

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BTK E Ki-67 EM DOENÇAS
LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B POR
CITOMETRIA DE FLUXO**

NATÁLIA AYDOS MARCONDES

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BTK E Ki-67 EM DOENÇAS
LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B POR
CITOMETRIA DE FLUXO**

NATÁLIA AYDOS MARCONDES

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2017

Marcondes, Natália Aydos

Avaliação da expressão de BTK e Ki-67 em doenças
linfoproliferativas crônicas de linhagem B por citometria de fluxo / Natália
Aydos Marcondes. -- 2017.

99 f.

Orientador: Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Faculdade de Medicina, Programa de PósGraduação em Medicina: Ciências
Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. BTK. 2. tirosina quinase de Bruton. 3. Ki-67. 4. citometria de fluxo. 5.
doença linfoproliferativa crônica de linhagem B. I. Faulhaber, Gustavo
Adolpho Moreira, orient. II. Título.

“Qualquer coisa é possível se você tiver coragem.”

J. K. Rowling

DEDICATÓRIA

Para meu pai.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor incondicional, carinho e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador, Dr. Gustavo Faulhaber, pelo apoio, aprendizado, disponibilidade e, principalmente, por acreditar na minha capacidade de finalizar este trabalho.

Aos colegas do Laboratório Zanol por formar uma excelente equipe e tornar possível a realização deste trabalho.

Aos amigos da Gangue do Pão de Queijo e da Biomedicina da UFCSPA, pelos momentos de companheirismo e descontração.

Ao PPGCM/UFRGS pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao FIPE/HCPA pelo suporte financeiro.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Base teórica: doenças linfoproliferativas crônicas de linhagem B (DLPC-B) são neoplasias clonais que afetam linfócitos B maduros. A tirosina quinase de Bruton (do inglês *Bruton's tyrosine kinase*, BTK) é uma proteína essencial para o desenvolvimento, diferenciação e sinalização nos linfócitos B. Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular. A avaliação de proteínas envolvidas nas vias de sinalização oncogênicas pode levar ao aprimoramento do diagnóstico, tratamento e definição de prognóstico das DLPC-B.

Objetivo: avaliar a expressão de BTK e Ki-67 em linfócitos de portadores de DLPC-B.

Métodos: para avaliação de BTK foi realizado um estudo transversal; foi avaliada a expressão de BTK em amostras de pacientes saudáveis e de pacientes com diagnóstico de DLPC-B. Para avaliação de Ki-67 foi realizado um estudo transversal. As amostras foram marcadas com CD45 FITC e CD19 APC para identificação dos linfócitos B. Após a lise das hemácias, foi realizada marcação citoplasmática de BTK PE e/ou Ki-67 PerCP-Cy5.5. O percentual de expressão e a intensidade de fluorescência média (IFM) dos marcadores avaliados foram determinados nos linfócitos B. A análise estatística foi realizada com testes de correlação de Pearson e Spearman entre BTK ou Ki-67 e as demais variáveis clínicas e laboratoriais, e ANOVA seguido por teste *post hoc* de Bonferroni para comparações entre grupos. Foi considerado resultado significativo quando $P < 0,05$.

Resultados: não foram observadas diferenças na expressão de BTK e não houve associação entre a expressão de BTK e as variáveis clínicas avaliadas. A expressão de Ki-67 foi maior nos grupos linfoma do manto, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B em relação aos demais; após análise multivariada, a IFM de Ki-67 foi associada à IFM de CD38.

Conclusão: no presente trabalho, a expressão de BTK em DLPC-B foi similar a de linfócitos B normais e a expressão de Ki-67 foi maior nas DLPC-B com curso clínico mais agressivo.

Palavras chave: BTK; tirosina quinase de Bruton; Ki-67; citometria de fluxo; neoplasia B madura; doença linfoproliferativa crônica de linhagem B.

ABSTRACT

Background: mature B-cell neoplasms (MBCN) are clonal neoplasms that affect mature B-cell lymphocytes. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is an essential protein for the development, differentiation and signaling in B-cell lymphocytes. Ki-67 is a nuclear protein associated to cellular proliferation. Evaluation of proteins involved in oncogenic signaling pathways can lead to improvement in the diagnosis, treatment and prognosis definition in MBCN.

Objective: to evaluate the expression of BTK and Ki-67 in lymphocytes of MBCN patients using flow cytometry.

Methods: a cross-sectional study was conducted for BTK assessment; BTK expression was assessed on healthy patients samples and MBCN samples. For evaluation of Ki-67 a cross-sectional study was conducted. Samples were stained with CD45 FITC and CD19 APC for identification of B-cell lymphocytes. After lysis of red blood cells, cytoplasmic staining of BTK PE and/or Ki-67 PerCP-Cy5.5 was performed. Percentage of expression and mean fluorescence intensity (MFI) of the markers were determined in B-cell lymphocytes. Statistical analysis was performed with Pearson and Spearman correlation tests between BTK and Ki-67 and the other clinical and laboratory variables, and ANOVA followed by post-hoc Bonferroni test for comparisons between groups. Results were considered significant when $P < 0.05$.

Results: no differences in BTK expression were identified and there was no association between BTK expression and clinical variables evaluated. Ki-67 expression was higher in mantle cell lymphoma, Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma cases; after multivariate analysis, MFI of Ki-67 was associated with MFI of CD38.

Conclusions: in this study, BTK expression in B-cell neoplasms was similar to that of normal B-cell lymphocytes and Ki-67 expression was higher in MBCN with more aggressive clinical courses.

Keywords: BTK; Bruton's tyrosine kinase; Ki-67; flow cytometry; mature B-cell neoplasm; B-cell chronic lymphoproliferative disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático da estratégia da busca.	19
Figura 2. Esquema com os estágios da maturação linfóide B.	23
Figura 3. Neoplasias de células B e estágios maturativos associados.	24
Figura 4. Representação esquemática dos domínios da BTK.	30
Figura 5. Esquema da sinalização via BCR.....	32
Figura 6. Representação de resultados da análise da expressão de BTK em monócitos por citometria de fluxo.....	35
Figura 7. A distribuição da proteína Ki-67 durante as diferentes fases do ciclo celular.	41
Figura 8. Exemplo de análise imunohistoquímica da expressão do marcador Ki-67 em amostras de linfoma.....	43
Figura 9. Exemplo de análise imunocitoquímica da expressão do marcador Ki-67 em amostras de linfoma.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das doenças linfoproliferativas crônicas B de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008) em português.....	21
Tabela 2. Critérios diagnósticos para neoplasias de células B maduras utilizados no presente trabalho.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

³ H	Timidina
³ H-Tdr	Timidina tritiada (do inglês <i>tritiated thymidine</i>)
ABC	Células B ativadas (do inglês <i>activated B-cell</i>)
AID	Citidina desaminase induzida por ativação (do inglês <i>activation-induced cytidine deaminase</i>)
BAFF	Fator ativador de células B (do inglês <i>B-cell activating factor</i>)
BAFF-R	Receptor de fator ativador de células B (do inglês <i>B-cell activating factor receptor</i>)
BCR	Receptor de célula B (do inglês <i>B-cell receptor</i>)
BH	<i>Btk homology region</i>
BLNK	Proteína ligante de células B (do inglês <i>B-cell linker protein</i>)
BMO	Biópsia de medula óssea
BTK	Tirosina quinase de Bruton (do inglês <i>Bruton's tyrosine kinase</i>)
BTK	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
CD	Cluster de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CID-O	Classificação Internacional de Doenças – Oncologia
CSR	Processo de recombinação mudança de classe (do inglês <i>class switch recombination</i>)
CTLA4	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico (do inglês <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4 (do inglês <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>)
DAG	Diacilglicerol (do inglês <i>diacylglycerol</i>)
DLPC-B	Doença linfoproliferativa crônicas de linhagem B
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FNA	Aspiração por agulha fina (do inglês <i>fine needle aspiration</i>)
GCB	Células B centro-germinais (do inglês <i>germinal center B-cell</i>)
HHV-8	Herpesvírus humano 8 (do inglês <i>humanherpesvirus 8</i>)
IBTK	Inibidora de BTK

IFM	Intensidade de fluorescência média
IgA	Imunoglobulina A
IgB	Imunoglobulina B
IGHV	Região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (do inglês <i>immunoglobulin heavy chain variable region</i>)
IL-4	Interleucina-4
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP3	Inositol trifosfato (do inglês <i>inositol trisphosphate</i>)
IPI	Índice prognóstico internacional
ITAM	Motivo de ativação baseado em tirosina (do inglês <i>tyrosine-based activation motifs</i>)
LBI-LDGCB/LB	Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o Linfoma difuso B de grandes células e o Linfoma de Burkitt
LDGCB	Linfoma difuso B de grandes células
LDH	Lactato desidrogenase
LLA	Leucemia/linfoma linfoblástico
LLA B	Leucemia/linfoma linfoblástico B
LLA T	Leucemia/linfoma linfoblástico T
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LZME	Linfoma de zona marginal esplênica
LZMN	Linfoma de zona marginal nodal
LZMN-P	Linfoma de zona marginal nodal pediátrico
MALT	Zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa (do inglês <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MBCN	<i>Mature B-cell neoplasms</i>
MCL	<i>Mantle cell lymphoma</i>
MCM6	Componente 6 do complexo de manutenção de minicromossomo (do inglês <i>minichromosome maintenance protein 6</i>)
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MGUS	Gamopatia monoclonal de significado incerto (do inglês <i>monoclonal gammopathy of unknown significance</i>)
MIPI	<i>Mantle cell International Prognostic Index</i>

MM	Mieloma múltiplo
MoAb	Anticorpo monoclonal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i>)
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas (do inglês <i>nuclear factor of activated T-cells</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B (do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
pBTK	Fosfo-BTK
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular (do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
Pin1	Proteína que interage com NIMA1 (do inglês <i>protein interacting with NIMA1</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (do inglês <i>phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate</i>)
PIP3	Fosfatidilinositol 4,5-trifosfato (do inglês <i>phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate</i>)
PKC	Proteína quinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PLCγ2	Fosfolipase C gama 2 (do inglês <i>phospholipase C gamma 2</i>)
PRP	<i>Polyproline region</i>
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
Sab	Proteína ligadora do domínio SH3 que preferencialmente se associa com BTK (do inglês <i>SH3 domain-binding protein that preferentially associates with BTK</i>)
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
siRNA	RNA interferente (do inglês <i>small interfering RNA</i>)
SLL	Linfoma linfocítico (do inglês <i>small lymphocytic lymphoma</i>)
SYK	Tirosina quinase esplênica (do inglês <i>spleen tyrosine kinase</i>)
TH	<i>Tec homology</i>

TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i>)
WASP	<i>Wiskott Aldrich syndrome protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XLA	Agamaglobulinemia ligada ao X (do inglês <i>X-linked agammaglobulinemia</i>)
ZAP-70	Proteína associada a cadeia ζ de 70 kDa de massa molecular (do inglês <i>ζ-chain-associated protein kinase of 70 kDa</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Porcento
+	Positivo
+	Mais
<	Inferior / menor que
>	Superior / maior que
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
11°	Décimo primeiro
c	Citoplasmático
C481	Cisteína 481
Ca ⁺⁺	Íons cálcio
δ	Delta
del	Deleção
f	Fraco
kDa	Quilodalton
mL	Mililitro
p	Braço curto
pS	Fosfoserina
pY	Fosfotirosina
q	Braço longo
θ	Teta
RPM	Rotações por minuto
s	Superfície
t	Translocação
™	<i>Trademark</i>
x	Vezes
Y223	Tirosina 223
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	19
2.2. DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B	20
2.2.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.2.2. LIFOMATOGÊNESE E SINTOMAS CLÍNICOS.....	23
2.2.3. CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO	25
2.2.4. TRATAMENTO.....	29
2.3. TIROSINA QUINASE DE BRUTON	29
2.3.1. BTK E A SINALIZAÇÃO VIA RECEPTOR DE CÉLULA B.....	30
2.3.2. ESTUDOS AVALIANDO A EXPRESSÃO DE BTK.....	34
2.3.3. BTK, DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B E INIBIDORES	37
2.4. Ki-67.....	40
2.4.1. Ki-67 E DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B: ESTUDOS COM CITOMETRIA DE FLUXO.....	44
3. MARCO TEÓRICO	50
3.1. O QUE NÃO SE SABE	50
3.2. O QUE FOI ESTUDADO E ESTRATÉGIA PARA ALCANÇAR A RESPOSTA À QUESTÃO DE PESQUISA	50
4. JUSTIFICATIVA	51
5. OBJETIVOS.....	52
5.1. OBJETIVOS GERAIS	52
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7. ARTIGO ORIGINAL: EXPRESSION OF BRUTON'S TYROSINE KINASE IN B-CELL NEOPLASMS EVALUATED BY FLOW CYTOMETRY	70
7.1. STROBE STATEMENT—EXPRESSION OF BRUTON'S TYROSINE KINASE IN B-CELL NEOPLASMS EVALUATED BY FLOW CYTOMETRY	76
8. LETTER TO THE EDITOR: FLOW CYTOMETRY ASSESSMENT OF INTRACELLULAR BTK EXPRESSION.....	78

9. ARTIGO ORIGINAL: Ki-67 EXPRESSION IN MATURE B-CELL NEOPLASMS: A FLOW CYTOMETRY STUDY	79
9.1. STROBE STATEMENT— Ki-67 EXPRESSION IN MATURE B-CELL NEOPLASMS: A FLOW CYTOMETRY STUDY	91
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
11. PERSPECTIVAS FUTURAS	95
12. ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

As doenças linfoproliferativas crônicas de linhagem B (DLPC-B) são neoplasias clonais que afetam linfócitos B maduros (1); nesse grupo estão incluídas leucemias e linfomas não-Hodgkin (LNH) (2). Durante o desenvolvimento de uma DLPC-B ocorre o aumento clonal de uma população linfoide, a qual poderá infiltrar a medula óssea e que, com o avanço da doença, levará a supressão da hematopoiese (3). O diagnóstico se dá pela avaliação de um conjunto de exames, como análise imunofenotípica de sangue, medula óssea e/ou tecidos linfoides, medulograma, biópsia de medula óssea e/ou linfonodos e avaliação citogenética (2).

Tirosina quinase de Bruton (BTK, do inglês *Bruton's tyrosine kinase*) é uma tirosina quinase não receptor, sua função é essencial para o correto desenvolvimento, diferenciação e sinalização nos linfócitos B. BTK é fundamental para a sinalização via receptor de célula B (BCR, do inglês *B-cell receptor*). A estimulação antigênica de BCR é importante para a seleção, proliferação, maturação, diferenciação e produção de anticorpos pelos linfócitos B normais, além de ser necessária para o desenvolvimento de uma DLPC-B (4, 5).

Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular (6). Esta proteína é expressa em todas as fases ativas de divisão celular, estando ausente em células quiescentes e durante a fase de reparo de DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*), portanto, a avaliação do percentual de células tumorais com expressão de Ki-67 é utilizada como índice proliferativo na avaliação de diversas neoplasias (7, 8).

O aprofundamento do conhecimento sobre as vias de sinalização oncogênicas com a identificação de marcadores críticos para o desenvolvimento, manutenção e resistência de tumores em geral pode levar ao aprimoramento dos tratamentos quimioterápicos. Deste modo, a avaliação da expressão de BTK e Ki-67 nas diversas DLPC-B pode vir a auxiliar no diagnóstico, bem como na escolha do tratamento e ser indicativo de prognóstico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada no papel das proteínas BTK e Ki-67 em DLPC-B – descrição, função e estudos envolvendo avaliação da expressão. A estratégia de busca envolveu as bases de dados MEDLINE, Scielo e Lilacs, com os termos “BTK”, “Bruton’s Tyrosine Kinase”, “Ki-67”, “B-cell” e “flow cytometry” e suas combinações ou traduções. A busca foi restringida a trabalhos cujo idioma fosse inglês, espanhol ou português. Foram utilizados livros-texto selecionados. Na figura 1 estão esquematizadas as estratégias de busca. Última atualização em 11 de agosto de 2017.

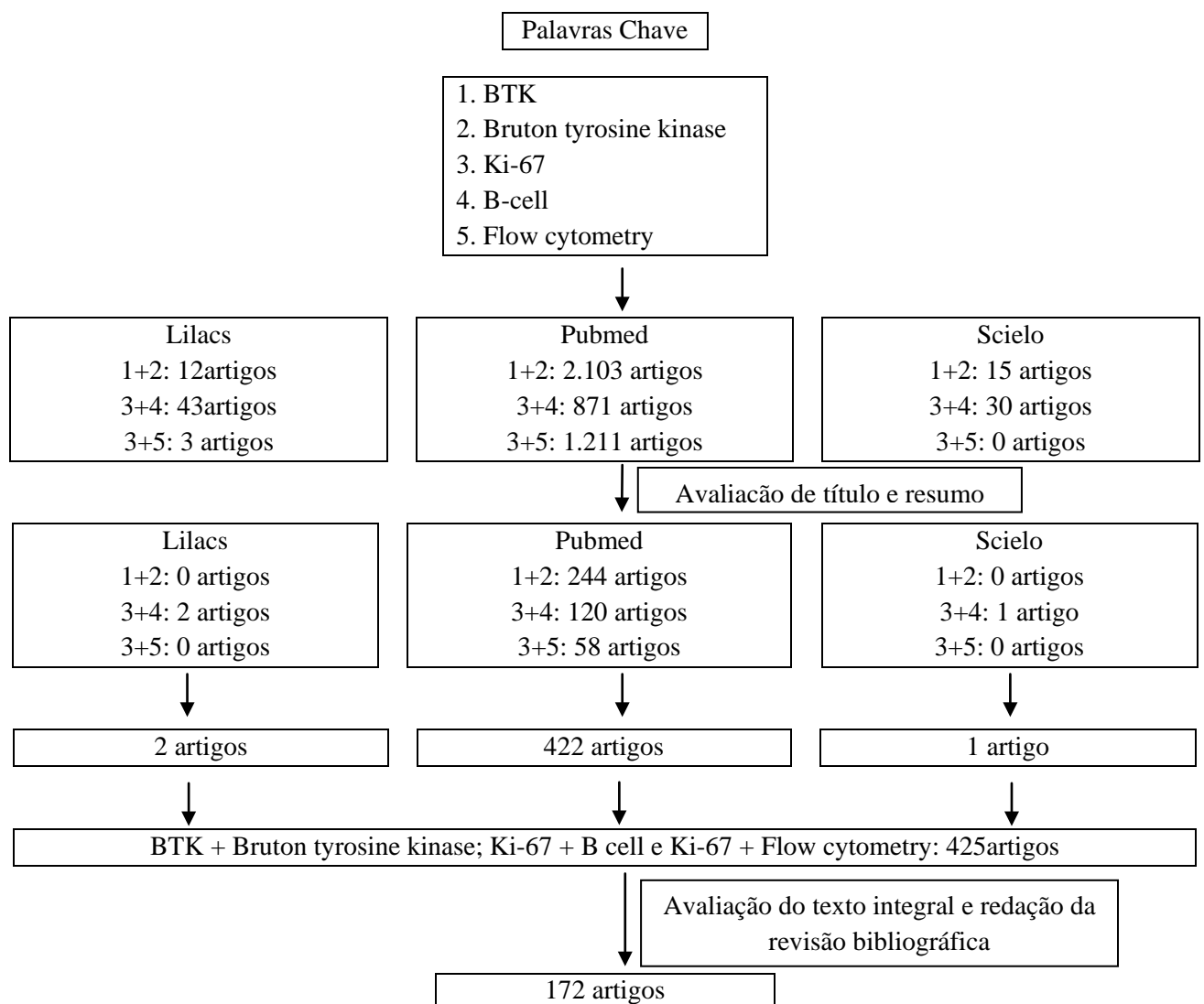


Figura 1. Modelo esquemático da estratégia da busca.

Fonte: elaborado pela autora (2017).

2.2. DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B

2.2.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

O termo neoplasias linfoides refere-se a um grupo heterogêneo de doenças malignas de linfócitos, a maioria das quais tem origem a partir de linfócitos B. A proliferação descontrolada é uma das principais características das células tumorais e, na maioria dos casos, o percentual de células em proliferação determina o comportamento biológico e curso clínico da doença (9).

Neoplasias indolentes apresentam normalmente baixa proliferação, células de tamanho pequeno e baixa agressividade clínica – a acumulação celular nestas neoplasias parece resultar de alterações na regulação da apoptose. Neoplasias agressivas tendem a apresentar alto índice proliferativo, células de tamanho maior e alta agressividade clínica. Após a apresentação inicial, pode ocorrer progressão da doença devido a alterações das características da neoplasia, as quais podem não apresentar significado clínico ou levar a um quadro de aceleração da doença (9).

A leucemia linfocítica crônica (LLC) com a sua versão tecidual, o linfoma linfocítico (SLL, do inglês *small lymphocytic lymphoma*), é o tipo mais comum de leucemia no ocidente (10), sendo mais comum em caucasianos. A LLC tem um *turnover* diário de 0,1% a 1,0% do clone, o qual é garantido por centros de proliferação, nos quais as células responsáveis podem ser identificadas pela expressão do antígeno Ki-67 (4). Dentre as outras leucemias crônicas de linhagem B estão incluídas a leucemia prolinfocítica e a tricoleucemia (11).

O linfoma folicular é um linfoma de baixo grau. Representa o LNH indolente mais comum e segundo LNH mais comum nos Estados Unidos (EUA). É definido como uma neoplasia composta por células B derivadas do centro germinal que apresentam, pelo menos parcialmente, um padrão de crescimento folicular (12).

O linfoma difuso B de grandes células (LDGCB) representa cerca de 25% dos LNH e constitui um grupo heterogêneo de neoplasias de linhagem B (13), subdivide-se em três tipos, de acordo com o perfil de genes expressos: células B centro-germinais (GCB, do inglês *germinal center B-cell*), células B ativadas (ABC, do inglês *activated B-cell*) e linfoma de grandes células primário do mediastino (14).

O linfoma do manto é um linfoma agressivo, com sobrevida curta, de cinco a sete anos. Este LNH representa cerca de 4% de todos os linfomas nos EUA e 7% a 9% dos casos na Europa, apresenta predomínio em sexo masculino (proporção de 2:1) e idade média de 60 anos (13, 15). Quatro variantes morfológicas de linfoma do manto estão descritas na

literatura: variante de células pequenas, variante da zona do manto, variante difusa e variante blástica (15).

Entre outros tipos de LNH de linhagem B, estão incluídos o linfoma de Burkitt, o linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa (linfoma MALT, do inglês *mucosa-associated lymphoid tissue*), o linfoma de zona marginal esplênica (LZME), o linfoma de zona marginal nodal (LZMN) e o linfoma linfoplasmacítico (13).

Para o ano de 2012, foram estimados aproximadamente 390 mil novos casos (2,7% do total de casos de câncer) e 200 mil óbitos (2,4% do total de óbitos) por LNH no mundo. Na avaliação de leucemias, foram estimados 352 mil novos casos de leucemia (2,5% do total de câncer) e 265 mil óbitos no mundo (16).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o ano de 2016 no Brasil eram esperados 5.210 casos novos de LNH em homens e 5.030 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,88 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, os LNH em homens são 11º tipo de câncer mais frequente na Região Sul (7,71/100 mil); e o nono mais frequente para as mulheres (6,61/100 mil) (16).

O INCA estimou para o Brasil, no ano de 2016, 5.540 novos casos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres. Excluindo-se os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é o décimo tipo de câncer mais comum na Região Sul (8,55/100 mil); e é o oitavo mais frequente para as mulheres (6,62/100 mil) (16).

Na tabela 1 está apresentada a listagem completa em português das DLPC-B, de acordo com a classificação de 2008 da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2, 17).

Tabela 1. Classificação das doenças linfoproliferativas crônicas B de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008) em português.

Neoplasias de células linfoides B maduras	CID-O
Leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico (LLC/SLL)	9823/3
Leucemia prolinfocítica B	9833/3
Linfoma B da zona marginal esplênica (LZME)	9689/3
Tricoleucemia	9940/3
Linfoma/leucemia esplênico de células B, inclassificável	9591/3
Linfoma esplênico difuso da polpa vermelha, de linfócitos B pequenos	9591/3

Tricoleucemia variante	9591/3
Linfoma linfoplasmacítico	9671/3
Macroglobulinemia de Waldeström	9761/3
Doenças da cadeia pesada	9762/3
Doença da cadeia pesada alfa	9762/3
Doença da cadeia pesada gama	9762/3
Doença da cadeia pesada mu	9762/3
Mieloma múltiplo (MM)	9732/3
Plasmocitoma solitário do osso	9731/3
Plasmocitoma extra ósseo	9734/3
Linfoma da zona marginal extranodal do tecido linfoide associado à mucosa (Linfoma MALT)	8688/3
Linfoma da zona marginal nodal (LZMN)	9699/3
Linfoma da zona marginal nodal pediátrico (LZMN-P)	9699/3
Linfoma folicular	9690/3
Linfoma folicular pediátrico	9690/3
Linfoma centrofolicular primário da pele	9597/3
Linfoma do manto	9673/3
Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB)	9680/3
Linfoma de grandes células B rico em células T e histiócitos	9688/3
Linfoma difuso de grandes células B do sistema nervoso central	9680/3
Linfoma difuso de grandes células B da pele, tipo "da perna"	9680/3
Linfoma difuso de grandes células B EBV-positivo do idoso	9680/3
Linfoma difuso de grandes células B associado à inflamação crônica	9680/3
Granulomatose linfomatoide	9766/1
Linfoma de grandes células B do mediastino (tímico)	9679/3
Linfoma de grandes células B intravascular	9712/3
Linfoma de grandes células B ALK-positivo	9737/3
Linfoma plasmablástico	9735/3
Linfoma de grandes células B com origem na doença de Castleman multicêntrica associada ao HHV-8	9738/3
Linfoma primário de efusões	9678/3
Linfoma de Burkitt	9687/3

Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Burkitt (LBI-LDGCB/LB)	9680/3
Linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o Linfoma de Hodgkin	9596/3

CID-O: Classificação Internacional de Doenças – Oncologia

Fonte: adaptado de Zerbini *et al.* (2011) (17).

2.2.2. LIFOMATOGÊNESE E SINTOMAS CLÍNICOS

As neoplasias linfoides B tendem a mimetizar estágios de diferenciação da maturação normal (2) e as DLPC-B tem origem em uma desordem no desenvolvimento linfoide (13). A célula pró-B é a primeira célula comprometida com a linhagem B, ainda não possui genes de imunoglobulina rearranjados. No estágio pré-B, inicia o processo de recombinação gênica de imunoglobulina. No estágio de linfócito B ocorre o rearranjo de cadeias leves e a célula passa a expressar moléculas de imunoglobulina de superfície. Por fim, os linfócitos B maduros maturam em plasmócitos (18). Translocações cromossômicas e mutações genéticas estão frequentemente envolvidas no desenvolvimento destas neoplasias (19). Na figura 2 está representado um esquema com a maturação linfoide B e alguns marcadores expressos. A figura 3 apresenta as neoplasias de linhagem B associadas com estágios de diferenciação de células normais.

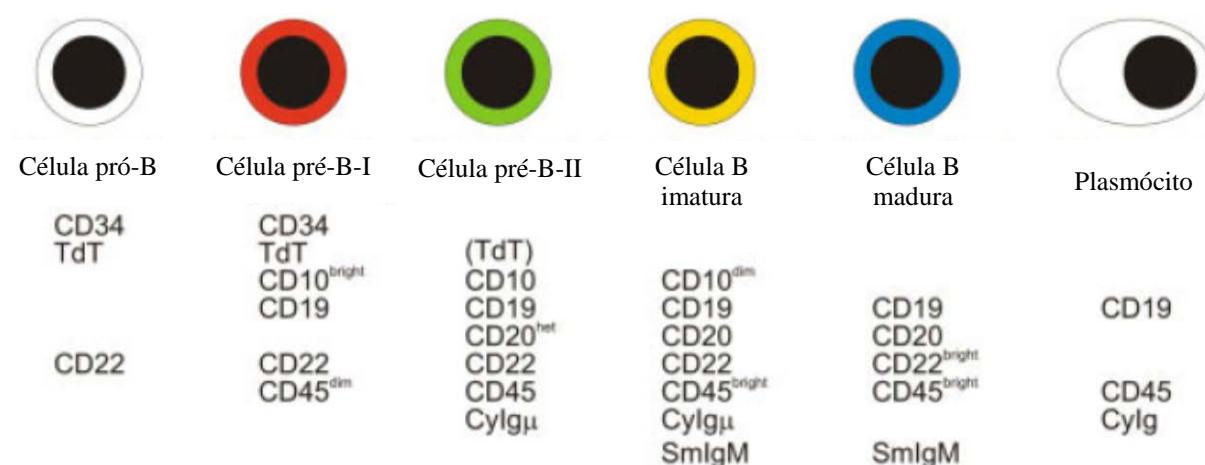


Figura 2. Esquema com os estágios da maturação linfoide B.

O desenvolvimento linfoide B tem início a partir da célula-tronco hematopoiética até o linfócito B maduro. Durante o processo maturativo ocorre alteração dos receptores celulares expressos, na figura estão representados alguns marcadores imunofenotípicos expressos ao longo do processo. Em uma DLPC-B, a células que se torna neoplásica é o linfócito B maduro.

Fonte: adaptado de van Lochem *et al.* (2004) (20).

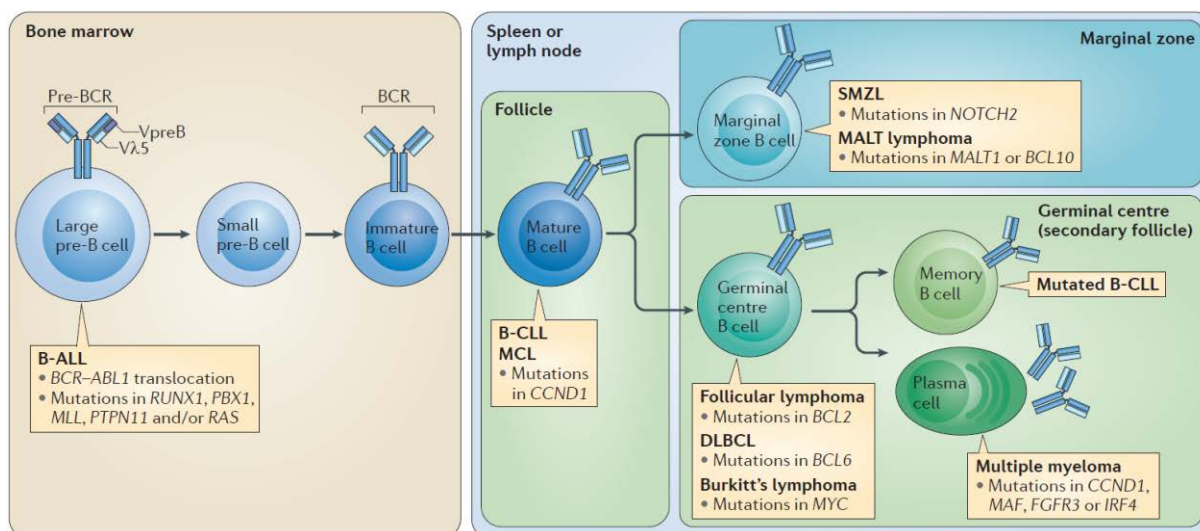


Figura 3. Neoplasias de células B e estágios maturativos associados.

A leucemia/linfoma linfoblástico B (LLA B) desenvolve-se a partir de células pré-B e geralmente apresenta translocação *BCR-ABL1* ou mutações em *RUNX1*, *PBX1*, *MLL*, *PTPN11* e *RAS*. A LLC é uma doença maligna indolente e o tipo não-mutado desenvolve-se a partir de células B CD5-positivo. O linfoma do manto se desenvolve de células B maduras circulantes. Diversos tipos de linfoma surgem a partir de subconjuntos de células B de órgãos linfóides secundários. LZME e linfoma MALT são neoplasias indolentes derivadas de células B da zona marginal. O linfoma folicular, o LDGCB e o linfoma de Burkitt são derivados de células B do centro germinal. A diversidade de linfomas derivados de centro germinal é paralela à diversidade deste compartimento dinâmico, onde ocorre intensa seleção de células B. Em alguns tipos de LNH B, especialmente em LDGCB, há evidências de que a sinalização contínua do BCR é necessária para a sobrevivência e progressão do linfoma. A LLC do tipo mutado apresenta evidência de hipermutação do segmento de gene variável de cadeia pesada de imunoglobulina e pode se desenvolver de células B de memória derivadas de centro germinal. O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia de células plasmáticas derivadas do centro germinal que persiste na medula óssea.

Fonte: Rickert *et al.* (2013) (19).

As neoplasias B maduras têm gene de imunoglobulina rearranjado, se caracterizam pelo aumento e acumulação de uma população linfóide monoclonal (3), que geralmente expressa cadeias kappa ou lambda (na superfície ou citoplasma celular) (1, 21), e possui vantagem proliferativa e/ou de sobrevivência sobre a população normal (22).

Ocorre acumulação progressiva das células clonais e seus produtos, causando linfocitose, infiltração da medula óssea, aumento de um ou vários outros tecidos (como linfadenopatias superficiais ou profundas, esplenomegalia e hepatomegalia), e a presença de um componente monoclonal sérico (22). Os linfócitos malignos podem infiltrar a medula óssea extensivamente, inicialmente causam mínimo prejuízo a hematopoiese; porém, com a

progressão da doença, podem suprimir a hematopoiese, resultando em uma combinação variada de anemia, trombocitopenia e/ou neutropenia (3).

Os sintomas clínicos mais frequentemente associados à DLPC-B são febre, sudorese noturna, perda de peso e anorexia; os quais não são comuns nas doenças de células pequenas bem diferenciadas, como a LLC e o linfoma linfoplasmacítico (3). A maioria dos pacientes diagnosticados com linfoma folicular apresenta doença disseminada e curso clínico indolente (12). O processo diagnóstico geralmente é iniciado a partir da investigação de manifestações clínicas ou alterações em exames laboratoriais (22).

2.2.3. CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO

A classificação de neoplasias linfoides B baseia-se na avaliação de parâmetros clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos (2). Para cada entidade dentro a categoria de neoplasias linfoides, vários fatores podem influenciar o resultado clínico (9). A correta identificação e classificação dos linfócitos neoplásicos são necessárias para o estabelecimento do diagnóstico final (22) e a maioria dos linfomas de células B apresenta um imunofenótipo característico, o qual é muito útil no diagnóstico, associado à história clínica do paciente (2, 23).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método de análise citológica através de instrumento equipado com laser, que permite a identificação, caracterização, contagem e separação física de células em suspensão. Consiste na marcação de epítomos na superfície, citoplasma e núcleo celular (23, 24). A realização do estudo da medula óssea por citometria de fluxo está indicada nas seguintes situações: citopenias, especialmente bicitopenia e pancitopenia; leucocitose, incluindo linfocitose, monocitose e eosinofilia; presença de células atípicas ou blastos no sangue periférico, medula óssea e/ou líquidos corporais; plasmocitose ou gamopatia monoclonal; organomegalia; e massas teciduais (25).

Uma grande vantagem da citometria de fluxo é a possibilidade de avaliar diversos parâmetros em uma única célula, como tamanho e granulocidade, além da co-marcação de mais de um antígeno (26). Atualmente, a identificação de linfócitos aberrantes baseia-se não só na distribuição numérica absoluta ou relativa dentro o total de linfócitos presentes na amostra, mas principalmente na identificação de perfis imunofenotípicos específicos e considerados “anormais”, os quais podem ser distinguidos dos padrões normais ou reativos (22), assim como a identificação de clonalidade pela avaliação de restrição de cadeia leve (25).

Em 2008 foi publicada a quarta edição do *The World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Classificação dos tumores hematopoiéticos e linfoides de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)), no qual são apresentadas as DLPC-B e os melhores parâmetros pelos quais estas podem ser diagnosticadas, com a citometria de fluxo apresentando um papel central (2, 17), esta classificação foi utilizada para classificar as DLPC-B incluídas no presente trabalho. Os distúrbios de células plasmáticas são considerados como um diagnóstico em separado das neoplasias B maduras pelo EuroFlow, já que usualmente suas apresentações clínicas e imunofenóticas são diferentes (27). A tabela 2 apresenta um resumo dos critérios diagnósticos para as principais DLPC-B, de acordo com a classificação da OMS (2008).

Tabela 2. Critérios diagnósticos para neoplasias de células B maduras utilizados no presente trabalho.

Entidade	Morfologia	Imunofenótipo	Anormalidades citogenéticas	Sinais clínicos
Leucemia linfocítica crônica	Linfócitos pequenos, cromatina condensada, manchas de Gumprecht, < 55% de prolinfócitos	Típico: CD5 ⁺ CD23 ⁺ CD43 ⁺ CD10 ⁻ CD20 ^{fraco} CD79 ^{fraco} CD200 ⁺ sIg ^{fraco}		
Leucemia prolinfocítica B	> 55% de prolinfócitos	Variável, pode se sobrepor com LLC e linfoma do manto		
Linfoma de zona marginal esplênica	Linfócitos vilosos no sangue periférico, histologia típica no baço	CD5 ⁻ CD23 ⁻ CD43 ⁻ CD10 ⁻ CD103 ^{usualmente negativo}	del(7q) +3q	Esplenomegalia
Linfoma MALT	Lesões linfoepiteliais, envolvimento de zona marginal de folículos reativos	CD5 ⁻ CD23 ⁻ CD10 ⁻ CD103 ^{usualmente negativo}	t(11;18); t(14;18); t(3;14); t(1;14); +3 +18	Envolvimento extranodal
Linfoma de zona marginal nodal		CD5 ⁻ CD23 ⁻ CD10 ⁻ CD103 ⁻ CD43 ⁺ em 50% dos casos	+3 +18 +7	Sem envolvimento extranodal ou esplênico
Tricoleucemia	Células vilosas	Típico: CD5 ⁻ CD22 ⁺⁺		Esplenomegalia,

		CD123 ⁺ CD11c ⁺ CD20 ⁺⁺ CD25 ⁺ CD200 ⁺⁺		pancitopenia
Linfoma linfoplasmacítico	Linfócitos pequenos, linfócitos plasmocitoides, plasmócitos	CD5 ⁻ CD23 ⁻ CD10 ⁻ CD103 ⁻ Plasmócitos clonais	del(6q)	IgM monoclonal
Linfoma folicular	Padrão de crescimento folicular	CD5 ⁻ CD43 ⁻ CD10 ⁺ Bcl-6 ⁺	t(14;18)(q32;q21)/IGH- BCL2 em 80% a 90% dos casos	
Linfoma do manto		CD5 ⁻ CD23 ^{- ou fraco} CD43 ⁺ CD200 ⁻ Bcl-6 ⁻ sIg ^{forte}	t(11;14)q13;q32 – leva a expressão aberrante de ciclina D1	Esplenomegalia (80% dos casos)
Linfoma difuso de grandes células B	Proliferação difusa de linfócitos grandes	Variável. CD5 ⁺ em 10% dos casos CD10 ⁺ em 30% a 60% dos casos	Anormalidades 3q; t(14;18); Rearranjo myc	
Linfoma de Burkitt	Citologia e histologia típicas: citoplasma marcadamente basofílico, núcleo arredondado, células monomórficas de tamanho médio	CD10 ⁺ CD38 ⁺ CD43 ⁺ CD200 ⁻	Rearranjo myc	

Fonte: adaptado de Böttcher *et al.* (2010), Craig *et al.* (2008), Hoffman (2013), Li *et al.* (2015) (12, 13, 15, 25, 27).

2.2.4. TRATAMENTO

O tratamento depende do tipo de DLPC-B e extensão da doença, entre outros fatores; se dá pelo uso de agentes quimioterápicos (quimioterapia curativa e paliativa), radioterapia, anticorpos monoclonais ou realização de esplenectomia (28). O advento de novos agentes terapêuticos tem melhorado o prognóstico de muitos pacientes, os quais dependem principalmente do tipo de neoplasia, deste modo o diagnóstico correto apresenta importância adicional na otimização do cuidado com o paciente (27).

O tratamento de neoplasias hematológicas com anticorpos monoclonais apresenta menor toxicidade, já que é direcionado às células doentes. Estas drogas eliminam as células neoplásicas mediante diversos mecanismos, como indução de apoptose, inibição do crescimento celular, citotoxicidade mediada pelo sistema complemento, citotoxicidade celular dependente do anticorpo e sensibilização à radioterapia ou quimioterapia. Para o tratamento de DLPC-B são utilizados anticorpos contra CD20 (rituximab, ibritumomab tiuxetan, zevalin, tositumomab e ofatumumab) e CD52 (alemtuzumab) (29). Inibidores da sinalização via BCR foram desenvolvidos contra vários componentes da via, como BTK (ibrutinib) (30).

2.3. TIROSINA QUINASE DE BRUTON

BTK, uma tirosina quinase não-receptor cuja função é crítica para o desenvolvimento, diferenciação e sinalização nos linfócitos B; tem expressão em quase todas as células hematopoiéticas, não sendo expressa por linfócitos T (30-32). É um membro da família de quinase Tec e tem papel essencial na sinalização via BCR (30-32), já que a ligação de imunoglobulina a membrana celular do linfócito B leva a sua fosforilação e ativação catalítica (33). O gene que codifica BTK possui 19 éxons e localiza-se no braço longo do cromossomo X (Xq22) (34, 35). Mutações neste gene causam a agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X (XLA, do inglês *X-linked agammaglobulinemia*), que resulta em marcada diminuição da função e quantidade de linfócitos B, devido à falha no processo maturativo durante a transição do progenitor linfoide B para célula B madura (36, 37).

BTK é composta por diversos domínios: PH (*Pleckstrin homology*) é o domínio N-terminal, seguido por TH (*Tec homology*), SH3 (*Src homology 3*), SH2 (*Src homology 2*) e um domínio tirosina quinase catalítico em C-terminal. BTK interage com diversos reguladores da transcrição, induzindo sua atividade (31). Na figura 4 está esquematizada a estrutura da proteína com os domínios.

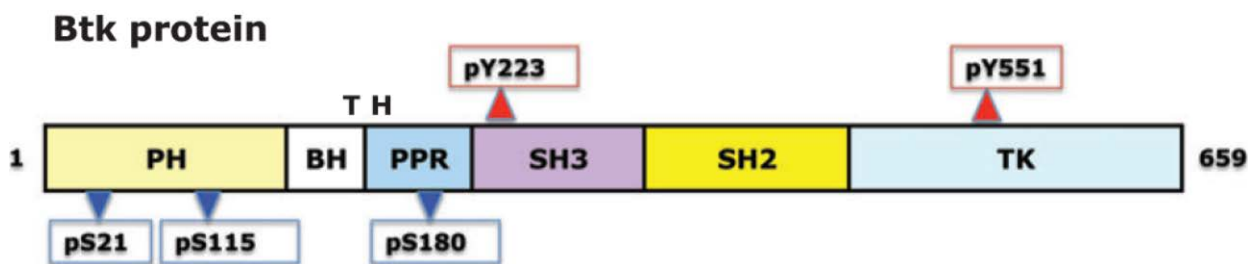


Figura 4. Representação esquemática dos domínios da BTK.

Domínios PH, TH (formado por BH [*Btk homology region*] e PRP [*polyproline region*]), SH3, SH2 e TK. Os sítios de fosforilação regulatória estão marcados por setas: em vermelho estão representados as fosfotirosinas pY223 e pY551, e em azul estão representadas as fosfoserinas pS21, pS115 e pS180.

Fonte: Mohamed (2009) (31).

2.3.1. BTK E A SINALIZAÇÃO VIA RECEPTOR DE CÉLULA B

Cada linfócito B expressa cerca de 200.000 BCR idênticos e a ligação de antígeno ativa a cascata de sinalização (38). A estimulação antigênica do BCR é importante para a seleção, proliferação, maturação, diferenciação e produção de anticorpos pelo linfócito B normal, além de ter sido identificada como mecanismo patológico central em diversas DLPC-B, sendo necessária para o desenvolvimento destas neoplasias (39, 40). A sinalização via BCR leva a diversas respostas celulares, as quais dependem do estágio de diferenciação celular e de estímulos extracelulares – a ativação da célula B madura ativa uma resposta proliferativa/mitogênica (41), enquanto na célula B imatura, resulta em inibição do crescimento (42).

A sinalização via BCR pode ser dividida em dois tipos principais: sinalização tônica ou antígeno independente e sinalização mediada por antígeno, as quais são importantes para manutenção e sobrevivência do linfócito B normal (43). Em células B normais, a sinalização via BCR geralmente é dependente de antígeno. Acredita-se que uma via de sinalização tônica hiperreativa seja um fator contribuinte para a formação de neoplasias linfoides B, criando um microambiente propício ao desenvolvimento tumoral (44).

BCR é um complexo de sinalização multimérico composto por uma imunoglobulina transmembrana de superfície associada com cadeias IgA (imunoglobulina A - CD79a) e IgB (imunoglobulina B - CD79b) (45). Nas células B normais a ligação de antígeno ao BCR inicia a sinalização por meio da ativação de um imunorreceptor em CD79b, o qual leva a agregação do BCR e fosforilação do motivo de ativação baseado em tirosina (ITAM, do inglês *tyrosine-based activation motifs*) na porção citoplasmática de CD79a e CD79b (46). Esta fosforilação leva ao recrutamento do sinalosomo, que inclui proteínas adaptadoras e quinases, como a

tirosina quinase esplênica (SYK, do inglês *spleen tyrosine kinase*), LYN – e até certo ponto da proteína associada à cadeia ζ de 70 kDa de massa molecular (ZAP-70, do inglês *ζ -chain-associated protein kinase of 70 kDa*) – e a ativação de BLNK (proteína ligante de células B, do inglês *B-cell linker protein*) e proteína fosfolipase C gama 2 (PLC γ 2, do inglês *phospholipase C gamma 2*). LYN prove continuação da amplificação por meio da formação de complexos com moléculas co-estimulatórias que reduzem o limiar para ativação da célula B. SYK é responsável pela fosforilação de CD79a e CD79b – a fosforilação do ITAM destas recruta SYK e este é ativado pela fosforilação de múltiplas tirosinas por LYN e por autofosforilação. SYK propaga o sinal via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K, do inglês *phosphoinositide 3-kinase*) δ , a qual media conversão defosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2, do inglês *phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate*) para fosfatidilinositol 4,5-trifosfato (PIP3, do inglês *phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate*) (43, 44, 47).

BTK tem localização citosólica e é recrutada para a membrana por interação do domínio PH com PIP3 (48). A ativação de BTK requer sua fosforilação no domínio catalítico por SYK e/ou LYN (domínio quinase na tirosina 551) (49), que induz sua autofosforilação na tirosina 223 do domínio SH3 (41). BTK fosforilada recruta BLNK e PLC γ 2 para a membrana celular, onde ocorre a fosforilação de ambas (50). BTK transmite e amplifica o sinal via fosforilação de PLC γ 2, iniciando a sinalização a jusante (51). Uma vez ativada, PLC γ 2 catalisa a produção dos segundos mensageiros inositol trifosfato (IP3, do inglês *inositol trisphosphate*) e diacilglicerol (DAG, do inglês *diacylglycerol*), o primeiro regula o influxo de Ca^{++} e o segundo ativa isoenzimas proteína quinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*) β , críticas para a expressão de fatores de transcrição (52).

A sinalização por BCR leva a ativação de diversos fatores de transcrição, como Aiolos, MAP quinase, fator nuclear de células T ativadas (NFAT, do inglês *nuclear factor of activated T-cells*) e fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) (53); estes últimos regulam os padrões de expressão gênica que controlam a proliferação, diferenciação e função celular, incluindo a produção de anticorpos (31, 43, 44, 54-56); uma variedade de fatores de transcrição é ativada por meio destas vias e, eventualmente, as células sofrem adaptação metabólica, resultando em proliferação celular aumentada, sobrevivência e diferenciação em plasmócitos ou linfócitos B de memória, bem como na produção de anticorpos (57). BTK regula a sobrevivência da célula B por meio da regulação direta da via clássica de NF- κ B via BCR e receptor de fator ativador de células B (BAFF-R, do inglês *B-cell activating factor receptor*), bem como induzindo a expressão de componentes da via alternativa para ativação sustentada de NF- κ B em resposta ao fator ativador de células B

(BAFF, do inglês *B-cell activating factor*) (58). Nas células B, BTK e a PLC γ 2 medeiam a adesão e migração controladas por citocinas, as quais têm papel importante no desenvolvimento e função celulares, bem como na patogênese de neoplasias linfoides B, doenças inflamatórias crônicas e doenças autoimunes (59). Na figura 5 está exemplificada a sinalização via BCR.

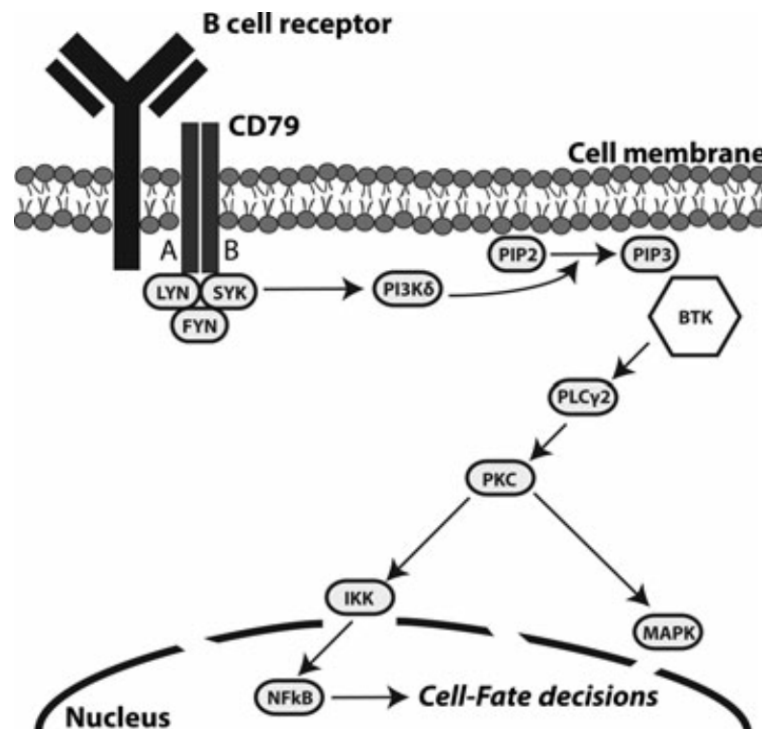


Figura 5. Esquema da sinalização via BCR.

A ligação de antígeno ao BCR inicia a transdução de sinal mediada por quinase, resultando na ativação de mensageiros secundários – incluindo BTK – e, ao final do processo, na transcrição de fatores que regulam o destino da célula.

Fonte: Aalipour (2013) (44).

A autofosforilação de BTK na tirosina 551 pode aumentar sua atividade enzimática (60). A fosforilação na tirosina 223 apresenta pequena influência na atividade catalítica, porém aumenta a afinidade de ligação a Syk e previne a ligação à proteína WASP (do inglês *Wiskott Aldrich syndrome protein*) (61). Acredita-se que o domínio SH3 tenha função regulatória da atividade de BTK por meio da ligação a proteínas reguladoras ou dobramento interno (62). Durante o desenvolvimento linfóide B, BTK apresenta função parcialmente independente de sua atividade catalítica, possivelmente atuando como uma molécula adaptadora (61).

A maioria das proteínas identificadas como reguladoras da atividade de BTK parecem ser reguladoras negativas. A proteína Sab (proteína ligadora do domínio SH3 que preferencialmente se associa com BTK, do inglês *SH3 domain-binding protein that preferentially associates with BTK*) se liga a BTK e promove regulação para baixo de sua atividade quinase (32). A PKC β exerce regulação negativa por meio da fosforilação de um resíduo de serina na posição 180 do domínio TH, levando a alteração da localização de BTK na membrana celular (63). IBTK (inibidora de BTK) se associa a BTK e diminui sua atividade de quinase. Nas serinas 21 e 115 estão presentes resíduos conservados em que se acredita que haja ligação de Pin1 (proteína que interage com NIMA1, do inglês *protein interacting with NIMA1*), a qual poderia modular a atividade quinase de BTK por meio de alteração conformacional ou desfosforilação da última. PKC θ parece ter função de ativar BTK (31, 55).

Estudos recentes demonstram um envolvimento de BTK em muitas vias de sinalização além da via a jusante de BCR (64). Na célula B, BTK participa da transdução de sinal em resposta a virtualmente todos os tipos de estímulos extracelulares, os quais são transmitidos via receptores de fator de crescimento, receptores de citocinas, receptores acoplados a proteína G, receptores de antígenos e integrinas (65).

BTK é expressa em outros tipos celulares, como mastócitos, monócitos, macrófagos, osteoclastos, plaquetas, células dendríticas, células de linhagem eritroide, neutrófilos, basófilos, células primárias neuronais, células hematopoiéticas multipotentes e células-tronco. Na maioria das células em que é expressa, BTK tem papel fundamental na sinalização após acoplamento de receptor, podendo ser ativada via BCR em células B ou por outros receptores nos demais tipos celulares (66, 67).

BTK foi identificada como tendo função anti-apoptótica em células linfoides B, apresentando função pró-apoptótica quando as células B são expostas a intermediários reativos do oxigênio. A apoptose inadequada pode estar relacionada ao desenvolvimento e resistência a drogas de leucemias e linfomas B, deste modo, o controle da apoptose torna-se um alvo importante para tratamento destas neoplasias. Sendo assim, inibidores de BTK apresentam potencial de aumentar a sensibilidade a fármacos de células neoplásicas que expressam esta proteína (68).

Althubiet *et al.* (2016) demonstraram o envolvimento de BTK na via p53 como moduladora de atividade. BTK tem atividade como estabilizador dos níveis da proteína p53 em diferentes modelos celulares, levando a um aumento da fosforilação de p53 na serina S15, sendo assim, BTK apresentam papel pro-apoptótico e anti-proliferativo e está envolvida na

resposta de danos ao DNA, paradoxalmente tendo papel nas vias de supressão tumoral em contraposição à sua participação nas vias de sinalização oncológica em neoplasias hematológicas. Desta forma, BTK apresenta diferentes funções, dependendo do contexto celular, as quais incluem vias pró-sobrevivência em células B e sinalização para morte celular em células epiteliais danificadas (69).

Ng *et al.* (2004) avaliaram células linfoides B de pacientes com XLA quanto a produção de anticorpos. Nas células com ausência de BTK funcional, cerca de metade dos anticorpos expressos foram altamente polirreativos e autorreativos, indicando que BTK tem papel na remoção de células linfóides B autorreativas em humanos (70).

Como a maioria das DLPC-B expressa imunoglobulinas de superfície, a expressão e sinalização funcional de BCR tem importância em algum ponto da formação da neoplasia linfóide B (13, 30, 32). Mesmo após a célula tornar-se maligna, o BCR mantém sua capacidade de reconhecimento/sinalização (71), sendo que a sinalização via BCR é necessária para a progressão da doença na LLC, linfoma do manto, linfoma folicular e alguns tipos de LDGCB (72). Acredita-se que diferenças na ativação da sinalização via BCR entre os indivíduos possam ser responsáveis pela variação na apresentação clínica das DLPC-B (4). A via de sinalização de BTK é uma das vias mais desreguladas nas linfoproliferações B maduras e esta induz diversos processos necessários para o crescimento, sobrevivência e proliferação da célula neoplásica (73).

2.3.2. ESTUDOS AVALIANDO A EXPRESSÃO DE BTK

De Weers *et al.* (1993) avaliaram a expressão de BTK por *northern blotting* em células linfoides B – incluindo precursores B, células de LLA B e plasmocitomas – e identificaram a expressão de BTK em hematogônias mesmo antes de ocorrer o rearranjo gênico de imunoglobulinas ou cadeias leves, bem como uma diminuição da expressão durante a transição de linfócito B maduro para plasmócito (74).

No estudo de Geneviev *et al.* (1994) foram avaliadas a expressão gênica (mRNA) e proteica de BTK em linhagens celulares linfoides B e mieloides normais, bem como em linhagens celulares derivadas de pacientes com XLA. Os autores identificaram expressão de mRNA por *northern blot* nas células B e mieloides, inclusive nas linhagens de células B XLA, enquanto que em linfócitos T e plasmócitos os transcritos foram indetectáveis. A expressão proteica foi identificada em todas as células de linhagem B e mieloides normais, não foi identificada expressão proteica nas células de linhagem T e em uma linhagem de células XLA, uma linhagem de células XLA apresentou expressão de BTK em níveis

reduzidos, e a expressão proteica de BTK também foi identificada em células B tonsilares normais e monócitos de sangue periférico de adultos saudáveis (75).

A expressão gênica de BTK foi avaliada no trabalho de Smith *et al.* (1994). Células de linhagem mieloide e linfóide B apresentaram alta expressão de mRNA de BTK, assim como linhagens de mastócitos, linfoma de Burkitt, LLC e eritroleucemia. Células de linhagem T e plasmocitária apresentaram níveis baixos a indetectáveis de mRNA de BTK (76).

Nisitani *et al.* (2000) avaliaram a expressão de BTK em células hematopoiéticas de camundongos ao longo do desenvolvimento. Os autores identificaram expressão da proteína em todas as linhagens celulares, com exceção de linfócitos T. Células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras linfóides comuns, e células B e mielóides em desenvolvimento apresentaram expressão de BTK em níveis comparáveis. Os linfócitos B em repouso de sítios periféricos (linfonodos, baço e peritônio) apresentaram expressão de BTK significativamente inferior em relação às células derivadas da medula óssea (77).

Existem poucos estudos investigando a expressão de BTK por citometria de fluxo. A maioria dos trabalhos avaliou a expressão de BTK em monócitos de pacientes com suspeita de XLA e seus parentes, de modo a identificar presença e/ou ausência de expressão proteica (78-89). Na figura 6 estão representados histogramas com expressão de BTK em monócitos.

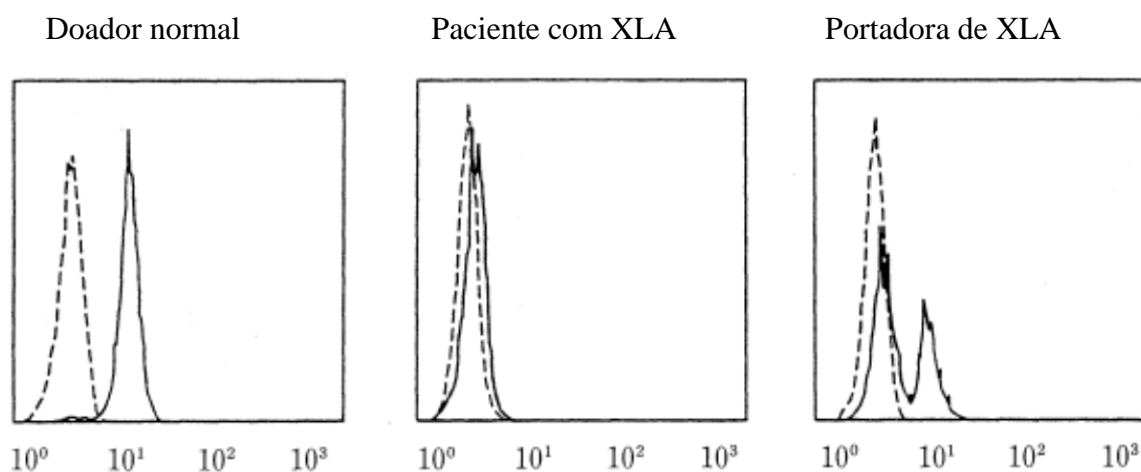


Figura 6. Representação de resultados da análise da expressão de BTK em monócitos por citometria de fluxo.

O doador normal apresenta alta expressão de BTK (linha sólida) em relação ao controle negativo (linha tracejada). Os monócitos do paciente com XLA não têm expressão de BTK. A portadora de XLA apresenta expressão com padrão bimodal.

Fonte: adaptado de Hashimoto (1999) (81).

Gaspar *et al.* (1997) avaliaram a expressão e atividade proteicas de BTK em pacientes com XLA e controles, os autores concluíram que a estas características não podem ser preditas a partir do defeito genético (90). No estudo de Futatani *et al.* (2001) foi detectada expressão de BTK em plaquetas de doadores saudáveis; nas plaquetas da maioria dos pacientes com XLA a expressão foi diminuída ou ausente; e as mulheres portadoras de XLA apresentaram plaquetas normais e com ausência de expressão de BTK – sugerindo uma inativação aleatória do cromossomo X em megacariócitos (91).

A expressão de BTK foi avaliada com imunofenotipagem por citometria de fluxo em linfócitos B de pacientes com artrite reumatoide e controles saudáveis, não sendo detectada diferença na expressão entre os grupos (92).

Corneth *et al.* (2017) avaliaram a expressão de BTK em linfócitos B de doadores normais e pacientes com doenças autoimunes (artrite reumatoide e síndrome de Sjögren primária). O nível de BTK apresentou associação com o nível de BTK fosforilada (pBTK) em Y551. Foi identificada diferença na expressão de BTK nas subpopulações de linfócitos B dos doadores saudáveis: as células B de memória não comutadas apresentaram expressão mais forte do que as células B naïve e células B de memória comutadas, sugerindo que os níveis de BTK sofrem regulação durante a diferenciação e aumentam em subtipos celulares com funções fisiológicas específicas. Dentre o total de células B dos pacientes, foram identificados níveis significativamente maiores de BTK em pacientes com artrite reumatóide e anticorpos anti-peptídeo citrulinado positivo em relação aos controles sadios e pacientes com anticorpos anti-peptídeo citrulinado negativo. No grupo de pacientes com síndrome de Sjögren primária também foi identificada expressão aumentada de BTK em vários subtipos de células B em relação ao grupo controle (93).

Kong *et al.* (2017) utilizaram citometria de fluxo para avaliar a expressão de BTK em células B de pacientes saudáveis em comparação à pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES). Apesar de uma fraca marcação intracelular de BTK, os autores identificaram maior expressão da proteína nos linfócitos B de sangue periférico dos pacientes com LES. Os autores relatam baixo percentual de células positivas para BTK (2-4%), fato explicado pela técnica de marcação citoplasmática utilizada. Na avaliação por imunohistoquímica e imunofluorescência, foi detectada maior expressão de BTK em glomérulos de pacientes com nefrite lúpica em comparação aos controles saudáveis (94).

2.3.3. BTK, DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B E INIBIDORES

No estudo de Fernández-Vega *et al.* (2015) foi avaliada a expressão de BTK em tecidos linfoides normais e reativos, bem como em amostras de LNH B. A expressão de BTK apresentou padrão diferenciado de acordo com a camada avaliada nas amostras de amígdalas e baço, variando de fraco a forte nas células linfoides B. A maioria dos linfomas avaliados apresentou expressão forte de BTK, entretanto, alguns casos de linfoma folicular grau III, LDGCB e tricoleucemia apresentaram marcação imunohistoquímica fraca ou negativa (95).

O nível de pBTK basal em células de linfoma folicular mostrou-se similar ao de linfócitos B de sangue periférico de voluntários saudáveis. A sinalização mediada por BCR, avaliada pela fosforilação de BTK, Syk e p38, ocorreu mais rápido e apresentou maiores níveis por células nas células de linfoma folicular em comparação às células normais, indicativo de sinalização via BCR aumentada (96).

No estudo de Krysiak *et al.* (2017) foi avaliada a presença mutações no gene *BTK* em células de linfoma folicular de pacientes com baixo risco (assintomáticos), estas mutações foram identificadas majoritariamente no domínio tirosina quinase (97). A hiperexpressão gênica de *BTK* (cerca de nove vezes) já foi relatada em casos de linfomas de Burkitt pediátricos (98).

O potencial de BTK como alvo terapêutico é suportado pelo fenótipo clínico de pacientes com XLA, em que a falta de BTK funcional é tanto não letal, quanto seletiva para apenas células B em relação às células T (44). Na avaliação de um modelo animal de LLC foi identificado que a expressão de BTK é necessária para a formação do tumor, já que nenhum dos animais deficientes em BTK desenvolveu a doença (99).

A sinalização via BCR vem sendo extensamente estudada como alvo terapêutico em diversos estudos clínicos com portadores de DLPC-B e outras doenças (72, 100). Na literatura, estão publicados dados de vários inibidores de BTK que variam em especificidade e mecanismo de ligação: spebrutinib (CC-292) (101), ONO-WG-307, LFM-A13, dasatinib, ibrutinib (PCI-32765) (44), acalabrutinib (ACP-196) (102, 103), ONO/GS-4059 (104), BMS-986142 (105), PRN1008 (106), GDC-0834, RN-486, HM-71224, CGI-560, CGI-1746, CNX-774 e LFM-A13. A maioria dos inibidores está em investigação pré-clínica e clínica (107).

Uckun *et al.* (2002) avaliaram os efeitos *in vivo* da administração de LFM-A13 em camundongos. Os autores obtiveram inibição altamente eficaz de BTK com uma concentração plasmática de LFM-A13 capaz de promover apoptose sem evidência de toxicidade. A droga foi capaz de prolongar a sobrevivência de camundongos quando usada em associação com

tratamento quimioterápico tradicional, corroborando a hipótese de que BTK está envolvida na resistência a quimioterapia de células leucêmicas de linhagem B (108).

No estudo de Evans *et al.* (2013), foi avaliado o efeito de CC-292 sobre BTK. CC-292 inibe de modo irreversível a autofosforilação de BTK na Y223 e a fosforilação de PLC γ 2, bem como a ativação da via de sinalização a jusante. A ocupação de BTK em células B humanas se correlaciona com a inibição da sinalização e proliferação celular (109).

Ibrutinib (PCI-32765) é um potente inibidor seletivo e irreversível de BTK, liga-se covalentemente a C481 no sítio ativo da proteína, resultando na inibição da sinalização a jusante – bloqueia a fosforilação, a atividade de quinase e inibe seletivamente a ativação de linfócitos B (110, 111). Ibrutinib foi inicialmente aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento de linfoma do manto, sendo também liberado para o uso em pacientes com LLC e linfoma linfoplasmacítico (112, 113). No estudo de Honigberg *et al.* (2010), ibrutinib apresentou eficácia em linfócitos B humanos maduros, bem como em modelos animais de artrite, lúpus e linfoma de células B (114). A inibição de BTK por ibrutinib prejudica a adesão controlada por BCR e por citocinas, bem como a migração de células de LLC, levando a diminuição da linfadenopatia e linfocitose (transiente), o que resulta em redução tumoral e torna as células leucêmicas mais acessíveis e vulneráveis a tratamento com quimioterápicos e anticorpos monoclonais (115, 116). Os linfócitos neoplásicos saem da medula óssea e dos linfonodos e ocorre linfocitose transitória - uma vez fora do microambiente protetor, os linfócitos doentes estão susceptíveis a apoptose e à morte celular induzida por outras drogas (117). Ibrutinib induz a ativação da via da caspase e depende desta ativação para induzir a apoptose em células de LLC, a apoptose pode ser induzida por diversos estímulos externos quando ocorre a inibição de BTK (118). Em pacientes com linfoma do manto, a atividade de BTK é necessária para o *homing* das células leucêmicas e sua inibição leva ao egresso destas ao sangue periférico (119).

Herman *et al.* (2011) avaliaram a expressão de BTK em células de LLC por técnica de *immunoblot*. Os autores demonstraram que a expressão proteica de BTK nos linfócitos de LLC é variável e não se relaciona a diferentes variáveis clínicas, como idade, sexo, tratamentos anteriores, estado mutacional da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (IGHV, do inglês *immunoglobulin heavy chain variable region*), expressão de ZAP-70 e aberrações genéticas específicas. A expressão de mRNA nas células de LLC foi similar entre os pacientes avaliados, com expressão significativamente superior a observada em linfócitos B de doadores normais. No mesmo estudo, foi demonstrado que ibrutinib promove a apoptose, inibe a proliferação e impede as células de LLC de responderem a

estímulos de sobrevivência providos pelo microambiente. Apesar das diferenças na expressão proteica de BTK, não houve correlação desta com a resposta ao inibidor ibrutinib (118).

Cheng *et al.* (2013) avaliaram linfócitos de sangue periférico de pacientes com LLC sem tratamento quimioterápico prévio, incluídos no estudo clínico contínuo de fase 1b de ibrutinib. A avaliação de BTK total por técnica de *western blotting* não revelou diferença entre a expressão de células de LLC e células B normais, entretanto, houve maior atividade de BTK (pBTK em Y223) nas células leucêmicas. Após início do tratamento com ibrutinib, foi identificada diminuição da fosforilação de BTK em Y233 no dia 28 (120). Em outro estudo, a expressão de pBTK em Y223 apresentou-se diminuída na avaliação de amostras de pacientes com LLC em uso de ibrutinib por seis meses. A expressão gênica de BTK nos mesmos pacientes não apresentou alteração significativa em decorrência do tratamento (121).

Guo *et al.* (2016) avaliaram a expressão de BTK e pBTK em amostras de LLC com IGVH mutada e não-mutada por técnica de *immunoblotting*. A quantidade de BTK total foi comparável entre os grupos. A expressão de pBTK em Y223 foi superior nas células de LLC com IGVH não-mutada. A expressão de pBTK apresentou correlação linear com a capacidade proliferativa (122).

Na avaliação de pBTK em culturas de células de linfoma do manto, foi identificada uma diminuição na fosforilação em Y223 de BTK 24 horas após o tratamento das células com ibrutinib, além de uma redução dose-dependente na viabilidade celular e indução de apoptose. Neste mesmo estudo foi avaliada a expressão de BTK em linfoma do manto por imunohistoquímica, a expressão de BTK foi forte nas camadas de tecido linfoide reativo, com expressão mais baixa nas células centro germinais e a presença de algumas células individuais espalhadas nas áreas interfoliculares. A reatividade a proteína BTK foi alta a moderada nas células de linfoma do manto, com marcação difusa no citoplasma e membrana celulares (123).

A expressão de BTK em células primárias de linfoma do manto, avaliada por *immunoblotting*, demonstrou-se similar a expressão em células B do sangue periférico de doadores saudáveis. Entretanto, a expressão de pBTK em Y223 foi superior nas células de linfoma do manto em comparação à células B em repouso, indicando que BTK é constitutivamente ativada nas células neoplásicas (124).

No estudo de Zheng *et al.* (2014) foi avaliada a expressão basal de BTK em linhagens celulares de LDGCB tipo GCB. A expressão a nível proteico e de mRNA foi superior à de células Jurkat (linhagem T). A expressão de pBTK também foi elevada nas células linfomatosas. As células de LDGCB apresentaram expressões de BTK similares entre si (125).

Na avaliação do efeito de bortezomib (inibidor de proteossoma) e ibrutinib, usados individualmente ou em conjunto em culturas de células de LDGCB, houve um maior aumento da morte celular das células alvo e pouca toxicidade para células CD34-positivo quando as drogas foram usadas em conjunto. Neste mesmo estudo, foi identificado que nas primeiras 24 horas de exposição à combinação de drogas, ocorre dano mitocondrial, ativação de caspases, diminuição na expressão de proteínas anti-apoptóticas, aumento de dano ao DNA e redução de fosfo-AKT em células de LDGCB e linfoma do manto. Também foi identificado que a co-administração das drogas é eficaz na indução de morte celular de linhagens resistentes ao bortezomib, com efeitos similares aos observados em outras culturas celulares (126).

No estudo de Sivina *et al.* (2014) foi avaliada a expressão de BTK em células de tricoleucemia por *immunoblotting* (BTK total e pBTK). A expressão foi detectada em nove amostras, sendo que os níveis de pBTK apresentaram aumento após estimulação com imunoglobulina e diminuição após pré-incubação com ibrutinib. Também foi identificada fosforilação constitutiva nas células avaliadas (127).

2.4. Ki-67

O antígeno Ki-67 foi originalmente definido pelo protótipo do anticorpo monoclonal Ki-67, gerado por Gerdes *et al.* em 1983 através da imunização de camundongos com núcleos de células de linfoma de Hodgkin (linhagem celular L428). O nome é derivado da cidade de origem (Kiel, Alemanha) e do número do clone na placa de 96 poços. O anticorpo Ki-67 original apresentava como desvantagem o fato de não poder ser utilizado em seções de parafina fixadas em formalina, MIB-1 é equivalente ao anticorpo monoclonal Ki-67 e pode ser utilizado nestes casos (128).

Ki-67 foi identificado como uma proteína em 1991. O antígeno é uma proteína não-histona de ligação ao DNA situada dentro dos componentes fibrilares densos do nucléolo, no núcleo celular (129-131). O gene da proteína Ki-67 tem 15 éxons e 14 íntros, localiza-se no cromossomo 10q25-ter (132). Após a transcrição e processamento, são geradas diversas variantes proteicas, dentre as quais duas formas mais proeminentes, com massas de aproximadamente 345 kDa e 395 kDa (133, 134). A proteína apresenta meia-vida de 60-90 minutos (135, 136).

Ki-67 está presente nas células em processo de divisão celular (células normais ou neoplásicas) e ausente nas células quiescentes; contribuindo para a regulação do ciclo celular (129, 130, 137, 138); e sofrendo modificações por vias de sinalização reguladas pelo ciclo celular – sua fosforilação é precisamente regulada durante a meiose e coincide com

importantes *check points* durante a mitose (133, 139). Nos núcleos em interfase, esta proteína localiza-se em locais de heterocromatina altamente compactada (140, 141). Sendo assim, Ki-67 é um excelente marcador para estabelecer a fração de crescimento de uma população celular em determinado momento (142). A figura 7 demonstra a distribuição da proteína Ki-67 durante as diferentes fases do ciclo celular.

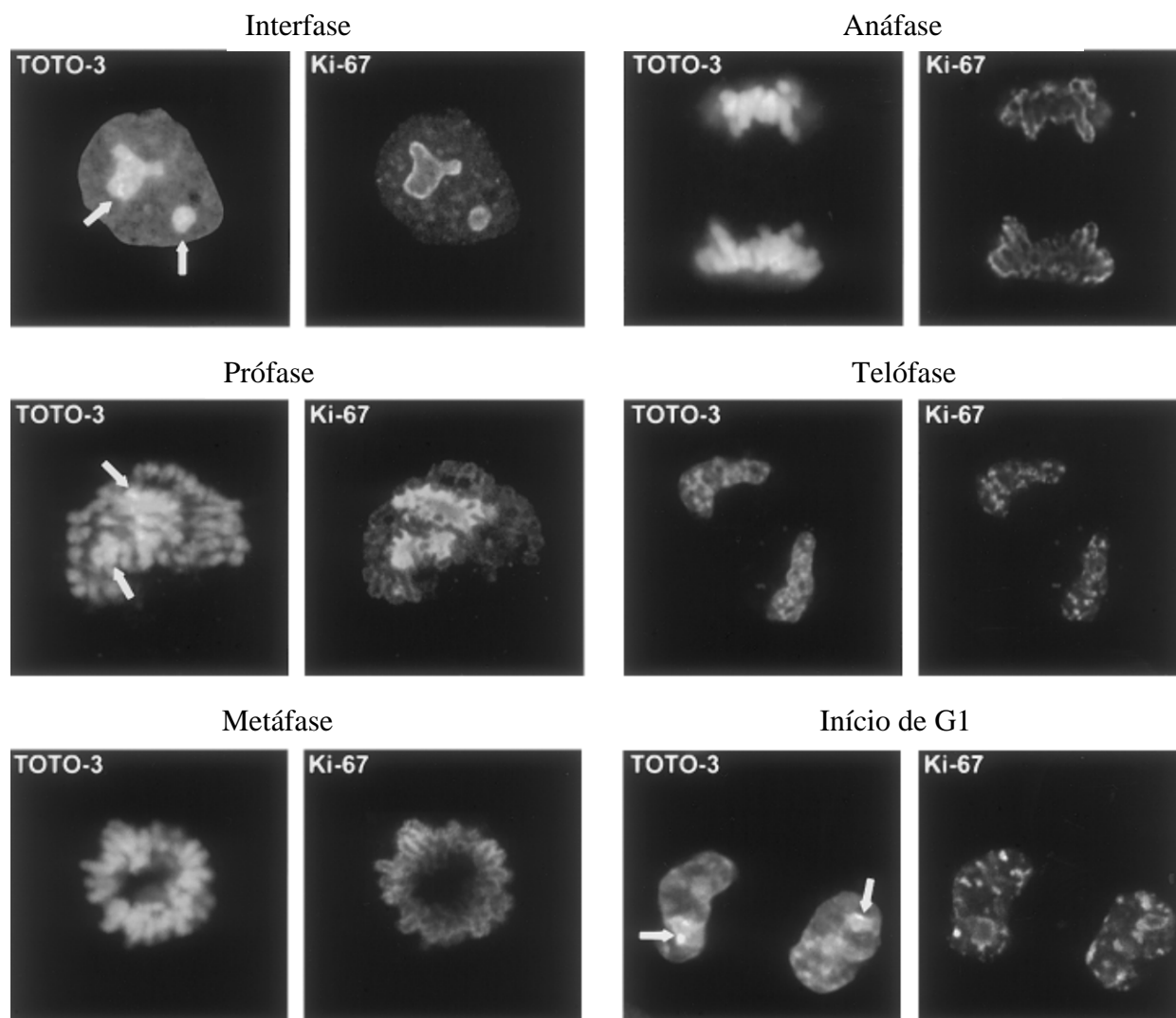


Figura 7. A distribuição da proteína Ki-67 durante as diferentes fases do ciclo celular.

Durante a interfase há uma marcação intensa da proteína Ki-67 na periferia dos nucléolos (setas), uma menor intensidade de coloração ao longo do núcleo e pequenos pontos nucleoplasmáticos. Durante a prófase, a proteína se dispersa dos nucléolos para os cromossomos condensados, ainda há, entretanto, uma intensa marcação das regiões que contém RNA e que podem representar nucléolos se dissociando (setas). Na metáfase e na anáfase a marcação de Ki-67 contorna as regiões pericromossômicas. Durante a telófase, a proteína Ki-67 está localizada nos núcleos recém-formados, constituindo vários pontos nucleares pequenos. No início de G1 os pontos nucleares de Ki-67 ainda estão presentes, quando as células procedem à reorganização do núcleo. Regiões de acúmulo de RNA (setas) já estão visíveis e podem indicar um nucléolo se formando novamente. As imagens

mostram seções intermediárias ópticas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células HeLa coradas com anticorpo MIB-1 e iodeto de TOTO-3 (marcação de RNA e DNA).

Fonte: Adaptado de Endl (2000) (133).

Tem sido evidenciada uma correlação positiva entre expressão de Ki-67/MIB-1 e grau histológico em neoplasias humanas (132). Alguns estudos sugerem que tumores com menores índices proliferativos podem apresentar menor sensibilidade à quimioterapia (143); outros autores especulam que uma alta expressão de Ki-67 associa-se a piores prognósticos devido ao re-crescimento tumoral e maior probabilidade de ocorrência de novas mutações; e ainda há os que propõem que um alto índice proliferativo possa estar relacionado à maior sensibilidade à quimioterapia e melhor resposta ao tratamento (144). O tamanho nuclear também já foi associado com a atividade proliferativa: células positivas para Ki-67 apresentam uma área nuclear 1,95 vezes maior do que células negativas para Ki-67 (145). Ki-67 é um marcador confiável de atividade proliferativa em neoplasias hematológicas e não hematológicas, sua expressão pode ser avaliada por imunohistoquímica ou imunocitoquímica (células ou tecidos fixados), ou ainda por citometria de fluxo (amostras com células em suspensão) (129, 144, 146).

No estudo de Pellegrini *et al.*(1995) foi avaliada a atividade proliferativa em biópsias de medula óssea normais através de marcação imunohistoquímica dupla. Foi identificada atividade proliferativa na vasta maioria dos agregados eritroides (>70% de células positivas); o percentual de promielócitos e mielócitos em áreas paratrabecular e perivascular com expressão de Ki-67 variou de 15% até 80%, sendo que os mieloblastos apresentaram negatividade para o marcador; a série megacariocítica apresentou positividade nos lobos nucleares em 10% a 25% das células; e os plasmócitos perivasculares maduros não apresentaram positividade para Ki-67 (147).

Para pacientes com linfoma, a determinação de índices proliferativos apresenta valor prognóstico e informações independentes de outros parâmetros clínicos e histológicos. Linfomas podem ser diferenciados com base em sua atividade proliferativa. É possível separar linfoma primário – ou linfoma *de novo* – em dois grupos: crescimento baixo (linfomas indolentes) e crescimento alto (linfomas agressivos) (9).

A maioria dos estudos de Ki-67 em DLPC-B na literatura apresenta avaliação por técnica de imunohistoquímica ou imunocitoquímica. Uma das principais dificuldades do estudo preciso de proliferação de células tumorais por estas metodologias é a presença de células reativas não malignas intercaladas entre as células neoplásicas – o índice proliferativo

em neoplasias linfoides depende tanto da atividade proliferativa das células neoplásicas quanto do percentual de células neoplásicas presentes no material avaliado (9). Além disso, os resultados são influenciados pelas diferentes metodologias empregadas no processamento de amostras e variação interoperador (148). Em um estudo do *International Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium* foi avaliado o impacto da técnica de coloração utilizada e variação interoperador na diferença da análise de diferentes marcadores prognósticos em LDGCB, os resultados da marcação de Ki-67 apresentaram pouca reprodutibilidade entre os laboratórios participantes e os autores concluíram que decisões clínicas baseadas na estratificação imunohistoquímica deveriam ser tomadas somente no contexto de ensaios clínicos com revisão centralizada dos casos (149). As figuras 8 e 9 exemplificam como pode ser realizada a análise da expressão de Ki-67 por imunohistoquímica e imunocitoquímica.

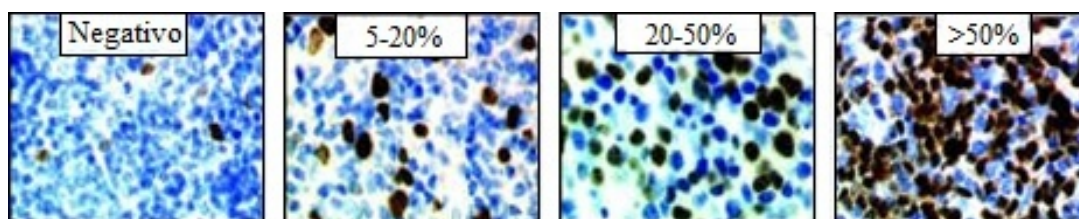


Figura 8. Exemplo de análise imunohistoquímica da expressão do marcador Ki-67 em amostras de linfoma.

Fonte: Adaptado de Petit *et al.* (2005) (150).

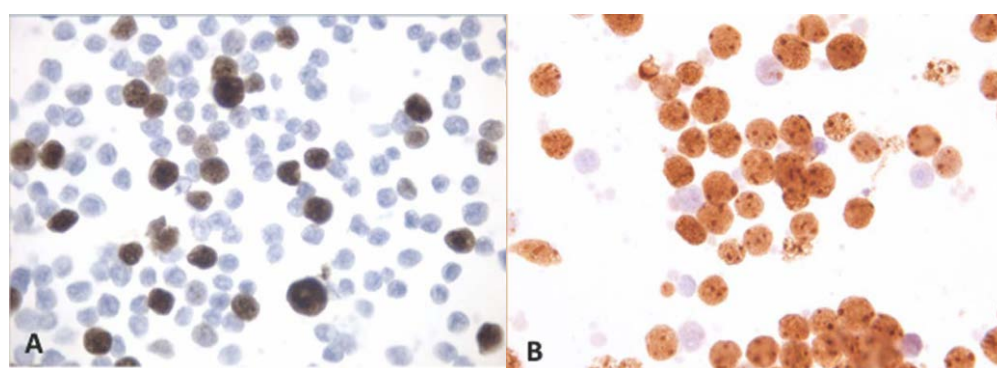


Figura 9. Exemplo de análise imunocitoquímica da expressão do marcador Ki-67 em amostras de linfoma.

Preparações por citocentrifugação de amostras de aspiração por agulha fina (FNA, do inglês *fine needle aspiration*). (A) Baixo índice proliferativo em um linfoma indolente. (B) Alto índice proliferativo em um linfoma agressivo.

Fonte: Adaptado de Ali *et al.* (2010) (151).

Estudos imunohistoquímicos com LNH B evidenciaram correlação entre o percentual de células positivas para Ki-67 e o grau histológico do tumor, com LNH de menor grau apresentando menores índices proliferativos do que tumores de maior grau (148, 152-165). Também foi identificada associação entre valores mais altos de Ki-67 e LNH agressivos, em comparação a linfomas indolentes (151, 166-172).

He *et al.* (2014) realizaram uma meta-análise com 27 estudos (3902 pacientes) para avaliar o impacto da expressão de Ki-67 na sobrevida de pacientes com o diagnóstico de linfoma. O marcador apresentou valor como prognóstico, havendo correlação significativa entre alta expressão de Ki-67 e maior mortalidade de pacientes e sobrevida livre de doença. Ki-67 manteve o valor prognóstico após a inclusão de rituximab no tratamento, quando avaliado em LDGCB e em linfoma do manto. Não houve associação entre o marcador e parâmetros clínico-patológicos (144).

2.4.1. Ki-67 E DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINHAGEM B: ESTUDOS COM CITOMETRIA DE FLUXO

A avaliação por citometria de fluxo tem como vantagem a padronização do método e a possibilidade de estudar somente as células de interesse, excluindo-se os demais grupos celulares da análise. No caso de neoplasias leucemizadas, as células neoplásicas presentes no sangue periférico ou na medula óssea tornam-se uma importante fonte para avaliação do índice proliferativo (7). Recentemente, Sun *et al.* (2016) desenvolveram e validaram um protocolo para avaliação da expressão de Ki-67 em células de sangue periférico para aplicação em estudos clínicos (173).

Palutke *et al.* (1987) utilizaram o anticorpo monoclonal (MoAb) Ki-67 para determinar a proliferação de linfócitos em resposta a mitógenos e células alogênicas, comparando os resultados obtidos com a técnica de incorporação de timidina [³H]. Para evitar marcação citoplasmática não específica, os autores removeram o citoplasma das células avaliadas e os núcleos intactos apresentaram estabilidade de pelo menos 24 horas em refrigeração. Houve boa correlação entre as técnicas utilizadas (174).

Em outro trabalho de Palutke *et al.* (1989), foi avaliada a proliferação celular em culturas mistas de linfócitos. A proliferação determinada pela incorporação de timidina tritiada (³H-TdR, do inglês *tritiated thymidine*), método demorado que baseia-se na mensuração de síntese do DNA, foi correlacionada com a proliferação determinada por avaliação de Ki-67 por citometria de fluxo. A correlação entre os valores obtidos nas duas

metodologias foi excelente, indicando que a avaliação de proliferação por dosagem de antígenos nucleares pode ser utilizada em sistemas de cultura celular e seções teciduais (175).

Na avaliação da expressão de Ki-67 durante o ciclo celular de linfócitos estimulados com fitohemaglutinina, foi realizada marcação dupla de Ki-67 e DNA por citometria de fluxo, bem como o uso de drogas para bloqueio dos linfócitos estimulados em diferentes fases do ciclo celular. Ficou demonstrado que a expressão do antígeno Ki-67 começa durante o início da fase S (176).

Na comparação de linfócitos B de pacientes jovens e idosos, foram avaliadas ativação, proliferação e susceptibilidade a apoptose. Foram identificadas alterações quantitativas e qualitativas nos linfócitos de pacientes idosos, nestes pacientes o percentual de linfócitos B de memória (CD27^{positivo}) foi muito inferior ao de linfócitos B naïve (CD27^{negativo}); além disso, os linfócitos B naïve apresentaram menor susceptibilidade a apoptose. Não foram identificadas diferenças entre imunoglobulina sérica ou expressão de Ki-67 entre os grupos (177).

Caraux *et al.* (2010) caracterizaram populações linfoides B circulantes no sangue periférico de doadores saudáveis. Foram identificados quatro perfis fenotípicos: imaturo, naïve, de memória e plasmócitos. Identificou-se correlação inversa entre idade e contagem percentual e absoluta dos linfócitos B de memória e plasmócitos circulantes. A marcação de Ki-67 permitiu definir que os linfócitos B circulantes são células quiescentes (média de expressão de 1,2%) e os plasmócitos apresentam fenótipo ativado (média de expressão de 66,8% para os plasmócitos CD138^{negativo} e de 76,2% para os CD138^{positivo}) (178).

No estudo da expressão de Ki-67 e de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês *proliferating cell nuclear antigen*) em células de LNH houve boa correlação entre os dois antígenos nucleares associados ao crescimento celular, bem como entre a fração de células positivas e o número de células em fase S determinada por análise de histograma de DNA (obtida pela marcação com iodeto de propídio). Os três parâmetros permitiram discriminação entre linfomas de alto e baixo grau. O Ki-67 médio dos LNH de baixo grau foi de 3,9%, com uma média de 38,5% para os LNH de alto grau (179).

Ao avaliar a cinética *in vivo* da incorporação de iododeoxiuridina no DNA em pacientes com LNH ou hiperplasia reativa, a técnica se mostrou viável e apresentou correlação com resultados de marcadores do ciclo celular. A avaliação da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo demonstrou baixa atividade proliferativa nos tumores de baixo grau (mediana de 6%) e alta fração de crescimento nos LNH de grau intermediário (mediana de 26%) e alto grau (mediana de 34%). Os casos de hiperplasia reativa apresentaram índice proliferativo mediano de 5% (180).

Aydin *et al.* (1995) avaliaram a expressão de CD25 em células de LLC e sua correlação com o índice proliferativo (Ki-67); a expressão média de Ki-67 foi de 1,56% no grupo CD25^{negativo} e de 2,48% no grupo CD25^{positivo}, havendo diferença significativa no percentual de expressão do marcador. Alta expressão do marcador Ki-67 apresentou correlação com concentração sérica de β 2 microglobulina e com padrão difuso de infiltração medular (181).

No estudo de Konikova *et al.* (2003) foram avaliadas neoplasias hematológicas. A expressão de Ki-67 variou de 23% a 68% nos casos avaliados, que incluíam LLA B, leucemia/linfoma linfoblástico T (LLA T), leucemia mielóide aguda (LMA) e LLC. Nos pacientes com LLC, o marcador foi positivo apenas naqueles com estágio clínico avançado (quatro dos dez casos avaliados) (182).

Em um estudo avaliando a capacidade de resposta a estímulos de células de LLC, a expressão basal de Ki-67 variou de 0 a 3%; e, após o estímulo com citocinas, obteve-se um índice proliferativo de 19% a 38% (183). Bennett *et al.* (2007) avaliaram a expressão de marcadores de células de LLC associados com a entrada e progressão do ciclo celular, as células alvo do estudo foram identificadas pela expressão de Ki-67, MCM-6 e CD19; e a expressão de Ki-67 foi predominantemente restrita a células expressando os níveis mais altos de CD39, CD86, CD95 e CD23 (184).

Na avaliação de subclones de LLC identificados pela expressão ou ausência de CD38 e comparação com controles saudáveis pareados por idade, as células de LLC apresentaram maior expressão de Ki-67 (média de 1,77%) em relação às células linfóides B CD5^{positivo} do grupo controle (média de 0,23%) e a expressão de Ki-67 foi encontrada com maior frequência nas subpopulações CD38^{positivo} de ambos os grupos. Na avaliação da expressão de Ki-67 entre os grupos de LLC com alta e baixa expressão de CD38, o grupo CD38 de alta expressão apresentou maior número de células positivas para Ki-67; também houve maior expressão de Ki-67 nos pacientes com IgVH não mutado. Ao separar as células por densidade de CD38 (IFM forte, intermediária ou fraca), foi identificada diferença significativa na expressão de Ki-67 entre os grupos, havendo maior expressão nos grupos com maior densidade do marcador. A expressão de ZAP-70 foi correlacionada com expressão de CD38 e Ki-67; também houve correlação de Ki-67 com a atividade de telomerase e expressão de ZAP-70 (185).

No estudo de Lin *et al.* (2008) foi avaliada a expressão de CD38 em células de LLC de sangue periférico ou medula óssea isoladas por *sorting* de acordo com a expressão de Ki-67. A população Ki-67^{positivo}CD19^{positivo} apresentou um número significativamente maior de

linfócitos leucêmicos CD38^{positivo} comparado à população Ki-67^{negativo}CD19^{positivo}. Não houve diferença entre o comprimento dos telômeros entre células CD38^{positivo} e CD38^{negativo} de um mesmo paciente; tampouco entre expressão e atividade de telomerase entre estas subpopulações. Não foi identificada diferença no percentual de células expressando CD38 ou na expressão de Ki-67 nas células CD38^{positivo} em amostras de sangue periférico e medula óssea de um mesmo paciente coletadas no mesmo dia (186).

A expressão de Ki-67 em linfócitos do sangue periférico criopreservados de pacientes com LLC foi avaliada por citometria de fluxo. Foi observada uma distribuição variável da expressão de Ki-67, com um valor médio de 52%. Os pacientes com expressão de Ki-67 abaixo do valor da média apresentaram sobrevida maior. Nos pacientes com baixa expressão de CD38 (<30% de positividade para o marcador), considerados de melhor prognóstico, uma alta expressão de Ki-67 foi associada à menor sobrevida geral; enquanto nos pacientes com expressão positiva de CD38, foi identificada apenas uma tendência a menor sobrevida geral. A expressão de Ki-67 em células de LLC típica tem implicação prognóstica e possivelmente reflete a fração de crescimento *in vivo* das células B neoplásicas (187).

No estudo de Palacios *et al.* (2010), foi quantificada a expressão de citidina desaminase induzida por ativação (AID, do inglês *activation-induced cytidine deaminase*) e processo de recombinação mudança de classe (CSR, do inglês *class switch recombination*) em curso em células mononucleares criopreservadas de pacientes com LLC, bem como foi caracterizada a expressão de diferentes moléculas relacionadas a interações do microambiente. Dentre os pacientes com IgVH não mutada foi identificada alta expressão de AID na subpopulação com CSR em andamento e esta pequena fração de células apresentou altos níveis de marcadores de proliferação, antiapoptóticos e de progressão (Ki-67, *c-myc*, Bcl-2, CD49d e citocinas CCL3 e CCL4) e baixos níveis da proteína p27^{kip1} (inibidora do ciclo celular e associada com progressão de doença) (188).

No estudo de Calissano *et al.* (2011), foram avaliados clones de LLC de acordo com diferentes cinéticas apresentadas pelas células, identificadas de acordo com a expressão de CD5 e do receptor de quimiocina CXC tipo 4 (CXCR4, do inglês *C-X-C chemokine receptor type 4*), focando nas células com divisão celular recente (CD5^{forte}CXCR4^{fraco}) e células em repouso (CD5^{fraco}CXCR4^{forte}). A fração de células em divisão (cerca de 0,1% a 1% do clone leucêmico) foi identificada utilizando a incorporação de ²H no DNA recém sintetizado e foi identificado um maior número de células com expressão de Ki-67 e do componente 6 do complexo de manutenção de minicromossomo (MCM6, do inglês *minichromosome maintenance protein 6*) dentre esta fração de células leucêmicas. Foram identificadas

diferenças na expressão gênica, bem como na expressão de moléculas de superfície dentre os compartimentos, com a fração proliferativa expressando em maior quantidade e intensidade CD38, CD20, CD23 e CD52, dentre outros marcadores (189).

No estudo de Herishanu *et al.* (2011), o marcador Ki-67 apresentou maior expressão nas células de LLC presentes em linfonodos comparado a células do sangue periférico: nos linfonodos 2% a 7% das células foram positivas e as células do sangue periférico apresentaram baixa frequência de marcação. Comparando a expressão gênica em células de linfonodos, medula óssea e sangue periférico, os linfonodos foram identificados como sítios de ativação e proliferação tumoral. Também foi identificado que a expressão gênica de células de LLC é influenciada por um efeito intrínseco do paciente individual e por um efeito extrínseco determinado pelo microambiente tumoral, além disso, células com IGHV não mutada apresentam maior expressão gênica em resposta a ligação de BCR do que as com IGHV mutada (190).

Cheng *et al.* (2014) avaliaram o efeito do tratamento com ibrutinib na expressão de marcadores proliferativos em células periféricas de LLC. A expressão de Ki-67, avaliada por citometria de fluxo, variou de 0,33% a 14% na avaliação inicial e houve decréscimo desta ao longo do tempo de tratamento, o qual se tornou estatisticamente significativo a partir do dia 15. Foi identificado o desaparecimento da expressão de Ki-67 no dia 28. Os achados foram confirmados por estudos posteriores com avaliação de incorporação de bromodeoxiuridina (120).

A avaliação de Ki-67 por citometria de fluxo em amostras de pacientes com LLC apresentando linfocitose devido ao uso de ibrutinib evidenciou baixa expressão do marcador previamente ao tratamento (mediana de 0,6%) e redução da expressão nove meses após o uso de ibrutinib (mediana 0%). Apesar de a inibição de BTK levar a linfocitose persistente, estes linfócitos não estão ativamente proliferando (121).

Na avaliação do papel do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4, do inglês *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) na patogênese de LLC, Mittal *et al.* (2013) fizeram a regulação para baixo deste marcador em células primárias de LLC obtidas de sangue periférico, medula óssea e linfonodos. Foi observado aumento de proliferação e sobrevivência celular, além de aumento da expressão de STAT1, NFATC2, c-Fos, c-Myc, Ki-67 e Bcl-2; sugerindo que CTLA4, quando normalmente expresso, tem papel no controle da proliferação e sobrevivência das células de LLC. Apesar da baixa atividade das células de LLC *in vitro*, a marcação de Ki-67 identificou um aumento na proliferação das células tratadas com siRNA de CTLA4 (191).

Zwick *et al.* (2013) demonstraram que auto-antígenos são o alvo antigênico do BCR de LLC em uma proporção considerável das células leucêmicas. Os auto-antígenos ligam-se especificamente às células leucêmicas e induzem sua ativação e proliferação (identificada pelo aumento da expressão de Ki-67 após incubação com auto-antígenos) (192).

Na avaliação do efeito *in vivo* de ibrutinib em pacientes com LLC, foi identificada uma expressão de Ki-67 nas células leucêmicas pré-tratamento de 18% em linfonodos, 9% na medula óssea e 3% em sangue periférico. Houve redução significativa da expressão após 24 horas de uso de ibrutinib. A expressão de Ki-67 nas células circulantes no sangue periférico alcançou níveis indetectáveis (<0,5% de expressão média) ao longo do tratamento. Os achados de citometria de fluxo e imunohistoquímica foram consistentes entre si, evidenciando que ibrutinib inibe a proliferação tumoral no microambiente de linfonodos e medula óssea *in vivo* (193).

Em um estudo da proliferação *in vitro* de células de linfoma do manto, foi realizada cultura celular de amostras de seis pacientes. As células foram estimuladas com agonista MoAb anti-CD40 e/ou interleucina-4 (IL-4) e a proliferação foi avaliada com indicador AlarmBlue, as células apresentaram maior proliferação na estimulação com IL-4 ou IL-4 associada a MoAb anti-CD40. A avaliação da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo foi realizada nas células cultivadas e também em células expostas a CD154 – a menor expressão de Ki-67 foi detectada nas células expostas somente ao meio de cultura, houve aumento discreto da expressão após exposição a IL-4 e marcado aumento de Ki-67 nas células expostas a CD154 (194).

A avaliação da proliferação tumoral em células de linfoma do manto por meio da marcação imunohistoquímica em biópsias de linfonodo e imunofenotípica por *gate* em células CD5^{positivo}CD19^{positivo} evidenciou forte correlação entre escore proliferativo e número de células Ki-67^{positivo} nas amostras de tumor nodal e leucemizado. Nos pacientes em que foram avaliadas amostras de linfonodo e sangue periférico, foi identificada expressão aumentada de Ki-67 no compartimento nodal comparada a população leucêmica. Os tumores com maior sinalização via BCR foram os que apresentaram maiores percentuais de células em proliferação (195).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. O QUE NÃO SE SABE

- Qual o percentual de expressão de BTK e Ki-67 em portadores de DLPC-B, avaliado por citometria de fluxo?
- Qual a intensidade de expressão de BTK e Ki-67 em portadores de DLPC-B, avaliada por citometria de fluxo?
- Quais os padrões de normalidade de BTK em linfócitos B maduros de pacientes saudáveis, avaliados por citometria de fluxo?

3.2. O QUE FOI ESTUDADO E ESTRATÉGIA PARA ALCANÇAR A RESPOSTA À QUESTÃO DE PESQUISA

Para avaliação de BTK, foi realizado um estudo caso-controle com pacientes com diagnóstico de DLPC-B, comparando-se a expressão de BTK dos casos com a de linfócitos B maduros de pacientes saudáveis. Para avaliação de Ki-67, foi realizado um estudo transversal com pacientes com neoplasias maduras de células B, avaliando-se a expressão deste marcador dentre as diferentes DLPC-B. As amostras foram obtidas após a realização de exame para o diagnóstico de DLPC-B, sendo aproveitadas antes do descarte. As amostras foram marcadas com MoAb anti-Ki-67, anti-BTK, CD45 e CD19. Os eventos foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACSCalibur™ de 4 cores. Foram avaliados o percentual de expressão e IFM das proteínas analisadas em DLPC-B e linfócitos B maduros normais, bem como correlação com parâmetros clínicos e laboratoriais.

4. JUSTIFICATIVA

O conhecimento a respeito das vias de sinalização oncogênicas associado à realização de ensaios clínicos permitiu a definição e otimização de tratamentos quimioterápicos para os pacientes com câncer. Atualmente tem-se buscado o aprimoramento dos tratamentos, com vistas a uma medicina personalizada, com o uso de terapias específicas para alvos moleculares e avaliação de biomarcadores preditivos (196). Apesar de a resposta geral ao uso de inibidores da via de BCR ser alta, alguns pacientes não apresentam resposta ou têm progressão da doença em um curto período após o início do tratamento. A identificação de marcadores que possam prever a resposta ao bloqueio da sinalização via BCR é de grande utilidade e não existem muitos estudos avaliando a expressão de BTK e Ki-67 em DLPC-B com citometria de fluxo. A avaliação da expressão de BTK e Ki-67 pode vir a auxiliar no diagnóstico, definição do comportamento biológico do tumor, escolha do tratamento e ser indicativo prognóstico e de sobrevida para portadores de DLPC-B, bem como ter utilidade na avaliação da eficácia do tratamento.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a expressão de BTK em doenças linfoproliferativas crônicas de linhagem B comparativamente a linfócitos B maduros normais. Avaliar a expressão de Ki-67 em doenças linfoproliferativas crônicas de linhagem B.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer relação entre a expressão de BTK e Ki-67 e dados do hemograma (leucócitos, hemoglobina e plaquetas) dos pacientes.
- Estabelecer padrões de normalidade para BTK em linfócitos B maduros normais.
- Correlacionar a intensidade de expressão de BTK e Ki-67 com o tipo de neoplasia B diagnosticada.
- Comparar a intensidade da expressão de BTK em linfócitos B de pacientes saudáveis e de pacientes com doenças linfoproliferativas crônicas de linhagem B.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bench AJ, Erber WN, Follows GA, Scott MA. Molecular genetic analysis of haematological malignancies II: Mature lymphoid neoplasms. *Int J Lab Hematol*. 2007 Aug;29(4):229-60.
2. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
3. Kaushansky K, Williams WJ. Williams hematology. 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
4. Burger JA. Inhibiting B-cell receptor signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Mar;7(1):26-33.
5. de Weers M, Brouns GS, Hinshelwood S, Kinnon C, Schuurman RK, Hendriks RW, et al. B-cell antigen receptor stimulation activates the human Bruton's tyrosine kinase, which is deficient in X-linked agammaglobulinemia. *J Biol Chem*. 1994 Sep 30;269(39):23857-60.
6. White DM, Smith AG, Smith JL. Assessment of proliferative activity in leukaemic bone marrow using the monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol*. 1994 Mar;47(3):209-13.
7. Klapper W, Hoster E, Determann O, Oschlies I, van der Laak J, Berger F, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop*. 2009 Jul;2(2):103-11.
8. Landberg G, Tan EM, Roos G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle. *Exp Cell Res*. 1990 Mar;187(1):111-8.
9. Sheval EV, Churakova JV, Dudnik OA, Vorobjev IA. Examination of the proliferative activity of tumor cells in human lymphoid neoplasms using a morphometric approach. *Cancer*. 2004 Jun 25;102(3):174-85.
10. Leuenberger M, Frigerio S, Wild PJ, Noetzli F, Korol D, Zimmermann DR, et al. AID protein expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is associated with poor prognosis and complex genetic alterations. *Mod Pathol*. 2010 Feb;23(2):177-86.
11. Hsi ED. The leukemias of mature lymphocytes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Aug;23(4):843-71.
12. Li Y, Hu S, Zuo Z, Hong M, Lin P, Li S, et al. CD5-positive follicular lymphoma: clinicopathologic correlations and outcome in 88 cases. *Mod Pathol*. 2015 Jun;28(6):787-98.

13. Hoffman R. Hematology : basic principles and practice. 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013.
14. Cabanillas F. Non-Hodgkin's lymphoma: the old and the new. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011 Jun;11 Suppl 1:S87-90.
15. Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2015 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. Am J Hematol. 2015 Aug;90(8):739-45.
16. INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro 2015.
17. Zerbini MCN, Soares FA, Velloso EDRP, Chauffaille MdLLF, Paes RP. Classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores dos tecidos hematopoético e linfóide, 4ª edição, 2008 - principais modificações introduzidas em relação à 3ª edição, 2001. Rev Assoc Med Bras. 2011;57(1):6.
18. Vihinen M, Smith CI. Structural aspects of signal transduction in B-cells. Crit Rev Immunol. 1996;16(3):251-75.
19. Rickert RC. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. Nat Rev Immunol. 2013 Aug;13(8):578-91.
20. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin Cytom. 2004 Jul;60(1):1-13.
21. Chizuka A, Kanda Y, Nannya Y, Oshima K, Kaneko M, Yamamoto R, et al. The diagnostic value of kappa/lambda ratios determined by flow cytometric analysis of biopsy specimens in B-cell lymphoma. Clin Lab Haematol. 2002 Feb;24(1):33-6.
22. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia. 2012 Sep;26(9):1908-75.
23. de Tute RM. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. Histopathology. 2011 Jan;58(1):90-105.
24. Duarte AJdS. Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa. Sales MM, Vasconcelos DdM, editors. São Paulo: Atheneu; 2013.
25. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood. 2008 Apr 15;111(8):3941-67.

26. Soares A, Govender L, Hughes J, Mavakla W, de Kock M, Barnard C, et al. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods*. 2010 Oct 31;362(1-2):43-50.
27. Böttcher S, Rawstron A, Lucio P, Macintyre E, Lima M, Velden VHJvd, et al. Diagnosis and classification of mature B-cell malignancies. In: *Immunologie EUA*, editor. *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010*. Rotterdam: Boek; 2010. p. 500.
28. Gajra A, Vajpayee N. B-Cell Lymphoma. *MedScape*; 2015; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/202677-overview>.
29. Ball ED, Broome HE. Monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Sep;23(3):403-16.
30. Davids MS, Brown JR. Targeting the B cell receptor pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012 Dec;53(12):2362-70.
31. Mohamed AJ, Yu L, Backesjo CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev*. 2009 Mar;228(1):58-73.
32. Brunner C, Muller B, Wirth T. Bruton's Tyrosine Kinase is involved in innate and adaptive immunity. *Histol Histopathol*. 2005 Jul;20(3):945-55.
33. Aoki Y, Isselbacher KJ, Pillai S. Bruton tyrosine kinase is tyrosine phosphorylated and activated in pre-B lymphocytes and receptor-ligated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 25;91(22):10606-9.
34. Rohrer J, Parolini O, Belmont JW, Conley ME, Parolino O. The genomic structure of human BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics*. 1994;40(5):319-24.
35. Sideras P, Muller S, Shiels H, Jin H, Khan WN, Nilsson L, et al. Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J Immunol*. 1994 Dec 15;153(12):5607-17.
36. Vihinen M, Mattsson PT, Smith CI. BTK, the tyrosine kinase affected in X-linked agammaglobulinemia. *Front Biosci*. 1997 Jan 01;2:d27-42.
37. Maas A, Hendriks RW. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cell development. *Dev Immunol*. 2001;8(3-4):171-81.
38. Crofford LJ, Nyhoff LE, Sheehan JH, Kendall PL. The role of Bruton's tyrosine kinase in autoimmunity and implications for therapy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016 Jul;12(7):763-73.

39. Efremov DG, Wiestner A, Laurenti L. Novel Agents and Emerging Strategies for Targeting the B-Cell Receptor Pathway in CLL. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012067.
40. Khan WN. B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol.* 2009 Sep;183(6):3561-7.
41. Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:555-92.
42. Hsueh RC, Scheuermann RH. Tyrosine kinase activation in the decision between growth, differentiation, and death responses initiated from the B cell antigen receptor. *Adv Immunol.* 2000;75:283-316.
43. Arita A, McFarland DC, Myklebust JH, Parekh S, Petersen B, Gabrilove J, et al. Signaling pathways in lymphoma: pathogenesis and therapeutic targets. *Future Oncol.* 2013 Oct;9(10):1549-71.
44. Aalipour A, Advani RH. Bruton tyrosine kinase inhibitors: a promising novel targeted treatment for B cell lymphomas. *Br J Haematol.* 2013 Nov;163(4):436-43.
45. Seda V, Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol.* 2015 Mar;94(3):193-205.
46. Grisafi D, Maestro A, Grumi C, Piazzoni L, Tirone G, Fiore W, et al. Ibrutinib: from bench side to clinical implications. *Med Oncol.* 2015 Sep;32(9):225.
47. Herishanu Y, Katz BZ, Lipsky A, Wiestner A. Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013 Apr;27(2):173-206.
48. Khan WN. Regulation of B lymphocyte development and activation by Bruton's tyrosine kinase. *Immunol Res.* 2001;23(2-3):147-56.
49. Kurosaki T, Kurosaki M. Transphosphorylation of Bruton's tyrosine kinase on tyrosine 551 is critical for B cell antigen receptor function. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):15595-8.
50. Lindvall JM, Blomberg KE, Väliäho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglöf A, et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev.* 2005 Feb;203:200-15.
51. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2014 Apr;14(4):219-32.
52. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood.* 2012 Aug 09;120(6):1175-84.

53. Antony P, Petro JB, Carlesso G, Shinnars NP, Lowe J, Khan WN. B-cell antigen receptor activates transcription factors NFAT (nuclear factor of activated T-cells) and NF-kappaB (nuclear factor kappaB) via a mechanism that involves diacylglycerol. *Biochem Soc Trans.* 2004 Feb;32(Pt 1):113-5.
54. Petro JB, Rahman SM, Ballard DW, Khan WN. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB in response to B cell receptor engagement. *J Exp Med.* 2000 May;191(10):1745-54.
55. Satterthwaite AB, Li Z, Witte ON. Btk function in B cell development and response. *Semin Immunol.* 1998 Aug;10(4):309-16.
56. Satterthwaite AB, Witte ON. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function: a genetic perspective. *Immunol Rev.* 2000 Jun;175:120-7.
57. Xia B, Qu F, Yuan T, Zhang Y. Targeting Bruton's tyrosine kinase signaling as an emerging therapeutic agent of B-cell malignancies. *Oncol Lett.* 2015 Dec;10(6):3339-44.
58. Shinnars NP, Carlesso G, Castro I, Hoek KL, Corn RA, Woodland RT, et al. Bruton's tyrosine kinase mediates NF-kappa B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3872-80.
59. de Gorter DJ, Beuling EA, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils JM, Hendriks RW, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity.* 2007 Jan;26(1):93-104.
60. Dinh M, Grunberger D, Ho H, Tsing SY, Shaw D, Lee S, et al. Activation mechanism and steady state kinetics of Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2007 Mar 23;282(12):8768-76.
61. Middendorp S, Dingjan GM, Maas A, Dahlenborg K, Hendriks RW. Function of Bruton's tyrosine kinase during B cell development is partially independent of its catalytic activity. *J Immunol.* 2003 Dec 01;171(11):5988-96.
62. Qiu Y, Kung HJ. Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene.* 2000 Nov;19(49):5651-61.
63. Kang SW, Wahl MI, Chu J, Kitaura J, Kawakami Y, Kato RM, et al. PKCbeta modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization. *EMBO J.* 2001 Oct;20(20):5692-702.
64. Khan WN. Colonel Bruton's kinase defined the molecular basis of X-linked agammaglobulinemia, the first primary immunodeficiency. *J Immunol.* 2012 Apr;188(7):2933-5.

65. Moschese V, Orlandi P, Di Matteo G, Chini L, Carsetti R, Di Cesare S, et al. Insight into B cell development and differentiation. *Acta Paediatr Suppl.* 2004 May;93(445):48-51.
66. Block H, Zarbock A. The role of the tec kinase Bruton's tyrosine kinase (Btk) in leukocyte recruitment. *Int Rev Immunol.* 2012 Apr;31(2):104-18.
67. Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol.* 2012 Apr;31(2):119-32.
68. Uckun FM. Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a dual-function regulator of apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 1998 Sep 15;56(6):683-91.
69. Althubiti M, Rada M, Samuel J, Escorsa JM, Najeeb H, Lee KG, et al. BTK Modulates p53 Activity to Enhance Apoptotic and Senescent Responses. *Cancer Res.* 2016 Sep;76(18):5405-14.
70. Ng YS, Wardemann H, Chelnis J, Cunningham-Rundles C, Meffre E. Bruton's tyrosine kinase is essential for human B cell tolerance. *J Exp Med.* 2004 Oct;200(7):927-34.
71. Greaves M. Clonal expansion in B-CLL: fungal drivers or self-service? *J Exp Med.* 2013 Jan 14;210(1):1-3.
72. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014 Feb;24:71-81.
73. Akinleye A, Furqan M, Adekunle O. Ibrutinib and indolent B-cell lymphomas. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2014 Aug;14(4):253-60.
74. de Weers M, Verschuren MC, Kraakman ME, Mensink RG, Schuurman RK, van Dongen JJ, et al. The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *Eur J Immunol.* 1993 Dec;23(12):3109-14.
75. Genevier HC, Hinshelwood S, Gaspar HB, Rigley KP, Brown D, Saeland S, et al. Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *Eur J Immunol.* 1994 Dec;24(12):3100-5.
76. Smith CI, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol.* 1994 Jan 15;152(2):557-65.
77. Nisitani S, Satterthwaite AB, Akashi K, Weissman IL, Witte ON, Wahl MI. Posttranscriptional regulation of Bruton's tyrosine kinase expression in antigen receptor-stimulated splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2737-42.

78. Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood*. 1998 Jan 15;91(2):595-602.
79. Kaneko H, Kawamoto N, Asano T, Mabuchi Y, Horikoshi H, Teramoto T, et al. Leaky phenotype of X-linked agammaglobulinaemia in a Japanese family. *Clin Exp Immunol*. 2005 Jun;140(3):520-3.
80. Teocchi MA, Domingues Ramalho V, Abramczuk BM, D'Souza-Li L, Santos Vilela MM. BTK mutations selectively regulate BTK expression and upregulate monocyte XBP1 mRNA in XLA patients. *Immun Inflamm Dis*. 2015 Sep;3(3):171-81.
81. Hashimoto S, Miyawaki T, Futatani T, Kanegane H, Usui K, Nukiwa T, et al. Atypical X-linked agammaglobulinemia diagnosed in three adults. *Intern Med*. 1999 Sep;38(9):722-5.
82. Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, Futatani T, Nomura K, Yamamoto J, et al. Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin Exp Immunol*. 2000 Jun;120(3):512-7.
83. Kanegane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, et al. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Dec;108(6):1012-20.
84. Sakamoto M, Kanegane H, Fujii H, Tsukada S, Miyawaki T, Shinomiya N. Maternal germinal mosaicism of X-linked agammaglobulinemia. *Am J Med Genet*. 2001 Mar;99(3):234-7.
85. Usui K, Sasahara Y, Tazawa R, Hagiwara K, Tsukada S, Miyawaki T, et al. Recurrent pneumonia with mild hypogammaglobulinemia diagnosed as X-linked agammaglobulinemia in adults. *Respir Res*. 2001;2(3):188-92.
86. Tani SM, Wang Y, Kanegane H, Futatani T, Pinto J, Vilela MM, et al. Identification of mutations of Bruton's tyrosine kinase gene (BTK) in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat*. 2002 Sep;20(3):235-6.
87. Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, et al. Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood*. 2004 Jan;103(1):185-7.

88. Aghamohammadi A, Fiorini M, Moin M, Parvaneh N, Teimourian S, Yeganeh M, et al. Clinical, immunological and molecular characteristics of 37 Iranian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;141(4):408-14.
89. Ramalho VD, Oliveira Junior EB, Tani SM, Roxo Junior P, Vilela MM. Mutations of Bruton's tyrosine kinase gene in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Sep;43(9):910-3.
90. Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C. Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. *Clin Exp Immunol*. 1998 Feb;111(2):334-8.
91. Futatani T, Watanabe C, Baba Y, Tsukada S, Ochs HD. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinaemia and carrier females. *Br J Haematol*. 2001 Jul;114(1):141-9.
92. Wang SP, Iwata S, Nakayamada S, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kondo M, et al. Amplification of IL-21 signalling pathway through Bruton's tyrosine kinase in human B cell activation. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Aug;54(8):1488-97.
93. Corneth OBJ, Verstappen GMP, Paulissen SMJ, de Bruijn MJW, Rip J, Lukkes M, et al. Enhanced Bruton's Tyrosine Kinase Activity in Peripheral Blood B Lymphocytes From Patients With Autoimmune Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Jun;69(6):1313-24.
94. Kong W, Deng W, Sun Y, Huang S, Zhang Z, Shi B, et al. Increased expression of Bruton's tyrosine kinase in peripheral blood is associated with lupus nephritis. *Clin Rheumatol*. 2017 Jun.
95. Fernandez-Vega I, Quiros LM, Santos-Juanes J, Pane-Foix M, Marafioti T. Bruton's tyrosine kinase (Btk) is a useful marker for Hodgkin and B cell non-Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch*. 2015 Feb;466(2):229-35.
96. Irish JM, Czerwinski DK, Nolan GP, Levy R. Altered B-cell receptor signaling kinetics distinguish human follicular lymphoma B cells from tumor-infiltrating nonmalignant B cells. *Blood*. 2006 Nov 01;108(9):3135-42.
97. Krysiak K, Gomez F, White BS, Matlock M, Miller CA, Trani L, et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood*. 2017 Jan;129(4):473-83.
98. Lee S, Day NS, Miles RR, Perkins SL, Lim MS, Ayello J, et al. Comparative genomic expression signatures of signal transduction pathways and targets in paediatric Burkitt lymphoma: a Children's Oncology Group report. *Br J Haematol*. 2017 May;177(4):601-11.

99. Kil LP, de Bruijn MJ, van Hulst JA, Langerak AW, Yuvaraj S, Hendriks RW. Bruton's tyrosine kinase mediated signaling enhances leukemogenesis in a mouse model for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res.* 2013;3(1):71-83.
100. Fowler N, Davis E. Targeting B-cell receptor signaling: changing the paradigm. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:553-60.
101. Brown JR, Harb WA, Hill BT, Gabrilove J, Sharman JP, Schreeder MT, et al. Phase I study of single-agent CC-292, a highly selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor, in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2016 Jul;101(7):e295-8.
102. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016 Jan;374(4):323-32.
103. Wu J, Zhang M, Liu D. Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. *J Hematol Oncol.* 2016 Mar;9:21.
104. Walter HS, Rule SA, Dyer MJ, Karlin L, Jones C, Cazin B, et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. *Blood.* 2016 Jan;127(4):411-9.
105. Lee SK, Xing J, Catlett IM, Adamczyk R, Griffies A, Liu A, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of BMS-986142, a novel reversible BTK inhibitor, in healthy participants. *Eur J Clin Pharmacol.* 2017 Jun;73(6):689-98.
106. Smith PF, Krishnarajah J, Nunn PA, Hill RJ, Karr D, Tam D, et al. A phase I trial of PRN1008, a novel reversible covalent inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2017 Jun.
107. Akinleye A, Chen Y, Mukhi N, Song Y, Liu D. Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development. *J Hematol Oncol.* 2013 Aug 19;6:59.
108. Uckun FM, Zheng Y, Cetkovic-Cvrlje M, Vassilev A, Lisowski E, Waurzyniak B, et al. In vivo pharmacokinetic features, toxicity profile, and chemosensitizing activity of alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2,5-dibromophenyl)propanamide (LFM-A13), a novel antileukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1224-33.
109. Evans EK, Tester R, Aslanian S, Karp R, Sheets M, Labenski MT, et al. Inhibition of Btk with CC-292 provides early pharmacodynamic assessment of activity in mice and humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013 Aug;346(2):219-28.
110. Brown JR. Ibrutinib (PCI-32765), the first BTK (Bruton's tyrosine kinase) inhibitor in clinical trials. *Curr Hematol Malig Rep.* 2013 Mar;8(1):1-6.

111. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol.* 2013 Aug 5.
112. Smith CI. From identification of the BTK kinase to effective management of leukemia. *Oncogene.* 2017 Apr;36(15):2045-53.
113. Roskoski R, Jr. Ibrutinib inhibition of Bruton protein-tyrosine kinase (BTK) in the treatment of B cell neoplasms. *Pharmacol Res.* 2016 Nov;113(Pt A):395-408.
114. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 20;107(29):13075-80.
115. de Rooij MF, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012 Mar 15;119(11):2590-4.
116. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood.* 2012 Feb 2;119(5):1182-9.
117. de Weerd I, Eldering E, van Oers MH, Kater AP. The biological rationale and clinical efficacy of inhibition of signaling kinases in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2013 Jul;37(7):838-47.
118. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011 Jun 9;117(23):6287-96.
119. Chang BY, Francesco M, De Rooij MF, Magadala P, Steggerda SM, Huang MM, et al. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood.* 2013 Oct 3;122(14):2412-24.
120. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia.* 2014 Mar;28(3):649-57.
121. Woyach JA, Smucker K, Smith LL, Lozanski A, Zhong Y, Ruppert AS, et al. Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy. *Blood.* 2014 Mar;123(12):1810-7.

122. Guo A, Lu P, Galanina N, Nabhan C, Smith SM, Coleman M, et al. Heightened BTK-dependent cell proliferation in unmutated chronic lymphocytic leukemia confers increased sensitivity to ibrutinib. *Oncotarget*. 2016 Jan;7(4):4598-610.
123. Cinar M, Hamedani F, Mo Z, Cinar B, Amin HM, Alkan S. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leuk Res*. 2013 Oct;37(10):1271-7.
124. Ma J, Lu P, Guo A, Cheng S, Zong H, Martin P, et al. Characterization of ibrutinib-sensitive and -resistant mantle lymphoma cells. *Br J Haematol*. 2014 Sep;166(6):849-61.
125. Zheng X, Ding N, Song Y, Feng L, Zhu J. Different sensitivity of germinal center B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells towards ibrutinib treatment. *Cancer Cell Int*. 2014 Apr;14(1):32.
126. Dasmahapatra G, Patel H, Dent P, Fisher RI, Friedberg J, Grant S. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 synergistically increases proteasome inhibitor activity in diffuse large-B cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) cells sensitive or resistant to bortezomib. *Br J Haematol*. 2013 Apr;161(1):43-56.
127. Sivina M, Kreitman RJ, Arons E, Ravandi F, Burger JA. The bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) blocks hairy cell leukaemia survival, proliferation and B cell receptor signalling: a new therapeutic approach. *Br J Haematol*. 2014 Jul;166(2):177-88.
128. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311-22.
129. Chen WJ, He DS, Tang RX, Ren FH, Chen G. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(2):411-20.
130. Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M. Proliferation marker pKi-67 affects the cell cycle in a self-regulated manner. *J Cell Biochem*. 2002;87(3):334-41.
131. Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci*. 1989 Jan;92 (Pt 1):123-30.
132. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015 Mar;11(3):1566-72.
133. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*. 2000 Jun 15;257(2):231-7.
134. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010 Feb;11(2):174-83.

135. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 1996 Jul;29(7):413-25.
136. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992 Jan;25(1):31-40.
137. Van Bockstaele DR, Lan J, Snoeck HW, Korthout ML, De Bock RF, Peetermans ME. Aberrant Ki-67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis. *Cytometry.* 1991;12(1):50-63.
138. Lašťovička J, Rataj M, Bartůňková J. Assessment of lymphocyte proliferation for diagnostic purpose: Comparison of CFSE staining, Ki-67 expression and (3)H-thymidine incorporation. *Hum Immunol.* 2016 Dec;77(12):1215-22.
139. Endl E, Gerdes J. Posttranslational modifications of the KI-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):371-80.
140. Kreitz S, Fackelmayer FO, Gerdes J, Knippers R. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp Cell Res.* 2000 Nov 25;261(1):284-92.
141. Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci.* 1989 Apr;92 (Pt 4):531-40.
142. Challen GA, Boles N, Lin KK, Goodell MA. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A.* 2009 Jan;75(1):14-24.
143. Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, et al. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int.* 1999 Dec;49(12):1043-52.
144. He X, Chen Z, Fu T, Jin X, Yu T, Liang Y, et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014;14:153.
145. Weinberg DS. The role of cell cycle activity in the generation of morphologic heterogeneity in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol.* 1989 Oct;135(4):759-70.
146. Drach J, Gatringer C, Glassl H, Schwarting R, Stein H, Huber H. Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. *Cytometry.* 1989 Nov;10(6):743-9.
147. Pellegrini W, Facchetti F, Marocolo D, Salvi L, Capucci A, Tironi A, et al. Assessment of cell proliferation in normal and pathological bone marrow biopsies: a study

using double sequential immunophenotyping on paraffin sections. *Histopathology*. 1995 Nov;27(5):397-405.

148. Martinez AE, Lin L, Dunphy CH. Grading of follicular lymphoma: comparison of routine histology with immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Jul;131(7):1084-8.

149. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2007 Mar 1;25(7):805-12.

150. Petit B, Chaury MP, Le Cloennec C, Jaccard A, Gachard N, Moalic-Judge S, et al. Indolent lymphoplasmacytic and marginal zone B-cell lymphomas: absence of both IRF4 and Ki67 expression identifies a better prognosis subgroup. *Haematologica*. 2005 Feb;90(2):200-6.

151. Ali AE, Morgen EK, Geddie WR, Boerner SL, Massey C, Bailey DJ, et al. Classifying B-cell non-Hodgkin lymphoma by using MIB-1 proliferative index in fine-needle aspirates. *Cancer Cytopathol*. 2010 Jun 25;118(3):166-72.

152. Schwartz BR, Pinkus G, Bacus S, Toder M, Weinberg DS. Cell proliferation in non-Hodgkin's lymphomas. Digital image analysis of Ki-67 antibody staining. *Am J Pathol*. 1989 Feb;134(2):327-36.

153. Falini B, Canino S, Sacchi S, Ciani C, Martelli MF, Gerdes J, et al. Immunocytochemical evaluation of the percentage of proliferating cells in pathological bone marrow and peripheral blood samples with the Ki-67 and anti-bromo-deoxyuridine monoclonal antibodies. *Br J Haematol*. 1988 Jul;69(3):311-20.

154. Palestro G, Pich A, Chiusa L, Geuna M, Ponti R, Kerim S, et al. Biological heterogeneity of diffuse mixed small and large cell non-Hodgkin's lymphomas assessed by DNA flow cytometry and Ki67. *Leuk Lymphoma*. 1995 Nov;19(5-6):467-72.

155. Schmitt F, Tani E, Tribukait B, Skoog L. Assessment of cell proliferation by Ki-67 staining and flow cytometry in fine needle aspirates (FNAs) of reactive lymphadenitis and non-Hodgkin's lymphomas. *Cytopathology*. 1999 Apr;10(2):87-96.

156. Sviatoha V, Tani E, Rassidakis G, Tribukait B, Kleina R, Skoog L. Analysis of proliferating cell fraction determined by monoclonal antibody to M1-subunit ribonucleotide reductase and Ki-67 in relation to p53 protein expression in fine-needle aspirates from non-Hodgkin's lymphomas. *Cytopathology*. 2000 Oct;11(5):290-301.

157. Kuze T, Nakamura N, Hashimoto Y, Hojo H, Abe M, Wakasa H. The relationship between the gene mutation of p53 and the protein expression of p53 and Ki-67 in non-Hodgkin's lymphomas. *Pathol Int.* 1996 Feb;46(2):130-6.
158. Holte H, Suo Z, Smeland EB, Kvaloy S, Langholm R, Stokke T. Prognostic value of lymphoma-specific S-phase fraction compared with that of other cell proliferation markers. *Acta Oncol.* 1999;38(4):495-503.
159. Wang SA, Wang L, Hochberg EP, Muzikansky A, Harris NL, Hasserjian RP. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. *Am J Surg Pathol.* 2005 Nov;29(11):1490-6.
160. Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, Yamamoto Y, Naitoh H, Kawakami K, et al. Disappearance of CD21-positive follicular dendritic cells preceding the transformation of follicular lymphoma: immunohistological study of the transformation using CD21, p53, Ki-67, and P-glycoprotein. *Pathol Res Pract.* 2003;199(5):293-302.
161. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2009 Nov;132(5):699-706.
162. Pervez S, Haroon S, Awan D. Ki-67 Labeling Indices in 'Classic' versus 'Blastoid' Mantle Cell Lymphomas--Proposed Cutoff Values for Routine Diagnostic Workup. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(15):6591-4.
163. Hoster E, Rosenwald A, Berger F, Bernd HW, Hartmann S, Loddenkemper C, et al. Prognostic Value of Ki-67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol.* 2016 Apr;34(12):1386-94.
164. Braziel RM, Arber DA, Slovak ML, Gulley ML, Spier C, Kjeldsberg C, et al. The Burkitt-like lymphomas: a Southwest Oncology Group study delineating phenotypic, genotypic, and clinical features. *Blood.* 2001 Jun 15;97(12):3713-20.
165. Chuang SS, Ye H, Du MQ, Lu CL, Dogan A, Hsieh PP, et al. Histopathology and immunohistochemistry in distinguishing Burkitt lymphoma from diffuse large B-cell lymphoma with very high proliferation index and with or without a starry-sky pattern: a comparative study with EBER and FISH. *Am J Clin Pathol.* 2007 Oct;128(4):558-64.
166. Hashmi AA, Hussain ZF, Faridi N, Khurshid A. Distribution of Ki67 proliferative indices among WHO subtypes of non-Hodgkin's lymphoma: association with other clinical parameters. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(20):8759-63.
167. Obermann EC, Eward KL, Dogan A, Paul EA, Loddo M, Munson P, et al. DNA replication licensing in peripheral B-cell lymphoma. *J Pathol.* 2005 Feb;205(3):318-28.

168. Broyde A, Boycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O, Bairey O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*. 2009 Jun;84(6):338-43.
169. Cardoso CC, de Moraes AC, Del Moral JA, Santos-Silva MC. Mature B cell neoplasms: retrospective analysis of 93 cases diagnosed between 2011 and 2014 in a University Hospital in southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2016 Apr-Jun;38(2):121-7.
170. Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A, et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):619-26.
171. Saito B, Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Adachi D, Nakamaki T, Tomoyasu S, et al. Efficacy of rituximab plus chemotherapy in follicular lymphoma depends on Ki-67 expression. *Pathol Int*. 2004 Sep;54(9):667-74.
172. Holte H, de Lange Davies C, Beiske K, Stokke T, Marton PF, Smeland EB, et al. Ki67 and 4F2 antigen expression as well as DNA synthesis predict survival at relapse/tumour progression in low-grade B-cell lymphoma. *Int J Cancer*. 1989 Dec 15;44(6):975-80.
173. Sun Y, Yang K, Bridal T, Ehrhardt AG. Robust Ki67 detection in human blood by flow cytometry for clinical studies. *Bioanalysis*. 2016 Dec;8(23):2399-413.
174. Palutke M, KuKuruga D, Tabaczka P. A flow cytometric method for measuring lymphocyte proliferation directly from tissue culture plates using Ki-67 and propidium iodide. *J Immunol Methods*. 1987 Dec 4;105(1):97-105.
175. Palutke M, Tabaczka PM, Kukuruga DL, Kantor NL. A method for measuring lymphocyte proliferation in mixed lymphocyte cultures using a nuclear proliferation antigen, Ki-67, and flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 1989 Apr;91(4):417-21.
176. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*. 1991;12(1):42-9.
177. Chong Y, Ikematsu H, Yamaji K, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, et al. CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int Immunol*. 2005 Apr;17(4):383-90.
178. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of

- circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica*. 2010 Jun;95(6):1016-20.
179. Landberg G, Roos G. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. *Acta Oncol*. 1991;30(8):917-21.
180. Brons PP, Raemaekers JM, Bogman MJ, van Erp PE, Boezeman JB, Pennings AH, et al. Cell cycle kinetics in malignant lymphoma studied with in vivo iododeoxyuridine administration, nuclear Ki-67 staining, and flow cytometry. *Blood*. 1992 Nov 1;80(9):2336-43.
181. Aydin A, Elnaggar A, Robertson L, Keating M, Huh Y. IL-2 receptor expression and ki-67 flow cytometric analysis in B-chronic lymphocytic-leukemia. *Int J Oncol*. 1995 Dec;7(6):1433-6.
182. Konikova E, Kusenda J. Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma*. 2003;50(1):31-40.
183. McManus AP, Desai ZR, Lavabre-Bertrand T. B-cell chronic lymphocytic leukaemia populations respond stochastically to combinations of growth signals in vitro. *Leuk Res*. 1993 Jun;17(6):477-81.
184. Bennett F, Rawstron A, Plummer M, de Tute R, Moreton P, Jack A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *Br J Haematol*. 2007 Nov;139(4):600-4.
185. Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C, et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3352-9.
186. Lin TT, Hewamana S, Ward R, Taylor H, Payne T, Pratt G, et al. Highly purified CD38 sub-populations show no evidence of preferential clonal evolution despite having increased proliferative activity when compared with CD38 sub-populations derived from the same chronic lymphocytic leukaemia patient. *Br J Haematol*. 2008 Aug;142(4):595-605.
187. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, Loiacono F, Matis S, Recchia AG, et al. More on the determination of Ki-67 as a novel potential prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2010 Dec;34(12):e326-8.
188. Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V, et al. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood*. 2010 Jun 3;115(22):4488-96.

189. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan XJ, Yancopoulos S, Hayes G, et al. Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1374-82.
190. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):563-74.
191. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rohlfen RA, Gupta P, Joshi AD, Hegde GV, et al. Role of CTLA4 in the proliferation and survival of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2013;8(8):e70352.
192. Zwick C, Fadle N, Regitz E, Kemele M, Stilgenbauer S, Buhler A, et al. Autoantigenic targets of B-cell receptors derived from chronic lymphocytic leukemias bind to and induce proliferation of leukemic cells. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4708-17.
193. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF- κ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. 2014 May;123(21):3286-95.
194. Castillo R, Mascarenhas J, Telford W, Chadburn A, Friedman SM, Schattner EJ. Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40 ligation and IL-4. *Leukemia*. 2000 Feb;14(2):292-8.
195. Saba NS, Liu D, Herman SE, Underbayev C, Tian X, Behrend D, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016 Jul;128(1):82-92.
196. Sellier H, Rebillard A, Guette C, Barre B, Coqueret O. How should we define STAT3 as an oncogene and as a potential target for therapy? *JAKSTAT*. 2013 Jul 1;2(3):e24716.

7. ARTIGO ORIGINAL: EXPRESSION OF BRUTON'S TYROSINE KINASE IN B-CELL NEOPLASMS EVALUATED BY FLOW CYTOMETRY

Clin Exp Med
DOI 10.1007/s10238-016-0447-9



ORIGINAL ARTICLE

Expression of Bruton's tyrosine kinase in B-cell neoplasms evaluated by flow cytometry

Natália Aydos Marcondes^{1,2} · Flavo Beno Fernandes² · Ana Paula Alegretti³ · Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber^{1,2,4}

Received: 27 June 2016 / Accepted: 15 December 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a cytoplasmatic protein that is part of the B-cell antigen receptor signaling pathway. Our aim was to evaluate the expression of BTK in B-cell neoplasms and compare it to normal B-cell lymphocytes. After surface staining with CD19 and CD45, flow cytometry staining for intracellular BTK was performed in leukemic or mature B-cells from bone marrow or peripheral blood samples. No differences in BTK expression were identified between groups, or in comparison to control samples, there was no association between BTK expression and the clinical variables evaluated. BTK expression in B-cell neoplasms was similar to that of normal B-cell lymphocytes.

Keywords B-cell neoplasm · Bruton's tyrosine kinase · BTK · Flow cytometry

Introduction

Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a cytoplasmatic non-receptor tyrosine kinase protein expressed in all hematopoietic cells, except in T-cell lymphocytes. BTK is a member of Tec-kinase family and part of the B-cell antigen receptor (BCR) signaling pathway, which has an essential role in B-cell development and function [1]. Mutations in BTK gene are known to cause X-linked agammaglobulinemia (XLA) that result in marked decrease in number and function of B-cell lymphocytes [1–3].

In normal B-cell lymphocytes, BCR signaling regulates gene expression patterns that control cell proliferation, differentiation and function, including antibodies production [4]. BCR signaling is also involved in the development and disease progression of B-cell neoplasms and is a key target of many clinical trials conducted world wide for the treatment of these diseases [5, 6].

In vitro inhibition of BTK leads to a blockade of BCR signaling and cell activation in mature human B-cell lymphocytes [7]. Ibrutinib, an irreversible BTK inhibitor, is FDA-approved for the treatment of mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphoplasmacytic lymphoma; it is also under investigation for the treatment of several other tumors [8]. Our aim was to evaluate the expression of BTK in mature B-cell neoplasms and compare it to normal B-cell lymphocytes with the use of a flow cytometric assay.

Patients and methods

Flow cytometry staining for intracellular BTK was performed in samples from 30 healthy controls (peripheral blood) and 174 patients diagnosed with mature B-cell neoplasms

✉ Natália Aydos Marcondes
nam_nati@yahoo.com.br

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2400, 2º andar, Porto Alegre 90035-903, Brazil

² Laboratório Zanol, Rua Mostardeiro 333 sala 120, Porto Alegre 90430-001, Brazil

³ Unidade de Diagnóstico Personalizado, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre 90035-903, Brazil

⁴ Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre 90035-903, Brazil

(peripheral blood or bone marrow), according to the World Health Organization criteria [9]. The exclusion criteria were age <18 years old; known hematological, inflammatory and/or infectious diseases; previous treatment for B-cell neoplasms; and presence of other hematological malignancies.

About 1,000,000 cells in a volume of up to 100 μ L of sample anticoagulated with EDTA were placed into polystyrene tubes and subjected to two-color staining with 20 μ L of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) against CD45 FITC (clone HI30) and CD19 APC (clone HIB19) for 20 min at room temperature. Red blood cells were lysed by incubation with Human BD Phosflow Lyse/Fix Buffer (in a volume of 20 \times the sample volume) for 10 min at 37 $^{\circ}$ C. Samples were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 1 mL of Fix/Perm Buffer (from Transcription Factor Buffer Set) for 50 min, at 4 $^{\circ}$ C. Samples were washed twice with Perm/Wash Buffer (from Transcription Factor Buffer Set). Samples were incubated with 1 mL of Perm/Wash Buffer and 20 μ L of anti-BTK PE (clone 53/BTK) MoAb for 50 min, at 4 $^{\circ}$ C. Samples were washed twice with Perm/Wash Buffer and resuspended in PBS. All samples were processed within 48 h of collection [10]. All reagents were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA) and used according to the manufacturer instructions, since it had better staining in optimization studies. At least 50,000 CD45⁺ events were acquired on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuestTM Pro software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), after daily quality control procedures, and were analyzed with CytoPaint Classic 1.1 (Leukocyte, Pleasanton, CA, USA).

Expression intensity of CD45 and CD19 was used to gate B-cell population and the relative mean fluorescence intensity (MFI) of BTK expression in CD19⁺/CD45⁺ B-cell lymphocytes was recorded (Fig. 1). Data analysis was carried out with ANOVA, and comparisons were adjusted by the Bonferroni test. All data were analyzed with SPSS v.18.0, and differences were considered significant when $P < 0.05$.

This study was carried out from October, 2014, to October, 2015, after approval of the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (project number 14-0104). Written informed consent was deemed unnecessary after the signature of a commitment term for the use of biological material and associated information by researchers. Laboratory data were obtained in reports provided by the medical assistants.

Results

The cases in this study included 110 chronic lymphocytic leukemias (CLL) (63.2%); seven atypical chronic lymphocytic leukemia (aCLL) (4.0%); 20 marginal zone

lymphomas (MZL) (11.5%); 12 lymphoplasmacytic lymphomas (LPL) (6.9%); ten mantle cell lymphomas (MCL) (5.7%); seven follicular lymphomas (FL) (4.0%); four hairy cell leukemias (HCL) (2.3%); two Burkitt lymphomas (BL) (1.2%); and two diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) (1.2%). MFI of BTK expression was comparable and within the same range in CD19⁺/CD45⁺ B-cells of patients and healthy controls (Fig. 2). BTK expression of CD19⁺/CD45^{bright} lymphocytes was within the negative control range. Patient baseline characteristics are shown in Table 1. Cases cell counts are shown in Table 2. Cases were grouped according to the disease, there was no difference in BTK expression between groups or compared to control samples and there was no association between BTK expression and laboratory variables.

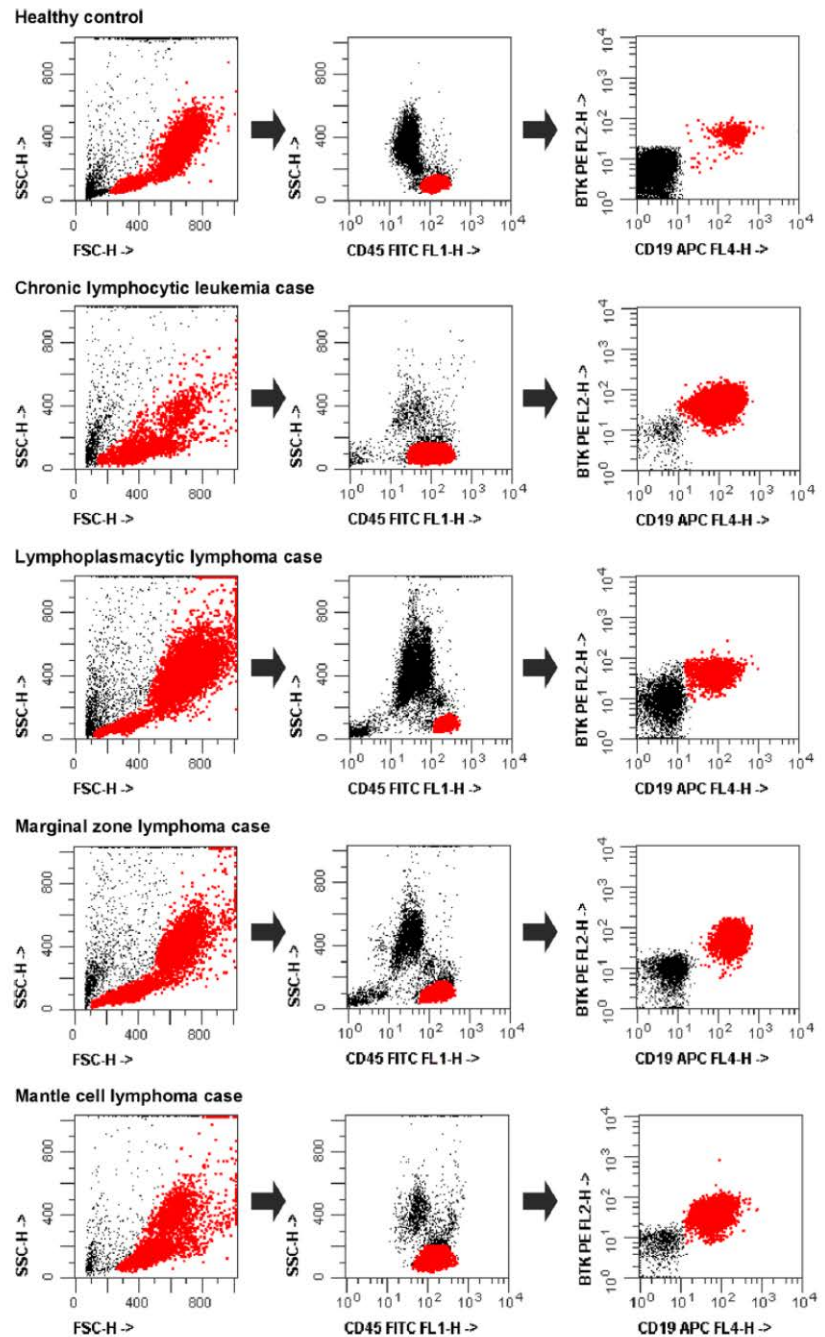
Discussion

In our study, there was no difference in BTK expression among B-cell neoplasm and normal samples. Expression of BTK has been previously evaluated in samples from purified cells of CLL patients with immunoblot technique, with highly variable protein expression between patient cells; mRNA expression was not variable among patients, but was higher than mRNA expression in normal B-cells from healthy volunteers. Despite the differences in BTK protein expression, there was no correlation among response to BTK inhibitor PCI-32765 and BTK protein expression [11].

Cheng et al. evaluated B-cell lymphocytes from peripheral blood of previously untreated CLL patients for BTK expression with western blotting. In accordance with our results, there was no difference between BTK expression in CLL and normal B-cells; however, leukemic cell exhibited higher BTK activity as shown by BTK phosphorylation on Y223 [12].

BTK expression in normal and neoplastic lymph nodes was evaluated with immunostaining. In normal lymphoid tissues (tonsil and spleen samples), BTK expression had different patterns according to the site evaluated, varying from strong to weak in B-cells. Most B-cell lymphomas presented strong BTK expression, but some cases of grade III follicular lymphoma, DLBCL and hairy cell leukemia were negative or had weak staining [13]. Cinar et al. compared BTK expression in tissues of MCL patients and benign lymph nodes with immunohistochemical staining. BTK exhibited moderate to stronger expression in all MCL samples. In reactive lymphoid tissues, BTK expression pattern differed according to the layer: was stronger in lymphocytes of mantle zone and weaker in the germinal center cells [14]. Our study evaluated BTK expression in bone marrow and peripheral blood samples with flow

Fig. 1 Example of flow cytometry gating strategy used for the evaluation of MFI of BTK in B-cell lymphocytes from control samples and different patient groups. Debris were excluded in the FSC versus SSC graph. Lymphocytes were selected based on SSC distribution and CD45 expression. B-cell lymphocytes were gated according to CD19 expression and MFI of BTK expression was recorded



cytometry, distinct methodologies and different tissue samples could explain the dissimilar results observed.

BTK expression assessed by flow cytometry has been used for the diagnosis of X-linked agammaglobulinemia, in order to determine presence or absence of the protein in patients and their relatives [15–17]. Flow cytometry

permits the evaluation of single-cell antigens, so this technique was used to evaluate BTK expression in developing hematopoietic cells, and BTK was detected in all lineages except for T cells, with higher expression in immature B-cells and a significantly lower expression in B-cells from peripheral sites [18]. In our study, only

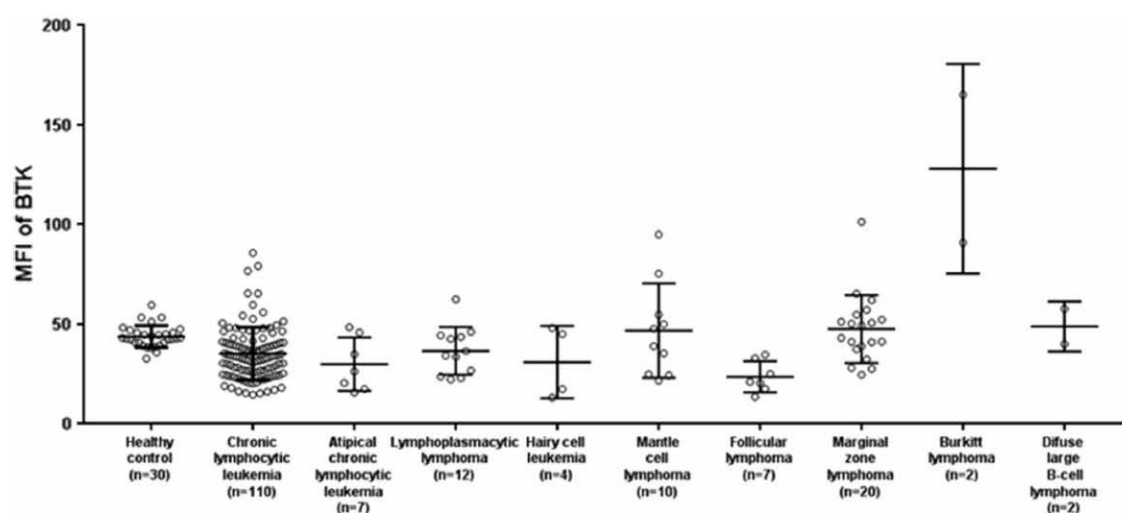


Fig. 2 Scatter dot plot with MFI of BTK expression in B-cell lymphocytes from healthy control patients and lymphocytes of B-cell neoplasms, separated by disease. Error bar shows mean and standard deviation for each group

Table 1 Cases and controls characteristics

Characteristic	Cases ($N = 174$)	Controls ($N = 30$)
Median age, years	69.5 (± 12.0)	45.9 (± 14.9)
<i>Sex</i>		
Male	92 (52.9%)	8 (26.7%)
Female	82 (47.1%)	22 (73.3%)
<i>Sample</i>		
Peripheral blood	88 (50.6%)	30 (100%)
Bone marrow	86 (49.4%)	0
Lymphocytes (%)	63.39 (± 22.02)	30.65 (± 8.60)
CD19 ⁺ (% of lymphocytes)	53.75 (± 25.50)	3.87 (± 1.88)
<i>Peripheral blood counts</i>		
White blood cell count ($\times 10^9/L$)	43.88 (± 51.21)	7.46 (± 1.62)
Hemoglobin (g/L)	121.4 (± 27.2)	137.4 (± 14.3)
Platelet count ($\times 10^9/L$)	180.9 (± 86.2)	260.0 (± 79.2)

Data are shown as mean \pm SD or number (n)

peripheral blood samples were included in the control group to enable the assessment of mature B-lymphocytes exclusively.

Flow cytometry has been used to evaluate BTK expression in mice CLL cells, which had a more variable expression than mice wild-type splenic B-cells; in the same study, BTK overexpression was associated with accelerated disease onset in a mice model [19]. Despite our Burkitt lymphoma group only having two cases, the MFI seemed considerably higher, which could correlate with the aggressive nature of the disease. In another flow cytometric study comparing BTK expression in rheumatoid arthritis patients and control subjects, there was no difference

between groups [20]. To our knowledge, this is the first study evaluating BTK expression in mature B-cell neoplasms compared to normal controls using flow cytometry.

Our study has some limitations. The major one is the inclusion of normal residual B-cells within the heterogeneous population of clonal lymphocytes in case samples, since our gating strategy was only able to identify B-cells in general. Besides, we only had access to immunophenotyping and biopsy results as complementary tests for the disease entity definition.

In summary, in our study, BTK expression in B-cell neoplasms was similar to that of normal B-cell lymphocytes. Flow cytometry is a rapid technique that allows

Table 2 Mature B-cell neoplasms cell counts

Count	Chronic lymphocytic leukemia (n = 110)	Atypical chronic lymphocytic leukemia (n = 7)	Lymphoplasmacytic lymphoma (n = 12)	Hairy cell leukemia (n = 4)	Mantle cell lymphoma (n = 10)	Follicular lymphoma (n = 7)	Marginal zone lymphoma (n = 20)	Burkitt lymphoma (n = 2)	Diffuse large B-cell lymphoma (n = 2)
<i>Sample counts</i>									
Lymphocytes (%)	69.44 (±18.34)	78.83 (±12.91)	40.10 (±24.05)	62.23 (±13.31)	56.98 (±25.30)	62.68 (±27.99)	45.27 (±20.91)	49.21 (±19.34)	62.55 (±24.02)
CD19 ⁺ (% of lymphocytes)	62.05 (±21.29)	71.05 (±18.43)	24.93 (±20.84)	21.31 (±10.00)	47.42 (±27.40)	51.59 (±25.34)	32.42 (±20.50)	38.30 (±29.95)	48.23 (±34.90)
<i>Peripheral blood counts</i>									
White blood cell (×10 ⁹ /L)	52.12 (±50.93)	83.23 (±109.26)	14.08 (±18.21)	3.02 (±0.63)	51.37 (±51.87)	24.25 (±24.41)	14.42 (±8.20)	19.31 (±22.89)	8.14 (±4.73)
Hemoglobin (g/L)	128.5 (±23.1)	117.0 (±24.2)	107.3 (±23.7)	123.3 (±44.4)	104.8 (±44.0)	111.2 (±20.0)	110.2 (±28.0)	77.0 (±5.7)	74.0 (±1.4)
Platelet (×10 ⁹ /L)	191.1 (±73.1)	171.9 (±78.1)	185.3 (±110.7)	84.0 (±40.8)	182.1 (±97.7)	151.1 (±105.2)	185.9 (±116.6)	102.0 (±45.2)	14.9 (±8.4)

Data are shown as mean ± SD or number (n)

single-cell evaluation. More studies are needed to monitor BTK expression during treatment and could guide the use of B-cell signaling inhibitors.

Acknowledgements We acknowledge the Incentive Fund for Research and Events of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) for the financial support.

Author's contribution NAM performed the experiments and wrote the manuscript. GAMF designed the project, analyzed the data and contributed to the writing of the manuscript. FBF collected the data. APA performed a critical review of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Mohamed AJ, Yu L, Backesjo CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev.* 2009;228(1):58–73. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00741.x.
- Davids MS, Brown JR. Targeting the B cell receptor pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(12):2362–70. doi:10.3109/10428194.2012.695781.
- Brunner C, Muller B, Wirth T. Bruton's tyrosine kinase is involved in innate and adaptive immunity. *Histol Histopathol.* 2005;20(3):945–55.
- Burger JA. Inhibiting B-cell receptor signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2012;7(1):26–33. doi:10.1007/s11899-011-0104-z.
- Fowler N, Davis E. Targeting B-cell receptor signaling: changing the paradigm. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2013;2013:553–60. doi:10.1182/asheducation-2013.1.553.
- Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014;24:71–81. doi:10.1016/j.semcancer.2013.08.011.
- Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(29):13075–80. doi:10.1073/pnas.1004594107.
- Roskoski R Jr. Ibrutinib inhibition of Bruton protein-tyrosine kinase (BTK) in the treatment of B cell neoplasms. *Pharmacol Res.* 2016;113(Pt A):395–408. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.011.
- Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS—part II—preanalytical issues. *Cytom B Clin Cytom.* 2013;84(5):286–90. doi:10.1002/cyto.b.21105.
- Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011;117(23):6287–96. doi:10.1182/blood-2011-01-328484.
- Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on

- B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014;28(3):649–57. doi:10.1038/leu.2013.358.
13. Fernandez-Vega I, Quiros LM, Santos-Juanes J, Pane-Foix M, Marafioti T. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a useful marker for Hodgkin and B cell non-Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch*. 2015;466(2):229–35. doi:10.1007/s00428-014-1698-z.
 14. Cinar M, Hamedani F, Mo Z, Cinar B, Amin HM, Alkan S. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leuk Res*. 2013;37(10):1271–7. doi:10.1016/j.leukres.2013.07.028.
 15. Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood*. 1998;91(2):595–602.
 16. Kaneko H, Kawamoto N, Asano T, Mabuchi Y, Horikoshi H, Teramoto T, et al. Leaky phenotype of X-linked agammaglobulinemia in a Japanese family. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(3):520–3. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02784.x.
 17. Teocchi MA, Domingues Ramalho V, Abramczuk BM, D'Souza-Li L, Santos Vilela MM. BTK mutations selectively regulate BTK expression and upregulate monocyte XBP1 mRNA in XLA patients. *Immun Inflamm Dis*. 2015;3(3):171–81. doi:10.1002/iid3.57.
 18. Nisitani S, Satterthwaite AB, Akashi K, Weissman IL, Witte ON, Wahl MI. Posttranscriptional regulation of Bruton's tyrosine kinase expression in antigen receptor-stimulated splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(6):2737–42. doi:10.1073/pnas.050583597.
 19. Kil LP, de Bruijn MJ, van Hulst JA, Langerak AW, Yuvaraj S, Hendriks RW. Bruton's tyrosine kinase mediated signaling enhances leukemogenesis in a mouse model for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res*. 2013;3(1):71–83.
 20. Wang SP, Iwata S, Nakayamada S, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kondo M, et al. Amplification of IL-21 signalling pathway through Bruton's tyrosine kinase in human B cell activation. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(8):1488–97. doi:10.1093/rheumatology/keu532.

7.1. STROBE STATEMENT—EXPRESSION OF BRUTON'S TYROSINE KINASE IN B-CELL NEOPLASMS EVALUATED BY FLOW CYTOMETRY

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	1
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	1
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	1
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	1
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	1
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	2
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	2
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	2
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	2
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	NA
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	NA
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	2
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	2
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	NA
		(c) Explain how missing data were addressed	NA
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	2

		(b) Give reasons for non-participation at each stage	NA
		(c) Consider use of a flow diagram	NA
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	4
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	5
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	NA
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	NA
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	NA
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	NA
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	2
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	4
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	2-4
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	2-4
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	5

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

N/A: not applicable.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

8. LETTER TO THE EDITOR: FLOW CYTOMETRY ASSESSMENT OF INTRACELLULAR BTK EXPRESSION

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 00:00–00 (2017)

Letter to the Editor

Flow Cytometry Assessment of Intracellular BTK Expression

Dear Editor,

We read with great interest the original article “Increased expression of Bruton’s tyrosine kinase in peripheral blood is associated with lupus nephritis” recently published in *Clinical Rheumatology* (1). In this paper, Kong et al. (2017) evaluated Bruton’s tyrosine kinase (BTK) expression in peripheral blood B-cells from healthy controls and systemic lupus erythematosus (SLE) patients. The authors report an increased BTK expression in B-cells from SLE patients compared to controls, nevertheless only 2–4% of peripheral B-cells showed BTK expression in the study.

Nisitani et al. (2000) used flow cytometry to evaluate BTK expression in developing hematopoietic cells, the protein expression was detected in all lineages except for T cells, with higher expression in immature B-cells and a lower expression in B-cells from peripheral sites (2). Wang et al. (2015) assessed BTK expression in B-cells from rheumatoid arthritis patients compared to control subjects with flow cytometry and no differences between groups were identified (3). Most recently, Corneth et al. (2017) evaluated BTK expression in B-cells from healthy controls, rheumatoid arthritis patients, and primary Sjögren’s syndrome patients, where they showed that BTK protein expression correlated with BTK phosphorylation and also that BTK levels were enhanced in most patients with autoimmune diseases (4).

We also evaluated BTK expression in B-cells from healthy controls compared to mature B-cell neoplasms (5). In our study, there were no statistical differences among B-cells from evaluated groups and BTK expression in CD19⁺/CD45^{bright} lymphocytes was within the negative control range. In our validation protocol, we tested the same

FIX&PERM® Cell Fixation and Permeabilization Kit (product code GAS-002, Nordic-MUBio, NED) for intracellular staining, but the staining was unsatisfactory and the mean fluorescence intensity (MFI) of BTK in B-cells was too weak. We selected and validated the Transcription Factor Buffer Set (product code 562574, BD Pharmingen™, USA), which showed a BTK staining that was not very bright, but allowed an appropriate distinction among positive and negative events.

This limitation of the staining kit could be responsible for the very low BTK expressing B-cells identified in both groups, with expression levels near the isotype control in the study by Kong et al. Despite the very low MFI of BTK staining, it is possible to identify a difference in the protein expression as shown in figure 1 (1), but this results should be cautiously interpreted with the understanding of the limitations imposed by the staining technique. Flow cytometry staining protocols should allow the distinction between negative and positive populations, as well as a quantifiable MFI, in order to enable comparison of results among different studies.

LITERATURE CITED

1. Kong W, Deng W, Sun Y, Huang S, Zhang Z, Shi B, Chen W, Tang X, Yao G, Feng X, et al. Increased expression of Bruton’s tyrosine kinase in peripheral blood is associated with lupus nephritis. *Clin Rheumatol*, in press.
2. Nisitani S, Satterthwaite AB, Akashi K, Weissman IL, Witte ON, Wahl MI. Posttranscriptional regulation of Bruton’s tyrosine kinase expression in antigen receptor-stimulated splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2737–2742.
3. Wang SP, Iwata S, Nakayama S, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kondo M, Kubo S, Yoshikawa M, Tanaka Y. Amplification of IL-21 signalling pathway through Bruton’s tyrosine kinase in human B cell activation. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54:1488–1497.
4. Corneth OBJ, Verstappen GMP, Paulissen SMJ, de Bruijn MJW, Rip J, Lukkes M, van Hamburg JP, Lubberts E, Bootsma H, Kroese FGM, et al. Enhanced Bruton’s tyrosine kinase activity in peripheral blood B lymphocytes from patients with autoimmune disease. *Arthritis Rheumatol* 2017;69:1313–1324.
5. Marcondes NA, Fernandes FB, Alegretti AP, Faulhaber GA. Expression of Bruton’s tyrosine kinase in B-cell neoplasms evaluated by flow cytometry. *Clin Exp Med*, in press.

Natália Aydos Marcondes* 

Programa de Pós Graduação em
Medicina: Ciências Médicas
Universidade Federal do
Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brazil
Laboratório Zanol
Porto Alegre, Brazil

Flavo Beno Fernandes

Laboratório Zanol
Porto Alegre, Brazil

Bianca Michel Spindler

Laboratório Zanol
Porto Alegre, Brazil

**Gustavo Adolpho Moreira
Faulhaber**

Programa de Pós Graduação em
Medicina: Ciências Médicas
Universidade Federal do
Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brazil
Laboratório Zanol
Porto Alegre, Brazil
Departamento de Medicina Interna
Universidade Federal do
Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brazil

*Correspondence to: Natália Aydos
Marcondes, Laboratório Zanol, Rua
Mostardeiro, 333/120, 90430-001, Porto
Alegre, Brazil.

Email: nam_nati@yahoo.com.br

Conflict of interest: The authors
declared that they have no conflict of
interest.

Published online 28 September 2017 in
Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/cyto.b.21592

9. ARTIGO ORIGINAL: Ki-67 EXPRESSION IN MATURE B-CELL NEOPLASMS: A FLOW CYTOMETRY STUDY

Original Article

Ki-67 expression in mature B-cell neoplasms: a flow cytometry study

Expressão de Ki-67 em neoplasias linfoides B maduras: um estudo de citometria de fluxo

Running title: Ki-67 expression in B-cell neoplasms

Study conducted at Laboratório Zanol, Rua Mostardeiro 333/120, and at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil

Natália Aydos Marcondes ^{1,2,*}

Flavo Beno Fernandes ²

Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber ^{1,2,3}

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Laboratório Zanol, Porto Alegre, Brazil

³ Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author

Laboratório Zanol, Rua Mostardeiro, 333/120, 90430-001, Porto Alegre, Brazil.

e-mail: nam_nati@yahoo.com.br

Fone: +55 51 35331020, fax: +55 51 35331290

Ethical aspects

This study was conducted from October, 2014, to October, 2015 in accordance with the Declaration of Helsinki and current laws in Brazil. This study was performed after approval of

the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (14-0104). Written informed consent was deemed unnecessary.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

SUMMARY

Objective: Ki-67 is a nuclear protein associated to cellular proliferation in normal or leukemic conditions that can help identify more aggressive diseases, this marker is usually evaluated with immunohistochemistry. The aim of this was to assess Ki-67 expression on mature B-cell neoplasms samples with flow cytometry immunophenotyping.

Method: After surface staining with CD19 and CD45, intracellular staining for Ki-67 was performed in leukemic mature B-cells. Ki-67 expression was evaluated with flow cytometry.

Results: Ki-67 expression was higher in mantle cell lymphoma, Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma cases. It was also associated with CD38 mean fluorescence intensity.

Conclusions: Ki-67 expression evaluated by flow cytometry can be a useful tool in the diagnosis of mature B-cell neoplasms. More studies are needed to validate Ki-67 assessment with flow cytometry immunophenotyping.

Key words: Flow cytometry; Immunophenotyping; Ki-67 Antigen.

Objetivo: Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular em condições normais ou leucêmicas que pode ajudar a identificar doenças mais agressivas, este marcador é geralmente avaliado com imuno-histoquímica. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de Ki-67 em amostras de neoplasias de células B maduras com imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Método: Após marcação de superfície com CD19 e CD45, foi realizada marcação intracelular para Ki-67 em células B maduras leucêmicas. A expressão de Ki-67 foi avaliada por citometria de fluxo.

Resultados: A expressão de Ki-67 foi maior em células de linfomas de manto, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B. Também houve associação de Ki-67 à intensidade de fluorescência média de CD38.

Conclusão: A expressão de Ki-67 avaliada por citometria de fluxo pode ser útil no diagnóstico de neoplasias de células B maduras. São necessários mais estudos para validar a avaliação Ki-67 com imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Palavras-chave: Citometria de Fluxo; Imunofenotipagem; Antígeno Ki-67.

INTRODUCTION

Mature B-cell neoplasms (MBCN) are a heterogeneous group of diseases that have rearranged immunoglobulin gene, characterized by a monoclonal B-cell lymphoid population that usually has kappa or lambda restriction ¹. In the course of disease, there is progressive accumulation of clonal cells, causing lymphocytosis, infiltration of bone marrow and other tissues ². The current classification of MBCN is based in the assesment of clinical, morphological, immunophenotypic and genetic data ³.

Uncontrolled proliferation is a key feature of tumor cells and, in most cases, the percentage of proliferating cells provides the biological behavior and clinical course of the disease ⁴. Ki-67 is a nuclear protein associated with cell proliferation that is expressed in all active stages of cell division, both in normal and leukemic cells, and contributes to cell cycle regulation ⁵⁻⁷. Therefore, Ki-67 is an excellent marker to establish the growth fraction of a cell population at a certain time and the percentage of tumor cells expressing Ki-67 is used as a proliferation index for evaluating several types of cancers ^{8,9}. Most studies assessing Ki-67 expression in MBCN were performed with immunohistochemistry, which can be influenced by the presence of non-malignant reactive cells between tumor cells, different methodologies used in sample processing and interoperator variations ^{10,11}. This study was conducted to establish the expression of Ki-67 on B-cell lymphocytes of MBCN with a flow cytometry methodology.

METHOD

Flow cytometry staining for intracellular Ki-67 was performed in samples from 147 patients diagnosed with MBCN, according to the World Health Organization criteria ³. The exclusion criteria were known previous treatment for B-cell neoplasms and presence of other hematological malignancies. Data were obtained in reports provided by the medical assistants.

The flow cytometric analysis was processed as reported elsewhere ¹². Briefly, samples were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs) against CD45 FITC and CD19 APC. Red blood cells were lysed with Human BD Phosflow Lyse/Fix Buffer. Cells were washed and incubated with Fix/Perm Buffer (Transcription Factor Buffer Set). Cells were washed and incubated with Perm/Wash Buffer (Transcription Factor Buffer Set) and 5 μ L of Ki-67 PerCP-Cy 5.5 MoAb (clone B56). Cells were washed and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). All samples were processed within 48-hours of collection ¹³. All reagents were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Cells were

acquired on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Analyses were carried out with CytoPaint Classic 1.1 (Leukocyte, Pleasanton, CA, USA). Expression intensity of CD19 and CD45 were used to gate B-cell population; the percentage and relative mean fluorescence intensity (MFI) of Ki-67 expression in CD19⁺/CD45^{bright} B-cell lymphocytes were recorded. MFI of CD5, CD10, CD19, CD20, CD23, CD38 and CD45 of MBCN cells were also registered.

Statistical analysis was performed with ANOVA and comparisons were adjusted by the Bonferroni test. Association of variables with Ki-67 MFI was evaluated by the correlation test of Spearman. Backwards multiple linear regression, including variables associated with MFI of Ki-67 with $P < 0.2$, was performed to identify factors independently associated to it, when variables had co-linearity, the more representative was included in the analysis. Data were analyzed with SPSS v.18.0 (Chicago, IL, USA), and differences were considered significant when $P < 0.05$.

This study was conducted from October, 2014, to October, 2015 in accordance with the Declaration of Helsinki and current laws in Brazil. This study was performed after approval of the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (14-0104). Written informed consent was deemed unnecessary.

RESULTS

This study included 94 chronic lymphocytic leukemias (CLL) (63.9%); 5 atypical chronic lymphocytic leukemias (aCLL) (3.4%); 19 marginal zone lymphomas (12.9%); 9 lymphoplasmacytic lymphomas (6.1%); 9 mantle cell lymphomas (MCL) (6.1%); 5 follicular lymphomas (3.4%); 2 hairy cell leukemias (1.4%); 2 Burkitt lymphomas (1.4%) and 2 diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) (1.4%). Sample characteristics separated per disease category are shown in table 1. Expression of Ki-67 of MBCN samples included in the study is shown in table 2.

MCL cases had higher Ki-67 expression compared to CLL, aCLL, lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma cases ($P < 0.05$). MFI and percentage of Ki-67 expression was significantly higher in Burkitt lymphoma and DLBCL samples compared to the remaining cases and Burkitt lymphoma cases had the highest Ki-67 MFI ($P < 0.001$) (figure 1). Statistical analysis demonstrated association of Ki-67 MFI in CD19⁺ events with MFI of

CD38 and CD20, and percentage of CD19 and lymphocytes on the samples. After multivariable analysis, MFI of CD38 expression remained significantly associated with MFI of Ki-67 ($P < 0.001$).

DISCUSSION

In our study, MFI of Ki-67 among different MBCN was associated with MFI of CD38 in leukemic cells. Also, the proliferation index – measured by Ki-67⁺ percentage and Ki-67 MFI in CD19⁺ events – was higher in MBCN that have more aggressive clinical courses compared to indolent diseases.

Few studies have evaluated Ki-67 expression with flow cytometry. Landberg and Roos (1991) evaluated Ki-67 expression in non-Hodgkin lymphoma (NHL) cells and the percentage of expression allowed for the discrimination between high and low grade lymphomas¹⁴. In another study, Ki-67 staining was able to help differentiate between low, intermediate and high grade NHL¹⁵. Our results are similar to those, with more aggressive diseases presenting higher proliferative index.

Ki-67 expression in samples from CLL has been evaluated with flow cytometry. Most studies evidenced low proliferative index and higher Ki-67 expression was identified in samples from patients with advanced clinical stage or after cytokine stimulation¹⁶⁻²². Similar results were obtained with an in vitro proliferation study of MCL cells²³. Those are in accordance with the low Ki-67 expression of CLL samples from our study, since we only included patients recently diagnosed. Given that our MCL group included some blastic variant samples, it had a higher and more variable Ki-67.

In a previous study, CLL subclones were separated according to their CD38 expression, Ki-67 expression was found with more frequency in the CD38⁺ population and cells with higher CD38 MFI presented higher Ki-67 percentage²⁴. Lin et al. (2008) sorted CLL cells from bone marrow or peripheral blood according to their Ki-67 expression; Ki-67⁺ B-cells compartment contained a significantly higher number of CD38⁺ leukemic cells compared to B-cells not expressing Ki-67; interestingly, they did not find differences in Ki-67 or CD38 expression in samples collected in the same day from different sites of the same patient²⁵. CD38 is expressed by activated B-cells and it was observed that CD38 expression was significantly higher in the proliferative fraction of CLL cells, this subset also has a higher number of cells

with Ki-67 expression ²⁶. We observed an association of MFI of Ki-67 and CD38, considering all neoplasms and different sample types included in our study.

Herishanu et al. (2011) used flow cytometry to evaluate Ki-67 expression in CLL cells from different sites and they identified higher expression on lymph nodes, compared to peripheral blood and bone marrow samples ²⁷. We only had one lymph node sample from a follicular lymphoma case and its Ki-67 expression was low (5.5%, MFI of 10.2).

Immunophenotyping by flow cytometry is a method of cytological analysis, which allows for the identification and characterization of cells in suspension ^{28,29}. A major advantage of flow cytometry is the possibility of methodology standardization for assessing multiple parameters on a single cell, as well as staining of more than one antigen ³⁰. The International Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium investigated the impact of immunohistochemical staining procedures and interoperator variation for the quantification of several markers in DLBCL and observed that Ki-67 expression had low reproducibility among the participant laboratories ¹¹. In our study, we used a flow cytometry approach to assess Ki-67 expression in different MBCN, flow cytometry has a methodological advantage compared to the current standard methodology for evaluation of Ki-67 expression considering that immunophenotyping procedures can be standardized and validated for use in laboratories worldwide, cell of interest can be gated and test results are ready within hours.

Our study has some limitations. The major one is the inclusion of normal residual B-cells within the heterogeneous population of clonal lymphocytes on samples. Besides, MCL cases were considered together as one group, regardless of variant type, and we had few cases of some types of MBCN. Also, we only had access to immunophenotyping and biopsy results as complementary tests for the disease entity definition, the latter provided by different laboratories.

CONCLUSION

In summary, in our study, Ki-67 expression was higher in MCL, Burkitt lymphoma and DLBCL cases; and was associated with MFI of CD38. Assessment of Ki-67 expression with flow cytometry has potential to be used in the differential diagnosis of MBCN and other neoplasms. More studies are needed to compare Ki-67 expression with flow cytometry and

immunohistochemistry in order to validate the flow cytometry methodology for diagnostic and research purposes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the FIPE/HCPA for the financial support.

REFERENCES

1. Kaushansky K, Williams WJ. *Williams hematology*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
2. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.
3. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
4. Sheval EV, Churakova JV, Dudnik OA, Vorobjev IA. Examination of the proliferative activity of tumor cells in human lymphoid neoplasms using a morphometric approach. *Cancer*. 2004;102(3):174-185.
5. Chen WJ, He DS, Tang RX, Ren FH, Chen G. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(2):411-420.
6. Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M. Proliferation marker pKi-67 affects the cell cycle in a self-regulated manner. *J Cell Biochem*. 2002;87(3):334-341.
7. Van Bockstaele DR, Lan J, Snoeck HW, Korthout ML, De Bock RF, Peetermans ME. Aberrant Ki-67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis. *Cytometry*. 1991;12(1):50-63.
8. Klapper W, Hoster E, Determann O, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop*. 2009;2(2):103-111.
9. Landberg G, Tan EM, Roos G. Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle. *Exp Cell Res*. 1990;187(1):111-118.
10. Martinez AE, Lin L, Dunphy CH. Grading of follicular lymphoma: comparison of routine histology with immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(7):1084-1088.

11. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):805-812.
12. Marcondes NA, Fernandes FB, Alegretti AP, Faulhaber GA. Expression of Bruton's tyrosine kinase in B-cell neoplasms evaluated by flow cytometry. *Clin Exp Med*. 2016.
13. Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(5):286-290.
14. Landberg G, Roos G. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. *Acta Oncol*. 1991;30(8):917-921.
15. Brons PP, Raemaekers JM, Bogman MJ, et al. Cell cycle kinetics in malignant lymphoma studied with in vivo iododeoxyuridine administration, nuclear Ki-67 staining, and flow cytometry. *Blood*. 1992;80(9):2336-2343.
16. Aydin A, Elnaggar A, Robertson L, Keating M, Huh Y. IL-2 receptor expression and ki-67 flow cytometric analysis in B-chronic lymphocytic-leukemia. *Int J Oncol*. 1995;7(6):1433-1436.
17. Konikova E, Kusenda J. Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma*. 2003;50(1):31-40.
18. McManus AP, Desai ZR, Lavabre-Bertrand T. B-cell chronic lymphocytic leukaemia populations respond stochastically to combinations of growth signals in vitro. *Leuk Res*. 1993;17(6):477-481.
19. Bennett F, Rawstron A, Plummer M, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells show specific changes in membrane protein expression during different stages of cell cycle. *Br J Haematol*. 2007;139(4):600-604.
20. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, et al. More on the determination of Ki-67 as a novel potential prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2010;34(12):e326-328.
21. Cheng S, Ma J, Guo A, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014;28(3):649-657.
22. Mittal AK, Chaturvedi NK, Rohlfen RA, et al. Role of CTLA4 in the proliferation and survival of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2013;8(8):e70352.

23. Castillo R, Mascarenhas J, Telford W, Chadburn A, Friedman SM, Schattner EJ. Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40 ligation and IL-4. *Leukemia*. 2000;14(2):292-298.
24. Damle RN, Temburni S, Calissano C, et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*. 2007;110(9):3352-3359.
25. Lin TT, Hewamana S, Ward R, et al. Highly purified CD38 sub-populations show no evidence of preferential clonal evolution despite having increased proliferative activity when compared with CD38 sub-populations derived from the same chronic lymphocytic leukaemia patient. *Br J Haematol*. 2008;142(4):595-605.
26. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, et al. Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1374-1382.
27. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-574.
28. Duarte AJdS. *Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa*. São Paulo: Atheneu; 2013.
29. de Tute RM. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology*. 2011;58(1):90-105.
30. Soares A, Govender L, Hughes J, et al. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods*. 2010;362(1-2):43-50.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Box-plot diagram of Ki-67 mean fluorescence expression in mature B-cell neoplasms (the line shows the mean). Abbreviations: CLL: chronic lymphocytic leukemia; aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia; MZL: marginal zone lymphoma; LPL: lymphoplasmacytic lymphoma; MCL: mantle cell lymphomas; FL: follicular lymphoma; HCL: hairy cell leukemia; BL: Burkitt lymphoma; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma. * BL MFI was higher than all other groups, $P < 0.001$. ** DLBCL MFI was higher than other groups, except BL cases, $P < 0.001$.

Table 1. Characteristics of the samples included in the study, separated by disease.

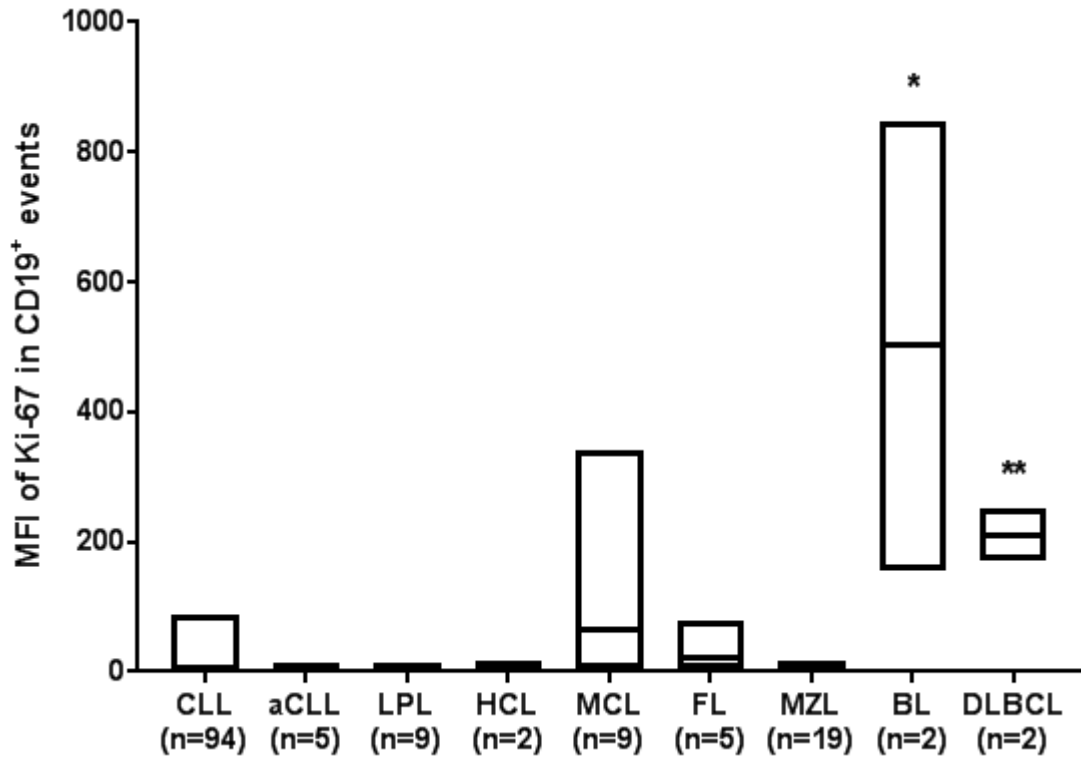
	CLL (n=94)	aCLL (n=5)	LPL (n=9)	HCL (n=2)	MCL (n=9)	FL (n=5)	MZL (n=19)	BL (n=2)	DLBCL (n=2)
Sample									
Bone marrow	38 (40.4%)	1 (20.0%)	8 (88.9%)	2 (100%)	6 (66.7%)	4 (80.0%)	12 (63.2%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)
Peripheral blood	56 (59.6%)	4 (80.0%)	1 (11.1%)	0	3 (33.3%)	0	7 (36.8%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)
Lymph node	0	0	0	0	0	1 (20.0%)	0	0	0
Sample counts									
Lymphocytes (%)	69.53 (±18.23)	76.87 (±14.30)	39.10 (±24.82)	60.75 (±0.57)	58.73 (±26.19)	64.28 (±26.75)	45.68 (±21.40)	49.21 (±19.34)	62.55 (±24.02)
CD19 ⁺ (% of lymphocytes)	62.72 (±20.34)	66.78 (±19.51)	25.11 (±22.85)	20.46 (±17.09)	50.76 (±26.81)	51.60 (±23.80)	33.15 (±20.80)	38.30 (±29.95)	48.23 (±34.90)
MFI of CD20 on neoplastic cells	111.22 (±119.28)	89.16 (±31.73)	489.01 (±271.68)	787.59 (±354.94)	512.60 (±250.64)	397.76 (±211.61)	753.42 (±484.89)	247.85 (±162.25)	203.13 (±105.90)
MFI of CD38 on neoplastic cells	7.75 (±8.00)	11.78 (±7.50)	22.42 (±20.46)	7.50 (±3.54)	30.48 (±26.71)	34.80 (±44.69)	9.86 (±8.05)	103.19 (±19.06)	40.46 (±49.17)

Data are shown as mean±SD or number (n). Abbreviations: CLL: chronic lymphocytic leukemia; aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia; MZL: marginal zone lymphoma; LPL: lymphoplasmacytic lymphoma; MCL: mantle cell lymphomas; FL: follicular lymphoma; HCL: hairy cell leukemia; BL: Burkitt lymphoma; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma.

Table 2. Ki-67 expression on mature B-cell neoplasms, separated by disease.

	CLL	aCLL	LPL	HCL	MCL	FL	MZL	BL	DLBCL
	(n=94)	(n=5)	(n=9)	(n=2)	(n=9)	(n=5)	(n=19)	(n=2)	(n=2)
Ki-67 ⁺ / CD19 ⁺ (% of total events)	1.63	1.67	0.81	0.99	11.99	3.28	1.56	35.79	38.10
	(±1.32)	(±2.07)	(±0.70)	(±0.95)	(±16.72)	(±2.84)	(±1.25)	(±31.57)	(±30.17)
MFI of Ki-67 in CD19 ⁺ events	7.3	4.6	7.8	8.8	63.3	21.3	9.0	501.6	210.6
	(±12.0)	(±1.7)	(±3.8)	(±1.3)	(±114.1)	(±32.9)	(±5.0)	(±490.8)	(±55.9)

Data are shown as mean±SD. Abbreviations: CLL: chronic lymphocytic leukemia; aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia; MZL: marginal zone lymphoma; LPL: lymphoplasmacytic lymphoma; MCL: mantle cell lymphomas; FL: follicular lymphoma; HCL: hairy cell leukemia; BL: Burkitt lymphoma; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma.



9.1. STROBE STATEMENT— Ki-67 EXPRESSION IN MATURE B-CELL NEOPLASMS: A FLOW CYTOMETRY STUDY

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	79
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	80
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	81
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	81
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	81
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	81-82
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	81
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	81-82
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	82
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	81-82
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	81
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	82
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	82
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	NA
		(c) Explain how missing data were addressed	NA
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed	82

		eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	NA
		(c) Consider use of a flow diagram	NA
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	82 and 88
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	82
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	NA
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	NA
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	NA
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	NA
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	83
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	83- 84
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	84
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	84
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	85

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

N/A: not applicable.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of

Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão de BTK se mostrou similar dentre os casos e controles incluídos neste trabalho, não sendo identificada nenhuma variável associada com a expressão ou com a intensidade de expressão deste marcador. Mais estudos são necessários para avaliar possíveis alterações na expressão de BTK pelas células neoplásicas ao longo do tratamento de DLPC-B.

A avaliação da expressão de Ki-67 mostrou diferenças significativas entre as DLPC-B incluídas neste estudo. Neoplasias consideradas mais agressivas apresentaram maior expressão de Ki-67 comparadas a neoplasias de curso clínico indolente. A intensidade de expressão de Ki-67 foi associada à intensidade de expressão de CD38, marcador associado a pior prognóstico em estudos com LLC. Mais estudos são necessários para validar a avaliação deste marcador por técnica de citometria de fluxo e torná-lo parte da rotina para diagnóstico de neoplasias hematológicas por esta metodologia.

A citometria de fluxo é uma técnica rápida que permite a análise simultânea e individualizada de diversos parâmetros em células neoplásicas ou normais, as quais podem ser obtidas a partir de líquidos ou tecidos corporais. A única desvantagem apresentada em relação à imunohistoquímica é a perda da estrutura de organização celular em tecidos sólidos, nestes casos deve ser utilizada como técnica complementar.

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

Após a conclusão deste trabalho, ficam como possibilidades de trabalhos futuros a avaliação da expressão de BTK em LLA B e comparação com a expressão em precursores linfoides B (hematogônias), o monitoramento da expressão de BTK ao longo do tratamento de DLPC-B e correlação dos achados com curso clínico e resposta terapêutica, bem como a avaliação da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo em outras neoplasias hematológicas e correlação com demais achados imunofenotípicos e a validação da metodologia para detecção da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo, por meio de estudo comparativo com técnica de imunohistoquímica, de modo a possibilitar seu uso em pesquisa e na rotina laboratorial.

12. ANEXOS

12.1. CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 14-0104 NO CEP/HCPA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140104

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

GUSTAVO ADOLPHO MOREIRA FAULHABER

FLAVO BENO FERNANDES

ANA PAULA ALEGRETTI

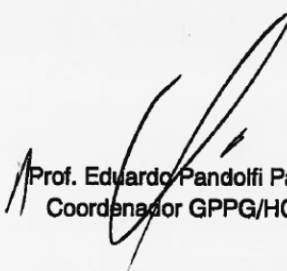
NATALIA AYDOS MARCONDES

Título: Avaliação da expressão de BTK e STAT3 em doenças linfoproliferativas crônicas de linhagem B por citometria de fluxo

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 31 de março de 2014.


Prof. Eduardo Pandolfi Passos
Coordenador GPPG/HCPA

12.2. PROTOCOLO DE CITOMETRIA DE FLUXO

12.2.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES

1 – *Lyse/fix buffer 5x*: diluir com água destilada ou deionizada para se obter uma solução 1x e pré-aquecer a solução a 37°C. Solução preparada: tampão de lise/fixação 1x.

2 – *BD Pharmingen TF fix/perm buffer 4x* (parte do *Transcription Factor Buffer Set*): inverter a solução estoque cinco vezes para homogeneizar. Diluir a solução utilizando o *BD PharmingenTF diluent buffer* para se obter um volume de 1x na solução de trabalho. Utilizar a solução até 1 hora após o preparo. Manter em gelo ou geladeira durante o protocolo de marcação intracelular. Solução preparada: tampão de fixação/permeabilização 1x.

3 – *BD Pharmingenperm/wash buffer 5x* (parte do *Transcription Factor Buffer Set*): inverter a solução estoque cinco vezes para homogeneizar. Diluir a solução usando água deionizada para se obter um volume de 1x na solução de trabalho. A solução pode ser armazenada por até uma semana entre 2°C e 8°C. Manter em gelo ou geladeira durante o protocolo de marcação intracelular. Solução preparada: tampão de permeabilização/lavagem 1x.

12.2.2. MARCAÇÃO DAS CÉLULAS

1 – Pipetar um volume de amostra que contenha cerca de 1.000.000 células em um tubo de poliestireno, 20µL de CD45 FITC e 20µL de CD19 APC, incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.

2 – Lisar os eritrócitos e fixar as células pela adição de 20x o volume utilizado de amostra do tampão de lise/fixação 1x, incubar por 10 minutos a 37°C.

3 – Centrifugar a amostra a 2.500 RPM por 5 minutos, aspirar o sobrenadante e lavar a amostra com tampão fosfato salino (PBS).

4 – Centrifugar a amostra a 2.500 RPM por 5 minutos, aspirar o sobrenadante e ressuspender a amostra por 3 segundos utilizando um vórtex.

5 – Adicionar 1 mL de tampão de fixação/permeabilização 1x, incubar a amostra por 45 minutos a 2-8°C, protegido da luz.

6 – Adicionar 1 mL de tampão de permeabilização/lavagem 1x, centrifugar a amostra a 2.500 RPM por 5 minutos, aspirar o sobrenadante.

7 – Adicionar 2 mL de tampão de permeabilização/lavagem 1x, centrifugar a amostra a 2.500 RPM por 5 minutos, aspirar o sobrenadante.

8 – Adicionar 200 µL de tampão de permeabilização/lavagem 1x à amostra, pipetar 20µL de BTK PE e 5µL de Ki-67 PerCP-Cy5.5, homogeneizar no vórtex durante 10 segundos, incubar

por 45 minutos a 2-8°C, protegido da luz. * Realizar a marcação com Ki-67 PerCP-Cy5.5 somente nos pacientes com diagnóstico de DLPC-B (casos).

9 –Homogeneizar a amostra, adicionar 2 mL de tampão de permeabilização/lavagem 1x, centrifugar a 2.500 RPM por 5 minutos, aspirar o sobrenadante.

10–Adicionar 2 mL de tampão de permeabilização/lavagem 1x, centrifugar a amostra a 2.500 RPM por 5 minutos, aspirar o sobrenadante. Ressuspender a amostra em 350 µL de PBS e adquirir em seguida.

12.2.3. AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS GRÁFICOS

Adquirir pelo menos 50.000 eventos em um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ de quatro cores, utilizando o *software* BD CellQuest™ Pro, após procedimento diário de controle de qualidade (calibrador BD Calibrite™). Analisar os gráficos com o *software* Cytosoft Classic 1.1 – selecionar a região de linfócitos B pela distribuição FSC x SSC (tamanho e complexidade) e pela expressão de CD19⁺ e CD45^{forte}; avaliar o percentual de expressão de BTK e Ki-67 e a IFM dos marcadores. Anotar os resultados no banco de dados.

