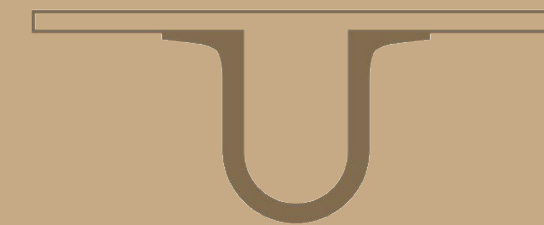




UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA



Melissa Melo de Oliveira

**CONTRIBUTO DA IMUNOFENOTIPAGEM POR  
CITOMETRIA DE FLUXO PARA O DIAGNÓSTICO  
DAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS**

VOLUME 1

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientado pelo Professor Doutor Artur Augusto Paiva e pela Professora Doutora Paula Cristina Veríssimo Pires e apresentado à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018



Melissa Melo de Oliveira

# Contributo da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo para o diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas

Relatório de estágio realizado no âmbito do Mestrado em Bioquímica, apresentado ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, orientado pelo Professor Doutor Artur Augusto Paiva (Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital e Universitário de Coimbra) e pela Professora Doutora Paula Cristina Veríssimo Pires (Coordenadora do Mestrado em Bioquímica, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra).

Setembro, 2018



**FCTUC** FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Artur Augusto Paiva, pela oportunidade de realizar o estágio na Unidade de Gestão Operacional de Citometria do serviço de Patologia Clínica, do centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Agradeço pela ajuda prestada ao longo do estágio, pelos conhecimentos partilhados, e pela orientação na realização deste relatório de estágio.

Agradeço também a Professora Doutora Paula Cristina Veríssimo Pires pelo apoio prestado ao longo deste ano e pela dedicação no auxílio aos alunos do mestrado em Bioquímica.

Agradeço a todo o serviço (Susana Pedreiro, Sandra Silva, Isabel Silva, Susana Santos, Anabela Carvalho, Patrícia Tomé, Paula Laranjeira e Carmen Sierra) que me apoiou ao longo do percurso e que me forneceu ajuda no trabalho prático e no manuseamento de todo o equipamento.

Obrigada à Universidade de Coimbra e ao mestrado de Bioquímica por todo o conhecimento e competências adquiridas ao longo destes 2 anos.

Finalmente, agradeço a todos os que me apoiaram, principalmente a família e amigos.



## Resumo

A imunofenotipagem por Citometria de Fluxo multiparamétrica (CF) é uma técnica que tem sido utilizada para o diagnóstico, classificação, prognóstico e monitorização da terapêutica de neoplasias hematológicas. Nos critérios mínimos de diagnóstico, a análise de células da medula óssea (MO) por CF foi sugerida como um co-critério para o diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicas (SMD) pela Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de Neoplasias Mieloides e Leucemia Aguda de 2016. A sensibilidade e especificidade das técnicas moleculares e citogenéticas, principalmente a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), utilizada no diagnóstico da SMD, podem ser melhoradas através da separação celular por CF.

Apesar das suas várias vantagens, a imunofenotipagem por CF ainda enfrenta várias limitações ao nível da contribuição para o diagnóstico das SMD, nomeadamente o reduzido conhecimento sobre a maturação da linha eritroide, na MO normal e a falta de marcadores para a caracterização desta mesma linha, o que torna o estudo de displasias associadas pouco sensível. O painel de diagnóstico de Doenças Linfoproliferativas Crónicas de células B (DLPC-B) inclui marcadores cuja expressão mostrou ser alterada na linha eritroide em casos de SMD, nomeadamente o CD43 e o CD49d.

Este trabalho engloba dois grandes objetivos. O primeiro consistiu na separação das células das linhas granulocítica (neutrófilo), monocítica e eritroide, e das células (CD34<sup>±</sup>/CD117<sup>±</sup>) da MO de 55 casos com suspeita de SMD (71 ± 12 anos), correspondendo a 21 mulheres e 34 homens, de forma a aumentar a sensibilidade da técnica de FISH (32 casos processados) e detetar a incidência das alterações genéticas mais frequentes nesta entidade, contribuindo desta forma para o diagnóstico e prognóstico. Foram detetadas anormalidades cromossómicas em apenas 17 dos casos processados, nomeadamente a del (20 q), monossomia do 7, del (7q), del (5q), anomalia (-Y), e a trissomia do 8.

O segundo objetivo consistiu no estudo do padrão de expressão dos marcadores CD43 e CD49d no compartimento CD34<sup>+</sup> da MO normal e na linha eritroide, sendo esta última estudada na MO normal e em casos diagnosticados com SMD. Para isso, foram analisadas 31 amostras de aspirados medulares referentes a 13 amostras de MO normal e 18 amostras de doentes com diagnóstico de SMD. O grupo SMD foi dividido em SMD I (que inclui casos de SMD com displasia unilinha (n=2) e casos com displasia multilinha

(n=6)); SMD II (que inclui casos de SMD com excesso de blastos do tipo 1 (n=3) e tipo 2 (n=7)). Ainda, tendo em conta todos os casos de SMD (n=18), foi definido um terceiro grupo de SMD onde se observou displasia eritroide por morfologia (n=7).

No compartimento CD34<sup>+</sup> normal, a expressão de CD43 e CD49d mostrou ser bastante mais elevada nos precursores hematopoiéticos comprometidos à linha eritroide em comparação com os precursores comprometidos às outras linhas hematopoiéticas. Na linha eritroide normal, observou-se uma diminuição da expressão de CD43 ao longo da maturação, com uma elevada expressão no estágio I e com uma consequente diminuição até ao último estágio. O padrão de expressão de CD49d foi caracterizado por um aumento de expressão do estágio I para o estágio II, por uma expressão mantida entre o estágio II e III e por uma diminuição constante do estágio III até ao último estágio, que apresentou a menor expressão deste marcador. No grupo SMD, a expressão de CD43 e CD49d mostrou seguir o mesmo padrão observado na MO normal, no entanto, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa nos valores da média da intensidade de fluorescência (MIF), em todos os estádios maturativos, para ambos os marcadores, em comparação ao grupo de controlo. Esta diminuição mostrou ser mais acentuada, e com significado estatístico, nos grupos SMD II e SMD com displasia eritroide, quando comparado com o grupo controlo, para ambos os marcadores.

Os resultados obtidos ao longo do trabalho reforçam o contributo da CF no diagnóstico das SMD e apontam para a utilidade dos marcadores CD43 e CD49d na caracterização da maturação eritroide, contribuindo deste modo para expandir o painel de marcadores utilizados para o estudo desta linha, e uma vez que ambos os marcadores estão incluídos no painel de diagnóstico DLPC-B, poderiam contribuir para o diagnóstico concomitante de uma neoplasia crónica de células B e uma possível SMD.

### **Palavras-Chave:**

Síndromes Mielodisplásicas; Citometria de Fluxo; Separação celular (FACS); FISH; CD43; CD49d; Displasia eritroide



## Abstract

Immunophenotyping by multiparameter flow cytometry (FC) is a technique that has been used for the hematologic neoplasm diagnosis, classification, prognosis and therapy monitoring. In the minimum diagnostic criteria, FC analysis of bone marrow (BM) cells was suggested as a co-criterion for the diagnosis of Myelodysplastic Syndromes (MDS) by the 2016 World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. The molecular and cytogenetic techniques sensitivity and specificity, especially fluorescence in situ hybridization (FISH), used in MDS diagnosis, can be improved by FC mediated cell sorting.

Despite its several advantages, FC immunophenotyping still faces several limitations in the contribution to the MDS diagnosis, namely the reduced knowledge about the erythroid maturation in normal MO and the lack of erythroid characterization markers, which makes the study of associated dysplasia less sensitive. The diagnostic panel for B-cell Chronic Lymphoproliferative Disorder (B-CLPD) includes markers whose expression shown to be altered in the erythroid lineage of MDS cases, namely CD43 and CD49d.

This work consisted of two major objectives. The first consisted on the separation of the cells from the monocytic, granulocytic (neutrophilic) an erythroid lineages and the (CD34<sup>+/+</sup>/CD117<sup>+</sup>) cells from the BM of 55 cases with suspected MDS (71 ± 12 years), corresponding to 21 women and 34 men, in order to increase the FISH technique sensitivity (32 processed cases) and to detect the incidence of the most frequent genetic alterations in this entity, thus contributing to the diagnosis and prognosis. Chromosomal abnormalities were detected in only 17 processed cases, namely del (20q), monosomy 7, del (7q), del (5q), (-Y), and trisomy 8.

The second objective was to study the expression pattern of CD43 and CD49d markers, both included in the diagnostic panel of B-CLPD, in the normal BM CD34<sup>+</sup> compartment and in the erythroid maturation, being the latter studied in the normal BM and in MDS diagnosed cases. For this, 31 samples of BM aspirates were evaluated, of which 13 samples from normal BM and 18 samples from patients diagnosed with MDS. The MDS group was divided into MDS I (which includes MDS cases with single lineage dysplasia (n=2) and with multilineage dysplasia (n=6)); MDS II (which includes MDS cases with excess blasts 1 (n=3) and excess blasts 2 (n=7)). Also, among all MDS cases

(n=18), a third group of MDS with erythroid dysplasia demonstrated by morphology (n=7) was defined.

In the CD34<sup>+</sup> compartment, the expression of CD43 and CD49d shown to be much higher in the hematopoietic precursors compromised with the erythroid lineage compared to the precursors involved with the other lineages. In normal erythroid maturation, there was a decrease in the expression of CD43 across the different stages, with a high expression in stage I and a consequent decrease until the last stage. The expression pattern of CD49d was characterized by an increase in expression levels from stage I to stage II, by maintained expression between stage II and III and by a constant decrease from stage III to the last stage, which presented the lowest expression of this marker. In the MDS group, the expression of CD43 and CD49d showed to follow the same pattern observed in normal BM, however, a statistically significant decrease in mean fluorescence intensity (MFI) values was observed in all maturation stages for both markers, compared to the control group, particularly in MDS II and MDS with morphologic erythroid dysplasia.

The results obtained during this study reinforce the contribution of FC in the MDS diagnosis and point to the usefulness of CD43 and CD49d markers in the erythroid maturation characterization, thus contributing to expand the panel of markers used for the study of this lineage, and since both markers are included in the B-CLPD diagnostic panel, could contribute to the concomitant diagnosis of a chronic B cell disorder and a possible MDS.

**Keywords:**

Myelodysplastic Syndromes; Flow Cytometry; Cell separation (FACS); FISH; CD43; CD49d; Erythroid dysplasia



# Índice

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Síndromes Mielodisplásicas .....	1
1.1.1. Etiologia .....	2
1.1.2. Fisiopatologia.....	3
1.1.3. Alterações cromossómicas .....	3
1.1.4. Classificação.....	4
1.1.4.1. Classificação FAB.....	5
1.1.4.2. Classificação da Organização Mundial de Saúde.....	6
1.1.4.3. Índice Prognóstico Internacional.....	8
1.2. Diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas .....	11
1.2.1. O contributo da Morfologia.....	13
1.2.2. O contributo da Citogenética.....	14
1.2.3. Critérios mínimos.....	16
1.3. Abordagem à Citometria de Fluxo .....	17
1.3.1. Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo .....	19
1.3.2. O contributo da Imunofenotipagem no diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas .....	20
1.3.2.1 Imunofenotipagem das amostras de medula óssea .....	22
1.3.3. Identificação de populações celulares na medula óssea por Citometria de Fluxo.....	23
1.3.3.1. Caracterização imunofenotípica da medula óssea normal.....	23
1.3.3.2. Principais alterações fenotípicas na Síndrome Mielodisplásica .....	24
1.3.4. O contributo da separação celular no diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas. 26	
1.3.4.1. Separador celular- Funcionamento.....	27
1.3.4.2. Utilidade clínica .....	28
1.4. A Síndrome Mielodisplásica associada a outras neoplasias hematológicas.....	29
1.4.1. Relevância do painel de diagnóstico de Doenças Linfoproliferativas Crónicas de células B no diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas.....	30
<b>2. Objetivos do estágio</b> .....	31
2.1. Objetivo 1- Separação celular de amostras de medula óssea com suspeita de Síndrome Mielodisplásica .....	32
2.1.1. Material e métodos .....	33
2.1.1.1. Amostras.....	33
2.1.1.2. Combinação de anticorpos monoclonais para a identificação das populações celulares de interesse.....	33

2.1.1.3. Processamento das amostras .....	34
2.1.1.4. Identificação das populações celulares de interesse para consequente separação .....	36
2.1.1.5. Separação celular.....	37
2.1.2. Resultados e discussão .....	37
2.2. Objetivo 2 - Análise do padrão de expressão do CD43 e CD49d ao longo da maturação eritroide normal e displásica .....	41
2.2.1. Material e métodos .....	44
2.2.1.1. Amostras.....	44
2.2.1.2. Combinação de anticorpos monoclonais para o estudo do compartimento dos precursores hematopoiéticos CD34 <sup>+</sup> .....	45
2.2.1.3. Combinação de anticorpos monoclonais para o estudo da linha eritroide .....	46
2.2.1.4. Processamento das amostras .....	47
2.2.1.5. Aquisição e análise.....	49
2.2.1.6. Análise estatística.....	49
2.2.2. Resultados e discussão .....	50
2.2.2.1. Identificação imunofenotípica do compartimento dos precursores CD34 <sup>+</sup> da medula óssea normal e dos diferentes comprometimentos maturativos .....	50
2.2.2.2. Identificação imunofenotípica da linha eritroide e dos seus estádios maturativos na medula óssea normal .....	54
2.2.2.3. Expressão do CD43 e CD49d na Síndrome Mielodisplásica .....	59
<b>3. Conclusão .....</b>	<b>63</b>
<b>4. Referências.....</b>	<b>64</b>
<b>4. Anexos .....</b>	<b>72</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Classificação de 2016 das SMD proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS). [Adaptado de 25].....	7
<b>Figura 2:</b> Identificação imunofenotípica das populações celulares maioritárias (linha a neutrófilo, monocítica e eritroide) e dos blastos CD34 <sup>+</sup> /CD117 <sup>+</sup> para posterior separação celular.....	36
<b>Figura 3:</b> Representação do compartimento das células precursoras hematopoiéticas CD34 <sup>+</sup> e da expressão diferencial de CD43 e CD49d tendo em conta os diversos comprometimentos maturativos.....	51
<b>Figura 4:</b> Representação dos padrões imunofenotípicos da maturação eritroide na medula óssea normal.....	56
<b>Figura 5:</b> Representação da curva de expressão (média da intensidade de fluorescência (MIF)) dos diversos marcadores utilizados ao longo da maturação eritroide normal.....	57
<b>Figura 6:</b> Representação da curva de expressão (média da intensidade de fluorescência (MIF) ± desvio padrão) dos diversos marcadores utilizados ao longo da maturação eritroide normal, com destaque na expressão do marcador CD43 representado a azul.....	57
<b>Figura 7:</b> Representação da curva de expressão (média da intensidade de fluorescência (MIF) ± desvio padrão) dos diversos marcadores utilizados ao longo da maturação eritroide normal, com destaque na expressão do marcador CD49d representado a verde.....	58

# Índice de Tabelas

<b>Tabela I:</b> Classificação IPSS-R proposta em 2012. [Adaptado de 26] .....	10
<b>Tabela II:</b> Pontuação IPSS-R, proposta em 2012, para os diferentes grupos de risco. [Adaptado de 29].....	10
<b>Tabela III:</b> Alterações celulares e anormalidades imunofenotípicas frequentemente identificadas na SMD, no compartimento CD34 <sup>+</sup> e nas linhas granulocítica/neutrófilo, monocítica e eritroide. [26, 41, 45, 46, 47] .....	25
<b>Tabela IV:</b> Dados relativos à idade média dos doentes por género. ....	33
<b>Tabela V:</b> Combinação de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos para a identificação das células das linhas granulocítica (neutrófilo), monocítica e eritroide e também dos blastos CD34 <sup>+</sup> /CD117 <sup>+</sup> .....	34
<b>Tabela VI:</b> Volume de cada anticorpo monoclonal utilizado para 1 mL de amostra.....	35
<b>Tabela VII:</b> Incidência de alterações cromossómicas por género.....	37
<b>Tabela VIII:</b> Frequência das alterações cromossómicas detetadas pela técnica de FISH nos 32 casos processados.....	38
<b>Tabela IX:</b> Caracterização quanto ao género e idade dos indivíduos incluídos nos diferentes grupos em estudo.....	44
<b>Tabela X:</b> Combinação de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos para o estudo do compartimento heterogéneo CD34 <sup>+</sup> .....	45
<b>Tabela XI:</b> Combinação de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos para o estudo da maturação da linha eritroide.....	46
<b>Tabela XII:</b> Volume de cada anticorpo monoclonal utilizado no estudo do compartimento CD34 <sup>+</sup> para 200 µL de amostra.....	47
<b>Tabela XIII:</b> Volume de cada anticorpo monoclonal utilizado no estudo da linha eritroide para 200 µL de amostra.....	48
<b>Tabela XIV:</b> Média da intensidade de fluorescência (MIF) dos marcadores CD43 e CD49d no compartimento CD34 <sup>+</sup> para os vários comprometimentos maturativos.....	53
<b>Tabela XV:</b> Média da intensidade de fluorescência (MIF) dos marcadores CD43 e CD49d nos diferentes estádios da maturação eritroide considerados. ....	62

## Abreviaturas

AcMo: Anticorpos monoclonais

APC: *Allophycocyanin*

APC-H7: *Allophycocyanin-Hilite7*

AR: Anemia refratária

AREB: Anemia refratária com excesso de blastos

AREB-T: Anemia refratária com excesso de blastos em transformação

ARSA: Anemia refratária com sideroblastos em anel

CF: Citometria de Fluxo

CFU: Unidades formadoras de colónias

DLPC-B: Doenças Linfoproliferativas Crónicas de células B

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FAB: *French-American-British*

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FISH: Hibridação *in situ* por fluorescência

FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*

FSC: *Forward Scatter*

HCS: *High-content screening*

HSC: Células estaminais hematopoiéticas

ICUS: Citopenia idiopática de significado indeterminado

IGHV: Região variável da cadeia pesada da imunoglobulina

IPSS: Índice Prognóstico Internacional

LLC: Leucemia linfoide crónica

LMA: leucemia Mieloide aguda



LMMC: Leucemia mielomonocítica crônica

MGUS: Gamapatia monoclonal de significado indeterminado

MIF: Média da intensidade de fluorescência

MO: Medula óssea

NK: *Natural Killer*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PB: *Pacific Blue*

PBS: Tampão fosfato salino

PE: *Phycoerythrin*

PE-Cy7: *Phycoerythrin-Cyanine 7*

PerCP-Cy5.5: *Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5*

PO: *Pacific Orange*

RNA: Ácido ribonucleico

SMD: Síndrome Mielodisplásica

SMD-DM: Síndrome Mielodisplásica com displasia multilinha

SMD-DU: Síndrome Mielodisplásica com displasia unilinha

SMD-EB: Síndrome Mielodisplásica com excesso de blastos

SMD-I: Síndrome Mielodisplásica inclassificável

SMD-SA: Síndrome Mielodisplásica com sideroblastos em anel

SMD-SA-DM: Síndrome Mielodisplásica com sideroblastos em anel com displasia multilinha

SMD-SA-DU: Síndrome Mielodisplásica com sideroblastos em anel com displasia unilinha

SSC: *Side Scatter*

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana



# 1. Introdução

## 1.1. Síndromes Mielodisplásicas

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogéneo de neoplasias mieloides com ampla variedade de manifestações clínicas e patológicas, que têm em comum um defeito clonal nas células progenitoras hematopoiéticas (CD34<sup>+</sup>). São caracterizadas por uma hematopoiese ineficaz, que resulta clinicamente em citopenias periféricas de uma ou mais linhagens hematopoiéticas e num risco aumentado de progressão para Leucemia Mieloide Aguda (LMA), o que sucede em cerca de 30% dos casos. São observadas displasias que podem afetar uma ou mais linhas, refletindo-se não só em termos quantitativos como em termos qualitativos. [1, 2]

Neste grupo de patologias as células estaminais passam por um processo de maturação anormal e podem acumular-se na medula óssea, passando esta a ser rica em células progenitoras, tornando-se hiperclonal. Uma sequência de alterações genéticas adquiridas resulta no desenvolvimento de um clone anómalo e geneticamente instável de células estaminais. Este clone anómalo apresenta alterações na proliferação e maturação, como o aumento da apoptose, responsável pelas citopenias nos estádios iniciais da doença, [3]. A apoptose decresce e a proliferação aumenta à medida que a SMD evolui para fases mais avançadas até progredir para LMA, [2]. A ineficácia do processo de hematopoiese resulta de vários fatores, como uma função anormal das células progenitoras hematopoiéticas devido à presença de mutações em um ou mais genes que controlam o *DNA* e histonas, e da supressão da função de células progenitoras hematopoiéticas residuais normais pelo clone neoplásico. [1]

A falha na função medular em produzir células maduras funcionais saudáveis é um processo gradual e sendo assim a SMD não é necessariamente uma doença terminal. A maioria dos doentes sucumbe principalmente devido aos efeitos diretos da doença, nomeadamente as citopenias, uma vez que um número reduzido de células sanguíneas pode levar a uma perda da capacidade do organismo em combater infeções e controlar possíveis hemorragias. [4]

### 1.1.1. Etiologia

As SMD são classificadas de acordo com a sua origem em primárias ou secundárias, [5]. A maioria dos casos em adultos é primária (*de novo*) com anomalias citogenéticas em 40% a 60% dos casos, [2]. O desenvolvimento da SMD primária ocorre em consequência a uma exposição prolongada a agentes tóxicos, sendo associada principalmente à exposição sistemática ao benzeno. [6]

Uma minoria é secundária, relacionada com a exposição a quimioterápicos, radioterapia e radiação ionizante, consequências de uma quimioterapia ou radioterapia anterior, [2]. As SMD secundárias geralmente são mais agressivas e estão frequentemente relacionadas com anomalias citogenéticas complexas (80%) e podem ser de dois tipos, do tipo clássico com início tardio, em geral sete anos após a exposição a agentes alquilantes, e com alterações citogenéticas complexas envolvendo o cromossomo 7, e do tipo rapidamente progressivo com histórico de exposição principalmente a inibidores da topoisomerase, com frequente expressão da proteína p53 e frequentemente com translocações do 11q23 e 21q22. A evolução para LMA pode ser muito rápida. [2]

Em pacientes pediátricos, as SMD podem ser secundárias a anomalias hematológicas congénitas, como a anemia de Fanconi, neutropenia congénita severa, síndrome de Shwachman-Diamond e anemia de Diamond-Blackfan. [2, 7]

As SMD são maioritariamente diagnosticadas no sexo masculino e numa faixa etária superior a setenta anos, [8, 9]. Esta faixa etária é mais sensível ao desenvolvimento da patologia devido a acumulação gradual e ao acaso de danos no genoma, por parte de carcinogêneos endógenos e exógenos, no decorrer da vida, [10]. Por norma, a faixa etária em que surge a SMD secundária é inferior à da SMD primária, [11]. A incidência aumenta com a idade e é maior naqueles expostos a agentes mutagénicos terapêuticos, ocupacionais e/ou ambientais. [2]

A etiologia da SMD permanece desconhecida na maioria dos casos. Há evidências de que algumas infeções virais ou a exposição a químicos como tintas, diluentes, inseticidas ou fungicidas possam estar implicados na origem da SMD, assim como causas ambientais, toxicidade associada a xenobióticos e predisposições genéticas de baixa frequência, que podem ser responsáveis por alguns dos casos. A compreensão da etiologia

torna-se fulcral para a elucidação dos mecanismos patogénicos, melhoramento dos métodos de diagnóstico e para a diferenciação em grupos. [8]

### 1.1.2. Fisiopatologia

A patogénese das SMD ainda é pouco compreendida, uma vez que há participação de um conjunto complexo de eventos anormais que impedem as células precursoras de funcionarem corretamente. Uma sequência de alterações genéticas adquiridas resulta no desenvolvimento de um clone anómalo e geneticamente instável de células estaminais. Este clone anómalo apresenta alterações de proliferação e maturação, com aumento da apoptose, responsável pelas citopenias nos estádios iniciais da doença. A apoptose detém um papel essencial na homeostasia dos tecidos, incluindo no sistema hematopoiético, [3]. A apoptose decresce e a proliferação aumenta à medida que a SMD evolui para fases mais avançadas até progredir para LMA, devido à instabilidade genómica e lesões genéticas adicionais, [2, 12]. Nesta patologia, o recetor FAS é expresso em níveis elevados na superfície de precursores eritroides maduros e há aumento da ativação de caspases, o que pode estar subjacente a uma alteração nos mecanismos de diferenciação celular. Esta modificação contribui para o aumento da apoptose e alteração no processo de diferenciação das linhagens celulares, [13]. As respostas imunes e de microambiente anómalas parecem representar um fenómeno secundário, também envolvido na fisiopatologia das alterações clínicas deste grupo de doenças. [2]

### 1.1.3. Alterações cromossómicas

Na SMD são comuns alterações do cariótipo, presentes em cerca de 40% a 60% dos casos de SMD primária e em 80% de SMD secundária, [2, 14]. Não se sabe se as alterações cromossómicas detetadas na SMD constituem eventos iniciais que levam ao desenvolvimento da doença (causa) ou se são apenas fenómenos secundários associados à mesma (consequência), [15]. O conjunto de alterações genéticas mais frequentes na SMD inclui deleções e/ou amplificações genéticas, mutações que alteram a sequência ou a expressão de genes individuais, translocações e anomalias epigenéticas, [16]. As

alterações cromossômicas mais comuns consistem na del (5q) (mais comum), del (7q), del (20q), monossomia 7, (-Y) e por fim na trissomia 8. [14, 17]

A frequência dessas anomalias aumenta com o aumento do risco associado à doença. A probabilidade de sobrevivência de pacientes com anormalidades envolvendo os cromossomos 5, 7, e 8 mostrou ser reduzida em comparação a casos com cariótipos normais. [18]

Acredita-se que as alterações cromossômicas como a deleção do braço longo do cromossomo 5 (síndrome 5q-), envolva genes relacionados com citocinas e seus receptores, reguladores do ciclo celular, fatores de transcrição, mediadores de sinalização e, mais recentemente, proteínas ribossômicas, como a RPS14. A alteração ou deleção de um grupo de genes que desempenham um papel no controle da hematopoiese parece desencadear os fenômenos vistos clinicamente. [2]

#### 1.1.4. Classificação

As manifestações clínicas das SMD não são específicas e são altamente variáveis, cada uma das quais com características específicas com respeito à contagem de células e à sua morfologia, mas também à caracterização da medula óssea e às alterações genéticas observadas. Estas características permitem estratificar o risco e o prognóstico associado à doença. Propostas de classificações morfológicas com implicações prognósticas visam identificar subgrupos de doentes, orientar diferentes opções terapêuticas e permitir a análise comparativa de resultados. [2]

O tempo de sobrevivência, prognóstico, estipulado após o diagnóstico da SMD pode variar de alguns meses até mais de 10 anos, tendo em conta a idade/sexo correspondente a populações normais. Este prognóstico altamente variável destaca e sublinha a importância da elaboração e uso de um sistema de classificação, suplementado por um índice de prognóstico, para prever a taxa de sobrevivência dos doentes diagnosticados com SMD e o tempo de progressão para LMA. Em adição, com os recentes desenvolvimentos e disponibilidade de várias opções de tratamentos eficazes, a necessidade de um sistema de classificação para prever a capacidade de resposta aos tratamentos de pacientes individuais tem sido da máxima importância. [19]

O aumento do conhecimento acerca das SMD esteve associado a estipulação de vários sistemas de classificação que são utilizados atualmente no diagnóstico da SMD, [20]. Durante os últimos 20 anos, vários sistemas de classificação e de estipulação de prognósticos têm sido propostos. Ajustes na classificação são necessários à medida que ocorrem avanços nas investigações sobre a etiologia e a patogênese das SMD. [19]

#### 1.1.4.1. Classificação FAB

O surgimento da classificação proposta pelo grupo FAB (do inglês: *French-American-British*) em 1982 e modificada mais tarde em 1985 trouxe grandes progressos para a melhor compreensão das SMD. A classificação FAB baseava-se nas alterações morfológicas observadas, considerando significativos os seguintes parâmetros, displasia em pelo menos duas linhagens hematopoiéticas, no sangue ou na medula óssea, a presença ou ausência de sideroblastos em anel, o número de blastos no sangue e na medula óssea e a presença de bastonetes de “Auer”. Os pacientes eram divididos em cinco subgrupos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). A classificação FAB permitiu delinear claramente grupos de baixo risco (AR e ARSA), com um tempo de sobrevivência de quatro a cinco anos, risco intermédio (AREB), com sobrevivência de aproximadamente um ano, e alto risco (AREB-T) com rápida transformação para LMA e sobrevivência muito curta. [21]

A classificação FAB foi bem aceita pelos clínicos e pelos patologistas e, embora houvesse inúmeros casos que não podiam ser classificados dentro dos parâmetros por ela propostos, por falha da classificação FAB em não considerar a intensa heterogeneidade das SMD, resultando em 5% a 10% de casos que não se encaixavam em nenhuma das categorias, foi extremamente útil nos últimos 25 anos, ajudando a estabelecer abordagens diagnósticas e terapêuticas e a uniformizar a linguagem usada em todo mundo. [21]

#### 1.1.4.2. Classificação da Organização Mundial de Saúde

A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de neoplasias mieloides e leucemia aguda, criada em 2008 e atualizada em 2016, representa o método de classificação mais utilizado. [22]

Em 2008 a OMS propôs um sistema de classificação para a SMD que integrou características clínicas, morfológicas, citoquímicas, genéticas e outras informações biológicas pertinentes, de forma a definir entidades com relevância clínica. [23, 24]

A classificação da OMS, de tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfoides, foi atualizada pela última vez em 2008 e desde então, vários avanços no estudo destas patologias e avanços na identificação de biomarcadores únicos, associados a algumas neoplasias mieloides e leucemias agudas, que podem melhorar significativamente os critérios de diagnósticos bem como a relevância prognóstica das entidades atualmente incluídas na classificação da OMS, sugeriram modificações e novas entidades que deviam ser adicionadas. Sendo assim, foi necessária uma revisão a esta classificação de 2008 que reflete um consenso de opiniões de hematopatologistas, hematologistas, oncologistas e geneticistas. Esta edição de 2016 representa apenas uma revisão à classificação anterior e não uma nova classificação por completo e tem por objetivo incorporar novos dados, clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos que foram descobertos desde a última classificação estabelecida. Assim, esta nova classificação tenta incorporar novos conhecimentos acerca das SMD obtidos desde 2008 e enfatizar as alterações e interpretações morfológicas, o número de citopenias e a acumulação de alterações genéticas para o diagnóstico e classificação das SMD. [25, 26]

A identificação de citopenias constitui um parâmetro importante para o diagnóstico das SMD e pré-classificação, porém a classificação da OMS baseia-se principalmente no grau de displasia e na percentagem de blastos para a classificação da patologia, sendo que citopenias específicas apenas possuem um reduzido impacto na classificação. Além desse facto, as linhagens hematopoiéticas que manifestam displasia morfológica frequentemente não se correlacionam com a citopenia específica em casos individuais de SMD.

A nova classificação substituiu o termo “citopenia refratária” e “anemia refratária” por “SMD” e considera os seguintes grupos: SMD com displasia unilinha (SMD-DU),



SMD com displasia multilinha (SMD-DM), SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA) que se pode subdividir em SMD-SA com displasia unilinha (SMD-SA-DU) e SMD-SA com displasia multilinha (SMD-SA-DM), SMD com excesso de blastos (SMD-EB) que mediante a percentagem de blastos se pode subdividir em SMD-EB-1 (5% a 9% de blastos) e SMD-EB-2 (10% a 19% de blastos), SMD associada à deleção do braço comprido do cromossoma 5 (SMD del (5q)) e SMD inclassificável (SMD-I). Não existem alterações na SMD da infância, a citopenia refratária da infância permanece como uma entidade provisória dentro desta categoria, [25, 26]. A **Figura 1** representa os diferentes grupos acima mencionados, e características associadas aos mesmos, considerados na classificação das SMD proposta pela OMS em 2016. [25]

Name	Dysplastic lineages	Cytopenias*	Ring sideroblasts as % of marrow erythroid elements	BM and PB blasts	Cytogenetics by conventional karyotype analysis
MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD)	1	1 or 2	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD)	2 or 3	1-3	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
<b>MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)</b>					
MDS-RS with single lineage dysplasia (MDS-RS-SLD)	1	1 or 2	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS-RS with multilineage dysplasia (MDS-RS-MLD)	2 or 3	1-3	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with isolated del(5q)	1-3	1-2	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	del(5q) alone or with 1 additional abnormality except -7 or del(7q)
<b>MDS with excess blasts (MDS-EB)</b>					
MDS-EB-1	0-3	1-3	None or any	BM 5%-9% or PB 2%-4%, no Auer rods	Any
MDS-EB-2	0-3	1-3	None or any	BM 10%-19% or PB 5%-19% or Auer rods	Any
<b>MDS, unclassifiable (MDS-U)</b>					
with 1% blood blasts	1-3	1-3	None or any	BM <5%, PB = 1%,‡ no Auer rods	Any
with single lineage dysplasia and pancytopenia	1	3	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any
based on defining cytogenetic abnormality	0	1-3	<15%§	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	MDS-defining abnormality
Refractory cytopenia of childhood	1-3	1-3	None	BM <5%, PB <2%	Any

\*Cytopenias defined as: hemoglobin, <10 g/dL; platelet count, <100 × 10<sup>9</sup>/L; and absolute neutrophil count, <1.8 × 10<sup>9</sup>/L. Rarely, MDS may present with mild anemia or thrombocytopenia above these levels. PB monocytes must be <1 × 10<sup>9</sup>/L

†If SF3B1 mutation is present.

‡One percent PB blasts must be recorded on at least 2 separate occasions.

§Cases with ≥15% ring sideroblasts by definition have significant erythroid dysplasia, and are classified as MDS-RS-SLD.

**Figura 1:** Classificação de 2016 das SMD proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS). [Adaptado de 25]

### 1.1.4.3. Índice Prognóstico Internacional

Em 1997, foi proposto o Índice Prognóstico Internacional (IPSS) (do inglês: *International Prognostic Score System*) com base exclusivamente em SMD primária, complementando assim a classificação FAB, adicionando parâmetros relevantes para o prognóstico como a citogenética, número de citopenias e idade dos pacientes, [21]. O índice proposto considerava a percentagem de blastos na medula óssea, a presença e tipo de anomalia citogenética e o número de citopenias no sangue periférico, de forma a estratificar os doentes em subgrupos distintos que prevêm a taxa de sobrevivência e o risco de progressão para LMA. [2, 26]

O sistema proposto em 1997 estratificava os pacientes em 4 grupos de risco: baixo, intermédio 1, intermédio 2 e alto. O grupo de baixo risco apresentava o melhor prognóstico, sendo caracterizado por uma percentagem de blastos inferior a 5%, cariótipo normal ou com alterações isoladas e apenas uma ou ausência de citopenias. A taxa de sobrevivência desse grupo era de aproximadamente 5 anos e a média de progressão para LMA era de 9 anos. O grupo de risco intermédio 1 era caracterizado por uma percentagem de blastos de 5% a 10% e por duas a três citopenias. A taxa de sobrevivência desse grupo era de 3 a 4 anos e a média de progressão para LMA era de 3 anos. O grupo intermédio 2 era caracterizado pela presença de um cariótipo com alterações no cromossoma 7 ou com mais de três alterações cromossómicas. A taxa de sobrevivência era de apenas 1 ano e dois meses e a progressão para LMA de 1 ano. Por fim, o grupo de alto risco possuía uma percentagem de blastos de 21% a 30%, uma taxa de sobrevivência de 4 meses e um tempo médio de progressão para LMA de 2 meses. [27]

Devido aos avanços nos conhecimentos acerca das SMD nos últimos anos, foi necessário examinar o impacto prognóstico das novas variáveis clínicas e citogenéticas, descobertas ao longo dos anos, e assim melhorar o sistema IPSS incorporando subgrupos citogenéticos mais diferenciados. [28]

O sistema de 1997 apresentava diversas limitações, pois o mesmo era válido apenas para pacientes adultos exclusivamente com SMD primária, tratados com cuidados de suporte ou fatores de crescimento hematopoiéticos. Além disso, não considerava a severidade das citopenias, descrevia o cariótipo de forma muito limitada, e não incluía

fatores de risco como a dependência de transfusões, [29]. Sendo assim, em 2012, o (IPSS) sofreu uma revisão (IPSS-Revisto). [28]

As maiores diferenças entre o IPSS e o IPSS-R são que este último inclui uma variedade mais ampla de anormalidades citogenéticas do que o IPSS de 1997, além disso, o IPSS revisto dá enorme importância aos dados citogenéticos, contrariamente ao IPSS clássico que atribuía mais peso à contagem dos blastos. O IPSS-R estratifica os doentes em 5 categorias de risco em comparação às 4 categorias do IPSS, e o grau de citopenias é considerado no sistema revisto, contrariamente ao clássico que apenas considerava o número. Apesar dessas melhorias, o IPSS-R continua a ser válido apenas para pacientes com SMD primária. [29]

O novo sistema permite dividir os pacientes diagnosticados com SMD em cinco subgrupos consoante os fatores de prognóstico: (I) Muito baixo, (II) Baixo, (III) Intermédio, (IV) Bom e (V) Muito bom. O grupo I é caracterizado por um cariótipo extremamente complexo com mais de 3 alterações genéticas, um tempo médio de sobrevivência e de progressão para LMA de 7 meses. O grupo II inclui cariótipos como (-7), alterações duplas (-7)/del (7q) e cariótipos complexos com mais de três alterações. A taxa de sobrevivência é de 1 ano e 5 meses e a progressão para LMA de 1 ano e 7 meses. Este grupo ainda é caracterizado por uma percentagem de blastos na medula óssea superior a 10%. No grupo III é característico um cariótipo de trissomia 8 ou 19 e/ou del (7q). A taxa de sobrevivência é de 2 anos e 7 meses e a progressão para LMA de 2 anos e 5 meses. Este grupo ainda é caracterizado por uma percentagem de blastos na medula de 5% a 10%, uma hemoglobina inferior a 8g/dL e uma contagem de plaquetas inferior a  $50 \times 10^9/L$ . O prognóstico IV é dado por um cariótipo normal ou del (5q), deleção do braço curto do cromossoma del (12p) e del (20q). A taxa de sobrevivência é de 4 anos e 8 meses e o risco de progressão para LMA de 9 anos e 4 meses. A percentagem de blastos na medula é de 2% a 5%, a hemoglobina varia entre 8 e 10 g/dL, a contagem de neutrófilos é inferior a  $0,8 \times 10^9/L$  e a contagem de plaquetas varia entre  $50 \times 10^9/L$  e  $100 \times 10^9/L$ . O grupo com prognóstico V é dado por um cariótipo com del (11q) e ausência do cromossoma Y bem como, uma taxa de sobrevivência de 5 anos e 4 meses. Neste subgrupo a percentagem de blastos é inferior a 2%, a hemoglobina superior ou igual a 10 g/dL, a contagem absoluta de neutrófilos superior ou igual a  $0,8 \times 10^9/L$  e a contagem de plaquetas superior a  $100 \times 10^9/L$ , [28, 29, e 30]. A **Tabela I** representa os grupos de risco, e características associadas aos mesmos, propostos pelo IPSS-R em 2012, [26]. A cada

grupo de risco está associada uma pontuação IPSS-R, como representado pela **Tabela II**. [29]

**Tabela I:** Classificação IPSS-R proposta em 2012. [Adaptado de 26]

Classificação IPSS-R (2012)							
Grupo de risco	Cariótipo	Blastos na MO (%)	Hemoglobina (g/dL)	Contagem de neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )	Contagem de plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	Taxa de sobrevivência (anos)	Progressão para LMA (anos)
Muito bom	del (11q), (-Y)	<2	$\geq 10$	$\geq 0.8$	>100	5.4	-
Bom	Normal, del (5q), del (12p), del (20q)	2-<5	8-<10	<0.8	50-100	4.8	9.4
Intermédio	(+8), del (+19), del (7q)	5-10	<8	-	<50	2.7	2.5
Baixo	(-7), alterações duplas incluindo (-7)/del (7q), complexo com >3 alterações	>10	-	-	-	1.5	1.7
Muito baixo	Complexo com >3 alterações	-	-	-	-	0.7	0.7

LMA, Leucemia Mieloide Aguda; MO, Medula óssea.

**Tabela II:** Pontuação IPSS-R, proposta em 2012, para os diferentes grupos de risco. [Adaptado de 29]

Grupo de risco	Pontuação IPSS-R
<b>Muito bom</b>	0-1.5
<b>Bom</b>	2-3
<b>Intermédio</b>	3.5-4.5
<b>Baixo</b>	5-6
<b>Muito baixo</b>	>6

Apesar da disponibilidade de classificações como a classificação da OMS e o IPSS, continua a ser necessário, devido a complexidade da doença e ao crescente número de alvos emergentes e abordagens terapêuticas, melhorar os valores de diagnóstico e prognóstico e definir padrões para a avaliação, seleção de pacientes e uso de fármacos direcionados nos vários subgrupos de SMD. [5]

## 1.2. Diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas

Na Síndrome Mielodisplásica a grande maioria dos doentes é assintomática num primeiro tempo e, dependendo da progressão da patologia, os sintomas que se vão desenvolvendo constituem uma ampla variedade de manifestações clínicas. Os sintomas apresentados pelos doentes são inespecíficos devido à possível associação dos mesmos outras situações clínicas não clonais que podem, de uma certa forma, partilhar algumas das características de displasia da SMD. [20]

Deste modo, a associação de vários métodos de diagnóstico é necessária de forma a estabelecer o diagnóstico, classificação, estratificação prognóstica e proceder à escolha da terapêutica mais adequada. Assim, para o diagnóstico da SMD, o conjunto dos resultados obtidos através de várias avaliações clínicas e laboratoriais tem de ser corretamente interpretado. [2, 29]

O processo de diagnóstico de doentes com suspeita de SMD inclui o exame clínico, a análise morfológica de esfregaços de sangue periférico e medula óssea (aspirado medular e biopsia óssea), estudos de citogenética e, em alguns casos particulares, a imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF). Além desses exames, um diagnóstico diferencial deve ser considerado de forma a excluir outros distúrbios não clonais como possível causa dos sintomas apresentados, por possuírem características semelhantes às observadas na SMD, [2, 29]. Vários desses distúrbios da hematopoiese normal e não-clonal devem-se ao uso de certos medicamentos, à alterações na função renal, hepática e tireoidiana, à alterações dos níveis de ferro, folato e vitamina B12, à certas infeções virais como o VIH (na infeção pelo vírus da imunodeficiência humana observa-se com frequência citopenias isoladas e até pancitopenia com medula óssea hiperclonal) e à presença de doenças autoimunes, daí a importância em avaliar todos esses parâmetros através de exames laboratoriais de forma a descartar estes distúrbios. [11, 29]

O diagnóstico da SMD é na maioria das vezes realizado numa consulta de rotina para situações, tais como insuficiência cardíaca ou doença renal, quando as características do sangue periférico e da medula óssea típicas da SMD são encontradas acidentalmente, [20, 29]. O diagnóstico é desencadeado por uma série de sintomas apresentados pelos pacientes, consequências diretas das citopenias e anormalidades na função celular, [31]. Estes sintomas correspondem a um quadro clínico de anemia, neutropenia e trombocitopenia, característicos da doença. A anemia (tipicamente macrocítica) é a anormalidade do sangue periférico mais comum, ocorrendo em aproximadamente 80% a 85% dos casos. [20]

Deve haver um alto índice de suspeita de SMD em situações relacionadas com pacientes idosos com anemia inexplicável isolada ou citopenias progressivas inexplicadas, aqueles com exposição prévia a quimioterapia e radioterapia, bem como aqueles com histórico de exposição a toxinas ambientais. Estima-se que 1 em cada 6 pacientes mais velhos, com anemia inexplicada, é diagnosticado com SMD, [20]. A maioria dos doentes apresenta fadiga, falta de energia, alguns apresentam falta de ar após esforços físicos, fenômenos relacionados com a anemia. Alguns pacientes vão notar hematomas, mais frequentemente na parte de baixo das pernas, e hemorragias frequentes indicativos de trombocitopenia e alguns irão sofrer infecções recorrentes (10%, a maioria de etiologia bacteriana) indicativo de neutropenias, [20, 31]. Assim, análises apropriadas são necessárias em todos os casos onde a SMD é suspeitada com a finalidade de realizar um diagnóstico preciso. [20]

A falta de sintomas característicos é um dos maiores desafios no diagnóstico e avaliação de doentes com uma suspeita de SMD de baixo risco. Pacientes com SMD de alto risco, que corresponde a cerca de 30% de todos os casos de SMD e que está associado tanto a um pior prognóstico como a uma maior probabilidade de progressão para LMA, são de diagnóstico fácil e direto. O quadro clínico desses últimos é tipicamente mais severo com infecções recorrentes e hemorragias inexplicáveis, devido à presença de células mieloides imaturas e blastos em circulação. [29]

O diagnóstico das SMD no contexto de uma situação clínica é difícil, constitui um desafio e depende de uma correta interpretação e análise, pelo hematologista, de todos os dados clínicos, citológicos, anatômicos, biológicos, citogenéticos, de citometria de fluxo, de marcadores genéticos, exclusão de outras patologias, de características fenotípicas e estudos moleculares. A avaliação deve tentar estabelecer a duração e a gravidade das

citopenias, das infecções e hemorragias. Também se devem conhecer tratamentos prévios e possíveis exposições a tóxicos, como agentes de uma quimioterapia anterior ou radioterapia, para descartar a hipótese de um SMD secundário. Neste último caso é importante conhecer os fármacos e a duração entre a administração do mesmo e a atual avaliação. Todos esses dados irão permitir estabelecer o prognóstico e decidir a forma de terapia adequada. A correta avaliação irá permitir conhecer melhor os riscos associados a cada caso, e irá permitir melhorar a qualidade de vida, prolongar o tempo de sobrevivência e em alguns casos alcançar a cura. [32]

### 1.2.1. O contributo da Morfologia

Embora o esfregaço sanguíneo possa sugerir SMD, a observação do aspirado medular é essencial para estabelecer o diagnóstico, [10]. A colheita do aspirado medular tem como principal objetivo a realização do esfregaço para estudo morfológico e contagem diferencial das células, também designado por mielograma, [33]. A biópsia do núcleo da medula óssea fornece informações complementares relevantes sobre a celularidade e a arquitetura, a morfologia dos megacariócitos e a presença de fibrose, informações úteis que podem auxiliar nas decisões terapêuticas. [10]

As características displásicas frequentemente observadas na SMD incluem a maturação megaloblastoide do eritrócito, células precursoras de eritrócitos binucleares e outras anormalidades de nucleação, sideroblastos em anel, hipolobulação ou hipogranulação de neutrófilos e megacariócitos de tamanho reduzido com núcleos anormalmente segmentados, [29]. Essas características também são observadas em outras neoplasias mieloides, bem como em certos distúrbios hematológicos metabólicos e não-clonais. Assim, o diagnóstico da SMD, como já referido anteriormente, passa por um processo de exclusão de outras patologias que podem partilhar algumas dessas características da displasia. [20]

Pacientes com SMD apresentam anormalidades na contagem de células sanguíneas sendo que, tipicamente apresentam algum grau de anemia (80% a 85% dos casos), sendo esta frequentemente detetada de forma acidental num hemograma de rotina. Os doentes também apresentam sintomas associados a anemia ou trombocitopenia, bem como infecções recorrentes. [6, 7]

A análise morfológica e histopatológica de esfregaços sanguíneos e de biopsias da medula óssea permite avaliar a celularidade e aceder aos diferentes estádios de diferenciação das linhagens hematopoiéticas, permitindo assim realizar uma contagem relativa das células nos diferentes estádios de maturação, reconhecíveis pelas suas características morfológicas, e realizar uma contagem diferencial das células normais e aberrantes. [29, 33]

A morfologia pode ser difícil de avaliar em alguns pacientes, devido a hipocelularidade ou fibrose da medula. Devido ao facto de medulas hipocelulares, no cenário da pancitopenia, poderem ser observadas tanto na SMD como na anemia aplástica, a diferenciação entre essas duas patologias baseando-se apenas nos estudos morfológicos pode ser impossível no caso dos aspirados da medula óssea não produzirem um número suficiente de células para uma avaliação precisa. A distinção entre as duas patologias é bastante importante pois o risco de progressão para LMA é muito maior na SMD. Além disso, a fibrose da medula óssea, uma descoberta inespecífica em uma série de transtornos agudos e crónicos, pode obscurecer características morfológicas específicas e fazer com que o diagnóstico da SMD se torne ainda mais difícil. [34]

Apesar da análise morfológica fornecer dados relevantes para o diagnóstico da SMD, é um método pouco sensível pois permite apenas estudar quantidades reduzidas de células nos diferentes tipos de amostra, não permitindo identificar de forma sensível células anormais mais raras ou alterações que afetam um número reduzido de células, o que ocorre nas fases iniciais da doença. Além disso, constitui um método sujeito a interpretações subjetivas. Deste modo, outros métodos de análise são necessários de forma a aumentar a sensibilidade do diagnóstico da SMD. [29, 33]

### 1.2.2. O contributo da Citogenética

A citogenética é a análise das alterações genéticas que envolve culturas de células da medula óssea e diferentes técnicas de bandeamento cromossómico, e pode ser dividida em clássica e molecular. Algumas alterações cromossómicas associadas a SMD podem ser analisadas através da citogenética clássica, mas quando o clone é reduzido uma técnica de citogenética molecular mais sensível é necessária para detetar uma determinada alteração, nomeadamente a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), [14, 15]. A vantagem desta técnica molecular reside no facto de a mesma poder avaliar as



células tanto em interfase como em metáfase (a citogenética clássica só estuda as células em metáfase), sendo por isso um método mais sensível e utilizado preferencialmente para o diagnóstico da SMD, [10]. A definição de clone, do ponto de vista citogenético, é a presença da mesma anomalia estrutural em pelo menos duas células, ou a ausência do mesmo cromossoma em pelo menos três metáfases. [15]

O estudo das alterações cromossômicas na SMD é de extrema importância pois auxilia no diagnóstico, classificação, prognóstico, decisão terapêutica e no melhor entendimento biológico da doença. [15]

Na SMD são comuns alterações do cariótipo, como já referido, estão presentes em cerca de 40% a 60% dos casos de SMD primária e em 80% dos casos de SMD secundária, [2, 14]. As alterações cromossômicas mais comuns consistem na del (5q), del (7q), del (20q), monossomia 7, (-Y) e por fim na trissomia 8, [14, 17]. A classificação da OMS tornou obrigatória a análise do cariótipo para a completa avaliação da SMD recém-diagnosticada e definiu a síndrome 5q- como uma entidade específica. [15]

Com base na citogenética as alterações cromossômicas associadas a SMD podem ser divididas em cariótipo normal, perdas isoladas, translocações balanceadas e cariótipos complexos (mais de três anomalias), sendo este último associado a um pior prognóstico. As SMD secundárias são geralmente mais agressivas e estão frequentemente relacionadas com anomalias citogenéticas complexas. [15]

Apesar da contribuição das técnicas descritas anteriormente, nomeadamente a morfologia e a citogenética, para o diagnóstico da SMD, num grande número de casos o grau de atipias encontrado é discreto e sujeito a interpretações subjetivas e as alterações citogenéticas, importante indicador de doença clonal, apenas constituem 50% das anormalidades observadas em doentes com SMD, sendo que em muitos casos o cariótipo é normal, [22, 35]. Assim, embora os estudos morfológicos, para detetar displasia na medula óssea e sangue periférico, e estudos citogenéticos, para detetar anormalidades cromossômicas características, sejam adequados para o diagnóstico da SMD na maioria dos casos, em casos em que os estudos combinados de morfologia e citogenética sejam inconclusivos, o auxílio de uma técnica mais sensível revela-se importante no estabelecimento do diagnóstico e prognóstico. [34]

### 1.2.3. Critérios mínimos

Os dados hematológicos e morfológicos nas SMD podem variar bastante e o diagnóstico é muitas vezes difícil, especialmente em estádios precoces. Além disso, em muitos casos com citopenias, pode ser difícil estabelecer ou excluir o diagnóstico de SMD. De modo a ajudar nessas situações, foram estabelecidos critérios mínimos de diagnóstico para os quais a condição de SMD é estipulada, [5].

Os critérios mínimos de diagnóstico são definidos pela introdução de dois critérios do tipo pré-requisito para SMD, denominados (critérios-A), pelo menos por um dos três critérios adicionais (decisivos) relacionados com as SMD (critérios-B) e por vários co-critérios (critérios-C). Os pré-requisitos necessários para o diagnóstico são (a) citopenia marcada e constante ( $\geq 6$  meses a não ser que estudos citogenéticos revelem alterações típicas da SMD) em, pelo menos, uma das seguintes linhas hematopoiéticas: linha eritroide ( $< 10$  g/dL), neutrófilo ( $< 1,8 \times 10^9/L$ ), megacariocítica ( $< 100 \times 10^9/L$ ); e (b) exclusão de outra doença hematológica clonal ou não clonal ou de doença não hematológica como principal causa da citopenia e/ou displasia. Em adição pelo menos um dos seguintes critérios de decisão, (i-iii), deve ser cumprido de modo a ser considerado SMD: (i) displasia morfológica, em pelo menos 10% de todas as células, em uma ou mais das seguintes linhas celulares: (a) eritroide (sideroblastos anelados ( $> 15\%$ ) também contam como critério de displasia), (b) neutrófilo, (c) megacariocítica; (ii) anomalias citogenéticas típicas (relatadas frequentemente em SMD); (iii) uma contagem constante de blastos de 5% a 19%. [25, 36]

Em doentes subdiagnosticados ou com resultados questionáveis em (i-iii) (devido a por exemplo, alterações cromossômicas atípicas, displasia em  $< 10\%$  das células, 4% de blastos, entre outras) mas com outras características clínicas relacionadas com a SMD (como a anemia macrocítica dependente de transfusão), testes adicionais (co-critérios) deverão ser realizados para se concluir sobre a existência de uma neoplasia mieloide clonal com falha medular, [36]. Esses testes adicionais podem incluir a CF, teste de Humara, *gene chip analysis*, unidades formadoras de colónias (CFU), e análise de mutações. Quanto maior o número de anormalidades encontradas ao longo desses testes adicionais, maior é a probabilidade de se tratar de um caso de SMD, mas na ausência de displasia morfológica, o diagnóstico não pode ser estabelecido. Se os ensaios adicionais

mostrarem resultados negativos, o padrão recomendado é de seguir o percurso clínico e de repetir os testes de diagnóstico após algum tempo. [5]

Nos critérios mínimos de diagnóstico a análise de células da medula óssea por citometria de fluxo foi sugerida como um co-critério para o diagnóstico das SMD. A citometria de fluxo é proposta para aperfeiçoar o diagnóstico e/ou para distinguir SMD inicial de citopenia idiopática de significado indeterminado (ICUS) (inclui casos com citopenias constantes (> 6 meses) de uma ou mais linhagens que não vão ao encontro dos critérios mínimos para SMD e que não podem ser explicados por outras doenças hematológicas ou não) devido à sua capacidade de contar blastos, avaliar anormalidades na população de blastos e distinguir anormalidades mieloides em maturação. Vários grupos têm-se focado na caracterização, mediada por citometria de fluxo, das células da medula óssea saudável e displásica, incluindo blastos mieloides e células mieloides em maturação. [36]

Atualmente, não existe nenhuma técnica que por si só seja capaz de estabelecer um diagnóstico exato, pois, o diagnóstico é estabelecido da interpretação, integração e interligação de todos os dados da avaliação diagnóstica. [32]

### 1.3. Abordagem à Citometria de Fluxo

A técnica de Citometria de Fluxo convencional é utilizada para separar, contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, permitindo assim estudar as várias características celulares de forma rápida, mediante vários parâmetros (multiparamétrica). [37]

A técnica consiste na passagem de uma suspensão de células previamente marcadas com anticorpos monoclonais (AcMo) associados a fluorocromos, de uma única amostra, em frente a um ou vários raios laser. Cada célula suspensa que passa através do feixe vai dispersar a luz tendo em conta as suas características intrínsecas, [26]. Assim, as células são analisadas segundo três parâmetros: o FSC (*Forward Scatter*), que nos dá informações acerca do tamanho relativo da célula, o SSC (*Side Scatter*), que nos dá informações acerca da granularidade ou complexidade da célula, e por fim um último parâmetro que nos dá a intensidade da fluorescência. O FSC deteta a dispersão frontal do

laser ao atingir a célula e o SSC detecta a dispersão lateral do laser e em conjunto esses dois parâmetros dão-nos informações acerca da morfologia celular. [37]

A quantidade de luz e de fluorescência dispersas dependem diretamente das características físicas e intrínsecas de cada célula e da presença de fluorocromos naturais ou artificiais ligados, respetivamente. Através desta técnica e tendo em conta alguns parâmetros, podem ser geradas e medidas entre três a dez diferentes emissões de fluorescência para cada evento celular. Seguidamente, a luz proveniente de emissões com diferentes comprimentos de onda é orientada de forma a atingir diferentes detetores. Esses últimos vão gerar sinais luminosos que vão ser convertidos em sinais elétricos, e seguidamente transformados em eletrónicos. [26]

O poder da CF reside na sua capacidade única de analisar cada célula individualmente sem interferências de outras células e avaliar cada uma para muitos parâmetros funcionais diferentes, tudo num curto espaço de tempo (microsegundos). Este tipo de técnica oferece taxas de análise celular muito maiores do que qualquer sistema de imagem disponível hoje, incluindo todos os instrumentos HCS (*High-content screening*) mais frequentemente utilizados. [38]

Outra grande vantagem dessa técnica em relação a outras utilizadas é a sua habilidade para estudar, medir e analisar populações heterogéneas de células, uma célula de cada vez. Essa sua capacidade de classificar células individuais em populações definidas com base em diferenças fenotípicas constitui uma grande força da CF, e permite assim o estudo de misturas complexas de células sem que por isso haja perda de informações importantes. [38]

Tradicionalmente, o diagnóstico hematológico depende de uma combinação da análise citomorfológica e histológica. No entanto, técnicas de imunofenotipagem como a CF e outras fornecem dados relevantes ao diagnóstico, como o estágio de maturação das populações celulares analisadas, a presença de células com fenótipo anormal, e permitem avaliar a presença de marcadores associados ao prognóstico ou até mesmo marcadores que são alvos terapêuticos. [39]

### 1.3.1. Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

Várias técnicas moleculares têm permitido obter informações relevantes para a classificação das diferentes patologias e para a monitorização da terapêutica. Contudo, existem várias desvantagens associadas, como serem demoradas, não serem aplicáveis em todos os doentes e não focarem em subpopulações celulares específicas. [40]

Uma técnica que se tem revelado importante e preferencial na rotina diagnóstica é a imunofenotipagem por CF. Este método é o único que associa uma alta performance a uma elevada rapidez, auxiliando no processo de diagnóstico e monitorização terapêutica de diferentes hemopatias malignas, permitindo focar numa determinada população celular anormal, usando para este fim proteínas intracelulares e de superfície como alvos. [40]

A imunofenotipagem por CF constitui uma técnica mais rápida do que a citogenética, relativamente barata e reprodutível, [17]. É um método altamente sensível usado na deteção de anormalidades quantitativas e qualitativas nas células hematopoiéticas. Tem a capacidade de analisar, simultaneamente, diversas características físicas das células em suspensão com grande objetividade, sensibilidade e rapidez. Permite medir diversas características na célula como o tamanho celular, complexidade citoplasmática, conteúdo em ácidos nucleicos e permite detetar uma grande variedade de proteínas de superfície, citoplasmáticas e nucleares, expressas pelas células, [14, 33]. Assim, a CF tem-se tornado uma excelente ferramenta para analisar uma grande variedade de tipo de amostras, incluindo a medula óssea. [33]

A imunofenotipagem por CF é uma técnica que tem sido utilizada para o diagnóstico, classificação, prognóstico e monitorização da terapêutica de neoplasias hematológicas, [40]. É uma técnica bem caracterizada para a classificação e prognóstico dos diversos subtipos de leucemias. Esta requer uma seleção específica de combinações de marcadores individuais para a identificação de linhagens celulares, estádios maturativos e fenótipos aberrantes. No entanto, a performance de combinações de diferentes marcadores apresenta maior relevância clínica do que a de marcadores individuais. [40]

### 1.3.2. O contributo da Imunofenotipagem no diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas

Nos critérios mínimos de diagnóstico a análise de células da medula óssea por citometria de fluxo foi sugerida como um co-critério para o diagnóstico da SMD pela OMS, podendo também ser usada sequencialmente no mesmo doente para rastrear a progressão do clone anormal (número de CD34<sup>+</sup> e aumento do número de anormalidades fenotípicas), [35, 36]. Desta forma, a análise celular por citometria de fluxo multiparamétrica tornou-se uma ferramenta útil no diagnóstico e na monitorização da SMD, [35]. A CF constitui uma ferramenta importante no diagnóstico de SMD pois permite obter informações relevantes que não podem ser obtidas por outras técnicas, nomeadamente a morfologia, citogenética e biologia molecular. [22, 35]

A CF multiparamétrica tem sido utilizada para analisar precursores hematopoiéticos, tanto nas medulas ósseas saudáveis como em outras patologias, na análise de linhagens celulares, de assincronismos maturativos e anormalidades na expressão de antigénios, [41]. Os estádios de diferenciação podem ser analisados por CF multiparamétrica através da identificação de padrões de expressão de antigénios. O conhecimento dos níveis de expressão de vários marcadores celulares específicos de cada linhagem e de cada estágio maturativo, no desenvolvimento hematopoiético normal, fornece uma referência para o reconhecimento de padrões de maturação anormais presentes na SMD. [35, 41]

Esta metodologia tem também sido utilizada no diagnóstico diferencial entre SMD e desordens não clonais, especialmente nos casos em que o doente apresenta cariótipo normal e alterações morfológicas displásicas pouco características. [10]

Na SMD têm sido descritas várias alterações na expressão de antigénios associados à linhagem e maturação celular nas três séries hematopoiéticas maioritárias, granulocítica, monocítica e eritroide, [35]. Assim, o foco da CF no contexto da SMD incide principalmente nessas linhas hematopoiéticas maioritárias e no compartimento CD34<sup>+</sup>, [36]. Em adição, estas linhas além de serem as mais representadas celularmente, são as linhas em que o processo de hematopoiese foi estudado de forma mais aprofundada e por isso se encontra descrito em maior detalhe na literatura. [36]

A CF no contexto do diagnóstico da SMD permite uma contagem precisa de mieloblastos (mesmo em medulas com menos de 5% de blastos), a identificação de mieloblastos com fenótipos anormais (com base no perfil antigénico), reconhece alterações imunofenotípicas em células maduras de diferentes linhas hematopoiéticas e quantifica essas anormalidades para fins prognósticos. [40]

Sendo a SMD um grupo heterogéneo de doenças, não existe um marcador específico de diagnóstico. Assim, em 2008 a OMS sugeriu que o diagnóstico desta patologia requer a presença de pelo menos três anormalidades imunofenotípicas. [22]

Quando certas aberrações imunofenotípicas são definidas com o auxílio da CF, os doentes também podem ser monitorizados por essa mesma técnica, mesmo após início da terapêutica, para determinar a progressão da doença, que se caracteriza pelo aumento das anormalidades, ou para determinar a resposta à intervenção terapêutica, [22, 40]. Estudos demonstram que anormalidades avaliadas por CF, relacionadas com a SMD, nas células da medula óssea, deixam de ser detetadas ou sofrem uma redução no número em doentes com resposta positiva aos tratamentos em comparação com os resultados pré-tratamento. A resposta efetiva a terapias intensivas pode levar a reconstituição de células normais após a eliminação das células neoplásicas, sendo que esta resposta à terapia pode ser demonstrada pela técnica de CF. Além disso, muitas formas de terapia podem alterar as anormalidades ou até mesmo introduzir novas devido a toxicidade associada aos tratamentos, sendo que a estabilidade das anormalidades, demonstrada pela CF, durante o tratamento pode poupar os pacientes a terapias de longo prazo que não surtem qualquer efeito e que se podem revelar tóxicas para os mesmos. [1]

Embora os critérios de diagnóstico estejam bem definidos para a SMD, um número significativo de pacientes têm dados relativos ao sangue e medula óssea que causam alguma dificuldade na estipulação de qualquer diagnóstico. Assim, embora os estudos morfológicos e citogenéticos sejam adequados para o diagnóstico da SMD na maioria dos casos, a CF pode detetar anormalidades imunofenotípicas em casos em que os estudos combinados de morfologia e citogenética sejam inconclusivos, levando assim ao estabelecimento do diagnóstico. [34]

Apesar das suas várias vantagens, a imunofenotipagem por CF ainda enfrenta várias limitações, como o número reduzido de estudos que relacionam esta técnica com o diagnóstico da SMD, o uso de antigénios isolados, é muito focada em subpopulações

celulares (ex: CD34<sup>+</sup>) e o conhecimento ainda limitado sobre o processo de hematopoiese normal, [38]. A principal limitação é a falta de “standardização” no seu uso ao nível clínico e nos parâmetros considerados, falta de marcadores específicos para discriminar a SMD de outras patologias, e a falta de conhecimento sobre a linha eritroide, ainda pouco descrita. [22]

### 1.3.2.1 Imunofenotipagem das amostras de medula óssea

Em 2012, o Consórcio *EuroFlow* criou e propôs painéis de anticorpos para o diagnóstico e classificação imunofenotípica das diferentes neoplasias hematológicas. Esses painéis foram desenhados de maneira a poderem ser utilizados de forma “standardizada” por diversos laboratórios de diagnóstico, podendo ser aplicados num único ou múltiplos passos sequenciais. Esses painéis de anticorpos são utilizados em combinação com o *software Infinicyt* de forma a otimizar a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo, podendo ser utilizados em todos os citómetros de fluxo atualmente disponíveis que permitem a avaliação de 8 parâmetros de fluorescência. [40]

Assim, a seleção de diferentes anticorpos monoclonais que ligam a proteínas expressas na superfície das células ou no seu citoplasma e conjugados a diferentes fluorocromos, permitiu a criação de painéis de anticorpos para uso clínico. [40]

Na imunofenotipagem a estratégia seguida varia consoante o caso a analisar. No caso em que a população celular alvo não seja previamente conhecida, uma etapa de *screening* baseada num número limitado de anticorpos, de preferência num único tubo, e dirigidos para a identificação diferencial de todos os subconjuntos celulares relevantes na amostra, é normalmente mais eficiente. Nos casos em que a população celular alvo tenha sido definida anteriormente, com base em outros dados de diagnóstico, o uso de um painel completo de anticorpos é recomendado para o diagnóstico desse grupo de patologias. [40]

O grupo *EuroFlow* desenvolveu um painel de diagnóstico, para SMD/LMA, [40]. Tanto a LMA como a SMD constituem patologias bastante heterogêneas, que podem afetar múltiplas linhagens celulares e múltiplos estádios de maturação. Assim, o painel desenvolvido permite identificar a linhagem celular e definir o perfil de maturação das células neoplásicas. O foco do painel SMD/LMA assenta nas linhagens hematopoiéticas



maioritárias, nomeadamente a neutrófilo, monocítica e eritroide, mas também permite o estudo de outros compartimentos hematopoiéticos como a linhagem megacariocítica, basofílica e dendrítica plasmocitóide. O painel também permite a deteção de alterações na maturação e/ou expressões aberrantes de marcadores associados à linhagem linfóide. O perfil imunofenotípico das células neoplásicas vai permitir a subsequente classificação da patologia e nalguns casos pode estar relacionado com anormalidades genéticas. [40]

### 1.3.3. Identificação de populações celulares na medula óssea por Citometria de Fluxo

O compartimento da medula óssea é um tecido complexo que contém células de múltiplas linhagens hematopoiéticas em vários estádios de maturação.

O compartimento CD34<sup>+</sup> da medula é constituído por células estaminais pluripotentes CD34<sup>+</sup> que irão dar origem a todos os componentes celulares, sendo esta população celular bastante heterogénea. [42]

Em indivíduos saudáveis as células precursoras da medula óssea garantem a produção contínua das várias linhagens hematopoéticas. A hematopoiese é um processo complexo em que ocorre uma expressão diferenciada de determinados antígenos ao longo do processo de maturação e diferenciação. [42]

A CF multiparamétrica permite, através da identificação de padrões de expressão de antígenos, o estudo dos diferentes estádios maturativos e linhas hematopoiéticas. O conhecimento dos níveis de expressão de vários marcadores celulares específicos de cada linhagem e de cada grau de diferenciação, no desenvolvimento hematopoiético normal, fornece uma referência para o reconhecimento de padrões de maturação anormais presentes na SMD. [42]

#### 1.3.3.1. Caracterização imunofenotípica da medula óssea normal

Na literatura o uso da expressão do antígeno CD45 e do parâmetro SSC, que nos permite analisar a complexidade celular, têm sido utilizados como o principal método para distinguir as linhas hematopoiéticas maioritárias na medula óssea. [43]

Na monopoiese, que corresponde a formação dos monócitos, as células maduras expressam uma quantidade de CD45 normalmente igual aos linfócitos, mas os monócitos

são caracterizados e assim distinguidos dos linfócitos pela sua maior granularidade. Além disso, estas células também expressam CD11b, CD14, CD33 e HLA-DR. Alguns marcadores linfóides como o CD3, CD19 e CD56 não são normalmente expressos pelos monócitos, [26, 43, 44].

A mielopoiese, processo de formação de células granulocíticas, eosinófilos, basófilos e neutrófilos, com foco nos neutrófilos, pode ser subdividida em 4 estádios principais de maturação com base na expressão de CD11b e CD13: mieloblastos, promielócitos e mielócitos, metamielócitos, e neutrófilos em bastão e maduros. Os neutrófilos mais maduros são caracterizados por uma maior expressão de CD45. Os neutrófilos expressam também elevados níveis de CD11b, CD15 e CD16. Estes últimos são distinguidos dos monócitos por expressarem menores níveis de CD33, CD64 e também por não expressarem HLA-DR e CD14. Alguns marcadores linfóides como CD19 e CD3 não são expressos pelos mesmos. [26, 43, 44]

Em termos da eritropoiese, processo que corresponde á formação dos eritrócitos, as células da linha eritroide apresentam níveis reduzidos ou ausência de expressão de CD45, ausência de antígenos linfóides e mielóides e uma elevada expressão de CD71. [26, 43, 44]

### 1.3.3.2. Principais alterações fenotípicas na Síndrome Mielodisplásica

Em neoplasias como a SMD, a sincronização e regulação da expressão de genes, parâmetros essenciais para o processo de hematopoiese normal, encontram-se alterados, [26]. Assim, as células da medula óssea na SMD mostram frequentemente alterações fenotípicas. Essas alterações podem ser numéricas e/ou na expressão de antígenos quer nas células CD34<sup>+</sup> quer nas CD34<sup>-</sup> nos diferentes compartimentos maturativos. [26]

Na linha granulocítica/neutrófilo, verifica-se uma diminuição da granularidade dos neutrófilos, uma redução na expressão de CD11b, CD15, CD16 e CD64, um aumento de expressão de CD13, uma expressão anormal de CD33 e a ausência de expressão de CD10 nos neutrófilos maduros. Na linha monocítica verifica-se um aumento da percentagem celular, uma expressão alterada de CD13, uma expressão aberrante de CD56, um aumento de expressão de CD64 e ainda a ausência de expressão de CD14 e CD33. [26, 41, 45]

Na linha eritroide, é observado um aumento na expressão de CD105 e de H-Ferritina citoplasmática e uma diminuição na expressão de CD71 e de Glicoporina A. [26, 46]

No compartimento CD34<sup>+</sup>, verifica-se um aumento absoluto e relativo da percentagem de células CD34<sup>+</sup> tendo em conta a celularidade global da medula óssea. Os precursores CD34<sup>+</sup> podem apresentar uma diminuição na expressão de CD38 e CD45 e uma alteração na expressão de CD34, que pode estar aumentada ou diminuída. [26, 47]

A **Tabela III** representa as anormalidades imunofenotípicas frequentemente detetadas nas linhas hematopoéticas maioritárias e no compartimento CD34<sup>+</sup> descritas anteriormente.

**Tabela III:** Alterações celulares e anormalidades imunofenotípicas frequentemente identificadas na SMD, no compartimento CD34<sup>+</sup> e nas linhas granulocítica/neutrófilo, monocítica e eritroide. [26, 41, 45, 46, 47]

<b>Alterações celulares e imunofenotípicas detetadas por CF</b>			
<b>Compartimento CD34<sup>+</sup></b>	<b>Linha granulocítica/neutrófilo</b>	<b>Linha monocítica</b>	<b>Linha eritroide</b>
Aumento da percentagem celular [47]	Diminuição da granularidade [41, 45]	Aumento da percentagem celular [41, 45]	Diminuição de expressão de CD71 e Glicoporina A [46]
Diminuição de expressão de CD38 e CD45 [47]	Aumento de expressão de CD13 [41, 45]	Aumento de expressão de CD64 [41, 45]	Aumento de expressão de CD105 e H- Ferritina citoplasmática [46]
Alteração na expressão de CD34 (aumentada/diminuída) [47]	Ausência de expressão de CD10 nos neutrófilos maduros [41, 45]	Ausência de expressão de CD14 ou CD33 [41, 45]	
	Diminuição de expressão de CD11b, CD15, CD16 e CD64 [41, 45]	Expressão aberrante de CD56 [41, 45]	
	Alteração na expressão de CD33 [41, 45]	Alteração na expressão de CD13 [41, 45]	

### 1.3.4. O contributo da separação celular no diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas

A separação celular tornou-se nos últimos anos uma técnica indispensável no diagnóstico clínico e na investigação básica e clínica, permitindo reforçar o conhecimento acerca da organização hierárquica do processo de diferenciação hematopoiética, aumentar o conhecimento sobre as propriedades moleculares das células de diferentes populações e permitiu estudar alterações na hematopoiese em situações de neoplasias hematológicas. [48, 49]

O *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) é um citómetro de fluxo especializado na separação celular e tem sido revolucionário no diagnóstico das neoplasias hematológicas, [48]. O FACS permite realizar a separação (*sorting*) física de células de determinada população ou subpopulação de interesse, de vários tipos de amostra, com um elevado grau de pureza (95% a 100%). Atualmente, os separadores celulares conseguem separar 4 a 8 subpopulações celulares simultaneamente na mesma amostra, [49, 50]. Os separadores celulares permitem separar uma suspensão heterogénea de células em frações puras de células de interesse com base em características de dispersão de luz (tamanho e complexidade celular) e fluorescentes, [48, 49, 50]. É um instrumento útil para uma análise rápida, objetiva e quantitativa de sinais fluorescentes provenientes de cada célula individual, com base na marcação associada às mesmas, de forma a realizar a separação, uma célula de cada vez, das células de interesse consoante as suas características imunofenotípicas. [48, 49]

O FACS pode ser utilizado em diversas situações clínicas e com diferentes objetivos, permitindo realizar separações de células de uma determinada amostra para subsequentes estudos citogenéticos (FISH) ou estudos moleculares, e também realiza separações assépticas de células para a realização de culturas celulares. [49, 50]

De forma a separar as células de interesse, as mesmas são primeiramente marcadas com anticorpos monoclonais associados a fluorocromos, que vão reconhecer e ligar-se a marcadores específicos nessas células. Os fluorocromos mais brilhantes devem ser utilizados para marcar antígenos pouco expressos, e os menos brilhantes devem ser utilizados para antígenos com alta expressão nas células de interesse. Além disso, os anticorpos devem ser selecionados de forma a minimizar a sobreposição dos seus espectros de emissão. [50]

### 1.3.4.1. Separador celular- Funcionamento

Os princípios de funcionamento da separação celular são os seguintes: a amostra celular, da qual se pretende realizar a separação de uma ou mais populações celulares, é aspirada e as partículas são incorporadas no centro de uma corrente de líquido, estreita e de fluxo rápido, criando-se assim um *stream* (fluxo) de células. [48, 49, 50, 51]

Seguidamente, o *stream* contínuo de células intercepta um ou mais lasers, sendo que os fluorocromos conjugados aos diferentes anticorpos monoclonais ligados aos recetores nas diferentes células de interesse vão emitir fluorescência, mais precisamente, vão emitir um pulso de fótons mensurável de um comprimento de onda específico. A intensidade de emissão depende do número de moléculas de fluorocromo em cada célula. Além disso, os lasers vão permitir medir parâmetros como o SSC e o FSC. Os sinais fluorescentes emitidos de cada célula individual vão ser analisados através de detetores de fluorescência. Os detetores vão permitir a obtenção de diversos gráficos e a identificação das diferentes populações celulares de interesse, com base nas suas características fluorescentes. [48, 49, 50, 51]

Posteriormente, o fluxo contínuo de células passa por um *nozzle* com um orifício de diâmetro muito reduzido (normalmente de 70 $\mu$ m). O qual vai permitir controlar os parâmetros do *stream*, nomeadamente o diâmetro, velocidade e pressão, de forma a permitir a passagem de uma única célula de cada vez. No *nozzle* um mecanismo de vibração vai levar a quebra desse *stream* contínuo de células criando um *stream* regular de gotículas (*droplets*), as quais são constituídas apenas por uma única célula. O sistema está configurado de forma a existir uma baixa probabilidade de ocorrer mais de uma célula por gotícula. Exatamente no local onde ocorre a quebra do *stream* existe um anel de carga elétrica que vai associar uma carga a cada gotícula que se cria consoante as características fluorescentes das células que estão presentes nas mesmas, medidas anteriormente pelos detetores. Assim, é associada uma carga a cada gotícula constituída por uma célula de interesse. [48, 49, 50, 51]

Seguidamente, cada gotícula formada passa por um sistema de deflexão eletrostática correspondente a duas placas de deflexão. No momento em que as gotículas passam no meio das duas placas, as mesmas vão ser desviadas consoante a carga associada, através de atração ou repulsão eletrostática. As gotículas que contêm células

de interesse vão ser atraídas para a placa de carga oposta à sua e assim desviadas para recipientes apropriados à sua recolha. As gotículas que não tiverem carga, por não incluírem células de interesse, passam pelas placas sem serem desviadas e são aspiradas por um sistema em direção a um recipiente de recolha das células não separadas. [48, 49, 50, 51]

Esta técnica apresenta varias vantagens em comparação com outros métodos de purificação. Quando uma elevada pureza de separação da população de interesse é necessária, como em casos em que as células alvo precisam de ser separadas com base num marcador pouco expresso ou quando duas ou mais populações celulares requerem uma separação com base na expressão diferente de um mesmo marcador, o FACS constitui o método preferencial de separação. [50]

#### 1.3.4.2. Utilidade clínica

A sensibilidade e especificidade das técnicas moleculares e citogenéticas, principalmente a técnica de FISH utilizada no diagnóstico da SMD, podem ser melhoradas através da separação celular, que permite a separação e análise de uma determinada população de interesse sem qualquer contaminação com outras células residuais. Assim, o estudo por FISH não incide na amostra total mas apenas na população separada e pura de células neoplásicas, sendo a análise mais sensível e específica. [48, 50]

A sensibilidade do FACS permite isolar populações clonais muito reduzidas de forma a possibilitar o estudo das alterações cromossómicas associadas, bem como, separar diferentes subpopulações clonais numa mesma amostra. Também, permite a avaliação da extensão da doença e a confirmação da doença residual mínima, esta última importante no contexto da monitorização da terapêutica. [48, 50]

#### 1.4. A Síndrome Mielodisplásica associada a outras neoplasias hematológicas

Recentemente, alterações imunofenotípicas comuns na SMD têm sido detetadas em neutrófilos maduros residuais e em monócitos (e de forma menos significativa em células da linhagem eritroide) de casos de LMA diagnosticada *de novo* e em casos de Gamopatias Monoclonais de significado indeterminado (MGUS) e de Mieloma Múltiplo. [52, 53]

Apesar da sua origem mieloide, vários casos de SMD apresentam anormalidades fenotípicas nas células B, frequentemente relacionadas com uma diminuição na produção das mesmas, presença de bloqueios maturativos e aumento no processo de apoptose, [54]. De facto, uma diminuição, ou mesmo ausência, de células CD34<sup>+</sup> comprometidas à linha linfoide B, é um achado muito frequente na MO de casos de SMD. [34, 52]

A associação entre doenças Linfoproliferativas Crónicas de células B (DLPC-B) e patologias da linhagem mieloide é pouco comum, tendo sido descrita de forma esporádica ao longo dos anos, incluindo casos de LLC (Leucemia Linfoide Crónica) associados a LMA, SMD e/ou mastocitose sistémica. [54, 55]

Casos de LLC com sequências de aminoácidos estereotipados no gene da IGHV (região variável da cadeia pesada da imunoglobulina) *versus* não estereotipados, apresentam uma maior incidência de alterações fenotípicas típicas de SMD em monócitos e/ou neutrófilos do sangue periférico. [55]

A associação entre a SMD e DLPC-B pode ser *de novo* ou em alguns casos, a SMD pode ocorrer de forma secundária, devido à terapêutica administrada. Este tipo de associação pode dificultar a escolha da terapêutica adequada além de conferir pior prognóstico. [56]

Assim, a utilização de um único painel de diagnóstico que permita classificar as DLPC-B e que também possibilite a identificação de fenótipos alterados e bloqueios maturativos nas diferentes linhas mieloides, o que ocorre na SMD, revela-se importante para o diagnóstico concomitante destas duas entidades.

### 1.4.1. Relevância do painel de diagnóstico de Doenças Linfoproliferativas Crônicas de células B no diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas

Atualmente, o painel de diagnóstico de DLPC-B, recomendado pelo consórcio *Euroflow*, inclui uma combinação de vários marcadores que permitem a classificação deste grupo de patologias de forma sensível. Este painel inclui marcadores que mostraram ser relevantes na identificação de rasgos fenotípicos displásicos nas linhas a neutrófilo, monocítica e eritroide. [56]

Em estudos realizados anteriormente, a expressão da molécula CD10 (também presente no painel de diagnóstico para LMA/SMD), que permite a identificação do último estágio maturativo da linha à neutrófilo, mostrou ser reduzida em casos de SMD quando comparado ao normal, [40, 56, 57]. Ainda nesta linha hematopoiética, os marcadores CD305 e CD95 também revelaram alterações na sua expressão em casos de SMD, nomeadamente um aumento de expressão nos neutrófilos maduros. [56]

No estudo de displasias associadas a linha monocítica, os marcadores CD39 e HLA-DR revelaram-se úteis. A expressão destes dois marcadores revelou ser diminuída nos monócitos de doentes com SMD em comparação ao normal. [56]

Por sua vez, os recetores CD43, CD49d e CD95, apresentaram alterações na sua expressão na linha eritroide em casos de SMD. Foi relatada uma diminuição da expressão dos recetores CD43 e CD49d, e tal como observado na linha a neutrófilo, um aumento da expressão de CD95. [56]

Alterações na expressão de CD43 e CD49d em casos de SMD já se encontram descritas na literatura. [58, 59, 60, 61, 62, 63]



## 2. Objetivos do estágio

Os objetivos do meu estágio consistiram em 2 principais:

1: Separação celular de amostras de medula óssea com suspeita de SMD, realizando a separação das populações maioritárias (linha a neutrófilo, monocítica e eritroide) e dos blastos  $CD34^{+/-}/CD117^{+}$ , através do uso de anticorpos monoclonais específicos, com a finalidade de melhorar a sensibilidade e especificidade da técnica de FISH.

2: Análise do padrão de expressão do CD43 e CD49d, marcadores do painel DLPC-B, ao longo da maturação da linha eritroide, na medula óssea normal e displásica (SMD), de forma a identificar a utilidade desses 2 recetores na identificação de rasgos fenotípicos displásicos na linha eritroide.

## 2.1. Objetivo 1- Separação celular de amostras de medula óssea com suspeita de Síndrome Mielodisplásica

No contexto das SMD, foram identificadas e seguidamente separadas as células das linhas granulocítica (neutrófilo), monocítica e eritroide, as que normalmente apresentam rasgos displásicos, e também os blastos CD34<sup>+</sup>/<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>.

Após a separação das diferentes populações celulares de interesse, as mesmas foram analisadas pelo método FISH, para avaliar a presença ou não das alterações genéticas mais frequentes nesta entidade, permitindo aumentar a sensibilidade deste método e quantificar em cada população o número de células com e sem alteração genética, contribuindo desta forma para o diagnóstico e prognóstico.

## 2.1.1. Material e métodos

### 2.1.1.1. Amostras

Foi realizada a separação das células das três linhagens maioritárias e do compartimento CD34<sup>+/</sup>-/CD117<sup>+</sup>, da MO de 55 casos com suspeita de SMD, correspondendo a 21 mulheres e 34 homens. A idade média dos doentes por género está descrita na **Tabela IV**.

**Tabela IV:** Dados relativos à idade média dos doentes por género.

	<b>Feminino</b>	<b>Masculino</b>	
	N= 21	N= 34	N total= 55
<b>Idade média ± DP</b>	72 ± 12	70 ± 13	71 ± 12

Resultados expressos em idade média ± desvio padrão (DP).  
N, número de casos.

### 2.1.1.2. Combinação de anticorpos monoclonais para a identificação das populações celulares de interesse

De forma a proceder à identificação de cada população maioritária de interesse e dos blastos CD34<sup>+/</sup>-/CD117<sup>+</sup>, com base no perfil imunofenotípico, foi utilizada uma combinação de 5 anticorpos monoclonais ligados a diferentes fluorocromos. A constituição desta combinação está descrita na **Tabela V**.

**Tabela V:** Combinação de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos para a identificação das células das linhas granulocítica (neutrófilo), monocítica e eritroide e também dos blastos CD34<sup>+/</sup>-/CD117<sup>+</sup>.

<b>Fluorescências</b>	<b>Anticorpo monoclonal</b>
<b>PO</b>	<b>CD45</b> (clone V500-c; BD Biosciences, USA)
<b>PE-Cy7</b>	<b>CD117</b> (clone 104D2D1; Beckman Coulter, France)
<b>PerCP-Cy5.5</b>	<b>CD34</b> (clone 8G12; BD Biosciences, USA)
<b>PE</b>	<b>CD33</b> (clone P67.6; BD Biosciences, USA)
<b>FITC</b>	<b>CD36</b> (clone FA6.152; Beckman Coulter, France)

PO, Pacific Orange; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7; PerCP-Cy5.5, Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5; PE, Phycoerythrin; FITC, Fluorescein Isothiocyanate.

### 2.1.1.3. Processamento das amostras

De forma a proceder à marcação imunofenotípica das amostras de aspirado medular, para conseqüente separação das populações de interesse, nomeadamente das células das linhas granulocítica (neutrófilo), monocítica, eritroide e blastos CD34<sup>+/</sup>-/CD117<sup>+</sup>, foi realizado o seguinte protocolo:

Num primeiro passo, cerca de 1mL de amostra de aspirado medular foi colocada num tubo de Falcon de 15 mL de forma a obter o máximo de células de interesse no momento da separação. As amostras foram de seguida lisadas com Cloreto de Amónio pH 7.3 (8,29 gramas de Cloreto de Amónio (marca comercial: PANREAC) + 1.0 grama de Bicarbonato de Potássio + 0.037 gramas de Na<sub>2</sub> EDTA diluído em 1 litro de água destilada) (até encher o tubo de Falcon) com o tubo deitado durante 20 minutos de forma a permitir a atuação do lisante. No final do período de lise, foi realizada uma centrifugação durante 5 min (minutos) a 540 x g, de forma a precipitar as células no fundo do tubo. Após a centrifugação foi feita uma decantação de forma a retirar o lisante em excesso.

Seguidamente, foi realizada a marcação imunofenotípica das amostra de aspirado medular com a adição do volume adequado de cada anticorpo monoclonal indicado na **Tabela VI**.

**Tabela VI:** Volume de cada anticorpo monoclonal utilizado para 1 mL de amostra.

<b>Anticorpos Monoclonais</b>	<b>CD36 FITC</b>	<b>CD33 PE</b>	<b>CD34 PerCP- Cy5.5</b>	<b>CD117 PE-Cy7</b>	<b>CD45 PO</b>
<b>Volume (µL)</b>	5	5	5	2,5	2

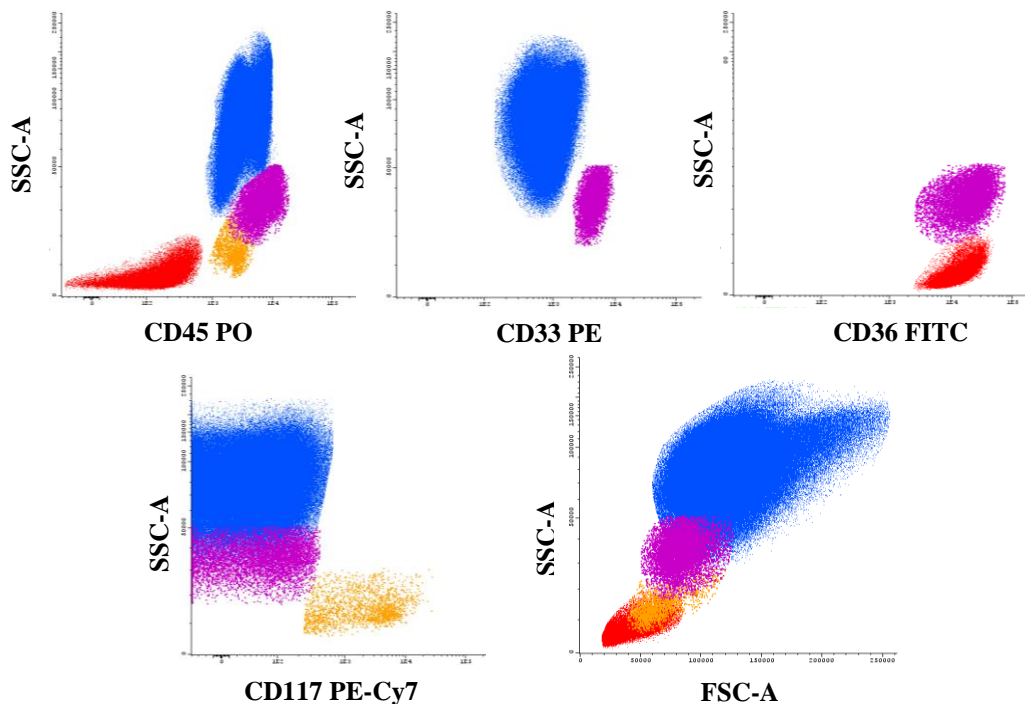
FITC, Fluorescein Isothiocyanate; PE, Phycoerythrin; PerCP-Cy5.5, Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7; PO, Pacific Orange.

Segue-se uma incubação durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Este tempo de incubação permite que os anticorpos se liguem aos respetivos antigénios de superfície nas células, e tendo em conta o facto de os anticorpos estarem conjugados a moléculas fotossensíveis, a incubação no escuro é essencial para evitar a perda de intensidade de fluorescência.

Num último passo, realizou-se a lavagem das amostras, com a adição de PBS (Tampão fosfato salino) 10 x pH 7.4 (até encher o tubo de Falcon) seguido de uma agitação e centrifugação durante 5 min a 540 x g. No final da centrifugação foi realizada uma decantação de forma a retirar o PBS em excesso. Finalmente foi realizada uma ressuspensão com 1mL de PBS.

#### 2.1.1.4. Identificação das populações celulares de interesse para consequente separação

A identificação de cada população maioritária de interesse e dos blastos  $CD34^{+/-}/CD117^{+}$ , com base no perfil imunofenotípico, foi realizada da seguinte forma: o CD33 permitiu distinguir os neutrófilos (expressão intermédia) dos monócitos (expressão forte); o CD34 permitiu identificar as células progenitoras hematopoiéticas  $CD34^{+}$ , assim como o CD117, também expresso nessas células e em células mais comprometidas às diferentes linhas hematopoiéticas, mas que já perderam a expressão de CD34; o CD36 permitiu identificar os eritroblastos (expressão forte) e os monócitos (expressão forte); por fim, o CD45 permitiu identificar os eritroblastos (expressão negativa), assim como auxiliou na deteção de todas as outras populações a separar em conjunto com as características de dispersão de luz (granularidade e tamanho celular). Cada uma das populações de interesse está identificada na **Figura 2**.



**Figura 2:** Identificação imunofenotípica das populações celulares maioritárias (linha a neutrófilo, monocítica e eritroide) e dos blastos  $CD34^{+/-}/CD117^{+}$  para posterior separação celular.

Os neutrófilos ( $SSC^{\text{elevado}}/FSC^{\text{elevado}}/CD45^{+}/CD33^{\text{intermédio}}/CD117^{-}$ ) estão representados a azul; os monócitos ( $CD33^{\text{forte}}/CD36^{\text{forte}}/CD117^{-}/CD45^{\text{forte}}$ ) estão representado a violeta; os eritroblastos ( $SSC^{\text{reduzido}}/CD45^{-}/CD36^{\text{forte}}$ ) estão representados a vermelho; os blastos ( $CD34^{+/-}/CD45^{\text{intermédio}}/CD117^{+}$ ) estão representados com a cor laranja.

### 2.1.1.5. Separação celular

Com recurso ao separador celular BD FACSAria™ II (Becton Dickinson (BD) *Biosciences*; San Jose, USA) equipado com o *software* BD FACSDiva (v6.1.2; BD *Biosciences*; San Jose, USA), foram separadas as células das linhas granulocítica (neutrófilo), monocítica e eritroide e os blastos CD34<sup>±</sup>/CD117<sup>+</sup>.

### 2.1.2. Resultados e discussão

A análise por FISH, dos blastos CD34<sup>±</sup>/CD117<sup>+</sup>, foi apenas processada em 58% dos 55 casos separados (11 mulheres e 21 homens). Foram detetadas anormalidades cromossómicas em 53% dos 32 casos processados com sucesso, como descrito na **Tabela VII**, o que corresponde ao reportado na literatura. [64]

**Tabela VII:** Incidência de alterações cromossómicas por género.

	Feminino	Masculino	
	N= 21	N= 34	N total= 55
<b>FISH</b>	11/21	21/34	32/55 (58%)
<b>Alteração</b>	3/11 (27%)	14/21 (67%)	17/32 (53%)

FISH, hibridação *in situ* por fluorescência (do inglês: *fluorescence in situ hybridization*).

A técnica permitiu identificar alterações genéticas típicas de SMD em cerca de metade dos casos processados com sucesso (n=17), o que fortalece a hipótese de diagnóstico. Ainda, permitiu quantificar nos blastos CD34<sup>±</sup>/CD117<sup>+</sup> separados o número de células com e sem alteração genética, o que pode vir a contribuir para o prognóstico, uma vez que quantifica em cada compartimento a frequência do clone SMD e das células normais. A **Tabela VIII** apresenta as alterações cromossómicas detetadas nos blastos CD34<sup>±</sup>/CD117<sup>+</sup> analisados e a frequência das mesmas.

**Tabela VIII:** Frequência das alterações cromossômicas detetadas pela técnica de FISH nos 32 casos processados.

Anomalia	N total (%*)	Anomalia isolada, n	Com uma anomalia adicional, n	Parte de um cariótipo complexo ( $\geq 3$ ), n	% Células** com alteração $\pm$ DP
<b>Del (5q)</b>	2 (6%)	-	1	1	94 $\pm$ 3
<b>Monossomia do 7</b>	4 (13%)	1	2	1	76 $\pm$ 23
<b>-Y</b>	2 (6%)	1	-	1	71 $\pm$ 25
<b>Del (7q)</b>	4 (13%)	2	1	1	49 $\pm$ 28
<b>Trissomia do 8</b>	1 (3%)	-	-	1	46
<b>Del (20q)</b>	12 (38%)	7	4	1	27 $\pm$ 17

N, número de casos; DP, desvio padrão.

\* Tendo em conta o número total de casos em que a técnica de FISH foi realizada (n total=32)

\*\* Blastos (34<sup>+</sup>/117<sup>+</sup>) analisados.

Foram observadas uma série de alterações cromossômicas nas amostras processadas com sucesso, podendo as mesmas apresentar-se como alterações isoladas (n=11), ou como parte de um conjunto de duas (n=4) ou três alterações (n=2) (cariótipo complexo).

Anomalias complexas na SMD caracterizam um grupo de doentes com um prognóstico e um tempo de sobrevivência média reduzidos e uma elevada probabilidade de progressão para LMA. A presença de três anomalias em simultâneo mostrou reduzir o tempo de sobrevivência para 17 meses e a presença de 4 ou mais, para menos de 9 meses. Anomalias complexas podem ser resultado de um processo de acumulação sequencial de alterações, conhecido como evolução cariotípica. [65, 66]

Constatou-se que a alteração genética mais frequente, presente em 38% dos casos, foi a del (20 q), isolada, com uma anomalia adicional ou como parte de um cariótipo complexo (**Tabela VIII**). Esta alteração foi detetada numa percentagem muito reduzida de blastos (27%  $\pm$  17), o que poderia dificultar a sua identificação caso não se tivesse procedido à separação dos blastos, aumentando assim a sensibilidade do FISH.

A incidência desta alteração foi maior do que a descrita na literatura onde a mesma é observada em apenas 2% a 5% dos casos. Esta alteração está associada a uma reduzida progressão para LMA. Embora esta alteração, no contexto da SMD, tenha sido estudada de forma aprofundada, nenhum dos genes perdidos aquando da deleção das regiões do 20q mostra ter alguma associação com o desenvolvimento desta patologia. Assim,



estudos adicionais sobre a ação desta alteração na patogênese da doença são necessários. [64, 65]

A monossomia do 7 e a del (7q) foram observadas em 13% dos casos (**Tabela VIII**). Anomalias no cromossoma 7 estão presentes em cerca de 10% dos casos de SMD primária, o que está de acordo com os resultados obtidos, e até 50% dos casos de SMD secundária. Anomalias associadas a este cromossoma estão relacionadas com um pior prognóstico e um tempo de sobrevivência reduzido em casos de SMD. [64]

Embora tenha sido detetada em apenas 6% dos casos analisados (**Tabela VIII**), a deleção do braço longo do cromossoma 5 (5q) consiste na alteração cromossômica mais frequente nos casos de SMD (15%). Quando presente, mostrou afetar a grande maioria dos blastos analisados (94% ± 3). Doentes com esta alteração apresentam parâmetros clínicos bastante heterogêneos, sendo divididos em dois grupos tendo em conta parâmetros biológicos e clínicos, a resposta à terapêutica e o prognóstico. Doentes com 5q isolado apresentam um melhor prognóstico e uma reduzida progressão para LMA, contrariamente aos doentes com alterações citogenéticas múltiplas (cariótipos complexos). A síndrome 5q- constitui um grupo específico na classificação desta patologia. [64, 65]

A anomalia -Y, observada em 6% dos casos analisados (**Tabela VIII**), comparável aos 4% descritos na literatura, está relacionada com a idade, mas também pode ocorrer em associação com neoplasias hematológicas. Casos de SMD com esta anomalia cromossômica isolada estão associados a um bom prognóstico. Uma vez que esta alteração está relacionada com o aumento da idade e que a incidência de SMD aumenta com esta última, a associação entre esta anomalia e a patologia não é clara. No entanto, foi sugerido que esta alteração possa ter um papel no desencadear de desordens mieloides. [64, 65, 66]

A trissomia do 8 foi detetada apenas num caso, sendo parte de um cariótipo complexo (**Tabela VIII**). Casos com esta anomalia isolada apresentam um risco intermédio. Essa alteração no contexto da SMD parece ocorrer de forma tardia na patogênese da doença, como evidenciado pela sua presença nos progenitores mieloides e quase ausência nas células estaminais CD34<sup>+</sup>. As células com esta alteração expressem elevados níveis de proteínas anti-apoptóticas e uma elevada resistência ao processo de apoptose, o que lhes confere vantagens significativas em relação aos

progenitores hematopoiéticos normais, nomeadamente a capacidade de sobrevivência do clone SMD ao microambiente autoimune. Mais ainda, doentes com esta alteração apresentam elevadas taxas de resposta a terapias imunossupressoras (67% dos casos), o que parece indicar a existência de uma fisiopatologia autoimune subjacente a esta alteração específica. [64]

Na SMD é comum a presença de anormalidades cromossómicas que levam a uma série de alterações em vários processos celulares, nomeadamente nos mecanismos de reparação do *DNA*, cascatas de sinalização celulares, *splicing* do *RNA* mensageiro e na regulação epigenética dos genes. A SMD apresenta vários tipos de combinações de alterações cromossómicas, o que contribui para a heterogeneidade desta entidade. Assim, a identificação de alterações no cariótipo, através da técnica de FISH, fornece dados importantes para o estabelecimento do prognóstico e para a escolha da terapêutica mais adequada, promovendo uma melhor resposta ao tratamento e uma redução na toxicidade associada a terapias menos adequadas. [64]

A separação dos blastos através da citometria de fluxo (FACS) parece permitir aumentar a sensibilidade da técnica de FISH, uma vez que a mesma não incide sobre o total da amostra em estudo mas sim sobre uma determinada população de interesse, permitindo identificar populações clonais muito reduzidas que provavelmente não seriam detetadas sem o contributo da separação celular.

## 2.2. Objetivo 2 - Análise do padrão de expressão do CD43 e CD49d ao longo da maturação eritroide normal e displásica

Apesar das suas diversas vantagens, a imunofenotipagem por CF ainda apresenta várias limitações no seu contributo para o diagnóstico das SMD, como a falta de “standardização” no seu uso clínico, o número reduzido de recetores que melhor permitem identificar, em cada linha hematopoiética, rasgos fenotípicos displásicos e ainda, o reduzido conhecimento da maturação da linha eritroide, que não possui um marcador específico de linhagem. [4, 67]

Até hoje, os marcadores CD235a e CD71 têm sido utilizados na rotina para a identificação dos diferentes estádios maturativos da linha eritroide, sendo mais tarde introduzido o CD105 como um marcador útil para a identificação das células CD34<sup>+</sup> comprometidas a esta linha. Recentemente, dois outros marcadores, o CD35 e o CD44 provaram ser úteis na deteção de displasia eritroide, contribuindo deste modo para expandir o painel de marcadores utilizados para o estudo desta linha. Expressão anormal de CD36, CD71, CD105 e CD235a são frequentemente detetadas nos casos de SMD. [67]

Num estudo recente, o painel de diagnóstico de DLPC-B da *Euroflow* mostrou incluir marcadores relevantes para a identificação de displasias associadas a linha eritroide, nomeadamente o CD43 e CD49d, que revelaram alterações na sua expressão em casos de SMD. [40, 56]

A leucosialina (CD43) é uma proteína transmembranar altamente glicosilada que interage com proteínas do citoesqueleto (domínio citoplasmático); transmite sinais que controlam uma série de vias de transdução de sinal intracelulares envolvidas na ativação, proliferação e sobrevivência celular; promove a adesão celular, apresentando também propriedades de anti-adesão, [56, 68]. Esta proteína é considerada um marcador pan-HSC (células estaminais hematopoiéticas) juntamente com o CD45. [68]

É expressa em todas as células hematopoiéticas expeto nas células B maduras quiescentes e nos eritrócitos. Na linhagem linfoide B a leucosialina é expressa em células pré-B mas está ausente em células B maduras quiescentes, sendo novamente expressa nas células B ativadas e nas células plasmáticas. É considerada um marcador associado a células T, uma vez que é expresso em cerca de 95% dos timócitos e células T do sangue periférico, [68, 69]. O CD43 pode ser expresso, de forma aberrante, nas células B do

linfoma do manto, nas de LLC e nas de outros tipos de linfomas não Hodgkin de células B. [69, 70]

Na linhagem eritroide, a sua expressão foi observada num estágio inicial da diferenciação, no qual células CD43<sup>+forte</sup>/CD45<sup>+fraco</sup>/CD34<sup>+intermédio</sup> foram definidas como células estaminais hematopoiéticas com potencial de diferenciação multilinha, mas com uma maior tendência para a diferenciação eritroide. [68, 69, 71]

A subunidade  $\alpha 4$  (CD49d) da integrina  $\alpha 4\beta 1$  é uma glicoproteína de superfície que medeia a adesão de precursores hematopoiéticos na membrana basal da MO, permitindo a migração das mesmas. Confere propriedades de adesão, mobilidade e proteção contra o processo de apoptose nas células estaminais hematopoiéticas. Ainda, apresenta um papel crucial na comunicação entre as células e o seu microambiente. [56, 58, 72]

Esta proteína é expressa em macrófagos, linfócitos T e B, eosinófilos, basófilos, células NK (*natural-killer*), células dendríticas, células Langerhans, células mieloides, precursores eritroides e timócitos. Contrariamente, os eritrócitos maduros, plaquetas e neutrófilos não expressam este marcador. [56, 58, 72]

Vários estudos demonstram que a sobrevivência, proliferação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos depende da interação com a fibronectina (componente da matriz extracelular da MO), a qual é mediada por esta integrina. Assim, os níveis de expressão e o estado funcional desta proteína constituem fatores importantes na regulação da proliferação e sobrevivência dos precursores hematopoiéticos. [58]

A interação desta integrina com a fibronectina mostrou promover a sobrevivência dos blastos em casos de LMA, podendo contribuir desta forma para a persistência da doença residual mínima. [58]

Trabalhos anteriores descrevem uma diminuição da expressão de CD49d ao longo da maturação eritroide, com uma expressão elevada deste marcador em precursores eritroides imaturos e uma diminuição da mesma nos eritroblastos mais diferenciados, [59, 73, 74]. Na linhagem eritroide, o CD49d revelou melhorar a identificação fenotípica dos diferentes estádios de diferenciação dos precursores eritroides. [75]

Embora o CD43 e o CD49d sejam expressos ao longo da maturação eritroide, o padrão de expressão dos mesmos no contexto da eritropoiese normal ainda não se encontra descrito de forma específica na literatura, e embora tenham sido observadas alterações na expressão destes marcadores na linha eritroide nos casos de SMD, um estudo mais detalhado destas alterações ao longo da maturação, para os diferentes estádios, é necessária.

Deste modo, o 2º objetivo do meu estágio consistiu:

- Na análise da expressão de CD43 e CD49d, no compartimento CD34<sup>+</sup> da MO, em função do seu comprometimento para as diferentes linhas hematopoiéticas;
- No estudo do padrão de expressão dessas duas moléculas durante a maturação da linha eritroide normal;
- Investigar se em casos de SMD esta expressão é diferente da observada na medula normal.

## 2.2.1. Material e métodos

### 2.2.1.1. Amostras

Para o estudo da expressão dos dois marcadores, CD43 e CD49d, no compartimento CD34<sup>+</sup> da medula óssea normal, tendo em conta os diferentes comprometimentos maturativos, e ao longo da maturação eritroide, na MO normal e em casos de SMD, foram analisadas 31 amostras de aspirados medulares, das quais 13 de MO normal (controlo) e 18 de doentes diagnosticados com SMD. Com base na classificação da OMS de 2016, o grupo SMD foi dividido em SMD I (que inclui casos de SMD com displasia unilinha (n=2) e casos com displasia multilinha (n=6)); SMD II (que inclui casos de SMD com excesso de blastos do tipo 1 (n=3) e tipo 2 (n=7)). Ainda, tendo em conta todos os casos de SMD (n=18), foi definido um terceiro grupo de SMD com displasia eritroide observada por morfologia (n=7). A idade média dos doentes por género em cada grupo está descrita na **Tabela IX**.

**Tabela IX:** Caracterização quanto ao género e idade dos indivíduos incluídos nos diferentes grupos em estudo.

		<b>Controlo</b>	<b>SMD</b>	<b>SMD I</b>	<b>SMD II</b>	<b>SMD com displasia eritroide</b>
<b>N total</b>		13	18	8	10	7
<b>Idade (Média ± DP)</b>	Sexo	N=8	N=6	N=3	N=3	N=2
	Feminino	( <b>56 ± 16</b> )	( <b>83 ± 3</b> )	( <b>84 ± 2</b> )	( <b>81 ± 2</b> )	( <b>84 ± 3</b> )
<b>Idade (Média ± DP)</b>	Sexo	N=5	N=12	N=5	N=7	N=5
	Masculino	( <b>59 ± 25</b> )	( <b>72 ± 9</b> )	( <b>75 ± 9</b> )	( <b>70 ± 10</b> )	( <b>78 ± 6</b> )

SMD, Síndrome Mielodisplásica; N, número de casos; DP, desvio padrão.

### 2.2.1.2. Combinação de anticorpos monoclonais para o estudo do compartimento dos precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup>

Para identificar e aceder ao compartimento dos precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> e aos diversos comprometimentos maturativos, foram utilizadas duas combinações de 7 anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos. A composição destas combinações está descrita na **Tabela X**.

**Tabela X:** Combinação de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos para o estudo do compartimento heterogéneo CD34<sup>+</sup>.

<b>Fluorescências</b>	<b>TUBO 1</b>	<b>TUBO 2</b>
<b>PB</b>	<b>Anti- HLA-DR</b> (clone L243; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>Anti- HLA-DR</b> (clone L243; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>PO</b>	<b>CD45</b> (clone V500-c; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD45</b> (clone V500-c; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>PE-Cy7</b>	<b>CD117</b> (clone 104D2D1; Beckman Coulter, France)	<b>CD117</b> (clone 104D2D1; Beckman Coulter, France)
<b>PerCP-Cy5.5</b>	<b>CD34</b> (clone 8G12; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD34</b> (clone 8G12; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>PE</b>	<b>CD13</b> (clone L138; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD13</b> (clone L138; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>APC</b>	<b>CD123</b> (clone 9F5; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD123</b> (clone 9F5; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>APC-H7</b>	<b>CD43</b> (clone 1G10; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD49d</b> (clone 9F10; BD <i>Biosciences</i> , USA)

PB, Pacific Blue; PO, Pacific Orange; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7; PerCP-Cy5.5, Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5; PE, Phycoerythrin; APC, Allophycocyanin; APC-H7, Allophycocyanin-Hilite7.

### 2.2.1.3. Combinação de anticorpos monoclonais para o estudo da linha eritroide

De forma a proceder à identificação e caracterização dos diferentes estádios maturativos da linha eritroide, com base no perfil imunofenotípico, foram utilizadas duas combinações de 7 anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos. A constituição destas combinações está descrita na **Tabela XI**.

**Tabela XI:** Combinação de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos para o estudo da maturação da linha eritroide.

<b>Fluorescências</b>	<b>TUBO 1</b>	<b>TUBO 2</b>
<b>PB</b>	<b>Anti- HLA-DR</b> (clone L243; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>Anti- HLA-DR</b> (clone L243; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>PO</b>	<b>CD45</b> (clone V500-c; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD45</b> (clone V500-c; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>PE-Cy7</b>	<b>CD117</b> (clone 104D2D1; Beckman Coulter, France)	<b>CD117</b> (clone 104D2D1; Beckman Coulter, France)
<b>PerCP-Cy5.5</b>	<b>CD34</b> (clone 8G12; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD34</b> (clone 8G12; BD <i>Biosciences</i> , USA)
<b>PE</b>	<b>CD105</b> (clone TEA3/17.1.1; Beckman Coulter, France)	<b>CD105</b> (clone TEA3/17.1.1; Beckman Coulter, France)
<b>FITC</b>	<b>CD36</b> (clone FA6.152; Beckman Coulter, France)	<b>CD36</b> (clone FA6.152; Beckman Coulter, France)
<b>APC-H7</b>	<b>CD43</b> (clone 1G10; BD <i>Biosciences</i> , USA)	<b>CD49d</b> (clone 9F10; BD <i>Biosciences</i> , USA)

PB, Pacific Blue; PO, Pacific Orange; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7; PerCP-Cy5.5, Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5; PE, Phycoerythrin; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; APC-H7, Allophycocyanin-Hilite7.



#### 2.2.1.4. Processamento das amostras

De forma a proceder à marcação imunofenotípica das amostras de MO, para consequente aquisição e análise por CF, foi executado o seguinte protocolo:

Num primeiro passo, as amostras de MO colhidas em tubos de K3E EDTA 4mL (Vacuette<sup>®</sup>, Áustria), foram previamente lavadas com PBS (Tampão fosfato salino) 10x pH 7.4, sendo esta lavagem realizada da seguinte forma: cerca de 1mL da amostra inicial colhida foi colocada num tubo de Falcon de 15 mL no qual foi adicionado PBS (até encher o tubo), a seguir as amostras foram homogeneizada e centrifugadas durante 5 minutos a 540 x g. Seguidamente, o sobrenadante foi retirado, e as amostras foram lavadas de novo com PBS e centrifugadas. Este passo é repetido três vezes.

Para a marcação imunofenotípica das amostras de MO, o volume adequado de cada anticorpo monoclonal foi adicionado a 200 µL de amostra previamente lavada. O volume de cada anticorpo utilizado no estudo do compartimento CD34<sup>+</sup> e da maturação eritroide está indicado na **Tabela XII** e **Tabela XIII**, respetivamente. Após a marcação das amostras realizou-se uma incubação durante 10 minutos no escuro à temperatura ambiente.

**Tabela XII:** Volume de cada anticorpo monoclonal utilizado no estudo do compartimento CD34<sup>+</sup> para 200 µL de amostra.

Anticorpos Monoclonais	Anti- HLA-DR PB	CD45 PO	CD117 PE-Cy7	CD34 PerCP- Cy5.5	CD13 PE	CD123 APC	CD43 APC- H7	CD49d APC-H7
Volume (µL)	2	2	2,5	5	5	5	2,5	2,5

PB, Pacific Blue; PO, Pacific Orange; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7; PerCP-Cy5.5, Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5; PE, Phycoerythrin; APC, Allophycocyanin; APC-H7, Allophycocyanin-Hilite7.

**Tabela XIII:** Volume de cada anticorpo monoclonal utilizado no estudo da linha eritroide para 200  $\mu$ L de amostra.

Anticorpos Monoclonais	Anti- HLA-DR PB	CD4 5 PO	CD117 PE-Cy7	CD34 PerCP-Cy5.5	CD105 PE	CD36 FITC	CD43 APC- H7	CD49d APC-H7
Volume ( $\mu$ L)	2	2	2,5	5	5	5	2,5	2,5

PB, Pacific Blue; PO, Pacific Orange; PE-Cy7, Phycoerythrin-Cyanine 7; PerCP-Cy5.5, Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5; PE, Phycoerythrin; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; APC-H7, Allophycocyanin-Hilite7.

Após este tempo de incubação foi adicionado a cada tubo 2 mL de lisante *FACS™ Lysing Solution* 10x (BD Biosciences; San Jose, USA), de forma a lisar os eritrócitos presentes na amostra e fixar as células de interesse (leucócitos e precursores eritroides nucleados). A seguir à agitação no vórtex para homogeneizar, cada tubo foi incubado durante 10 minutos no escuro à temperatura ambiente de forma a permitir a atuação do lisante. No final do período de incubação, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 540 x g, de forma a precipitar as células no fundo dos tubos. Após a centrifugação cada tubo foi decantado de forma a retirar o lisante em excesso.

Num último passo, realizou-se a lavagem das amostras, com a adição de 2 mL de PBS a cada tubo, agitação no vórtex e centrifugação durante 5 minutos a 540 x g. No final da centrifugação cada tubo foi decantado de forma a retirar o PBS em excesso. Finalmente, foi realizada uma ressuspensão do *pellet* com 200  $\mu$ L de PBS.

### 2.2.1.5. Aquisição e análise

Após a realização deste protocolo foi efetuada a aquisição das amostras no citómetro de fluxo *BD FACSCanto™ II* (BD Biosciences; San Jose, USA), usando o *software BD FACSDiva* (v6.1.2; BD Biosciences; San Jose, USA). A análise dos resultados obtidos por CF foi realizada através do *software Infinicyt 1.7* (Cytognos SL; Salamanca, España).

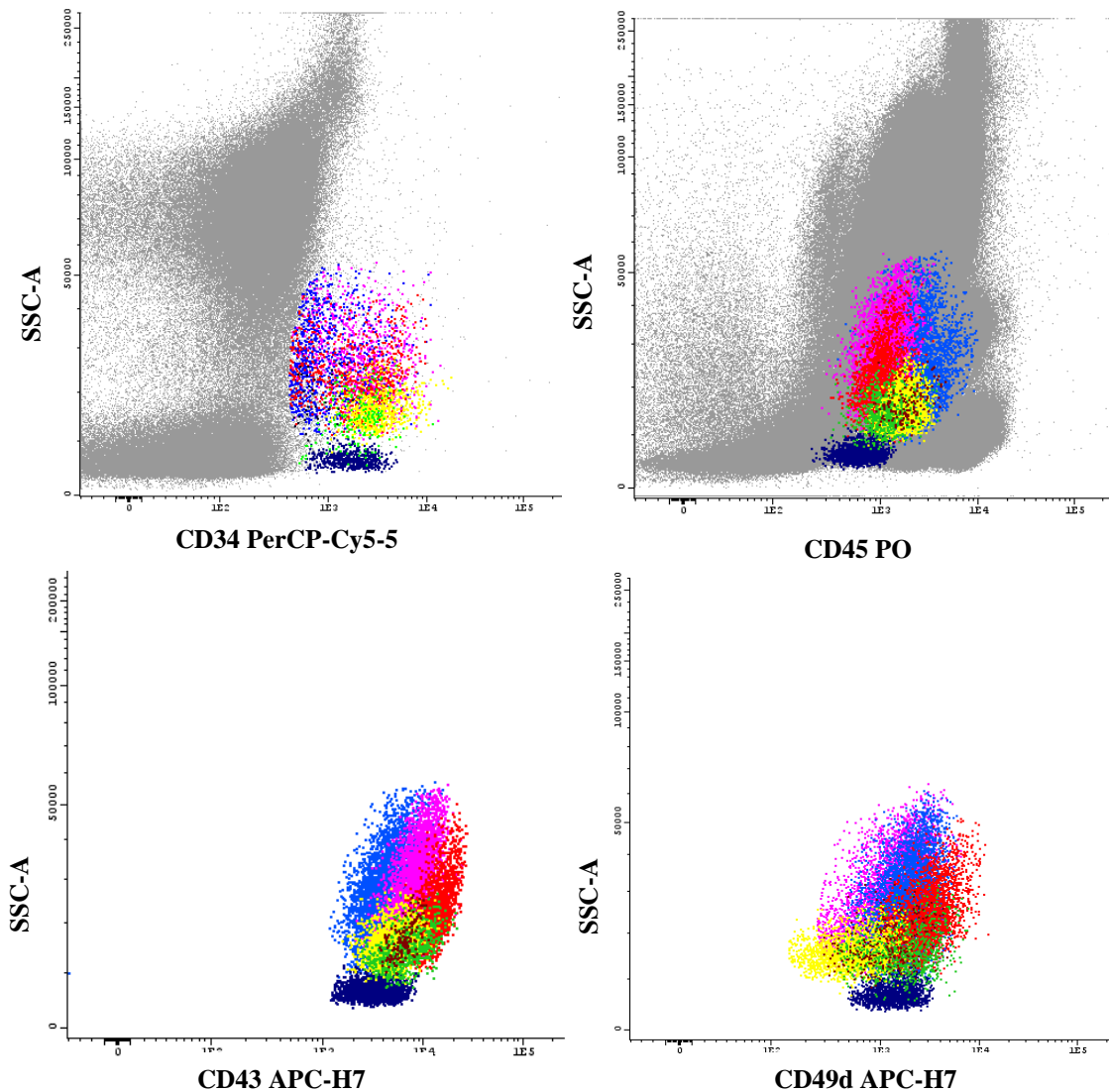
### 2.2.1.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente usando o *software Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 23.0, IBM, Armonk, NY, USA)*. Os valores das médias e desvio padrão foram calculados para todas as variáveis em estudo. Para se poder determinar o significado estatístico das diferenças observadas entre os grupos definidos (Controlo, SMD, SMD I, SMD II e SMD com displasia eritroide) foi realizado o teste de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de  $p < 0.05$ .

## 2.2.2. Resultados e discussão

### 2.2.2.1. Identificação imunofenotípica do compartimento dos precursores CD34<sup>+</sup> da medula óssea normal e dos diferentes comprometimentos maturativos

Após a identificação do compartimento das células precursoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>, o comprometimento das mesmas às diferentes linhagens hematopoiéticas foi identificado da seguinte forma: as células CD34<sup>+</sup> não comprometidas a nenhuma linha hematopoiética (mais imaturas) foram definidas como CD34<sup>+forte</sup>/CD45<sup>+fraco</sup>/HLA-DR<sup>+intermédio</sup>/CD117<sup>+intermédio</sup>/CD13<sup>+intermédio</sup>; os precursores comprometidos à linhagem linfóide B foram definidos como FSC<sup>reduzido</sup>/CD45<sup>+fraco</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD13<sup>-</sup>; os precursores comprometidos a linha a neutrófilo apresentaram um SSC<sup>elevado</sup>/CD13<sup>+forte</sup>/CD117<sup>+forte</sup>/HLA-DR<sup>+forte</sup>; as células CD34<sup>+</sup> comprometidas à linhagem monocítica expressavam um SSC<sup>intermédio</sup>/CD34<sup>+fraco</sup>/CD117<sup>+intermédio</sup>/HLA-DR<sup>+forte</sup>/CD13<sup>+intermédio</sup>; o comprometimento das células à linhagem dendrítica plasmocitóide foi definido pela expressão de CD123<sup>+forte</sup>/HLA-DR<sup>+forte</sup>; os precursores que apresentavam um compromisso com a linha a basófilo foram definidos como sendo HLA-DR<sup>+fraco</sup>/CD123<sup>+intermédio/forte</sup>; finalmente os precursores comprometidos de forma precoce à linha eritroide apresentaram um SSC<sup>elevado</sup>/CD13<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+intermédio/forte</sup>/CD117<sup>+intermédio/forte</sup>. Os precursores CD34<sup>+</sup> e os seus diversos comprometimentos maturativos estão representados na **Figura 3**.



**Figura 3:** Representação do compartimento das células precursoras hematopoiéticas  $CD34^+$  e da expressão diferencial de CD43 e CD49d tendo em conta os diversos comprometimentos maturativos.

O comprometimento para as diferentes linhas hematopoiéticas foi identificado da seguinte forma: as células  $CD34^+$  não comprometidas a nenhuma linha hematopoiética (mais imaturas) foram definidas como  $CD34^{+forte}/CD45^{+fraco}/HLA-DR^{+intermédio}/CD117^{+intermédio}/CD13^{+intermédio}$  e estão representadas em amarelo; os precursores comprometidos à linhagem linfóide B apresentavam um  $FSC^{reduzido}/CD45^{+fraco}/HLA-DR^{+}/CD117^{-}/CD13^{-}$  e estão representados em azul-escuro; os precursores comprometidos a linha a neutrófilo apresentavam um  $SSC^{elevado}/CD13^{+forte}/CD117^{+forte}/HLA-DR^{+forte}$  e estão representados em rosa; as células  $CD34^+$  comprometidas à linhagem monocítica expressavam um  $SSC^{intermédio}/CD34^{+fraco}/CD117^{+intermédio}/HLA-DR^{+forte}/CD13^{+intermédio}$  e estão representadas em verde; o comprometimento das células à linhagem dendrítica plasmocitóide foi definido pela expressão de  $CD123^{+forte}/HLA-DR^{+forte}$  representado em azul; os precursores que apresentavam um compromisso com a linha a basófilo foram definidos como sendo  $HLA-DR^{+fraco}/CD123^{+intermédio/forte}$  e estão representados em castanho; finalmente os precursores comprometidos de forma precoce à linha eritroide apresentavam um  $SSC^{elevado}/CD13^{-}/HLA-DR^{+intermédio/forte}/CD117^{+intermédio/forte}$  e estão representados em vermelho.

A expressão de CD43 mostrou ser bastante mais elevada nos precursores hematopoiéticos comprometidos à linha eritroide em comparação aos precursores comprometidos com as outras linhas, como observado na **Figura 3** e **Tabela XIV**. Na linhagem eritroide, a expressão deste marcador num estágio precoce de diferenciação já foi descrita em trabalhos anteriores. De facto, tanto o CD45 como o CD43 são considerados como marcadores pan-hematopoiéticos e a expressão precoce de CD43 nos progenitores hematopoiéticos parece indicar um possível papel desta proteína no desenvolvimento hematopoiético. A expressão de CD43 confere propriedades de adesão aos precursores eritroides e está associada ao decréscimo gradual da expressão de CD34 nos mesmos ao longo da eritropoiese. [68]

Trabalhos anteriores definiram as células CD43<sup>forte</sup> como a primeira população celular de linha eritroide, através de ensaios *in vitro* de unidades formadoras de colónias. Assim, usando a expressão de CD43, é possível isolar células que estão comprometidas à linhagem eritroide. [71]

Tal como para o CD43, os precursores CD34<sup>+</sup> comprometidos à linha eritroide apresentaram uma maior expressão de CD49d, como observado na **Figura 3** e **Tabela XIV**. A expressão elevada de CD49d nos precursores eritroide está de acordo com o observado em trabalhos anteriores.

Um estudo anterior, usando ensaios de citometria de fluxo, mostrou que o CD49d é expresso de forma elevada em células imaturas (definidas como Ter119<sup>fraco</sup>/CD71<sup>forte</sup>) sendo essencial para manter uma hematopoiese e microambiente normal e medeia a associação entre os eritroblastos mais imaturos e os macrófagos, ainda, esta integrina apresenta um papel essencial na eritropoiese pois, permite manter os precursores eritroides associados ao estroma medular, [59]. Outro trabalho, no qual células da MO de ratos foram marcadas com anticorpos CD71, Ter119, CD49d ou CD49e e CD44 e analisadas por citometria, mostrou uma elevada expressão desta integrina num estágio mais precoce da eritropoiese. [74]

**Tabela XIV:** Média da intensidade de fluorescência (MIF) dos marcadores CD43 e CD49d no compartimento CD34<sup>+</sup> para os vários comprometimentos maturativos.

<b>Comprometimento maturativo</b>	<b>CD43</b>	<b>CD49d</b>
<b>Imaturas</b>	<b>5971 ± 2355</b>	<b>750 ± 505</b>
<b>Linhagem Linfoide B</b>	<b>4539 ± 2682</b>	<b>1240 ± 345</b>
<b>Linha a Basófilo</b>	<b>7221 ± 2947</b>	<b>1352 ± 497</b>
<b>Linhagem eritroide</b>	<b>15474 ± 6072</b>	<b>2491 ± 773</b>
<b>Linhagem monocítica</b>	<b>7787 ± 3134</b>	<b>1516 ± 509</b>
<b>Linha a neutrófilo</b>	<b>9398 ± 3960</b>	<b>1113 ± 253</b>
<b>Linhagem dendrítica plasmocitóide</b>	<b>4748 ± 1700</b>	<b>1610 ± 301</b>

### 2.2.2.2. Identificação imunofenotípica da linha eritroide e dos seus estádios maturativos na medula óssea normal

Foram considerados 5 distintos estádios maturativos nas células da MO comprometidas à linha eritroide, com base nas suas características imunofenotípicas.

O conjunto mais imaturo de precursores eritroide (estádio I) foi definido como CD34<sup>+</sup>/ CD117<sup>+forte</sup>/ HLA-DR<sup>+forte</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>+fraco</sup>/ CD43<sup>+forte</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; o estágio II foi caracterizado como CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>+intermédio</sup>/ CD105<sup>+forte</sup>/ CD36<sup>+forte</sup>/ CD45<sup>+fraco</sup>/ CD43<sup>+forte</sup>/ CD49d<sup>+forte</sup>; o estágio III inclui precursores CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+forte</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+forte</sup>; o estágio IV foi definido como FSC<sup>intermédio</sup>/ SSC<sup>intermédio</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; finalmente o estágio V foi definido como FSC<sup>reduzido</sup>/ SSC<sup>reduzido</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup> (**Figura 4, 5, 6, 7**).

A expressão de CD43, na maturação eritroide normal, foi caracterizada por uma diminuição constante ao longo da maturação, com uma elevada expressão no estágio I e consequente diminuição até ao último estágio. (**Figura 4, 6**) (**Tabela XV**).

A expressão precoce deste recetor nos precursores eritroides e a diminuição da mesma ao longo da maturação encontra-se descrita na literatura. Trabalhos anteriores mostraram, através de ensaios de eletroforese e fluorografia, que durante a diferenciação eritroide a expressão de CD43 parecia diminuir, uma vez que os eritroblastos apresentavam níveis reduzidos da mesma na superfície celular e os eritrócitos maduros não expressavam esta glicoproteína. [76, 77, 78]

Outro trabalho, realizado com base em ensaios de CFU, mostrou que durante as fases terminais da diferenciação eritroide a expressão de CD43 é reduzida, contudo é expresso em níveis elevados até 11 dias de cultura. [71]

Apesar da diminuição desta proteína ao longo da maturação eritroide já se encontrar descrita, a análise da expressão do CD43 ao longo da eritropoiese através da citometria de fluxo ainda não foi realizada.

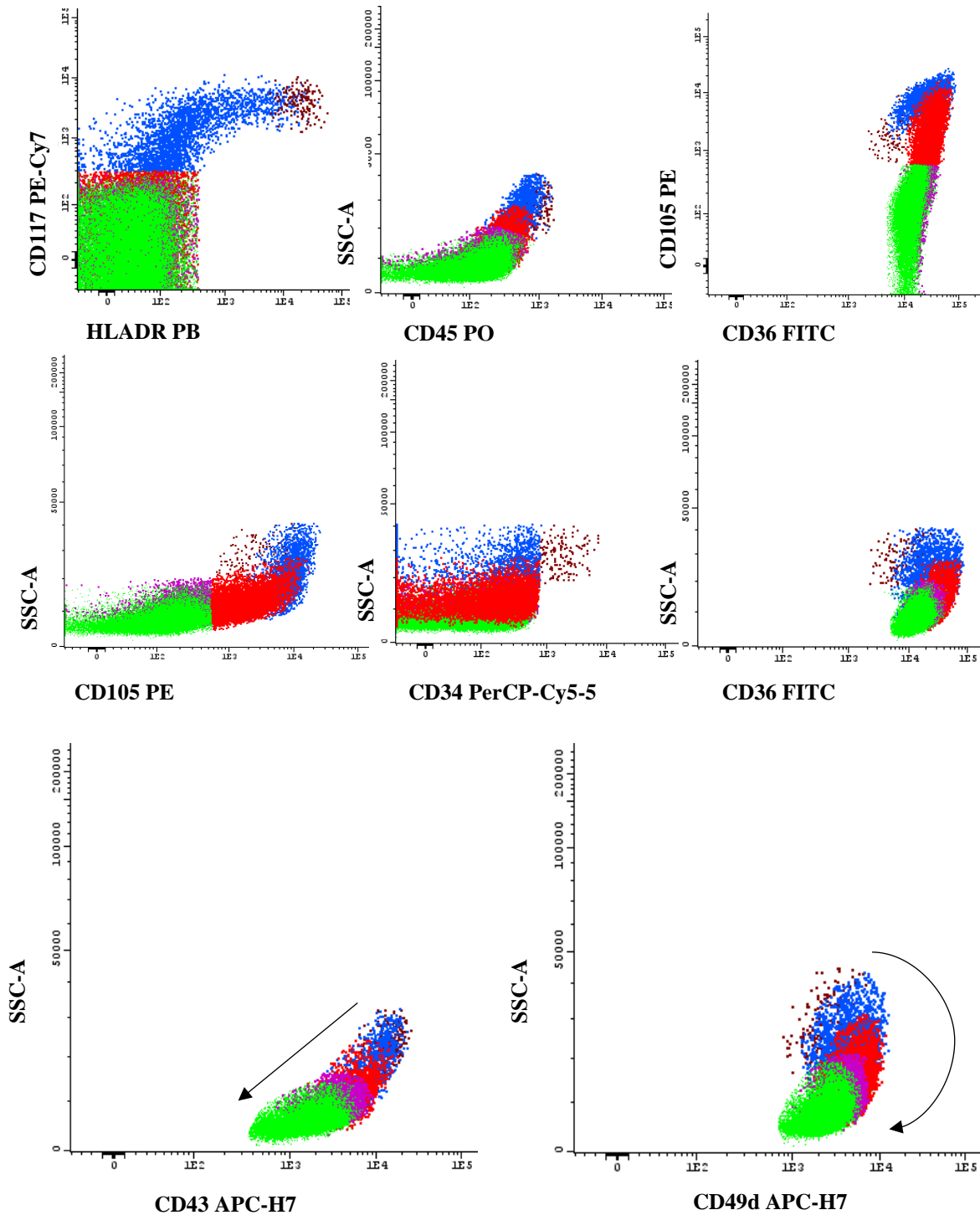
A expressão de CD49d também parece seguir um padrão definido caracterizado por um aumento de expressão do estágio I para o estágio II, por uma expressão mantida entre o estágio II e III e por uma diminuição constante do estágio III até ao último estágio,



que apresenta a menor expressão deste marcador. (**Figura 4, 7**) (**Tabela XV**). O decréscimo na expressão deste marcador ao longo da maturação eritroide está de acordo com o relatado em trabalhos anteriores. [59, 74]

Um estudo realizado em 2011, utilizando a citometria de fluxo, analisou as células da MO de ratos transplantados. Os precursores eritroides foram classificados do seguinte modo: pró-eritroblastos definidos como (Ter119<sup>+intermédio</sup>/CD71<sup>+forte</sup>), eritroblastos basófilos (Ter119<sup>+forte</sup>/CD71<sup>+forte</sup>), basófilos tardios e eritroblastos policromatófilos (Ter119<sup>+forte</sup>/CD71<sup>+intermédio</sup>), e eritroblastos ortocromáticos (Ter119<sup>+forte</sup>/CD71<sup>+fraco</sup>). A expressão de CD49d mostrou diminuir ao longo da maturação, com uma maior expressão nas células mais imaturas (Ter119<sup>+fraco</sup>/CD71<sup>+forte</sup>) e uma menor expressão nos eritroblastos mais diferenciados (Ter119<sup>+forte</sup>/CD71<sup>+fraco</sup>). [59]

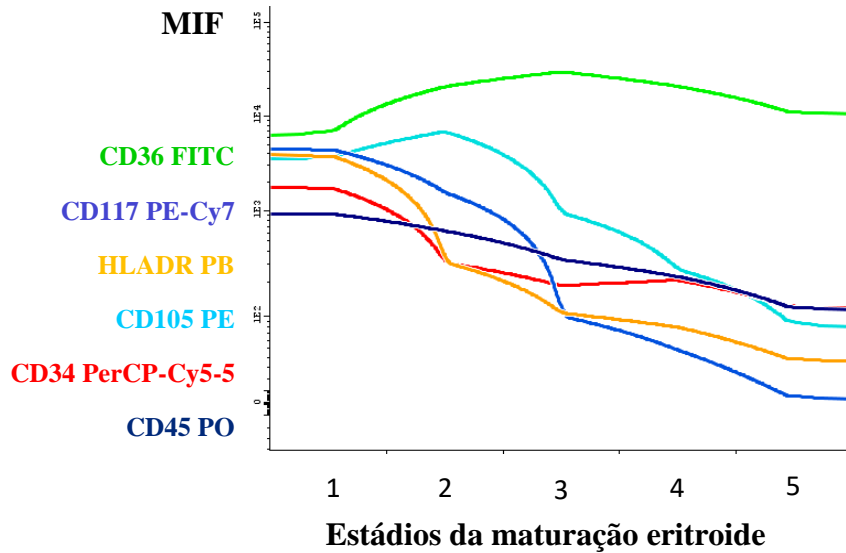
Outro estudo foi realizado em 2014, onde as células da MO de ratos foram marcadas com anticorpos CD71, Ter119, CD49d ou CD49e e CD44. A média da intensidade de fluorescência (MIF) do CD49d mostrou ser maior na fase de eritroblasto basófilo (estádio II) que apresenta o maior perfil de ativação desta proteína, diminuindo até aos eritroblastos mais maduros. Neste estágio o CD49d forma complexos estáveis com uma série de *tetraspanins* que aumenta a afinidade da mesma, potenciando as interações eritroblasto/macrófago *versus* eritroblasto/fibronectina, [74]. Este aumento de expressão do CD49d na fase de eritroblasto basófilo (estádio II) está de acordo com o observado neste trabalho.



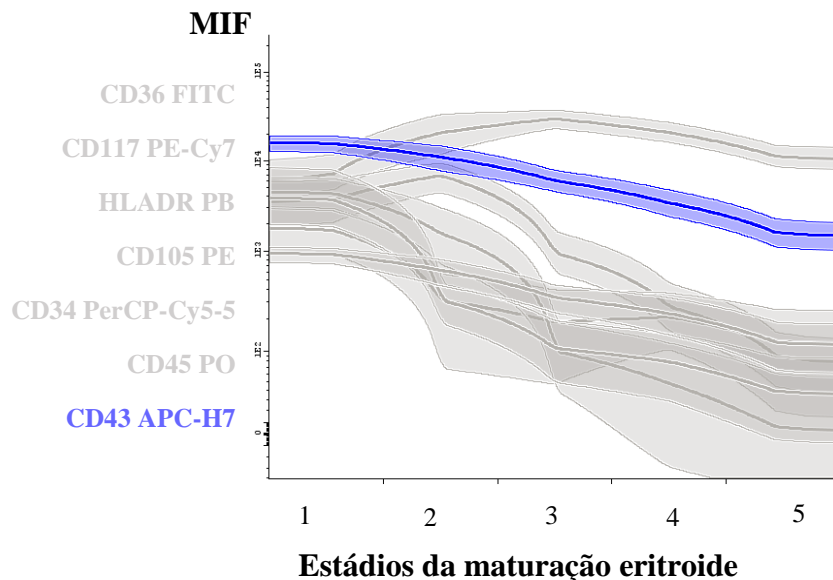
**Figura 4:** Representação dos padrões imunofenotípicos da maturação eritroide na medula óssea normal.

As células  $CD34^+$  comprometidas à linha eritroide ( $CD34^+/CD117^{+forte}/HLA-DR^{+forte}/CD105^+/CD36^+/CD45^{+fraco}/CD43^{+forte}/CD49d^+$ ) incluídas no estágio I estão representadas em castanho; Os eritroblastos incluídos no estágio II ( $CD34^+/CD117^+/HLA-DR^{+intermédio}/CD105^{+forte}/CD36^{+forte}/CD45^{+fraco}/CD43^{+forte}/CD49d^{+forte}$ ) correspondem aos eventos em azul; O estágio III está representado em vermelho e inclui células  $CD34^-/CD117^-/HLA-DR^-/CD105^+/CD36^{+forte}/CD45^-/CD43^+/CD49d^{+forte}$ ; O estágio IV definido como  $FSC^{intermédio}/SSC^{intermédio}/CD34^-/CD117^-/HLA-DR^-/CD105^-/CD36^+/CD45^-/CD43^+/CD49d^+$ , está

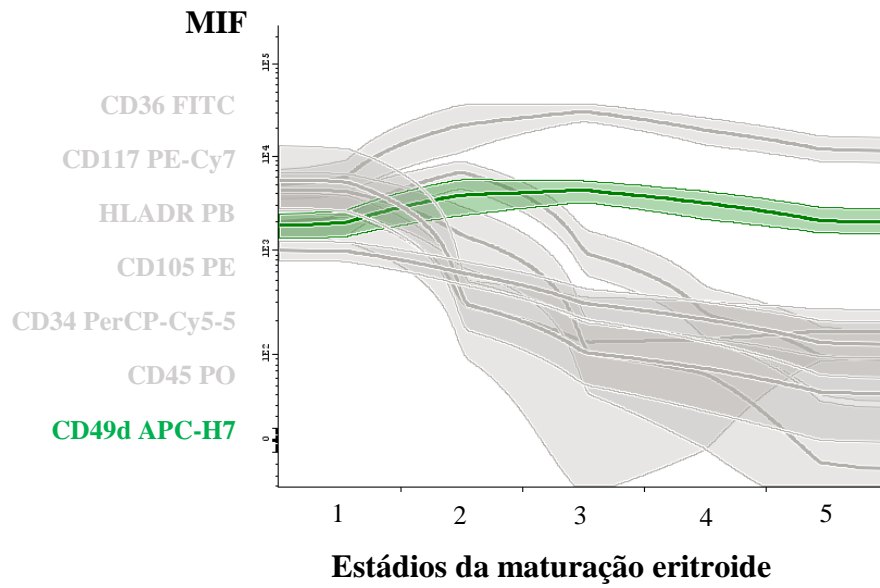
representado em violeta; Finalmente o ultimo estágio (V) que inclui eritroblastos  $FSC^{\text{reduzido}}/SSC^{\text{reduzido}}/CD34^-/CD117^-/HLA-DR^-/CD105^-/CD36^+/CD45^-/CD43^+/CD49d^+$ , está representado com a cor verde. As setas indicam o caminho da maturação



**Figura 5:** Representação da curva de expressão (média da intensidade de fluorescência (MIF)) dos diversos marcadores utilizados ao longo da maturação eritroide normal.



**Figura 6:** Representação da curva de expressão (média da intensidade de fluorescência (MIF)  $\pm$  desvio padrão) dos diversos marcadores utilizados ao longo da maturação eritroide normal, com destaque na expressão do marcador CD43 representado a azul.



**Figura 7:** Representação da curva de expressão (média da intensidade de fluorescência (MIF)  $\pm$  desvio padrão) dos diversos marcadores utilizados ao longo da maturação eritroide normal, com destaque na expressão do marcador CD49d representado a verde.

### 2.2.2.3. Expressão do CD43 e CD49d na Síndrome Mielodisplásica

Em SMD, a expressão de CD43 mostrou seguir o padrão observado na MO normal, ou seja, uma diminuição constante ao longo da maturação, no entanto, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa nos valores da MIF, em todos os estádios maturativos quando comparado ao grupo de controlo, tal como indicado na **Tabela XV**. Trabalhos anteriores relataram alterações na expressão de CD43 em doentes diagnosticados com SMD, [60, 61, 62, 63]. No entanto, ainda não se encontram descritas alterações na expressão deste marcador na linha eritroide, em casos de SMD.

Quando se agrupou os doentes com diagnóstico de SMD, em SMD I (que inclui casos de SMD com displasia unilinha e multilinha), SMD II (que inclui casos de SMD com excesso de blastos do tipo 1 e tipo 2) e SMD com displasia eritroide, continuou a observar-se uma diminuição de expressão de CD43, sendo esta mais acentuada e com significado estatístico, nos casos de SMD II e SMD com displasia eritroide quando comparado com o grupo controlo. (**Tabela XV**)

O processo de eritropoiese ocorre integralmente nas chamadas *erythroblastic islands*, que consistem num macrófago central cercado de eritroblastos em desenvolvimento. Interações de adesão entre o macrófago e os eritroblastos, assim como entre estes últimos e proteínas da matriz extracelular, são essenciais na regulação da diferenciação eritroide, [59, 79]. Estas adesões iniciam vias de sinalização, expressão de genes e proliferação celular. Estudos anteriores mostraram que a adição de anticorpos contra estas moléculas de adesão em co-culturas de eritroblastos/macrófagos diminui significativamente a proliferação, maturação e enucleação. [80, 81]

Os eritroblastos expressem uma grande variedade de moléculas de adesão, nomeadamente a integrina  $\beta 1$  e a glicoproteína transmembranar CD44, que são sujeitas a uma variação dinâmica ao longo da maturação eritroide. [59, 79, 82]

A expressão precoce da proteína transmembranar CD43 nos precursores hematopoiéticos, derivados de células estaminais embrionárias, parece indicar que este marcador apresenta um papel essencial no processo de hematopoiese, conferindo propriedades de adesão/anti- adesão e proliferação. [68, 71]

O CD43 transmite sinais que permitem outras interações recetor-ligando de forma a promover a adesão celular, atuando desta forma como um “*gateway*” facilitando

determinadas interações celulares. O domínio citoplasmático do CD43 interage com proteínas do citoesqueleto e transmite sinais que regulam uma série de vias de transdução de sinal intracelulares envolvidas na ativação, proliferação e sobrevivência celular. [68]

Na linha eritroide, a sua expressão precoce confere propriedades de adesão aos precursores eritroides, [68]. Assim, uma diminuição da sua expressão, o que foi observado nos casos de SMD, pode de certa forma comprometer a eritropoiese, afetando as interações entre o macrófago central e os eritroblastos, assim como entre estes últimos e proteínas da matriz extracelular, podendo finalmente contribuir para a presença de anemia.

Tal como observado no CD43, a expressão de CD49d na SMD mostrou seguir o padrão observado na MO normal, ou seja um aumento do estágio I para o estágio II, expressão mantida entre o II e III estágio, seguido de uma diminuição até ao último estágio, no entanto, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa nos valores da MIF em todos os estádios comparativamente ao grupo controlo. (**Tabela XV**)

Nos diferentes grupos considerados, SMD I, SMDII e SMD com displasia eritroide, continuou a observar-se o mesmo padrão, com uma diminuição dos valores da MIF em cada estágio, sendo esta mais acentuada nos grupos SMD II e SMD com displasia eritroide quando comparado com o grupo controlo. (**Tabela XV**).

Na eritropoiese, as interações, mediadas pelo CD49d, dos precursores eritroides com macrófagos e com a fibronectina, têm sido estudadas e foram consideradas importantes no processo de expansão/maturação. [74]

Trabalhos anteriores mostraram que as células precursoras CD34<sup>+</sup> de doentes diagnosticados com SMD com níveis elevados de apoptose intramedular apresentavam uma redução significativa desta integrina o que podia estar associado a uma reduzida adesão *in vitro* aos fragmentos de fibronectina. Este achado *in vitro* supõe que uma diminuição na expressão de CD49d nos precursores hematopoiéticos de doentes com SMD pode levar a uma diminuição da adesão dos mesmos aos componentes da matriz extracelular (fibronectina) *in vivo*, [58]. Um nível reduzido desta integrina pode levar a uma libertação precoce dos precursores das *erythroblastic islands*, afetando a proliferação e diferenciação e também pode levar a uma diminuição da sobrevivência celular. [58, 59]

Ainda, tendo em conta o papel de proteção do CD49d no processo de apoptose, uma diminuição na sua expressão, o que foi observado nos casos de SMD, poderá estar associada ao aumento da apoptose intramedular frequente nessa entidade, o que leva a ocorrência das citopenias periféricas. [56, 58]

Na literatura, a diminuição na expressão desta integrina foi observada em doentes diagnosticados com SMD e com elevados níveis de apoptose, quando comparado ao grupo de controlo, [56, 58]. Deste modo, a diminuição desta proteína nos precursores eritroides poderá ser considerado como um fator pro- apoptótico em casos de SMD. [58]

**Tabela XV:** Média da intensidade de fluorescência (MIF) dos marcadores CD43 e CD49d nos diferentes estádios da maturação eritroide considerados.

	Controlo		SMD		SMD I		SMD II		SMD com displasia eritroide	
	CD43	CD49d	CD43	CD49d	CD43	CD49d	CD43	CD49d	CD43	CD49d
Estádio I	<b>14917</b> ± 3939	<b>2861</b> ± 1033	<b>10284</b> ± 6174 <sup>a</sup>	<b>1986</b> ± 1155 <sup>a</sup>	<b>11583</b> ± 5012	<b>2394</b> ± 1626 <sup>a</sup>	<b>9245</b> ± 7055 <sup>a</sup>	<b>1660</b> ± 442 <sup>a</sup>	<b>12918</b> ± 7219	<b>2305</b> ± 1764 <sup>a</sup>
Estádio II	<b>10438</b> ± 2595	<b>4149</b> ± 1076	<b>6980</b> ± 3322 <sup>a</sup>	<b>3156</b> ± 1829 <sup>a</sup>	<b>7788</b> ± 3500	<b>3501</b> ± 2600	<b>6334</b> ± 3206 <sup>a</sup>	<b>2881</b> ± 932 <sup>a</sup>	<b>8099</b> ± 3429	<b>3630</b> ± 2673
Estádio III	<b>5859</b> ± 1745	<b>4185</b> ± 961	<b>3981</b> ± 1785 <sup>a</sup>	<b>3387</b> ± 1285 <sup>a</sup>	<b>4183</b> ± 1813 <sup>a</sup>	<b>3447</b> ± 1661	<b>3820</b> ± 1843 <sup>a</sup>	<b>3339</b> ± 982	<b>4052</b> ± 1955 <sup>a</sup>	<b>3134</b> ± 1710 <sup>a</sup>
Estádio IV	<b>3345</b> ± 1022	<b>3610</b> ± 719	<b>2219</b> ± 982 <sup>a</sup>	<b>2724</b> ± 1095 <sup>a</sup>	<b>2543</b> ± 939	<b>2677</b> ± 1247	<b>1960</b> ± 985 <sup>a</sup>	<b>2762</b> ± 1025 <sup>a</sup>	<b>2147</b> ± 842 <sup>a</sup>	<b>2097</b> ± 1180 <sup>a</sup>
Estádio V	<b>1779</b> ± 552	<b>2159</b> ± 442	<b>1233</b> ± 557 <sup>a</sup>	<b>1525</b> ± 620 <sup>a</sup>	<b>1420</b> ± 529	<b>1535</b> ± 606 <sup>a</sup>	<b>1083</b> ± 559 <sup>a</sup>	<b>1516</b> ± 664 <sup>a</sup>	<b>1165</b> ± 459 <sup>a</sup>	<b>1079</b> ± 549 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em média da intensidade de fluorescência (MIF) ± desvio padrão.

O conjunto mais imaturo de precursores eritroide (estádio I) foi definido como CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+forte</sup>/HLA-DR<sup>+forte</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>+fraco</sup>/CD43<sup>+forte</sup>/CD49d<sup>+</sup>; o estágio II foi caracterizado como CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+intermédio</sup>/CD105<sup>+forte</sup>/CD36<sup>+forte</sup>/CD45<sup>+fraco</sup>/CD43<sup>+forte</sup>/CD49d<sup>+forte</sup>; o estágio III inclui precursores CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD36<sup>+forte</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>+forte</sup>; o estágio IV foi definido como FSC<sup>intermédio</sup>/SSC<sup>intermédio</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>; finalmente o estágio V foi definido como FSC<sup>reduzido</sup>/SSC<sup>reduzido</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>.

<sup>a</sup> p <0.05 quando comparado ao grupo controlo. Mann-Whitney U multiple-comparison test.



### 3. Conclusão

Este estudo permitiu concluir que a imunofenotipagem por CF multiparamétrica é de facto uma abordagem útil no diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicas, permitindo detetar anormalidades no processo de hematopoiese como assincronismos maturativos e anormalidades na expressão de antígenos. Ainda, a separação celular através da CF permite aumentar a sensibilidade da citogenética, nomeadamente a técnica de FISH, o que potencia a identificação de alterações cromossómicas mesmo quando o clone é reduzido, contribuindo desta forma para o diagnóstico e prognóstico destas entidades.

Tendo em conta o conhecimento ainda reduzido sobre a maturação da linha eritroide e a falta de marcadores para a caracterização desta mesma linha, foram estudados dois novos marcadores, incluídos no painel de diagnóstico de Doenças Linfoproliferativas Crónicas de células B (DLPC-B), o CD43 e o CD49d, no compartimento dos precursores hematopoiéticos da medula óssea normal, tendo em conta o comprometimento dos mesmas às diversas linhagens hematopoiéticas, e na maturação eritroide normal e em casos de SMD.

No compartimento CD34<sup>+</sup>, a expressão dos dois marcadores mostrou ser maior nos precursores comprometidos à linha eritroide.

Na maturação eritroide, o CD43 e CD49d são expressos de forma precoce na maturação eritroide e são expressos segundo um padrão definido, o que nos permite caracterizar com maior especificidade os diferentes estádios maturativos. Na SMD, a expressão dos dois marcadores encontra-se diminuída em todos os estádios embora o padrão seguido seja mantido. Nos casos de SMD com displasia eritroide, observada por morfologia, a expressão do marcador CD49d parece ser especialmente afetada nos estádios finais da maturação.

Os resultados obtidos apontam para a utilidade dos marcadores CD43 e CD49d na caracterização da maturação eritroide, contribuindo deste modo para expandir o painel de marcadores utilizados para o estudo desta linha, e uma vez que ambos os marcadores estão incluídos no painel de diagnóstico DLPC-B, poderiam contribuir para o diagnóstico concomitante de uma neoplasia crónica de células B e uma possível SMD.

## 4. Referências

- 1 van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, *et al.* 2009. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 94(8):1124–34
- 2 Vassallo J, Magalhães SMM. 2009. Myelodysplastic syndromes and diseases with myelodysplastic and myeloproliferative features. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 31(4):267-72
- 3 Nolte F, Hofmann W-K. 2010. Molecular mechanisms involved in the progression of myelodysplastic syndrome. *Future Oncol.*, 6(3):445-55
- 4 Manero GG. 2010. Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *ASH Education Book*, 2010(1):330-37
- 5 Valent P, Horny HP, Bennett JM, *et al.* 2007. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research*, 31(6):727-36
- 6 Irons RD, Gross SA, Le A, *et al.* 2010. Integrating WHO 2001-2008 criteria for the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome (MDS): a case-case analysis of benzene exposure. *Chem Biol Interact.*, 184(1-2):30-8
- 7 Li J. 2013. Myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cell. *Int J Cancer.*, 133(3):525-33
- 8 Bowen DT. 2013. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol.*, 26(4):319-26
- 9 Sant M, Allemani C, Tereanu C, *et al.* 2010. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the Haemacare project. *Blood*, 116(19):3724-34
- 10 Costa ASL, Anjos MEF, Beltrão ACS, *et al.* 2009. Diagnóstico das síndromes mielodisplásicas. *Rev Para Med.*, 23(2)

- 11 Smith SM, Le Beau MM, Huo D, *et al.* 2003. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*, 102(1):43-52
- 12 Kerbauy DB, Deeg HJ. 2007. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol.*, 35(11):1739-46
- 13 Gyan E, Frisan E, Beyne-Rauzy O, *et al.* 2008. Spontaneous and Fas-induced apoptosis of low-grade MDS erythroid precursors involves the endoplasmic reticulum. *Leukemia*, 22(10):1864-73
- 14 Mattos JR, Da Silva DM, Macedo LC. 2016. Myelodysplastic syndrome: from suspect to definitive diagnosis. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, 11(1):80-9
- 15 Chauffaille Mde L. 2006. Chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 28(3)
- 16 Bejar R, Levine R, Ebert BL. 2011. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.*, 29(5):504-15
- 17 Macedo LC, Silvestre APA, Rodrigues C, *et al.* 2015. Genetics factors associated with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis.*, 55(1):76-81
- 18 West RR, Stafford DA, White AD, *et al.* 2000. Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood*, 95(6):2093-97
- 19 Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, *et al.* 2008. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*, 93(11):1712-17
- 20 Foran JM, Shammo JM. 2012. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Med.*, 125(7 Suppl):S6-13
- 21 Bortolheiro TC. 2006. Morphologic classifications of myelodysplastic syndromes: from FAB to WHO. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 28(3):194-97
- 22 Bento LC, Correia RP, Pitangueiras Mangureira CL, *et al.* 2017. The Use of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes: A Review. *Front. Oncol.*, 7(270)

- 23 Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7):2292-302
- 24 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.* 2008. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
- 25 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, *et al.* 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20):2391-405
- 26 Pinto CPS. 2016. Contribuição da imunofenotipagem para o diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica. Tese de Mestrado em Bioquímica, especialidade em Bioquímica Clínica. Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro.
- 27 Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, *et al.* 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89(6):2079-88
- 28 Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, *et al.* 2012. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12):2454-65
- 29 Steensma DP. 2015. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.*, 90(7):969-83
- 30 Garcia-Manero G. 2015. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.*, 90(9):831-41
- 31 Olney HJ, Le Beau MM. Cytogenetic diagnosis of myelodysplastic syndromes. in: H.J. Deeg, D.T. Bowen, S.D. Gore, T. Haferlach, M.M. Le Beau, C. Niemeyer (Eds.) Myelodysplastic syndromes. Springer-Verlag,; 2013:41-72.
- 32 Nucifora E, Zimmerman J, Fazio P, *et al.* 2010. Diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicas (SMD). *Hematologia*, 14(3):103-7
- 33 Ferreira LCC. 2012. Estudo fenotípico da maturação da linha eritróide na medula óssea. Tese de mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, especialidade em Hematologia e Imunohemoterapia. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Católica Portuguesa, Porto. 55 pp.
- 34 Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, *et al.* 2001. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*, 98(4):979-87

- 35 Lorand- Metze I. 2006. The application of flow cytometric analysis of bone marrow cells for the diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 28(3):178-81
- 36 Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, *et al.* 2008. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk. Res.*, 32(1):5-17
- 37 Romagnoli GG. 2013. Citometria de Fluxo. Disciplina de Imunologia- Biomed. Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNESP.
- 38 Robinson JP, Rajwa B, Patsekina V, *et al.* 2012. Computational analysis of high-throughput flow cytometry data. *Expert Opin Drug Discov.*, 7(8):679-93
- 39 Rego EM, Santos GAS. 2009. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 31(5):367-74
- 40 van Dongen JJM, Hermitte LL, Bottcher S, *et al.* 2012. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9):1908-75
- 41 Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CSP, *et al.* 2007. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res.*, 31(2):147-55
- 42 van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, *et al.* 2004. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.*, 60(1):1-13
- 43 Stelzer GT, Shults KE, Loken MR. 1993. CD45 Gating for Routine Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow Specimens. *Ann N Y Acad Sci.*, 677:265-80
- 44 Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, *et al.* 1993. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol.*, 100(5):534-40

- 45 Wells DA, Benesch M, Loken MR, *et al.* 2003. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 102(1):394-403
- 46 Porta MG Della, Malcovati L, Invernizzi R, *et al.* 2006. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 20(4):549-55
- 47 Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, *et al.* 2004. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A.*, 58(1):62-71
- 48 Will B, Steidl U. 2012. Multi-Parameter Fluorescence-Activated Cell Sorting and Analysis of Stem and Progenitor Cells in Myeloid Malignancies. *Best practice & research Clinical haematology*, 23(3):391-401
- 49 Ibrahim SF, van den Engh. G. 2007. Flow Cytometry and Cell Sorting. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.*, 106:19-39
- 50 Basu S, Campbell HM, Dittel BN, *et al.* 2010. Purification of Specific Cell Population by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (41):1546
- 51 Ibrahim SF, van den Engh G. 2003. High-speed cell sorting: fundamentals and recent advances. *Current opinion in Biotechnology*, 14:5-12
- 52 Matarraz S, López A, Barrena S, *et al.* 2008. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*, 22(6):1175-83
- 53 Matarraz S, Paiva B, Díez-Campelo M, *et al.* 2014. Immunophenotypic alterations of bone marrow myeloid cell compartments in multiple myeloma patients predict for myelodysplasia-associated cytogenetic alterations. *Leukemia*, 28(8):1747-50
- 54 Sandes AF, Chauffaille Mde L, Orfao A, *et al.* 2012. Association of myelodysplastic syndrome with CD5+, CD23+ monoclonal B-cell lymphocytosis. *Clinics*, 67(12):1487-91

- 55 Rodríguez-Caballero A, Henriques A, Criado I, *et al.* 2015. Subjects with chronic lymphocytic leukaemia-like B-cell clones with stereotyped B-cell receptors frequently show MDS-associated phenotypes on myeloid cells. *Br J Haematol.*, 168(2):258-67
- 56 Ferreira DFC. 2017. Relevância do painel de diagnóstico fenotípico de Doenças Linfoproliferativas Crônicas de células B na identificação de rasgos fenotípicos displásicos nas linhas a neutrófilo, monocítica e eritroide. Tese de mestrado em Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra. 74 pp.
- 57 Chang CC, Cleveland RP. 2000. Decreased CD10-positive mature granulocytes in bone marrow from patients with myelodysplastic syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 124(8):1152-6
- 58 Delforge M, Raets V, Van Duppen V, *et al.* 2005. CD34+ marrow progenitors from MDS patients with high levels of intramedullary apoptosis have reduced expression of alpha4beta1 and alpha5beta1 integrins. *Leukemia*, 19(1):57-63
- 59 Cao YA, Kusy S, Luong R, *et al.* 2011. Heme oxygenase-1 deletion affects stress erythropoiesis. *PLoS One*, 6(5):e20634
- 60 Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Tzardi M, *et al.* 2000. Downregulation of CD43 in RAEB and RAEB-T patients. *Am J Hematol.*, 63:20-7
- 61 Kyriakou D, Alexandrakis MG, Kyriakou ES, *et al.* 2001. Reduced CD43 expression on the neutrophils of MDS patients correlates with an activated phenotype of these cells. *Int J Hematol.*, 73(4):483-91
- 62 Kyriakou E, Kyriakou D, Liapi D, *et al.* 2006. Alterations of CD43 expression in transfusion-dependent myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.*, 85:281-84
- 63 Kyriakou D, Liapi D, Kyriakou E, *et al.* 2000. Aberrant expression of the major sialoglycoprotein (CD43) on the monocytes of patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.*, 79:198-205
- 64 Mohammad FZ, Umair AM, Momena S, *et al.* 2017. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.*, 11(3):231-39

- 65 Abdo Haddad, Jaroslaw P. Maciejewski, Matt Kalaycio. 2008. Clinical Significance of Cytogenetics in Myelodysplastic Syndromes. *Laboratory Medicine*, 39(6):367-70
- 66 Detlef H. 2008. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.*, 87(7):515-26
- 67 Laranjeira P, Rodrigues R, Carneiro T, *et al.* 2015. Expression of CD44 and CD35 during normal and myelodysplastic erythropoiesis. *Leuk. Res.*, 39(3):361-70
- 68 Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II. 2006. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood*, 108(6):2095-105
- 69 Kudo S, Fukuda M. 1995. Tissue specific transcriptional regulation of human leukosialin (CD43) gene is achieved by DNA methylation. *J. Biol. Chem.*, 270(22):13298-302
- 70 Faramarz Naeim, P. Nagesh Rao, Sophie X. Song, Wayne W. Grody. Principles of Immunophenotyping. In Atlas of Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches. Elsevier Inc., 2013. Cap.2, pp.25-46.
- 71 Kessel KU, Bluemke A, Schöler HR, *et al.* 2017. Emergence of CD43-Expressing Hematopoietic Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Transfus. Med. Hemother.*, 44(3):143-50
- 72 Singh V, Erb U, Zöller M. 2013. Cooperativity of CD44 and CD49d in leukemia cell homing, migration, and survival offers a means for therapeutic attack. *J Immunol.*, 191(10):5304-16
- 73 Papayannopoulou T, Brice M. 1992. Integrin expression profiles during erythroid differentiation. *Blood*, 79(7):1686-94
- 74 Ulyanova T, Padilla SM, Papayannopoulou T. 2014. Stage specific functional roles of integrins in erythropoiesis. *Exp Hematol.*, 42(5):404-9
- 75 Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. 2016. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol.*, 173(2):206-18



- 76 Carlsson SR, Fukuda M. 1986. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem.*, 261(27):12779-86
- 77 Fukuda M, Tsuboi S. 1999. Mucin-type O-glycans and leukosialin. *Biochim Biophys Acta.*, 1455(2-3):205-17
- 78 Fukuda M, Fukuda MN, Papayannopoulou T, *et al.* 1980. Membrane differentiation in human erythroid cells: unique profiles of cell surface glycoproteins expressed in erythroblasts in vitro from three ontogenic stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(6):3474-8
- 79 Chen K, Liu J, Heck S, *et al.* 2009. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41):17413-18
- 80 Hanspal M, Smockova Y, Uong, Q. 1998. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood*, 92(8):2940-50
- 81 Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. 1995. Very late activation antigen 4- vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med.*, 181(1):411-5
- 82 Spring FA, Parsons SF. 2000. Erythroid cell adhesion molecules. *Transfus Med Rev.*, 14(4):351-63

## 4. Anexos

## **CD43 and CD49d from the B-cell chronic lymphoproliferative disorders diagnostic panel are useful to detect erythroid dysplasia**

Oliveira M.<sup>1</sup>; Laranjeira P.<sup>2</sup>; Fortuna M.<sup>1</sup>; Bártoło R.<sup>1</sup>; Ribeiro A.<sup>4</sup>; Santos M.<sup>5</sup>;  
Cortesão E.<sup>4</sup>; Marques G.<sup>6</sup>; Sarmiento-Ribeiro A.<sup>4</sup>; Vitória H.<sup>5</sup>; Ribeiro L.<sup>4</sup>; Paiva  
A<sup>1,2,3</sup>.

1. Unidade de Gestão Operacional de Citometria, Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

2. Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculdade de Medicina; Universidade de Coimbra

3. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

4. Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

4. Serviço de Hematologia, Centro Hospitalar Viseu-Tondela

6. Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

### **Keywords:**

Myelodysplastic Syndromes; Flow Cytometry; CD43; CD49d; Erythroid dysplasia

## Abstract

Despite its several advantages, immunophenotyping still faces several limitations in the contribution to the Myelodysplastic syndromes (MDS) diagnosis, namely the reduced knowledge about the erythroid maturation in normal bone marrow (BM) and the lack of erythroid characterization markers.

The diagnostic panel for B-cell Chronic Lymphoproliferative Disorders (B-CLPD) includes markers that have shown to be relevant for the identification of neutrophil dysplasia in MDS cases, namely CD10.

Thus, the objective of this work was to analyze the expression pattern of CD43 and CD49d markers, both included in the diagnostic panel of B-CLPD, in the normal BM CD34<sup>+</sup> compartment and in the erythroid maturation, being the latter studied in the normal BM and in MDS diagnosed cases.

For this, 31 samples of BM aspirates were evaluated, of which 13 from normal BM and 18 from patients diagnosed with MDS. In the CD34<sup>+</sup> compartment, the expression of CD43 and CD49d shown to be much higher in the hematopoietic precursors committed to the erythroid lineage.

In normal erythroid maturation, there was a decrease in the expression of CD43 across the different stages, with a high expression in the first stages of maturation and a consequent decrease until the last stage. The expression pattern of CD49d was characterized by an increase in expression levels from stage I to stage II, by maintained expression between stage II and III and by a constant decrease from stage III to the last stage, which presents the lowest expression of this marker. In the MDS group, the expression of CD43 and CD49d showed to follow the same pattern observed in normal BM, however, a statistically significant decrease in mean fluorescence intensity (MFI) values was observed in all maturation stages for both markers, compared to the control group, particularly in MDS with excess blasts and with morphologic erythroid dysplasia.

The obtained results point to the usefulness of CD43 and CD49d markers in the identification of dysplastic phenotypic features in erythroid lineage, and therefore for the concomitant diagnosis of a chronic B cell disorder and a possible MDS.

## Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of myeloid neoplasms with a wide variety of clinical and pathological manifestations, which have in common a clonal defect in hematopoietic progenitor cells. They are characterized by ineffective haematopoiesis, which clinically results in peripheral cytopenias of one or more hematopoietic lineages and an increased risk of progression to acute myeloid leukaemia (AML), which occurs in about 30% of cases. [1, 2]

Multicolour flow cytometry (FC) allows the identification and quantification of the distinct bone marrow (BM) hematopoietic cell compartments, their maturation stages and protein expression profiles. [3]

In MDS, several changes in antigen expression associated to a specific cell lineage and maturation have been described in the three major hematopoietic series, granulocytic, monocytic and erythroid. Thus, the identification of altered phenotypes on these major hematopoietic lineages and CD34<sup>+</sup> compartment, based on FC, is currently considered by the WHO 2016 classification of haematological malignancies as co-criteria for the diagnosis of MDS. [4, 5]

Despite erythroid dysplasia and ineffective erythropoiesis being common findings among MDS patients, current knowledge about the immunophenotypic characteristics of this cell lineage is still limited to a relatively small number of markers. [3]

To date, CD235a and CD71 have been routinely used to identify the different stages of erythroid maturation, later CD105 was introduced as an additional useful marker for the identification of CD34<sup>+</sup> cells early committed to the erythroid lineage. More recently, two other markers, CD35 and CD44 have been proved to be useful for the detection of erythroid dysplasia, contributing to expand the panel of markers used for the study of this lineage. Abnormal expressions of CD36, CD71, CD105 and CD235a have been frequently detected in patients with MDS. [3]

Recently, altered MDS-like immunophenotypes were found on residual maturing neutrophils and monocytes (and, to a lesser extent, also in erythroid cells) from *de novo* AML patients and from cases with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and Multiple Myeloma. [6, 7]

Despite their myeloid origin, several MDS cases show abnormalities in B-cells, usually related to a decrease in the B-cell production and/or an increase in apoptosis and blockages in the maturation process. [8]

Chronic lymphoproliferative disorders (CLPD) in association with myeloid malignancies is uncommon and has been only sporadically reported, including cases with chronic lymphocytic leukemia (CLL) associated with AML, MDS, and/or systemic mastocytosis. [8, 9]

CLL patients with stereotyped versus non-stereotyped IGHV amino acid sequences shows a higher incidence of myelodysplasia-associated phenotypic alterations on peripheral blood neutrophils and/or monocytes. [9]

Currently, the Euroflow consortium's B-CLPD panel presents a combination of several markers that allow classification of these entities in a sensitive way. This panel includes the CD10 molecule, also present in the AML/MDS panel that allows the identification of the last maturation stage of the neutrophil lineage, having been described changes in its expression in MDS cases, [10, 11]. CD43 and CD49d receptors are also part of the B-CLPD panel, contributing to their diagnosis, and previous work have described changes in its expression in MDS cases. [12, 13, 14, 15, 16, 17]

CD43 (leukosialin) is a highly glycosylated transmembrane protein that interacts with cytoskeletal proteins (cytoplasmic domain); transmits signals controlling a series of intracellular signal transduction pathways involved in cell activation, proliferation and survival; promotes cell adhesion, and also exhibits anti-adhesion properties, [18]. In humans, both CD45 and CD43 are considered as pan-hematopoietic markers. [18] This protein is expressed in all hematopoietic cells except resting mature B cells and mature erythrocytes. CD43 is often considered as a T-cell associated marker, because it is expressed by over 95% of thymocytes and peripheral blood T-cells. In the B-cell lineage, leukosialin is expressed in pre-B cells but is absent in resting mature B cells. [18, 19]

In the erythroid cell lineage, its expression has been observed only at an early stage of differentiation, in which  $CD43^{hi}/CD45^{low}/CD34^{+/-}$  cells were defined as hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) with multilineage differentiation potential with a bias towards erythroid differentiation, then decreasing during cell maturation. [18, 19, 20]

CD49d, the  $\alpha 4$  subunit of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin is a surface glycoprotein that mediates the adhesion of hematopoietic precursors in the BM basement membrane, allowing their migration. Provides adhesion, mobility and protection properties against the apoptotic processes in hematopoietic stem cells. Furthermore, it plays a crucial role in the communication between cells and their microenvironment. [12, 21]

Several studies have shown that the survival, proliferation and differentiation of hematopoietic precursors depends on the interaction with fibronectin, mediated by this integrin. Thus, the levels of expression and functional status of this protein are important factors in the regulation of the hematopoietic precursor's proliferation and survival. [12].

CD49d is expressed in macrophages, T and B cells, eosinophils, basophils, NK cells, dendritic cells, Langerhans cells, myeloid cells, erythrocyte precursors and thymocytes. It is not expressed in mature erythrocytes, platelets and neutrophils. [12, 21]

In the erythroid cell lineage, CD49d has been shown to improve the resolution of the various stages of erythroid precursor differentiation, [22]. Previous work describes a decrease in CD49d expression in a pattern following erythroblast maturation, from the highest expression in immature cells to the lowest in the most differentiated erythroblasts. [13, 23, 24]

Although CD43 and CD49d are expressed throughout the maturation of the erythroid lineage, their expression pattern in normal erythropoiesis has not yet been specifically described, nor whether this expression is different from normal in MDS.

Thus, it was the objective of this study to evaluate the expression of these two receptors in the BM CD34<sup>+</sup> compartment and how this expression varies in function of CD34<sup>+</sup> cells commitment to the different hematopoietic lineages; to study the expression of these molecules during the maturation of the erythroid lineage and to investigate whether, in cases of MDS, this expression is different from that observed in normal BM.

## Materials and Methods

### Patients

To study the expression pattern of CD43 and CD49d markers in the normal BM CD34<sup>+</sup> compartment and in the erythroid maturation, being the latter studied in the normal BM and in the BM of MDS diagnosed cases, 31 samples of bone marrow aspirates were evaluated, of which 13 samples of normal BM (HG) and 18 samples from patients diagnosed with MDS. Based on the 2016 WHO classification, the MDS group was divided into MDS I which includes MDS cases with unilineage dysplasia (n = 2) / and cases of MDS with multilineage dysplasia (n = 6); MDS II (which includes MDS cases with excess blasts 1 (n = 3) and excess blasts 2 (n = 7). Among all MDS cases, a third group of MDS with erythroid dysplasia (n = 7) was formed. The information about the patient's mean age and gender and other relevant clinical information for the various groups, is shown in **Table 1**.

### Immunophenotypic studies

To identify and access the CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells (HCS) compartment and the various commitment to the different hematopoietic cell lineages, two combinations of 7 monoclonal antibodies (mAb) conjugated to different fluorochromes were used. The first tube consisting of the following monoclonal antibody reagents: HLA-DR Pacific Blue (PacB) (clone L243; BD Biosciences, USA); CD45 Pacific Orange (PacO) (clone V500-c; BD Biosciences, USA); CD117 Phycoerythrin-Cyanine 7 (PECy7) (clone 104D2D1; Beckman Coulter, France); CD34 Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5) (clone 8G12; BD Biosciences, USA); CD13 Phycoerythrin (PE) (clone L138; BD Biosciences, USA); CD123 Allophycocyanin (APC) (clone 9F5; BD Biosciences, USA); and CD43 Allophycocyanin-Hilite7 (APC-H7) (clone 1G10; BD Biosciences, USA). The second tube is constituted with the same monoclonal antibodies as the first one, but with CD49d (APC-H7) (clone 9F10; BD Biosciences, USA) instead of CD43.

For the identification and characterization of the different maturation stages of the erythroid lineage, based on the immunophenotypic profile, two combinations of 7 monoclonal antibodies (mAb) conjugated to different fluorochromes were used. The first



tube consisting of the following monoclonal antibody reagents: HLA-DR Pacific Blue (PacB) (clone L243; BD Biosciences, USA); CD45 Pacific Orange (PacO) (clone V500-c; BD Biosciences, USA); CD117 Phycoerythrin-Cyanine 7 (PECy7) (clone 104D2D1; Beckman Coulter, France); CD34 Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5) (clone 8G12; BD Biosciences, USA); CD105 Phycoerythrin (PE) (clone TEA3/17.1.1; Beckman Coulter, France); CD36 Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (clone FA6.152; Beckman Coulter, France) and CD43 Allophycocyanin-Hilite7 (APC-H7) (clone 1G10; BD Biosciences, USA). The second tube is constituted with the same monoclonal antibodies as the first one, but with CD49d (APC-H7) (clone 9F10; BD Biosciences, USA) instead of CD43.

Total BM cells (a volume of 200  $\mu$ L) were stained for cell surface markers using a stain-lyse-wash direct immunofluorescence technique. In a first step, the proper volume of each monoclonal antibody was added to 200  $\mu$ L of sample and then incubated in the dark for 10 minutes, at room temperature. After this incubation time, 2 mL of lysing solution (BD FACS lysing solution) were added to each tube in order to lyse the erythrocytes present in the sample. Then each tube was incubated in the dark for 10 minutes, at room temperature in order to allow the lysing solution to act. At the end of the incubation period, the samples were centrifuged for 5 min (minutes) at 540 $\times$ g. The supernatant were discarded and the cell pellet was washed in 2 mL of phosphate buffered saline (PBS) and, lastly, resuspended in 200  $\mu$ L of PBS.

After completion of this protocol, the samples were acquired in a BD FACSCanto™ II (BD Biosciences; San Jose, USA) equipped with the FACSDiva software (v6.1.2; BD Biosciences; San Jose, USA). Data analysis was performed in the Infinicyt (version 1.7) software (Cytognos SL, Salamanca, Spain).

### **Statistical analyses**

For all variables under study, their mean values and standard deviation were calculated. To determine the statistical significance of the differences observed between groups, the non-parametric Mann–Whitney U and Kruskal–Wallis multiple comparison tests were performed using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS, version 23.0, IBM, Armonk, NY, USA). Statistically significant differences were considered when  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

### Immunophenotypic identification of different hematopoietic cell lineages commitment within the bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells (HCS) compartment.

Within the CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells (HCS) compartment the commitment to the different hematopoietic lineages was phenotypically identified. The CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells not committed to any hematopoietic lineage (more immature) were defined as CD34<sup>high</sup>/CD45<sup>dim</sup>/HLA-DR<sup>int</sup>/CD117<sup>int</sup>/CD13<sup>int</sup>, the commitment to the B cell lineage was defined as FSC<sup>low</sup>/CD45<sup>dim</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD13<sup>-</sup>; the commitment to the neutrophilic lineage was defined as SSC<sup>high</sup>/CD13<sup>high</sup>/CD117<sup>high</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>; the CD34<sup>+</sup> cells committed to the monocytic lineage were SSC<sup>int</sup>/CD34<sup>low</sup>/CD117<sup>int</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>/CD13<sup>int</sup>; the plasmacytoid dendritic cell lineage commitment was defined as CD123<sup>high</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>; the basophilic lineage-committed precursors were defined as HLA-DR<sup>low</sup>/CD123<sup>int/high</sup>; and finally the commitment to the erythroid lineage was defined as SSC<sup>high</sup>/CD13<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>int/high</sup>/CD117<sup>int/high</sup>. (**Figure 1**)

CD43 expression showed to be much higher in the hematopoietic precursors committed to the erythroid lineage compared to the precursors committed to other lineages, as observed in **Figure 1** and **Table 2**. In the erythroid cell lineage, its expression at an early stage of differentiation, has been already described in previous work. In fact both CD45 and CD43 are considered as pan-hematopoietic markers of the earliest clonogenic progenitors and differentiating hematopoietic cells and the early expression of CD43 on hematopoietic progenitors seems to indicate a possible role of CD43 in hematopoietic development. The early expression of this marker confers adhesion properties to erythroid precursors and is associated with a gradual decrease in the expression of CD34 along the erythropoiesis. [18]

Previous work as defined CD43<sup>high</sup> cells as the cell population of origin for in vitro erythropoiesis through colony-forming unit (CFU) assays, [20]. Thus using CD43 expression as a marker it's possible to isolate cells that are committed to the erythroid lineage. [20]

As for CD43, the CD34<sup>+</sup> precursors committed to the erythroid line showed a higher expression of CD49d, as observed in **Figure 1** and **Table 2**. The elevated expression of CD49d in the erythroid precursors is in agreement with previous studies. A previous report, using a flow cytometric assay, showed that CD49d is highly expressed in immature (Ter119<sup>low</sup>/CD71<sup>high</sup>) cells being essential to maintaining normal hematopoiesis and BM microenvironments and mediates the association between primitive erythroblasts and fetal liver-derived macrophages, also, this integrin has a critical role in erythropoiesis by holding maturing precursors in close association with the marrow stroma, [13]. Another report, were bone marrow (BM) cells from mice were stained with CD71, Ter119, CD49d or CD49e and CD44 antibodies and analyzed by Fluorescence Activated Cell Sorting showed a high expression of this integrin in the early erythropoiesis. [24]

### **Immunophenotypic identification of BM erythroid precursors and their maturation stages in normal bone marrow**

Within BM cells committed to the erythroid lineage, five distinct maturation stages were phenotypically identified. The most immature subset of erythroid precursors (stage I) was defined as CD34<sup>+</sup>/ CD117<sup>+high</sup>/ HLA-DR<sup>+high</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>+low</sup>/ CD43<sup>+high</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; the following stage of maturation (stage II) was defined as CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>+int</sup>/ CD105<sup>+high</sup>/ CD36<sup>+high</sup>/ CD45<sup>+low</sup>/ CD43<sup>+high</sup>/ CD49d<sup>+high</sup>; stage III included CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+high</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+high</sup> precursors; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/ SSC<sup>int</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; Finally stage V was defined as FSC<sup>low</sup>/ SSC<sup>low</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup>. (**Figure 2, 3 and 4**)

The expression of CD43, in normal erythroid maturation, was characterized by a constant decrease throughout maturation, with a high expression in stage I and consequent decrease to the last stage, as shown in **Figure 3** and **Table 3**.

The early expression of this receptor in erythroid precursors and the decrease throughout maturation has been described in the literature. Previous works showed through electrophoresis and fluorography assays that during erythroid differentiation the expression of CD43 appears to decline, since erythroblasts possess only small amounts

on the cell surface and mature erythrocytes are completely lacking this glycoprotein. [25, 26, 27]

Another report, using colony-forming unit (CFU) assays, showed that during terminal erythroid differentiation CD43 is downregulated, however initially maintained on high levels until day 11 of culturing. [20]

However the analysis of CD43 expression during erythroid differentiation by flow cytometry has not yet been performed until now.

The expression of CD49d also appears to follow a defined pattern characterized by increased expression of stage I to stage II, followed by a maintained expression between stage II and III and by a constant decrease from stage III to the last stage which presents the less expression of this marker, (**Figure 4** and **Table 3**). This decrease along the erythroid maturation is in agreement with previous reports, [13, 24]. A study carried out in 2011 using a flow cytometric assay analyzed cells from the BM of transplanted mice. The erythroid precursors were classified as early proerythroblast defined as (Ter119<sup>med</sup>/CD71<sup>high</sup>), basophilic erythroblast (Ter119<sup>high</sup>/CD71<sup>high</sup>), late basophilic and polychromatophilic erythroblast (Ter119<sup>high</sup>/CD71<sup>med</sup>), and orthochromatophilic erythroblast (Ter119<sup>high</sup>/CD71<sup>low</sup>). The CD49d expression showed to decrease in a pattern following erythroblast maturation, from the highest expression in immature (Ter119<sup>low</sup>/CD71<sup>high</sup>) cells to the lowest in the most differentiated erythroblasts (Ter119<sup>high</sup>/CD71<sup>low</sup>). [13]

Another report using flow cytometry analysis was carried out in 2014, also in mice, where total bone marrow (BM) cells were stained with CD71, Ter119, CD49d or CD49e and CD44 antibodies and analyzed by Fluorescence Activated Cell Sorting, [24]. The mean fluorescence intensity (MFI) of CD49d showed to be upregulated in the basophilic erythroblast stage which presents the highest activation stage and binding profile, followed by a decrease until the most mature erythroblasts, [24]. At this stage CD49d forms stable complexes with a series of tetraspanins which increase the affinity and/or clustering of CD49d and can bias erythroblast/macrophage interactions vs. erythroblast/fibronectin interactions by introducing different ligand-specific signaling, [24]. This increase in CD49d expression in the basophilic erythroblast stage (stage II) is in agreement with the one observed in this work.

Although immunophenotypic studies have already been performed in this context, they were performed in mice and few markers were used for the discrimination of the various erythroid maturation stages, thus, in this study the use of 7 markers makes the establishment of the erythroid maturation stages more sensitive.

## Expression of CD43 and CD49d in Myelodysplastic Syndromes

In MDS, the expression of CD43 showed to follow the same pattern as the one observed in normal BM, that is, a constant decrease throughout maturation, however, a statistically significant decrease was observed in the mean fluorescence intensity (MFI) values, in all maturation stages, when compared with HG (**Table 3**). It has previously been shown that CD43 expression is altered in patients with myelodysplastic syndrome. [14, 15, 16, 17]

However changes in the erythroid lineage in MDS have not yet been described in the literature. Thus further experiments are needed to investigate the significance of CD43 downregulation in the erythroid lineage.

When the patients with MDS were grouped, in MDS I (which includes MDS cases with uni and multilineage dysplasia), MDS II (which includes MDS cases with excess blasts 1/2) and MDS with erythroid dysplasia, the reduction of CD43 expression continued to be observed, being this one more pronounced and with statistical significance in cases of MDS II and MDS with erythroid dysplasia, when compared to the HG. (**Table 3**)

Erythropoiesis occurs entirely in erythroid niches known as “erythroblastic islands” which consist of a central macrophage surrounded by developing erythroblasts. Adhesive interactions between the central macrophage and erythroblasts, as well as between erythroblasts and extracellular matrix proteins, are essential in the regulation of erythroid differentiation. [13, 28]

These adhesive bindings initiate signaling pathways, gene expression and cell proliferation. Previous studies showed that adding antibodies against these adhesion molecules in erythroblast or erythroblast/macrophage co-cultures significantly decreased proliferation, maturation and enucleation. [29, 30]

The erythroblasts are known to express various adhesion molecules, namely  $\beta 1$  integrin and CD44 (transmembrane glycoprotein), that undergo dynamic variation during erythroid differentiation. [13, 28, 31]

Thus CD43 is a transmembrane protein whose early expression in hematopoietic precursor cells derived from embryonic stem cells seems to indicate that this marker plays

an essential role in the hematopoietic process, conferring adhesion/ anti-adhesion and proliferation capabilities, [18, 20]. CD43 transmits signals enabling other ligand-receptor interactions to promote cell adhesion acting as a gateway to facilitate certain cell contacts. The cytoplasmic domain of CD43 interacts with cytoskeletal proteins and transmits signals that regulate a variety of intracellular signal transduction pathways involved in cell activation, proliferation, and survival. [18]

In the erythroid lineage its early expression confers adhesion properties to erythroid precursors, [18]. Thus, a decrease in the expression of this marker, which was observed in MDS, may, at least in part, compromise erythropoiesis, affecting interactions between the central macrophage and erythroblasts, as well as between erythroblasts and extracellular matrix proteins and therefore may contribute to the presence of anemia.

As observed in CD43, the expression of CD49d in MDS showed to follow the same pattern as observed in normal BM, increased from stage I to stage II, maintained between stage II and stage III, followed by a decrease, however, there was a statistically significant decrease in the MFI values in all stages compared to HG (**Table 3**).

In the different groups considered, SMD I, SMDII and SMD with erythroid dysplasia, the same pattern was observed, with a decrease in MFI values at each stage, which was more pronounced in the SMD II and SMD with erythroid dysplasia groups when compared to HG. (**Table 3**)

In erythropoiesis, CD49d mediated interactions between erythroid precursors and macrophages or fibronectin in their microenvironment, have been studied and were considered important in the expansion/maturation process. [24]

Previous work have shown that CD34<sup>+</sup> progenitor cells from MDS patients with high levels of intramedullary apoptosis have a significant downregulation of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin receptor which could be associated with reduced in vitro adhesiveness to fibronectin fragments, their principal natural ligands. These in vitro findings might support the concept that CD49d downregulation on hematopoietic progenitors from MDS patients may decrease in vivo adhesiveness to the extracellular matrix component fibronectin, [12]. Decreased levels of CD49d may lead to an early release of these cells from “erythroblastic islands”, subsequently affecting proliferation and differentiation and may also reduce progenitor cell survival. [12, 13]

Still, given the protective role of CD49d in the apoptosis process, a decrease in its expression, which has been observed in MDS, may be associated with the increased intramedullary apoptosis process, characteristic of this entity, which leads to the occurrence of peripheral blood cytopenias. [12]

In the literature, the decreased expression of this integrin was observed in patients diagnosed with MDS and with high levels of apoptosis, when compared to the control group. Thus, the decrease of this protein expression in erythroid precursors may be considered as a pro-apoptotic factor in cases of MDS. [12]



## **Conclusions**

CD43 and CD49d are strongly expressed in the erythroid lineage since the earlier stages of differentiation, despite the decreased expression observed across the different stages of maturation.

In MDS BM, the expression of these two markers is diminished in all stages of maturation of the erythroid lineage, when compared with normal BM, despite maintaining a similar pattern. In cases with morphologic erythroid dysplasia the expression of the CD49d appears to be especially affected in the final stages of maturation.

The obtained results point to the usefulness of CD43 and CD49d markers in the identification of dysplastic phenotypic features in erythroid lineage, and since both markers are included in B-CLPD diagnostic panel, could contribute to the concomitant diagnosis of a chronic B cell disorder and a possible MDS.

## References

1. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, *et al.* 2009. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 94(8):1124–34
2. Vassallo J, Magalhães SMM. 2009. Myelodysplastic syndromes and diseases with myelodysplastic and myeloproliferative features. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 31(4):267-72
3. Laranjeira P, Rodrigues R, Carvalheiro T, *et al.* 2015. Expression of CD44 and CD35 during normal and myelodysplastic erythropoiesis. *Leuk. Res.* 39(3):361-70
4. Lorand- Metze I. 2006. The application of flow cytometric analysis of bone marrow cells for the diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 28(3):178-81
5. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, *et al.* 2008. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk. Res.* 32(1):5-17
6. Matarraz S, López A, Barrena S, *et al.* 2008. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 22(6):1175-83
7. Matarraz S, Paiva B, Díez-Campelo M, *et al.* 2014. Immunophenotypic alterations of bone marrow myeloid cell compartments in multiple myeloma patients predict for myelodysplasia-associated cytogenetic alterations. *Leukemia* 28(8):1747-50
8. Sandes AF, Chauffaille Mde L, Orfao A, *et al.* 2012. Association of myelodysplastic syndrome with CD5+, CD23+ monoclonal B-cell lymphocytosis. *Clinics* 67(12):1487-91
9. Rodríguez-Caballero A, Henriques A, Criado I, *et al.* 2015. Subjects with chronic lymphocytic leukaemia-like B-cell clones with stereotyped B-cell receptors frequently show MDS-associated phenotypes on myeloid cells. *Br J Haematol.* 168(2):258-67

10. van Dongen JJM, Hermitte LL, Bottcher S, *et al.* 2012. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26(9):1908-75
11. Chang CC, Cleveland RP. 2000. Decreased CD10-positive mature granulocytes in bone marrow from patients with myelodysplastic syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124(8):1152-6
12. Delforge M, Raets V, Van Duppen V, *et al.* 2005. CD34+ marrow progenitors from MDS patients with high levels of intramedullary apoptosis have reduced expression of alpha4beta1 and alpha5beta1 integrins. *Leukemia* 19(1):57-63
13. Cao YA, Kusy S, Luong R, *et al.* 2011. Heme oxygenase-1 deletion affects stress erythropoiesis. *PLoS One* 6(5):e20634
14. Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Tzardi M, *et al.* 2000. **Downregulation of CD43 in RAEB and RAEB-T patients.** *Am J Hematol.* 63:20–7
15. Kyriakou D, Alexandrakis MG, Kyriakou ES, *et al.* 2001. Reduced CD43 expression on the neutrophils of MDS patients correlates with an activated phenotype of these cells. *Int J Hematol.* 73(4):483-91
16. Kyriakou E, Kyriakou D, Liapi D, *et al.* 2006. Alterations of CD43 expression in transfusion-dependent myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 85: 281–84
17. Kyriakou D, Liapi D, Kyriakou E, *et al.* 2000. Aberrant expression of the major sialoglycoprotein (CD43) on the monocytes of patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 79:198–205
18. Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II. 2006. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood* 108(6):2095-105
19. Kudo S, Fukuda M. 1995. Tissue specific transcriptional regulation of human leukosialin (CD43) gene is achieved by DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 270(22):13298–302
20. Kessel KU, Bluemke A, Schöler HR, *et al.* 2017. Emergence of CD43-Expressing Hematopoietic Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Transfus. Med. Hemother.* 44(3):143-50

21. Singh V, Erb U, Zöller M. 2013. Cooperativity of CD44 and CD49d in leukemia cell homing, migration, and survival offers a means for therapeutic attack. *J Immunol.* 191(10):5304-16
22. Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. 2016. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol.* 173(2):206-18
23. Papayannopoulou T, Brice M. 1992. Integrin expression profiles during erythroid differentiation. *Blood* 79(7):1686-94
24. Ulyanova T, Padilla SM, Papayannopoulou T. 2014. Stage specific functional roles of integrins in erythropoiesis. *Exp Hematol.* 42(5):404-9
25. Carlsson SR, Fukuda M. 1986. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem.* 261(27):12779-86
26. Fukuda M, Tsuboi S. 1999. Mucin-type O-glycans and leukosialin. *Biochim Biophys Acta.* 1455(2-3):205-17
27. Fukuda M, Fukuda MN, Papayannopoulou T, et al. 1980. Membrane differentiation in human erythroid cells: unique profiles of cell surface glycoproteins expressed in erythroblasts in vitro from three ontogenic stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 77(6):3474-8
28. Chen K, Liu J, Heck S, et al. 2009. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106(41):17413-18
29. Hanspal M, Smockova Y, Uong, Q. 1998. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 92(8):2940-50
30. Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. 1995. Very late activation antigen 4- vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med.* 181(1):411-5
31. Spring FA, Parsons SF. 2000. Erythroid cell adhesion molecules. *Transfus Med Rev.* 14(4):351-63

## Legends – Tables and Figures

**Table 1.** Patient's mean age and gender, in the various groups.

HG, healthy group; MDS, Myelodysplastic syndromes; N, number of cases; SD, standard deviation.

\*% of (CD34<sup>±</sup>/ CD117<sup>+</sup>) cells analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH).

**Table 2.** Mean Fluorescent Intensity of CD43 e CD49d observed in the CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells (HCS) compartment from normal bone marrow aspirates (HG)

**Table 3.** Mean fluorescence intensity of CD43 and CD49d markers in the different stages of erythroid maturation observed in HG and MDS groups.

The results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) ± standard deviation.

The five maturation stages were defined as follows: The most immature subset of erythroid precursors (stage I) was defined as CD34<sup>+</sup>/ CD117<sup>high</sup>/ HLA-DR<sup>high</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>high</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; the following stage of maturation (stage II) was defined as CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>int</sup>/ CD105<sup>high</sup>/ CD36<sup>high</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>high</sup>/ CD49d<sup>high</sup>; stage III included CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>high</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>high</sup> precursors; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/ SSC<sup>int</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; Finally stage V was defined as FSC<sup>low</sup>/ SSC<sup>low</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup>.

a p < 0.05 vs. HG. Mann–Whitney U multiple-comparison test.

**Figure 1.** Immunophenotypic identification of the commitment to different hematopoietic cell lineages within the bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells (HCS) compartment and the differential expression of CD43 and CD49d markers. The CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells not committed to any hematopoietic lineage (more immature) defined as CD34<sup>+high</sup>/ CD45<sup>+dim</sup>/HLA-DR<sup>+int</sup>/CD117<sup>+int</sup>/CD13<sup>+int</sup> are represented in yellow; the precursors cells committed to the B cell lineage defined as FSC<sup>low</sup>/ CD45<sup>+dim</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup>/ CD13<sup>-</sup> are represented in dark blue; the precursors committed to the neutrophilic lineage defined as SSC<sup>high</sup>/ CD13<sup>+high</sup>/ CD117<sup>+high</sup>/HLA-DR<sup>+high</sup> are represented in pink; the CD34<sup>+</sup> cells committed to the monocytic lineage defined as SSC<sup>int</sup>/CD34<sup>+low</sup>/CD117<sup>+int</sup>/HLA-DR<sup>+high</sup>/ CD13<sup>+int</sup> are represented in green; the precursors committed to the plasmacytoid dendritic cell lineage defined as CD123<sup>+high</sup>/ HLA-DR<sup>+high</sup> are represented in blue; the basophilic lineage-committed precursors defined as HLA-DR<sup>+low</sup>/ CD123<sup>+int/high</sup> are represented in brown; finally the precursors committed to the erythroid lineage defined as SSC<sup>high</sup>/ CD13<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>+int/high</sup>/CD117<sup>+int/high</sup> are represented in red.

**Figure 2. (A)** Represent the immunophenotyping pattern of erythroid precursors in normal bone marrow. Five distinct maturation associated cell subsets were phenotypically identified. The most immature erythroid precursors (stage I) defined as CD34<sup>+</sup>/ CD117<sup>+high</sup>/ HLA-DR<sup>+high</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>+low</sup>/ CD43<sup>+high</sup>/ CD49d<sup>+</sup> are represented as brown events; the following stage of maturation (stage II) defined as CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>+int</sup>/ CD105<sup>+high</sup>/ CD36<sup>+high</sup>/ CD45<sup>+low</sup>/ CD43<sup>+high</sup>/ CD49d<sup>+high</sup> is represented in blue; stage III included CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+high</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+high</sup> precursors represented in red; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/ SSC<sup>int</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup> and are represented in purple; Finally stage V defined as FSC<sup>low</sup>/ SSC<sup>low</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup> is represented in green. **(B)** Expression pattern of the relevant markers along the erythroid maturation process occurring in normal BM. In this panel the median amount of antigen expressed per cell, in terms of mean fluorescence intensity (MFI) is shown for each phenotypic marker using the same color codes as defined for individual markers on the left of the panel.

**Figure 3. (A)** Representation of the immunophenotyping pattern of CD43 in normal erythroid maturation. Five distinct maturation associated cell subsets were phenotypically identified. The most immature erythroid precursors (stage I) defined as CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>high</sup>/ HLA-DR<sup>high</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>high</sup>/ CD49d<sup>+</sup> are represented as brown events; the following stage of maturation (stage II) defined as CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>int</sup>/ CD105<sup>high</sup>/ CD36<sup>high</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>high</sup>/ CD49d<sup>high</sup> is represented in blue; stage III included CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>high</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>high</sup> precursors represented in red; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/ SSC<sup>int</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup> and are represented in purple; Finally stage V defined as FSC<sup>low</sup>/ SSC<sup>low</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup> is represented in green. The arrow indicate the maturation pathway. **(B)** Expression pattern of CD43 along the erythroid maturation process occurring in normal BM. The Expression pattern of CD43 along the erythroid maturation process is represented in blue and the other relevant markers are represented in gray.

**Figure 4. (A)** Representation of the immunophenotyping pattern of CD49d in normal erythroid maturation. Five distinct maturation associated cell subsets were phenotypically identified. The most immature erythroid precursors (stage I) defined as CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>high</sup>/ HLA-DR<sup>high</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>high</sup>/ CD49d<sup>+</sup> are represented as brown events; the following stage of maturation (stage II) defined as CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>int</sup>/ CD105<sup>high</sup>/ CD36<sup>high</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>high</sup>/ CD49d<sup>high</sup> is represented in blue; stage III included CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>high</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>high</sup> precursors represented in red; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/ SSC<sup>int</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup> and are represented in purple; Finally stage V defined as FSC<sup>low</sup>/ SSC<sup>low</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup> is represented in green. The arrow indicate the maturation pathway. **(B)** Expression pattern of CD49d along the erythroid maturation process occurring in normal BM. The Expression pattern of CD49d along the erythroid maturation process is represented in green and the other relevant markers are represented in gray.

**Table 3.** Patient's mean age and gender, in the various groups.

	HG	MDS	MDS I	MDS II	MDS with erythroid dysplasia	
<b>Total N</b>	13	18	8	10	7	
<b>(Mean age ± SD)</b>	Female	N=8 (56 ± 16)	N=6 (83 ± 3)	N=3 (84 ± 2)	N=3 (81 ± 2)	N=2 (84 ± 3)
	Male	N=5 (59 ± 25)	N=12 (72 ± 9)	N=5 (75 ± 9)	N=7 (70 ± 10)	N=5 (78 ± 6)
<b>Chromosomal alterations</b>		5/18	3/8	2/10	2/7	
		<b>del(20q)</b> (n=5; 20% ± 29%*)	<b>del(20q)</b> (n=3; 41% ± 38%*)	<b>del(20q)</b> (n=2; 25% ± 7%*)	<b>del(20q)</b> (n=2; 51% ± 48%*)	
		<b>del(5q)</b> (n=2; 64% ± 48%*)	<b>del(5q)</b> (n=1; 98%*)	<b>del(5q)</b> (n=1; 30%*)	<b>del(5q)</b> (n=1; 98%*)	
		<b>del(7q)</b> (n=1; 43%*)	<b>del(7q)</b> (n=1; 43%*)	<b>Trisomy 8</b> (n=1; 30%*)	<b>del(7q)</b> (n=1; 43%*)	
		<b>Monosomy 7</b> (n=1; 100%*)	<b>Monosomy 7</b> (n=1; 100%*)			
	<b>Trisomy 8</b> (n=1; 30%*)					

HG, healthy group; MDS, Myelodysplastic syndromes; N, number of cases; SD, standard deviation.

\*% of (CD34<sup>±</sup>/ CD117<sup>+</sup>) cells analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH).



**Table 4.** Mean Fluorescent Intensity of CD43 e CD49d observed in the CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells (HCS) compartment from normal bone marrow aspirates (HG)

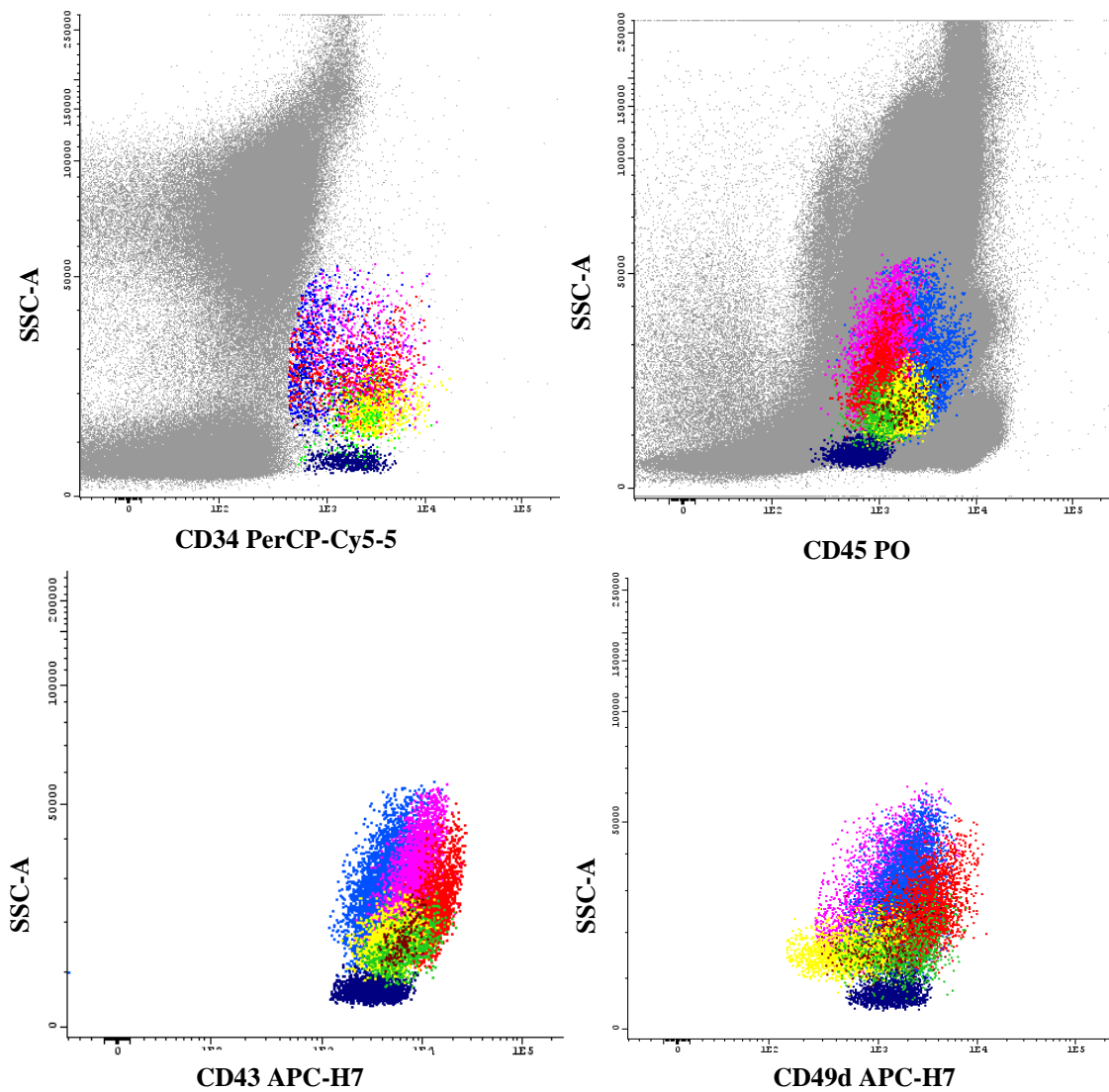
	<b>HG</b>	
	CD43	CD49d
<b>Immature (HCS)</b>	<b>5971 ± 2355</b>	<b>750 ± 505</b>
<b>B cell lineage</b>	<b>4539 ± 2682</b>	<b>1240 ± 345</b>
<b>Basophilic lineage</b>	<b>7221 ± 2947</b>	<b>1352 ± 497</b>
<b>Erythroid lineage</b>	<b>15474 ± 6072</b>	<b>2491 ± 773</b>
<b>Monocytic lineage</b>	<b>7787 ± 3134</b>	<b>1516 ± 509</b>
<b>Neutrophilic lineage</b>	<b>9398 ± 3960</b>	<b>1113 ± 253</b>
<b>Plasmacytoid dendritic cell lineage</b>	<b>4748 ± 1700</b>	<b>1610 ± 301</b>

**Table 3.** Mean fluorescence intensity of CD43 and CD49d markers in the different stages of erythroid maturation observed in HG and MDS groups.

	HG		MDS		MDS I		MDS II		MDS with erythroid dysplasia	
	CD43	CD49d	CD43	CD49d	CD43	CD49d	CD43	CD49d	CD43	CD49d
Stage I	<b>14917</b> ± 3939	<b>2861</b> ± 1033	<b>10284</b> ± 6174 <sup>a</sup>	<b>1986</b> ± 1155 <sup>a</sup>	<b>11583</b> ± 5012	<b>2394</b> ± 1626 <sup>a</sup>	<b>9245</b> ± 7055 <sup>a</sup>	<b>1660</b> ± 442 <sup>a</sup>	<b>12918</b> ± 7219	<b>2305</b> ± 1764 <sup>a</sup>
Stage II	<b>10438</b> ± 2595	<b>4149</b> ± 1076	<b>6980</b> ± 3322 <sup>a</sup>	<b>3156</b> ± 1829 <sup>a</sup>	<b>7788</b> ± 3500	<b>3501</b> ± 2600	<b>6334</b> ± 3206 <sup>a</sup>	<b>2881</b> ± 932 <sup>a</sup>	<b>8099</b> ± 3429	<b>3630</b> ± 2673
Stage III	<b>5859</b> ± 1745	<b>4185</b> ± 961	<b>3981</b> ± 1785 <sup>a</sup>	<b>3387</b> ± 1285 <sup>a</sup>	<b>4183</b> ± 1813 <sup>a</sup>	<b>3447</b> ± 1661	<b>3820</b> ± 1843 <sup>a</sup>	<b>3339</b> ± 982	<b>4052</b> ± 1955 <sup>a</sup>	<b>3134</b> ± 1710 <sup>a</sup>
Stage IV	<b>3345</b> ± 1022	<b>3610</b> ± 719	<b>2219</b> ± 982 <sup>a</sup>	<b>2724</b> ± 1095 <sup>a</sup>	<b>2543</b> ± 939	<b>2677</b> ± 1247	<b>1960</b> ± 985 <sup>a</sup>	<b>2762</b> ± 1025 <sup>a</sup>	<b>2147</b> ± 842 <sup>a</sup>	<b>2097</b> ± 1180 <sup>a</sup>
Stage V	<b>1779</b> ± 552	<b>2159</b> ± 442	<b>1233</b> ± 557 <sup>a</sup>	<b>1525</b> ± 620 <sup>a</sup>	<b>1420</b> ± 529	<b>1535</b> ± 606 <sup>a</sup>	<b>1083</b> ± 559 <sup>a</sup>	<b>1516</b> ± 664 <sup>a</sup>	<b>1165</b> ± 459 <sup>a</sup>	<b>1079</b> ± 549 <sup>a</sup>

The results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) ± standard deviation. The five maturation stages were defined as follows: The most immature subset of erythroid precursors (stage I) was defined as CD34<sup>+</sup>/ CD117<sup>+high</sup>/ HLA-DR<sup>+high</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>+high</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; the following stage of maturation (stage II) was defined as CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>+</sup>/ HLA-DR<sup>+int</sup>/ CD105<sup>+high</sup>/ CD36<sup>+high</sup>/ CD45<sup>low</sup>/ CD43<sup>+high</sup>/ CD49d<sup>+high</sup>; stage III included CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>+</sup>/ CD36<sup>+high</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+high</sup> precursors; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/ SSC<sup>int</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup>; Finally stage V was defined as FSC<sup>low</sup>/ SSC<sup>low</sup>/ CD34<sup>-</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>-</sup>/ CD105<sup>-</sup>/ CD36<sup>+</sup>/ CD45<sup>-</sup>/ CD43<sup>+</sup>/ CD49d<sup>+</sup>.

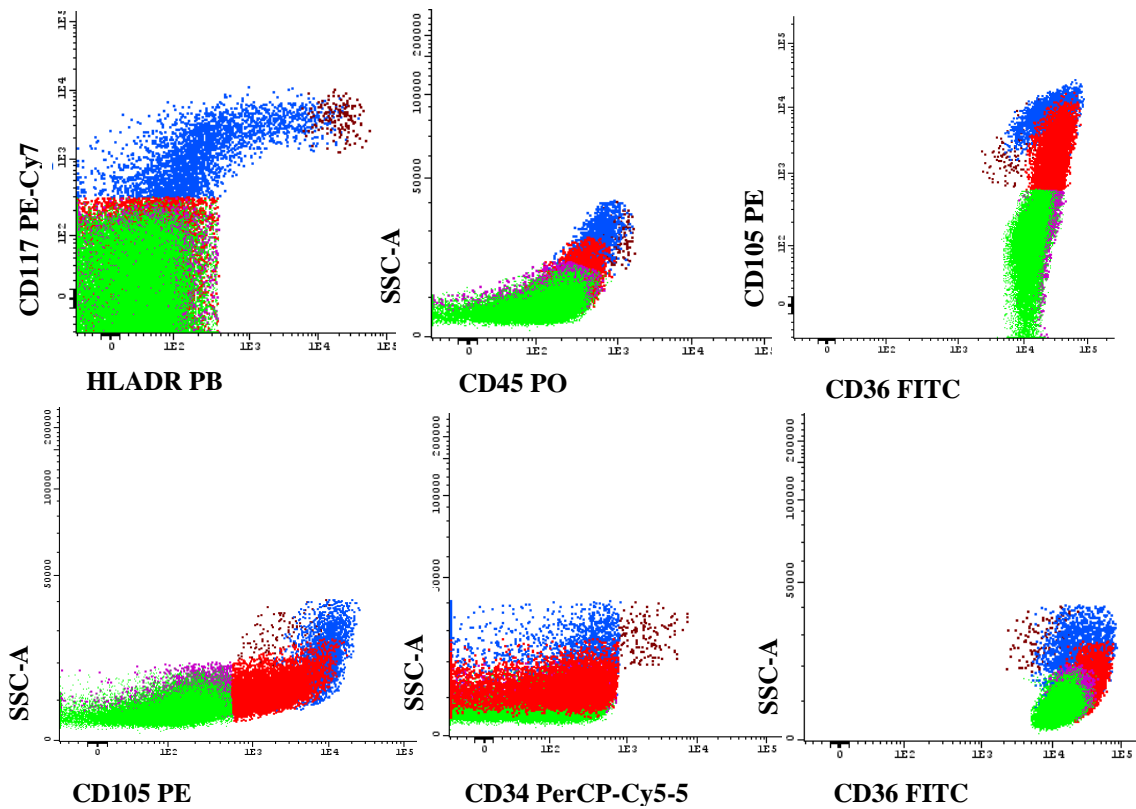
<sup>a</sup> p < 0.05 vs. HG. Mann–Whitney U multiple-comparison test.



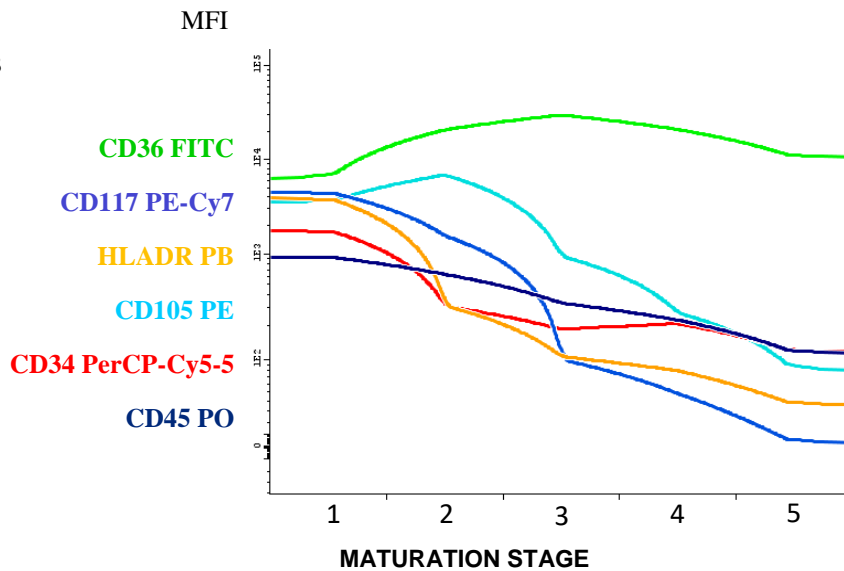
**Figure 1.** Immunophenotypic identification of the commitment to different hematopoietic cell lineages within the bone marrow CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells (HCS) compartment and the differential expression of CD43 and CD49d markers. The CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells not committed to any hematopoietic lineage (more immature) defined as CD34<sup>high</sup>/ CD45<sup>dim</sup>/HLA-DR<sup>int</sup>/CD117<sup>int</sup>/CD13<sup>int</sup> are represented in yellow; the precursors cells committed to the B cell lineage defined as FSC<sup>low</sup>/ CD45<sup>dim</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup>/ CD13<sup>-</sup> are represented in dark blue; the precursors committed to the neutrophilic lineage defined as SSC<sup>high</sup>/ CD13<sup>high</sup>/ CD117<sup>high</sup>/HLA-DR<sup>high</sup> are represented in pink; the CD34<sup>+</sup> cells committed to the monocytic lineage defined as SSC<sup>int</sup>/CD34<sup>low</sup>/CD117<sup>int</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>/ CD13<sup>int</sup> are represented in green; the precursors committed to the plasmacytoid dendritic cell lineage defined as CD123<sup>high</sup>/

HLA-DR<sup>high</sup> are represented in blue; the basophilic lineage-committed precursors defined as HLA-DR<sup>low</sup>/ CD123<sup>int/high</sup> are represented in brown; finally the precursors committed to the erythroid lineage defined as SSC<sup>high</sup>/ CD13<sup>-</sup>/ HLA-DR<sup>int/high</sup>/CD117<sup>int/high</sup> are represented in red.

A



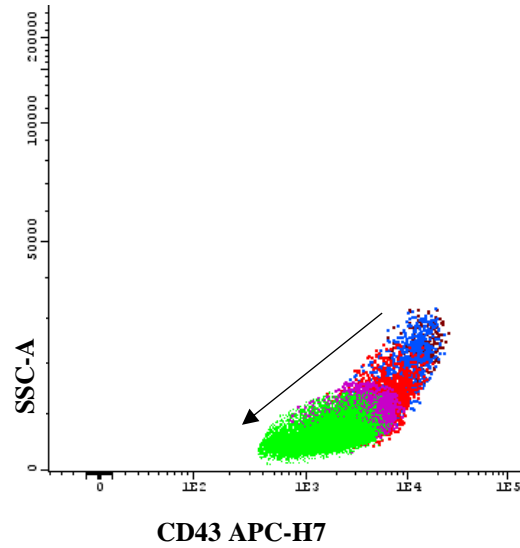
B



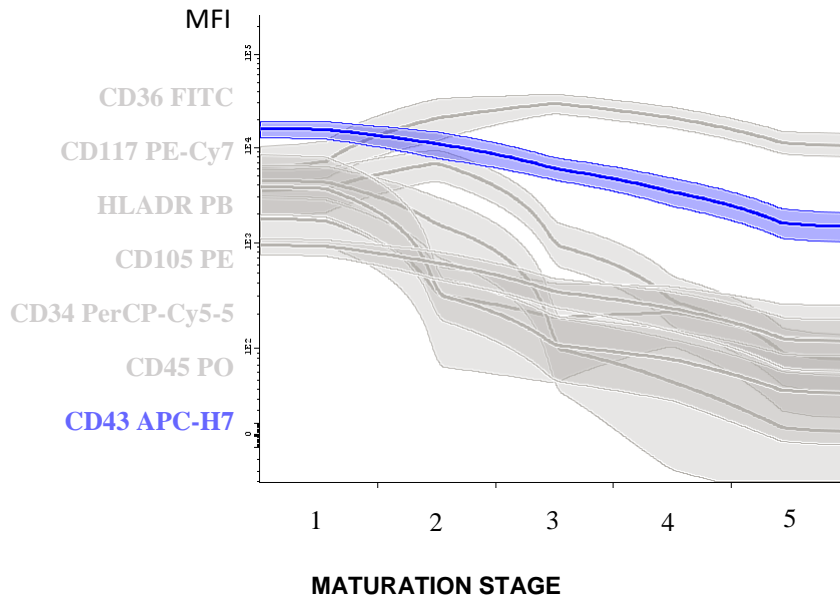
**Figure 2.** (A) Represent the immunophenotyping pattern of erythroid precursors in normal bone marrow. Five distinct maturation associated cell subsets were phenotypically identified. The most immature erythroid precursors (stage I) defined as CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>high</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>/CD43<sup>high</sup>/CD49d<sup>+</sup> are

represented as brown events; the following stage of maturation (stage II) defined as CD34<sup>-</sup> / CD117<sup>+</sup> / HLA-DR<sup>+int</sup> / CD105<sup>+high</sup> / CD36<sup>+high</sup> / CD45<sup>+low</sup> / CD43<sup>+high</sup> / CD49d<sup>+high</sup> is represented in blue; stage III included CD34<sup>-</sup> / CD117<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / CD105<sup>+</sup> / CD36<sup>+high</sup> / CD45<sup>-</sup> / CD43<sup>+</sup> / CD49d<sup>+high</sup> precursors represented in red; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup> / SSC<sup>int</sup> / CD34<sup>-</sup> / CD117<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / CD105<sup>-</sup> / CD36<sup>+</sup> / CD45<sup>-</sup> / CD43<sup>+</sup> / CD49d<sup>+</sup> and are represented in purple; Finally stage V defined as FSC<sup>low</sup> / SSC<sup>low</sup> / CD34<sup>-</sup> / CD117<sup>-</sup> / HLA-DR<sup>-</sup> / CD105<sup>-</sup> / CD36<sup>+</sup> / CD45<sup>-</sup> / CD43<sup>+</sup> / CD49d<sup>+</sup> is represented in green. **(B)** Expression pattern of the relevant markers along the erythroid maturation process occurring in normal BM. In this panel the median amount of antigen expressed per cell, in terms of mean fluorescence intensity (MFI) is shown for each phenotypic marker using the same color codes as defined for individual markers on the left of the panel.

A



B

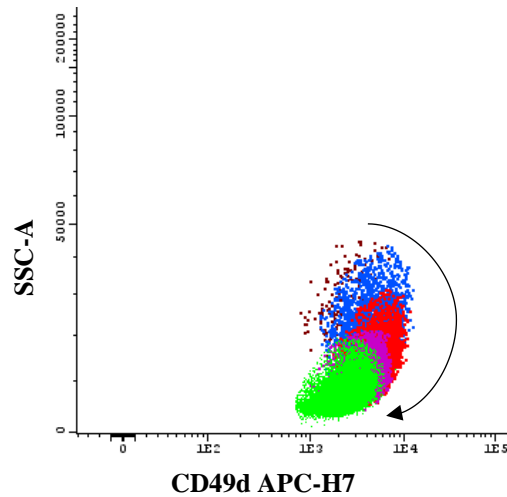


**Figure 3. (A)** Representation of the immunophenotyping pattern of CD43 in normal erythroid maturation. Five distinct maturation associated cell subsets were phenotypically identified. The most immature erythroid precursors (stage I) defined as CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>high</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>/CD43<sup>high</sup>/CD49d<sup>+</sup> are represented as brown events; the following stage of maturation (stage II) defined as CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>int</sup>/CD105<sup>high</sup>/CD36<sup>high</sup>/CD45<sup>low</sup>/CD43<sup>high</sup>/CD49d<sup>high</sup> is represented in blue; stage III included CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD36<sup>high</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>high</sup> precursors represented in red; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/SSC<sup>int</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup> and are represented in purple; Finally stage V defined

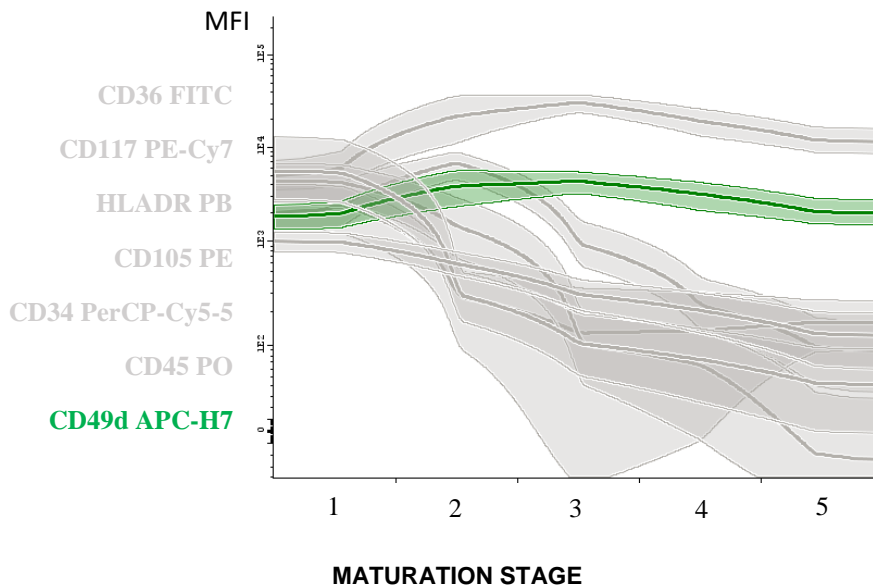
as FSC<sup>low</sup>/SSC<sup>low</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup> is represented in green. The arrow indicate the maturation pathway. **(B)** Expression pattern of CD43 along the erythroid maturation process occurring in normal BM. The Expression pattern of CD43 along the erythroid maturation process is represented in blue and the other relevant markers are represented in gray.



A



B



**Figure 4. (A)** Representation of the immunophenotyping pattern of CD49d in normal erythroid maturation. Five distinct maturation associated cell subsets were phenotypically identified. The most immature erythroid precursors (stage I) defined as CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>high</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>/CD43<sup>high</sup>/CD49d<sup>+</sup> are represented as brown events; the following stage of maturation (stage II) defined as CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>int</sup>/CD105<sup>high</sup>/CD36<sup>high</sup>/CD45<sup>low</sup>/CD43<sup>high</sup>/CD49d<sup>high</sup> is represented in blue; stage III included CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD36<sup>high</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>high</sup> precursors represented in red; erythroid precursors at stage IV were phenotypically characterized as FSC<sup>int</sup>/SSC<sup>int</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup> and are represented in purple; Finally stage V defined as FSC<sup>low</sup>/SSC<sup>low</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>/CD36<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD43<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>

is represented in green. The arrow indicate the maturation pathway. **(B)** Expression pattern of CD49d along the erythroid maturation process occurring in normal BM. The Expression pattern of CD49d along the erythroid maturation process is represented in green and the other relevant markers are represented in gray.