

Relatório: Fração de linfócitos - Métodos para estimar a presença de células B e T

Jean Resende

2023-06-08

Fração de linfócitos

Contextualização

A progressão do tumor e o sucesso das terapias anticancerígenas são influenciadas pela composição e a densidade das células imunes no microambiente tumoral. As técnicas recomendadas com a finalidade de estudar tais células são: citometria de fluxo, coloração imuno-histoquímica ou sequenciamento de célula única. Geralmente, bases de dados de sequenciamento de RNA (RNA-seq). Sendo assim, torna-se necessário a aplicação de métodos computacionais para estimar a composição de células imunes a partir dos dados RNA-Seq.

Há vários métodos computacionais propostos recentemente que prometem estimar a fração de células imunes em dados de sequenciamento do tipo RNA-Seq. Porém, diferentes métodos utilizam diferentes cálculos, trilham caminhos diferentes e conseqüentemente geram resultados que contradizem com outro método. Alguns métodos de quantificação de células imunes olham para a matriz de expressão gênica, e a partir de genes marcadores e/ou deconvolução estimam a composição celular. Outros métodos como MiXCR e TRUST4 (dentre outros) olham para o dado bruto do sequenciamento, ou seja, não olham a matriz de expressão gênica, mas sim as leituras que se alinham a região do transcriptoma referente ao receptor de células B/T por exemplo.

Nosso trabalho é direcionado às células B e T a partir de dados brutos de RNA-Seq. Isso faz com que utilizemos um método que acesse as leituras brutas do sequenciamento e então estime a composição dessas células. (1) Mas será que os métodos que utilizam genes marcadores ou os que são baseados em deconvolução estimam a presença de células B e T assim como os métodos TRUST4/MiXCR que olham diretamente para o dado bruto? (2) Quais métodos podemos utilizar em nosso trabalho, reforçando a presença de células B e T?

Metodologia

Fiz uma revisão de literatura sobre os principais métodos de quantificação de linfócitos aplicados na imunooncologia. O artigo Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology foi o trabalho que me debrucei mais, pois os autores avaliaram os principais métodos de quantificação de tipos celulares da imunooncologia. Os métodos que eles avaliaram foram: CIBERSORT, EPIC, MCP-counter, quanTIseq, TIMER e xCell. Os métodos que eles recomendaram foram: EPIC, MCP-counter, xCell e quanTIseq (<https://academic.oup.com/view-large/137497314>).

EPIC e **quanTIseq** utilizam regressão de mínimos quadrados restrito para inferir frações a partir de uma matriz de assinatura e da expressão gênica em massa. Já o método **CIBERSORT** utiliza *v-Support Vector Regression* também sob uma matriz de assinatura. Já o método **MCP-counter** utiliza a expressão de genes marcadores em amostras heterogêneas, quantificando cada tipo de célula de forma independente. O **xCell**

também utiliza expressão de genes marcadores, no entanto aplica um teste estatístico de enriquecimento. Tanto o quanTIseq quanto o EPIC geram pontuações relativas à quantidade total de células sequenciadas.

A extração dos TCR e BCR por meio do TRUST4 como já vimos antes foi bem sucedida. Identificamos TCR e BCR nas amostras e começamos a visualizar um padrão relacionando a contagens desses receptores e o perfil esteroidal. Sendo assim, a primeira análise que fiz, foi utilizar os métodos indicados por Sturm et al. (2019) nos dados públicos de ACC (ou seja, a matriz de expressão gênica disponível no TCGA). Porém, o foco do estudo é direcionado para as células B e T, então tentei retirar dos métodos as células que eram diferentes de B e T, assim como fizemos com o CIBERSORT. Tais métodos utilizam métricas diferentes, ou seja, não posso aplicar a mesma lógica que apliquei no CIBERSORT.

Resultados

A Figura 1 mostra o resultado desta primeira análise. Porém, não consegui retirar as células diferentes de B e T para os métodos EPIC e quanTIseq, pois são métodos que geram uma fração (variando de 0 a 1) então teria que alterar na matriz de referência, mas esses dois métodos utilizam outros objetos de referência além da matriz. No entanto, consegui remover as células diferentes de B e T para os métodos MCP-counter e xCell, pois esses métodos não geram frações, mas sim pontuações e por causa disso, posso considerar apenas as células de interesse.

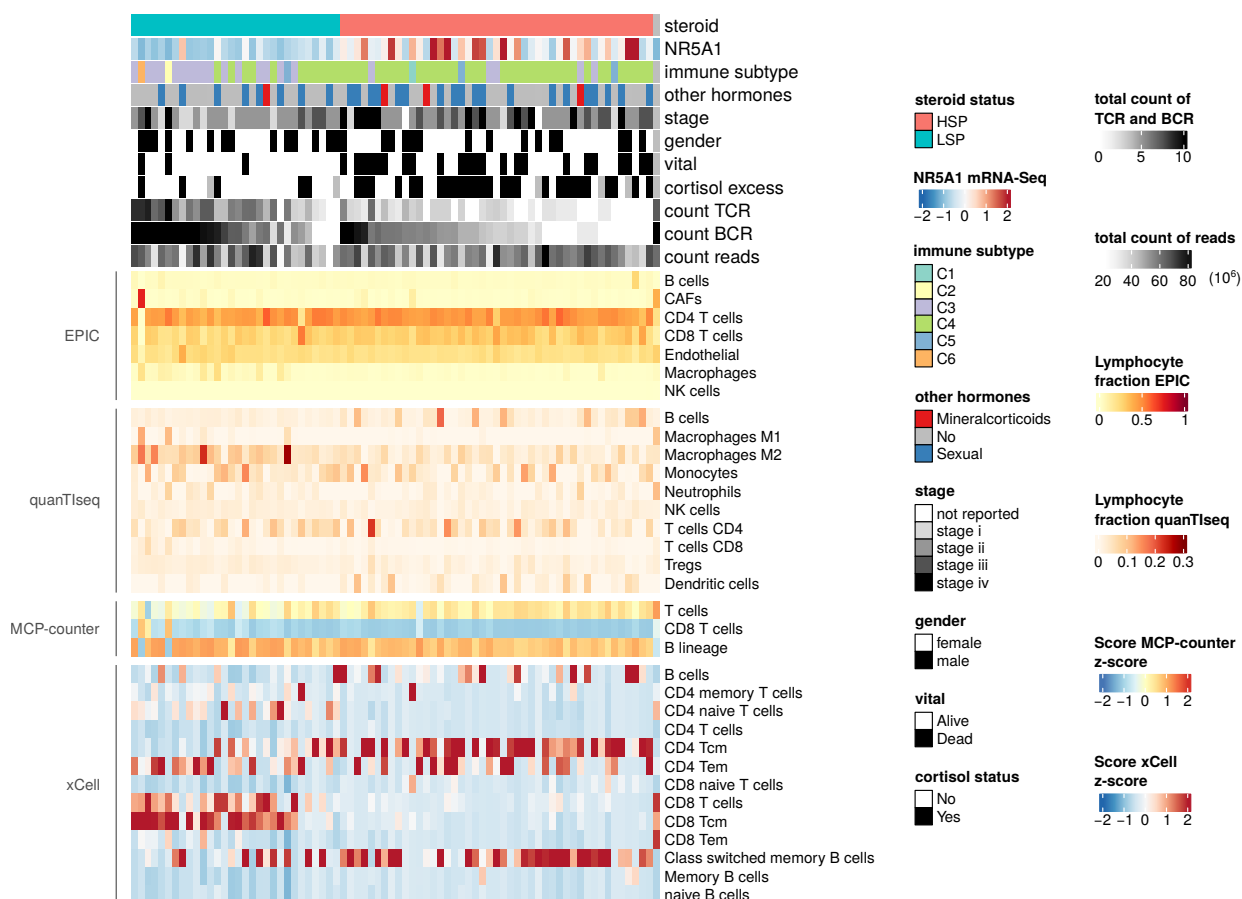


Figure 1: Figura 1

O xCell mostrou um perfil interessante, mais parecido com as contagens que encontramos com o TRUST4. Apesar disso, o xCell indicou uma presença de células T e B que o TRUST4 não encontrou. O xCell separa

algumas subcategorias dessas células, isso o TRUST4 não faz. O TRUST4 encontrou mais células T em low steroid, e o xCell encontrou mais células CD8 Tcm, CD8 T e CD4 naive T. Mas o xCell apontou para uma presença maior de células CD4 Tcm para high steroid e uma presença parecida entre low steroid e high steroid (não fiz teste estatístico, são hipóteses com base na visualização).

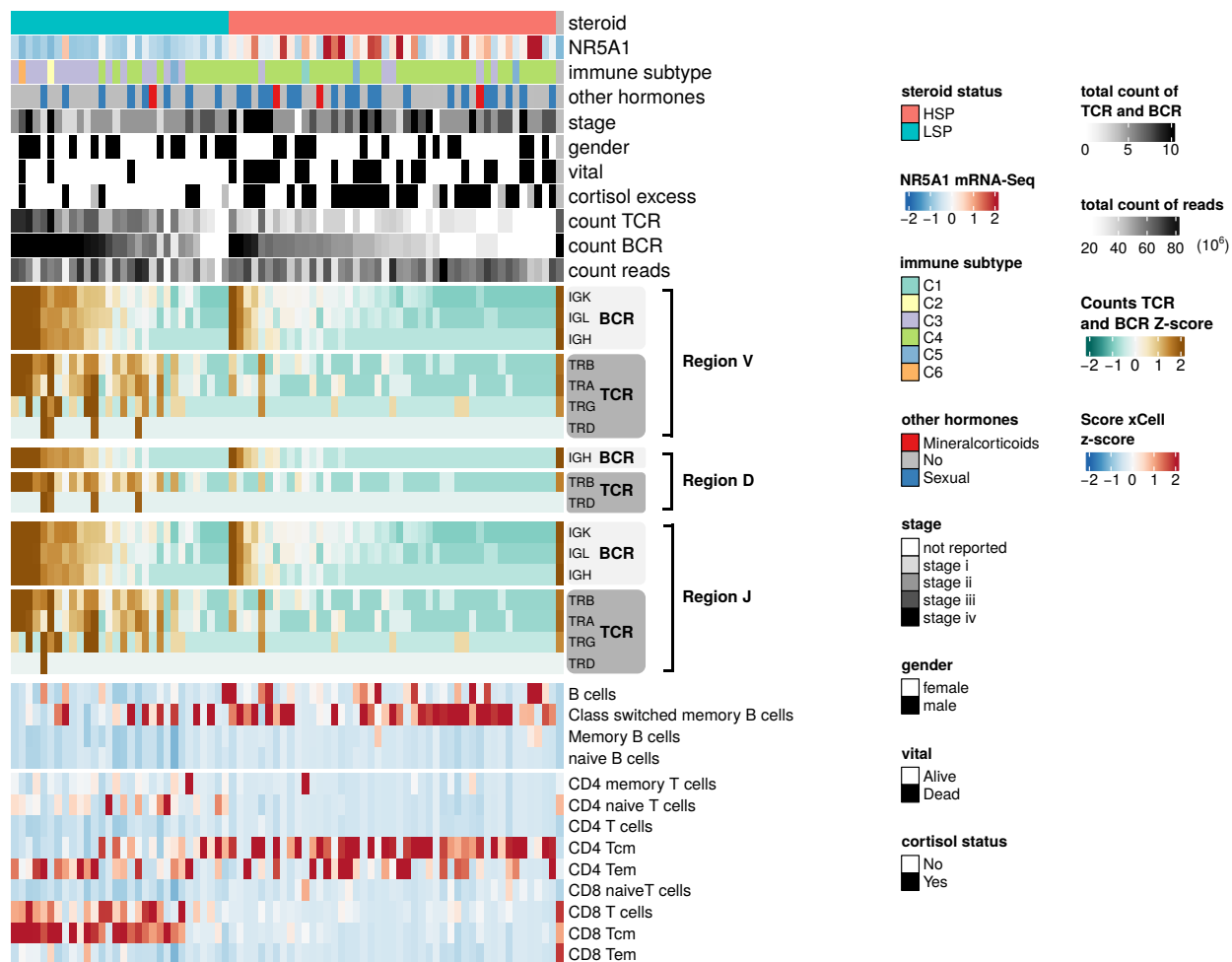


Figure 2: Figura 2

Discussão

O xCell foi o método que mais se aproximou da extração de TCR e BCR com o TRUST4, comparado com os outros métodos (EPIC, quanTIseq e MCP-counter). Prefiro utilizá-lo como o método de quantificação de tipo celular baseado na matriz de expressão gênica em conjunto com o TRUST4 que olha para os dados brutos. Outro ponto que reforça esta escolha é que muitos trabalhos tem utilizado o xCell, inclusive o trabalho que o João publicou em 2021.

Expressão de TCR e BCR

Contextualização

Visto que o número de leituras de TCR e BCR pode depender do total de leituras do sequenciamento, defini a expressão dos receptores sendo: $TCR/BCR = Mi/(Ni + Mi)$ em que i corresponde a cada amostra, M é o número de leituras que mapeiam para um BCR/TCR específico e N é o número de leituras que mapeiam para qualquer outra coisa no genoma. Esse cálculo é usado para esta finalidade - expressão de BCR e TCR específicos (Pineda et al., 2021, Yu et al., 2022, Selitsky et al., 2019).

Olhar somente as contagens de TCR e BCR sem considerar o tamanho da biblioteca (quantidade de leituras sequenciadas pelo RNA-Seq) pode ser algo perigoso, pois essas amostras não tem uma quantidade padronizada de tamanho de biblioteca. Sendo assim, uma amostra pode ter mais/menos contagens de TCR/BCR quando comparada a outra, e essa diferença ser devido a quantidade de leituras a mais/menos que esta amostra tem em relação a outra.

Metodologia

Apliquei a fórmula $TCR/BCR = Mi/(Ni + Mi)$ sob as contagens de TCR e BCR resultantes do TRUST4. Para uma amostra i , inseri como valor Mi a contagem de um TCR/BCR. Para o valor de Ni inseri a quantidade de leituras da amostra i resultante do controle de qualidade feita pelo FastQC (um dos resultados desta ferramenta foi a quantidade de leituras sequenciadas).

Resultados

A Figura 3 mostra a expressão dos TCR e BCR com base no cálculo apresentado acima. É possível observar um perfil visual parecido com a contagem bruta (Figura 2). No entanto, algumas amostras, assim como algumas cadeias de receptores evidenciaram mais a expressão dos TCRs e BCRs. Também nota-se que

Discussão

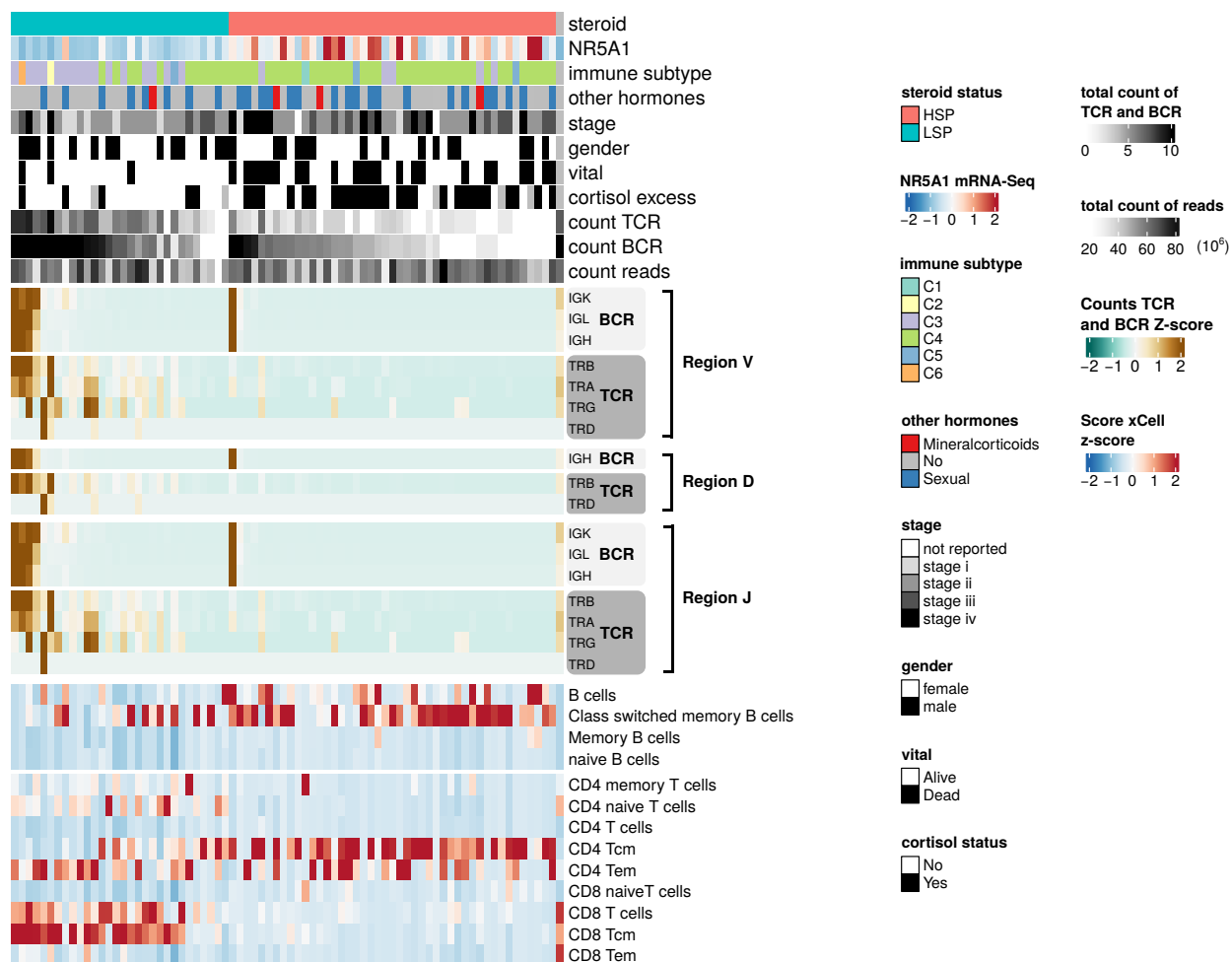


Figure 3: Figura 3

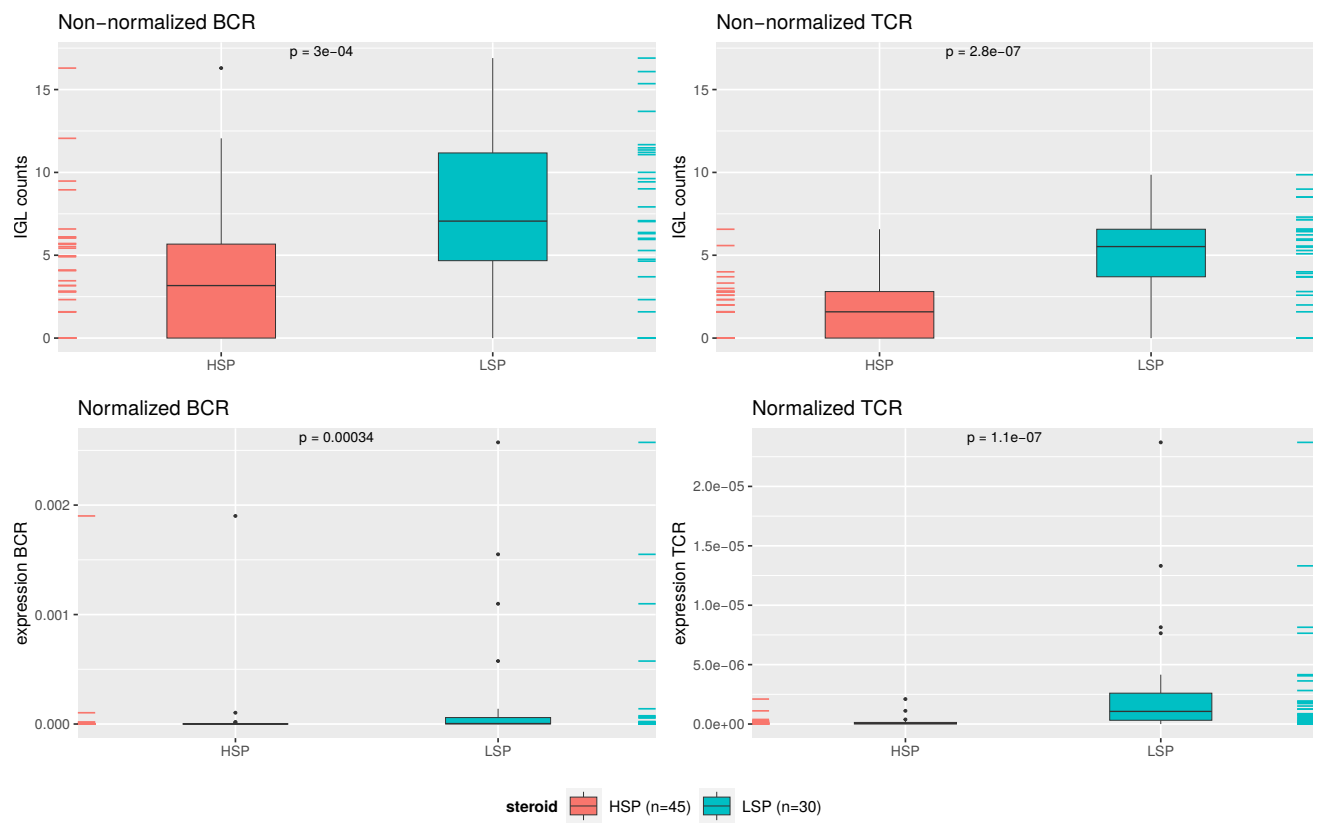


Figure 4: Figura 4