



SUIELLEN CARVALHO REIS ALVES

**MODIFICAÇÃO DO SISTEMA DE PONTUAÇÃO
FCSS (SCORE DE CITOMETRIA) APRIMORA O
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE CITOPENIAS
PERIFÉRICAS REACIONAIS E SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

SUIELLEN CARVALHO REIS ALVES

MODIFICAÇÃO DO SISTEMA DE PONTUAÇÃO FCSS (SCORE DE CITOMETRIA) APRIMORA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE CITOPENIAS PERIFÉRICAS REACIONAIS E SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

Tese de Doutorado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para a obtenção do título de Doutora em
Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

ORIENTAÇÃO: Prof. Dra. Irene Gyongyver Heidmarie Lorand Metze

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
SUIELLEN CARVALHO REIS ALVES, E ORIENTADA PELA
PROF^a DR^a IRENE GYONGYVER HEIDMARIE LORAND METZE.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R277m Reis-Alves, Suiellen Carvalho, 1982-
Modificação do sistema de pontuação FCSS (score de citometria) aprimora o diagnóstico diferencial entre citopenias periféricas reacionais e síndromes mielodisplásicas / Suiellen Carvalho Reis Alves. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndromes mielodisplásicas. 2. Citometria de fluxo. 3. Diagnóstico diferencial. 4. Antígenos CD34. I. Lorand-Metze, Irene, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: A modified flow cytometric score system improves the differential diagnosis between reactive peripheral cytopenias and MDS

Palavras-chave em inglês:

Myelodysplastic syndromes

Flow cytometry

Differential diagnosis

Antigens, CD34

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze [Orientador]

Luiz Fernando Lopes

Mihoko Yamamoto

Erich Vinicius de Paula

Afonso Celso Vigorito

Data de defesa: 08-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

SUIELLEN CARVALHO REIS ALVES

ORIENTADORA: PROF. DR. IRENE GYONGYVER HEIDEMARIE LORAND METZE

MEMBROS:

1. PROF. DR. IRENE GYONGYVER HEIDEMARIE LORAND METZE

2. PROF. DR. LUIZ FERNANDO LOPES

3. PROF. DR. MIHOKO YAMAMOTO

4. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

5. PROF. DR. AFONSO CELSO VIGORITO

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08 de abril de 2014

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai José Reis e à minha mãe Irlei Reis
que sempre acreditaram em mim...*

*Ao meu marido Paulo César que sempre me
apoiou e incentivou neste sonho e em todas as
outras circunstâncias...*

*Aos meus filhos Rebecca e Lucca César que são
a maior herança da minha vida e motivação para
viver plenamente.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por ter me alcançado e me transformado, por ser fonte de toda sabedoria, amor, força e capacitação, obrigada Senhor Jesus!

Á Profa. Dra. Irene, por todo incentivo, dedicação, confiança, aprendizado e oportunidade. Todo este processo, desde o mestrado até a finalização do doutorado, foi para mim uma grande experiência com grande crescimento e amadurecimento profissional. Toda a minha gratidão por toda a sua dedicação compreensão e muita paciência. Que o Senhor Jesus continue te abençoando e derramando graça sobre graça em sua vida.

Á Dra Fabiola, pela dedicação com que selecionou os pacientes que fizeram parte desse estudo, pela amizade e carinho que sempre me tratou.

Á Fernanda, minha querida amiga que esteve junto comigo nesta batalha do doutorado desde o início, nas aulas da pós e na defesa. Obrigada pela sua amizade, incentivo, conselhos e participação direta no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Criopreservação e Marcadores Celulares, Felipe, Mariana, Alini, Lílian, Letícia, Fernanda, Rosangela e Raquel, por toda amizade, carinho, momentos especiais, ajuda, compreensão e experiências compartilhadas, tanto pessoais como profissionais, vocês moram em meu coração.

Á Eliana Miranda, por todo carinho, amizade, incentivo e ensinamento em estatística.

Aos amigos do Banco de Sangue de Cordão, por toda amizade e carinho que sempre me trataram.

Á Mônica e sua equipe do Laboratório de Hematologia, pela amizade e carinho. Pela dedicação, competência e excelência com que preparam os mielogramas e outros exames, que auxiliam no diagnóstico dos pacientes.

Aos médicos e residentes da Hematologia, que fizeram as punções das medulas, analisarem os mielogramas e acompanharam esses pacientes.

Dr. Afonso, por todo apoio, incentivo e confiança.

Á secretária Nicete, por toda sua competência, ajuda e disposição.

Á Adriana e ao Bruno, secretários da pós graduação da clínica médica, pela atenção e orientações no decorrer do desenvolvimento desta tese.

A todos os meus amigos do Hemocentro, pelos bons momentos compartilhados, conselhos e incentivo.

Ao Hemocentro, pela oportunidade e incentivo ao meu desenvolvimento profissional.

Aos meus pais, por ser uma fonte inesgotável de muito amor e sempre acreditarem em mim. Obrigada pelos exemplos de perseverança e dedicação que trilharam um caminho que me permitiu chegar até aqui, Obrigada por toda credibilidade, apoio, amor... enfim, obrigada por tudo, eu amo vocês!!

Aos meus irmãos, Pollyanna, Ricardo, Adriano, Leandro, Igor e Yasmim, por todo amor e carinho. Obrigada por sempre me incentivarem. Amo vocês!

Aos meus amados amigos de fé, por serem parte essencial da minha vida aqui em Campinas, no meu relacionamento com vocês eu posso vê o amor de Cristo e assim o cuidado do Deus para com a minha vida e da minha família.

Ao meu amado marido Paulo César, por ser um dos maiores presentes de Deus na minha vida e incentivador de todos os meus sonhos. Meu amor, meu amigo, meu companheiro, meu conselheiro. Obrigada pelos seus cuidados e dedicação com a nossa família, por sua muita paciência e amor. Eu amo você e empenho a minha honra para cuidar dos sonhos de Deus em nossas vidas.

A todos os meus familiares, pela confiança, incentivo e amor.

Ao CNPq/INCTs, CNPq, FAPESP, FAEPEX e MDS Foundation pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

“Não que eu o tenha já recebido ou tenha já obtido a perfeição; mas prossigo para conquistar aquilo para o que também fui conquistado por Cristo Jesus. Irmãos, quanto a mim, não julgo havê-lo alcançado; mas uma coisa faço: esquecendo-me das coisas que para trás ficam e avançando para as que diante de mim estão, prossigo para o alvo, para o prêmio da soberana vocação de Deus em Cristo Jesus. ”

FL. 3:12-1420 RA.

RESUMO

A imunofenotipagem é reconhecida como uma importante ferramenta para o diagnóstico das síndromes mielodisplásicas (SMD). O sistema de pontuação por citometria de fluxo descrito recentemente (FCSS) é útil para o diagnóstico diferencial, bem como para o prognóstico de SMD. Avaliamos se a inclusão de valores quantitativos de expressões anormais em células CD34⁺ e monócitos nesta pontuação poderia melhorar o seu valor diagnóstico. O FCSS modificado (FCSS -R) abrange 9 alterações granulocíticas, 8 monocíticas e 6 de células CD34⁺. A análise imunofenotípica foi realizada em células de medula óssea (MO) de 56 pacientes com SMD (76% com blastos na medula óssea <5%), 33 casos de citopenias reacionais e 41 doadores de medula óssea saudáveis de transplante alogênico (controles normais). As duas pontuações foram aplicadas em todos os casos.

Embora tenhamos encontrado o desvio à esquerda assíncrono na maturação dos granulócitos, a diminuição das hematogônias e o aumento de monócitos CD16⁺, bem como casos isolados de co-expressões anormais no amadurecimento de precursores mielomonocíticos em citopenias reacionais, alterações qualitativas e quantitativas nos sub tipos de células mielóides CD34⁺ foram mais específicas de SMD. Ambas as pontuações permitiram discriminar SMD de citopenias reacionais, mas, de acordo com a área sob a curva ROC, o FCSS -R foi mais sensível (53% para FCSS e 94% para FCSS -R). Ambas as pontuações apresentaram especificidade de 100%.

A inclusão de valores quantitativos de expressões anormais nas células CD34⁺ e monócitos em FCSS melhorou a sensibilidade de FCSS-R para o diagnóstico diferencial entre SMD e citopenias periféricas reacionais.

Palavras-chave: SMD, citometria de fluxo, pontuação por citometria de fluxo, diagnóstico diferencial, células CD34⁺

ABSTRACT

Immunophenotyping has been recognized as an important tool for diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS). The recently described flow cytometry scoring system (FCSS) is useful for the differential diagnosis as well as prognosis of MDS. We examined if the inclusion of quantitative values of abnormal expressions in CD34⁺ cells and monocytes in this score could improve its diagnostic value. The modified FCSS (FCSS-R) covers 9 granulocytic, 8 monocytic and 6 CD34⁺ cell abnormalities. Immunophenotypic analyzes were performed on bone marrow (BM) cells of 56 patients with MDS (76% with bone marrow blasts <5%), 33 cases of reactive cytopenias and 41 healthy bone marrow donors for allogeneic BM transplantation (normal controls). The two scores were applied in all cases.

Although asynchronous shift to the left in the maturing granulocytes, decrease in hematogones and increase in CD16⁺ monocytes as well as isolated cases of abnormal co-expressions in maturing myelomonocytic precursors could be found in reactive PB cytopenias, the most important differences with MDS were seen in the subsets of myeloid CD34⁺ cells. Both scores allowed to discriminate MDS from reactive cytopenias, but, according to the area under the ROC curve FCSS-R was more sensitive (53% for FCSS and 94% for FCSS-R). Both scores had a specificity of 100%.

The inclusion of quantitative values of abnormal expressions in CD34⁺ cells and monocytes in FCSS improved the sensibility of FCSS for the differential diagnosis between MDS and reactive peripheral cytopenias.

Key words: MDS, flow cytometry, flow cytometric scoring, differential diagnosis, CD34⁺ cells

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
APC	Aloficocianina
AR	Anemia Refratária
AREB	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
AREB-1	Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1
AREB-2	Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2
AREB-T	Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação
ARSA	Anemia Refratária com Sideroblasto em Anel
BD	Becton Dickinson
BM	Bone Marrow
CD	Cluster Defferentiation
CRDM	Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem
CRDMSA	Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem com Sideroblasto em Anel
CRDU	Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem
CF	Citometria de Fluxo
DP	Desvio- padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELN	European LeukemiaNet
Fem	Feminino
FAB	French-American-British
FCM	Flow Cytometry
FCSS	Flow Cytometry System Score
FCSS-R	Flow Cytometry System Score Revised
FITC	Isitiocianato de Fluoresceína
FPS	FCM progress scoring
Hb	Hemoglobina
IS	Immunophenotypic score
IMF	Índice Médio de Fluorescência
IPSS	Intenational Prognostic Sistem of Score
IPSS-R	Intenational Prognostic Sistem of Score Revised
LAIPs	Leukemia-Associated Immunophenotypes

LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
Masc	Masculino
Max	Máximo
MDS	Myelodysplastic Syndromes
mL	Mililitro
Min	Mínimo
MO	Medula Óssea
NR	Neutropenia Refratária
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Peripheral Blood
PBS	Tampão Fosfato
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Piridina de Clorofila
ROC	Receiver Operating Characteristic
RPM	Rotações por minuto
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SP	Sangue Periférico
SSC	Side Scatter
SSCint	Side Scatter intermediário
TA	Temperatura ambiente
TM	TradeMark
TR	Trombocitopenia Refratária
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
USA	Estados Unidos da América
WHO	World Health Organization
WPSS	<i>WHO-classification based Prognostic Scoring System</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Separação das populações.....	39
Figura 2: Detecção de anormalidades na maturação de granulócitos	40
Figura 3: A detecção de anormalidades em monócitos	41
Figura 4: Subpopulações CD34 ⁺ em casos normais, reacionais e SMD.	42
Figura 5: Co-expressões anômalas de CD7 e CD56 em células CD34 ⁺ em casos normais, reacionais e SMD	43
Figura 6: Caracterização de hematogonias em casos normais, reacionais e SMD.....	43
Figura 7: Distribuição dos casos de acordo com ambas as pontuações.	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Classificação FAB	20
Tabela 2: Classificação OMS 2008	21
Tabela 3: Critérios diagnósticos mínimos em SMD	23
Tabela 4: Classificação IPSS das SMD	27
Tabela 5: Novo sistema de pontuação citogenética em SMD	28
Tabela 6: Classificação IPSS-R das SMD	28
Tabela 7: WPSS revisado incluindo o grau de anemia.....	29
Tabela 8: Painel de quatro cores de anticorpos monoclonais para SMD.....	37
Tabela 9: Anticorpos monoclonais usados.....	38
Tabela 10: Definição do FCSS.....	45
Tabela 11: Definição do sistema de pontuação por citometria fluxo modificado.....	47
Tabela 12: Características clínicas e hematológicas das SMD.	50
Tabela 13: Características hematológicas das citopenias reacionais.....	51
Tabela 14: Padronização do perfil imunofenotípico normal.	52
Tabela 15: Frequência das alterações imunofenotípicas na série granulocítica.....	53
Tabela 16: Frequência das alterações imunofenotípicas na série monocítica.....	54
Tabela 17: Frequência das alterações imunofenotípicas nas células CD34 ⁺	55
Tabela 18: Comparações dos dados imunofenotípicos entre as citopenias reacionais e as SMD.	56
Tabela 19: Área sob a curva ROC para discriminar as citopenias reacionais e as SMD. .	57
Tabela 20: Distribuição das categorias de risco imunofenotípico pelo FCSS-R e FCSS .	59

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	19
Classificação.....	20
Critérios diagnósticos mínimos	22
O diagnóstico de SMD como diagnóstico de exclusão	23
Citometria de Fluxo nas SMD	24
Avaliação prognóstica nas SMD	27
Linha de Pesquisa	30
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	33
4. SUJEITOS E MÉTODOS	35
Casuística	35
Critérios mínimos de inclusão de casos com SMD	35
Critérios de exclusão do diagnóstico de SMD	35
Materiais e Reagentes	36
Imunofenotipagem	37
Análise Imunofenotípica	38
Padronização dos valores normais de referência	44
FCSS	44
Sistema de Pontuação por citometria de fluxo modificado (FCSS-R).....	45
Análise Estatística	48
5. RESULTADOS.....	50
Características Clínicas das SMD	50
Características Clínicas dos casos com citopenias reacionais	51
Análise por citometria de Fluxo.....	51
FCSS-R x FCSS	57
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9. ANEXOS.....	78

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) constituem um amplo espectro de desordens hematopoéticas clonais com curso clínico variável, caracterizadas por citopenias no sangue periférico, com medula óssea celular e atípicas dos progenitores, implicando em uma evolução para insuficiência medular e uma tendência à transformação leucêmica (1-4). As citopenias são causadas por uma resposta inadequada dos progenitores da medula óssea aos fatores de crescimento, apoptose excessiva dos elementos imaturos resultando em hematopoese ineficiente (1, 2, 4-6).

Estas desordens acometem predominantemente os pacientes idosos, e sua incidência aumentou nas últimas décadas, sobretudo em indivíduos com idade média de 65-70 anos, devido ao aumento populacional deste grupo (7-9). Alterações no microambiente medular causadas pelo envelhecimento favorecem o surgimento de clones anormais e consequentemente o desenvolvimento de mielodisplasias (8, 10, 11).

As SMDs apresentam alterações na diferenciação dos progenitores de uma ou mais linhagens. O acúmulo de defeitos na célula progenitora impede a hematopoese normal. Após os danos iniciais às células progenitoras, várias alterações adicionais acabam por favorecer sua vantagem proliferativa. (12-14).

Tais danos estão frequentemente relacionados com a incapacidade dos progenitores neoplásicos de se diferenciar em células maduras e com a supressão dos progenitores residuais normais pelo clone neoplásico. Há evidências de que citocinas inibitórias tenham participação na fisiopatologia da hematopoese ineficaz. Postula-se que as células do clone anormal interagem com as células do estroma medular e células do sistema imunológico, levando à produção exacerbada de $TNF\alpha$, $TGF\beta$, $IL-1\beta$, causando inflamação da medula óssea. Com esta elevada produção de citocinas há prejuízos fatais às células normais e o clone anormal prolifera (8, 10, 15, 16).

Classificação

A classificação inicial das SMD foi realizada pelo grupo French-American-British (FAB) que propuseram critérios diagnósticos para seu reconhecimento (1, 17). A classificação foi descrita em 1982 e revisada em 1985, sendo utilizada como guia para melhor compreensão desse grupo heterogêneo de desordens. Esta classificação inclui cinco subgrupos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), anemia refratária com excesso de blastos (AREB) e anemia refratária com excesso de blasto em transformação (AREB-T) (tabela 1). Estas duas últimas desordens são consideradas de alto risco e têm maior probabilidade de evoluir para leucemia mielóide aguda (1, 17).

Tabela 1: Classificação FAB

Tipo	Sangue Periférico	Medula óssea
Anemia refratária (AR)	Blastos $\leq 1\%$	Blastos $\leq 5\%$
Anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA)	Blastos $\leq 1\%$	Blastos $\leq 5\%$ Sideroblasto em anel $> 15\%$
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	Blastos $< 5\%$	Blastos $> 5\%$ e $< 20\%$
Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)	Blastos $< 5\%$ Monócitos $> 1000/\text{mm}^3$	Blastos $< 20\%$
Anemia refratária com excesso de blasto em transformação (AREB-T)	Blastos $\geq 5\%$	Blastos entre $> 20\%$ e $< 30\%$ ou com bastonete de Auer

Em 2002, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma nova classificação das SMD, com modificações significativas nos diversos subgrupos FAB (18). Em 2008, os critérios diagnósticos da OMS foram revisados (tabela 2) (2, 17).

Avanços importantes nesta nova classificação foram evidenciados com o reconhecimento da necessidade de se padronizar o diagnóstico e classificação das SMD. Estabeleceu-se requisitos mínimos, critérios diagnósticos, critérios

adicionais, como achados de citometria de fluxo, citogenética e de marcadores moleculares (6, 12, 17).

Tabela 2: Classificação OMS 2008

Tipo	Sangue Periférico	Medula óssea
Citopenia refratária com displasia de única linhagem (CRDU) : AR; NR e TR	Unicitopenia; bicitopenia, blastos <1%	Displasia de uma única linhagem, <5% de blastos, < 15% sideroblasto em anel
Anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA)	Anemias, Ausências de blastos	Displasia apenas na linhagem eritroblástica, <5% de blastos, ≥15% de sideroblasto em anel
Citopenia refratária com displasias multilinhagem (CRDM)	Bi ou pancitopenia, blastos <1% sem bastonete de Auer, monócitos < 1000 /mm ³	Displasias em ≥10% das células de duas ou mais linhagens, <5% de blastos sem bastonete de Auer, ± 15% sideroblasto em anel
Anemia refratária com excesso de blastos – 1 (AREB-1)	Bi ou pancitopenia, <5% blastos sem bastonete de Auer, monócitos < 1000 /mm ³	Displasia uni ou multilinhagem, 5%-9% de blastos sem bastonete de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos – 2 (AREB-2)	Bi ou pancitopenia, 5%-19% blastos ± bastonete de Auer, Monócitos < 1000/mm ³	Displasia uni ou multilinhagem, 10%-19% de blastos ± bastonete de Auer
SMD associado com del(5q) isolada	Anemia, plaquetas normais ou elevadas < 1% blastos	Megacariócitos em números normais e elevados com núcleos hipolobulados, <5% blastos, sem bastonete de Auer 5q- isolado
Síndromes Mielodisplásicas inclassificáveis • Não se encaixam em outra categoria • Incluem: CRDU ou CRDM, porém com 1% de blastos persistentes no sangue periférico; Pancitopenia com displasia de uma única linhagem; Citopenias persistentes com <1% de blastos no sangue periférico e <5% de blastos na medula óssea, inequívoca displasia em <10% de blastos e anormalidades citogenéticas inequívocas.		

Crêterios diagnósticos mínimos

O diagnóstico de SMD na maioria dos pacientes   baseado nos cr terios OMS. Contudo, em muitos casos com citopenias periféricas de causa obscura pode ser difícil estabelecer ou excluir o diagnóstico de SMD. Esses casos incluem: pacientes sem anormalidades citogenéticas e somente com uma citopenia, pacientes com cariótipo t pico e citopenias com discreta ou nenhuma displasia e pacientes com anemia macrocítica com dependência transfusional sem anormalidades cariotípicas e sem evidência de displasia (6, 12, 13)

Em 2007(6) foram propostos cr terios mínimos de diagnóstico suficientes para definir o diagnóstico de SMD nas situações relatadas acima. Estes cr terios mínimos são definidos pela introdu   o de dois pré-requisitos que obrigatoriamente devem ser contemplados, tr s cr terios decisivos nos quais pelo menos um deve ser cumprido para atender a condi   o de SMD e vários cr terios adicionais que podem auxiliar na defini   o diagnóstica (tabela 3).

A citometria de fluxo   proposta como uma ferramenta extremamente útil no aperfeiçoamento diagnóstico, pois permite refinar e/ou distinguir uma SMD precoce de uma citopenia reacional devido a sua habilidade de quantificar os blastos de forma precisa, analisar as anormalidades desta popula   o blástica e distinguir anormalidades imunofenotípicas da maturac  o mielomonocítica (6, 12, 13).

Tabela 3: Critérios diagnósticos mínimos em SMD

(A) Critérios pré- requisitos

Citopenia estável em 1 ou mais linhagens: eritróide, neutrofílica ou megacariocítica

Exclusão de todas as outras desordens hematológicas e não hematológicas com reações primárias para citopenias/displasia

(B) Critérios decisivos relacionados com SMD

Displasia em pelo menos 10% de todas as células em uma das seguintes linhagens em esfregaço de MO: eritróide, neutrofílica ou megacariocítica, ou > 15% de sideroblasto em anel

5-19% de blastos no esfregaço de MO

Anormalidades cromossômicas típicas

(C) Critérios adicionais

Anormalidades fenotípicas identificadas por citometria de fluxo.

Marcadores moleculares de uma população monoclonal, perfil genético ou análise de uma mutação pontual.

Acentuada e persistente redução de formação de colônias de células de medula óssea e/ou de células progenitoras circulantes.

O diagnóstico de SMD como diagnóstico de exclusão

No momento do diagnóstico, é possível que o diagnóstico de SMD seja um desafio principalmente quando não há alteração citogenética ou molecular, e a citologia apresenta uma baixa porcentagem de blastos. Em contrapartida, numerosas doenças reacionais podem mimetizar uma SMD por causa da presença de citopenias periféricas e atipias medulares, especialmente nos eritroblastos (2, 4, 6, 19-21).

Casos como anemia carencial, desnutrição grave, medicamentos ou agentes mielotóxicos, insuficiência hepática e/ou renal, hipotireoidismo, infecção viral, especialmente hepatite e HIV, doenças auto-imunes principalmente lúpus

eritematoso sistêmico e doença de Still, são condições que apresentam citopenias periféricas e medula óssea com atipias e devem ser excluídas. Nisto é extremamente importante realizar uma ampla investigação para excluir o diagnóstico de citopenias reacionais (2, 4, 6, 19-21).

As citopenias idiopáticas de significado indeterminado (ICUS), são situações em que o paciente apresenta citopenia constante (≥ 6 meses) em uma ou mais linhagem mielóide, que não atente os critérios decisivos de uma SMD e não pode ser explicado por qualquer outra desordem hematológica ou não-hematológica (2, 4, 6, 19-21).

Muitas vezes o tipo de citopenia pode indicar uma potencial SMD ou uma pré-fase. Esses pacientes devem ser cuidadosamente monitorados e uma investigação sequencial é recomendada para confirmar ou excluir o diagnóstico de SMD (2, 4, 6, 19-21).

Citometria de Fluxo nas SMD

Na última década, a análise multiparamétrica por citometria de fluxo dos precursores hematopoéticos da medula óssea (MO) foi amplamente estudada nas SMDs, está atualmente padronizada e é factível em todos pacientes (13, 14, 22-31).

A imunofenotipagem de precursores hematopoéticos da MO, especialmente da série mielomonocítica e de células progenitoras CD34⁺ é reconhecida como uma técnica auxiliar diagnóstica valiosa para confirmar o diagnóstico de SMD, e para o diagnóstico diferencial com citopenias reacionais. (6, 12-14, 23-25, 32-39).

Já é bem conhecido que na maturação das linhagens hematopoéticas a sequência da expressão dos vários antígenos é geneticamente bem controlada. Um processo clonal é caracterizado por anormalidades nesta sequência da expressão dos antígenos quando comparado com a expressão normal, bem como quando ocorre deficiência ou aumento da expressão destes antígenos. (13, 14, 22-29, 36, 40)

A regulação da expressão de antígenos está distorcida em vários graus nas SMDs de modo que, à medida que a doença se desenvolve há uma progressiva perda da regulação da expressão dos antígenos (6, 12-14, 23, 24, 33-36, 40). É difícil diferenciar de co-expressões assíncronas, devido a um desvio à esquerda, ou um aumento de progenitores numa medula estimulada. Sabemos que nenhuma anormalidade de expressão antigênica é evidência de displasia, nem é específica para SMD, mas a presença de múltiplas aberrações apoia fortemente este diagnóstico (6, 12-14, 23, 24, 33-36, 40).

Vários tipos de anormalidades fenotípicas já foram descritas nas SMDs tais como a hipogranularidade dos precursores granulocíticos (diminuição do SSC), perda da expressão de antígeno em pelo menos 10% da população de interesse, assincronismo ou bloqueio de maturação, expressão aberrante de antígenos, anormalidades quantitativas e qualitativas nas células CD34⁺, juntamente com a diminuição de células precursoras B (12, 14, 23-28, 30, 33-38, 40-42). Muitas anormalidades fenotípicas encontradas nas células CD34⁺ foram associadas com a progressão da doença e são capazes de predizer a sobrevida global dos pacientes. (5, 25, 27, 30, 31, 39, 43-46).

De acordo com a padronização do *European Leukemia Net Working Group* (ELN) standardization (13, 30), a imunofenotipagem de MO nas SMDs deve no mínimo focar nos precursores mielomonocíticos e precursores hematopoéticos. A enumeração de precursores de células B e análise da diferenciação eritróide também podem adicionar informações. Para este propósito, um painel mínimo deve ser desenhado para detectar todas estas anormalidades. Além disso, comparação com o padrão normal é importante.

Além da descrição das aberrações fenotípicas hematopoéticas, sistemas de pontuação (scores) destas anormalidades foram descritos para auxiliar o diagnóstico de SMD. Estes devem ser fáceis de realizar e reproduzíveis. (25, 33, 37, 40, 47, 48). Wells *et al* (37) descreveram um score (FCSS) baseado na análise da série mielomonocítica e na enumeração das células CD34⁺. Eles também demonstraram que o acúmulo de anormalidades tem valor prognóstico. Chu *et al* (25) validaram a utilidade clínica do FCSS incluindo a proporção e a co-

expressão antigênica nas células CD34⁺ para assessorar o diagnóstico de SMD. Eles também demonstraram a utilidade no diagnóstico diferencial e valor prognóstico do FCSS (25, 37).

Matarraz *et al* (40) desenvolveram um sistema de pontuação (IS) baseado na distribuição alterada e em um elevado número de variáveis do compartimento de maturação da MO. Eles mostraram que o número, o tipo e o grau de severidade das anormalidades encontradas fornecem informações sobre o grau de comprometimento genético. Este sistema de pontuação permitiu diferenciar SMD de MO reativas como de MO normais. As pontuações mais altas nas SMD foram associadas com pior prognóstico e representa um fator prognóstico independente para sobrevida global. Contudo, o elevado número de variáveis avaliadas neste sistema é muito complexo para uma aplicação em rotina laboratorial.

Ogata *et al* (33) desenharam um sistema de pontuação (FCM score) aplicável para o diagnóstico de SMD baseado nas características das células CD34⁺. Este foi o primeiro estudo que mostrou a variedade de anormalidades nas células CD34⁺ em SMD de baixo risco e como estas anormalidades são úteis para o diagnóstico.

Baseando-se no padrão de expressão de CD19, CD38, CD117 e CD7 nas células CD34⁺, Xu *et al* (48) desenvolveram um sistema de pontuação progressivo (FPS) e mostraram sua utilidade para o diagnóstico diferencial nas SMD assim como para a evolução prognóstica. A elevada pontuação prevê a progressão da doença e a diminuição da sobrevida nas SMD.

Um estudo multicêntrico (47) também desenvolveu e validou um FCM-*score* para o diagnóstico baseado em quatro parâmetros reproduzíveis: número de mieloblastos CD34⁺ e de células precursoras B, expressão aberrante de CD45 e redução do SSC dos granulócitos.

O aumento do número e da expressão anômala de antígenos nas células CD34⁺, assim como o total de anormalidades fenotípicas nos precursores da MO mostraram ser fatores de risco independente para sobrevida dos pacientes (14, 22, 24, 25, 27, 29, 46).

Avaliação prognóstica nas SMD

O estudo das características clínicas que são capazes de prever a sobrevida e a progressão dos pacientes para leucemia mieloide aguda (LMA) é muito importante a fim de designar corretamente os pacientes para ensaios clínicos que testam novas abordagens terapêuticas (6, 7, 49-52). A gravidade das citopenias periféricas, a porcentagem de blastos medulares e o tipo de alterações citogenéticas são reconhecidos como fatores prognósticos independentes em SMDs e fazem parte dos sistemas de pontuação prognóstica usados atualmente como o *International Prognostic Scoring System* (IPSS) e o *WHO-classification based Prognostic Scoring System* (WPSS)

O IPSS (49) é um reconhecido pontuação clínica para avaliação de risco de pacientes com SMD, e é amplamente utilizado para estratificar os pacientes. Este sistema baseia-se em parâmetros prognósticos como: número de citopenias periféricas encontradas, porcentagem de blastos medulares e tipo de alterações citogenéticas (tabela 4).

Tabela 4: Classificação IPSS das SMD (49)

Variáveis prognósticas	Pontuação IPSS				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
% Blastos MO	<5%	5%-10%	-	11%-20%	21%-30%
Citogenética	Favorável	Intermediário	Desfavorável	-	-
Citopenias	0-1	2-3	-	-	-
Categoria de Risco		Pontuação IPSS		Sobrevida Global (anos)	
Baixo		0,0		5,7	
Intermediário I		0,5-1,0		3,5	
Intermediário II		1,5-2,0		1,2	
Alto		≥2,5		0,4	

Em 2012, achados citogenéticos foram reanalisados em um estudo multicêntrico internacional e sua importância para estratificação de risco foi revista (53). Recentemente o IPSS foi revisado (IPSS-R) (50), com base nos grupos citogenéticos revisados (tabela 5) (54) e na categorização mais detalhada dos valores das citopenias de sangue periférico e da porcentagem de blastos medulares. (tabela 6). Assim, uma proporção considerável de casos de risco intermediário pelo IPSS mudou para categoria de alto risco no IPSS-R (50).

Anormalidades citogenéticas são encontradas em 30% a 80% dos casos com SMD primária. Estas anormalidades são heterogêneas e algumas muito raras, impedindo a avaliação do seu real valor prognóstico (51).

Tabela 5: Novo sistema de pontuação citogenética em SMD (54).

Subgrupos prognósticos	Anormalidades citogenéticas
Muito bom	-Y, del(11q)
Bom	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), dupla incluindo del(5q)
Intermediário	del(7q),+8, +19, i(17q), qualquer outra alteração simples ou dupla independente do clone
Ruim	-7, inv (3)/t(3q)/del(3q), dupla incluindo -7/del(7q), complexo com 3 anormalidades
Muito ruim	Complexo com mais de 3 anormalidades

Tabela 6: Classificação IPSS-R das SMD (50).

Variáveis prognósticas	Pontuação IPSS-R						
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
% Blastos MO	≤2%	-	>2%-5%	-	>5%-10%	>10%	-
Citogenéticas	Muito bom	-	Bom	-	Intermediário	Ruim	Muito Ruim
Hemoglobina, g/dL	≥10%	-	8-10	<8	-	-	-
Plaquetas x10 ⁹ /L	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
Neutrófilosx10 ⁹ /L	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-
Categoria de Risco		Pontuação IPSS-R			Sobrevida global (anos)		
Muito baixo		≤1,5			8,8		
Baixo		>1,5-3			5,3		
Intermediário		>3- 4,5			3,0		
Alto		>4,5-6			1,6		
Muito alto		>6			0,8		

O WPSS foi definido e validado em pacientes não tratados (55). Este sistema considera as categorias da OMS, dependência transfusional e anormalidades cariotípicas, e é capaz de identificar cinco grupos de risco de pacientes com SMD com diferenças na sobrevida e no risco de progressão leucêmica.

Como a dependência transfusional é difícil de padronizar, este parâmetro foi substituído pelo nível de hemoglobina do paciente: <9g/dL para homens e <8 g/dL para mulheres (52). Esta pontuação é dinâmica e pode ser aplicada em qualquer ponto do curso da doença. (tabela 7)

Tabela 7: WPSS revisado incluindo o grau de anemia (52).

Variáveis	Pontuação das variáveis			
	0	1	2	3
Categoria OMS	ARSA, CRDU, SMD	CRDM	AREB-I	AREB-II
Cariótipo*	Bom	Intermediário	Ruim	-
Anemia Severa (Hb<9g/dL em homens e Hb<8g/dL em mulheres)	Ausente	Presente	-	-
Risco WPSS	Soma da pontuação das variáveis			
Muito baixo	0			
Baixo	1			
Intermediário	2			
Alto	3-4			
Muito Alto	5-6			

*Bom (normal, -Y, del (5q); Ruim (complexo, anormalidades no cromossomo 7); Intermediário: outras anormalidades cromossômicas

Por outro lado, várias mutações pontuais frequentes como TP53, EHZ2, ETV6, RUNX1 e ASXL1 são consideradas fatores prognósticos independentes quando comparadas com a idade, sexo e classificação IPSS (56, 57). Mutações TET2 foram frequentes em casos com cariótipo normal e aquelas de TP53 foram

associadas com anormalidades do cromossomo 17 ou com cariótipo complexo, mas mutações de EZH2 (localizadas no cromossomo 7) não foram associadas com a deleção do 7q. Assim, a presença de múltiplas mutações genéticas em SMD pode explicar a heterogeneidade clínica dessas desordens clonais e poderia aprimorar a previsão do prognóstico dos pacientes.

Linha de Pesquisa

Atualmente, não há um consenso internacional quanto ao melhor painel para a imunofenotipagem nas SMD e sim recomendações que geralmente incluem um grande número variáveis, o que abrange um amplo espectro de anticorpos monoclonais (MoAbs) e muitas das alterações imunofenóticas encontradas não têm importância prognóstica (12, 13, 30, 40) .

Em nossos estudos anteriores (24, 27), nós mostramos que com um pequeno painel de quatro cores de anticorpos monoclonais é possível detectar várias anormalidades fenotípicas na série mielomonocítica e nas células CD34⁺. Entre as alterações fenotípicas detectadas, aquelas de células CD34⁺ são mais importantes para prever a sobrevida global dos pacientes. Os resultados deste painel foram apresentados no 10th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (Patras, Grécia, 06-10/05/2009), recebendo um dos prêmios para jovem pesquisador.

Recentemente (46), comparamos o valor prognóstico do IPSS, IPSS-R e WPSS com dados obtidos pela citometria de fluxo e mostramos que as variáveis: porcentagem de células CD34⁺/CD13⁺ e o número total de alterações imunofenóticas detectadas foram fatores prognósticos independentes adicionais para as pontuações clínicas.

Em um dos nossos estudos piloto (58-60), os resultados da importância da avaliação seriada das análises imunofenóticas nas SMD, com o objetivo de estudar quais das alterações imunofenóticas estão relacionadas com a progressão da doença mostraram que se não há modificação no hemograma não há alteração na imunofenotipagem, mas nos casos em que há piora do

hemograma, o número de alterações imunofenotípicas aumenta. Mas somente o aumento das células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺, seja no diagnóstico ou na avaliação sequencial, prevê transformação para LMA. A inclusão de novos casos neste estudo é importante para confirmar nossos resultados.

Neste momento, priorizamos caracterizar os parâmetros citométricos que contribuem para o aprimoramento do diagnóstico diferencial entre as SMD e as citopenias reacionais, e que possuem valor prognóstico. Nisto nos propusemos a modificar o sistema de pontuação por citometria de fluxo proposto por Wells.

Justificativa e Objetivos

2. JUSTIFICATIVA

- Vários estudos indicam que a análise por citometria de fluxo (CF) pode contribuir significativamente para o diagnóstico diferencial e prognóstico das SMD. É necessário que cada laboratório de rotina diagnóstica estabeleça o seu padrão normal para o painel usado, e analise as alterações encontradas compare o grau de anormalidade dos achados de cada caso com o observado na medula normal. Nenhum dos achados citométricos, por si só, é específico para o diagnóstico de SMD. Seria desejável ter uma pontuação de achados citométricos que, ao mesmo tempo fosse útil para o diagnóstico diferencial de citopenias periféricas reacionais de uma SMD com cariótipo normal, mas que também tivesse significado prognóstico.

3. OBJETIVOS

- Examinar se as variáveis detectadas pelo nosso painel diagnóstico são capazes de discriminar entre citopenias periféricas reacionais e SMD, especialmente em casos com poucos blastos e cariótipo normal.
- Examinar se a inclusão de anormalidades específicas de células CD34⁺ e alterações quantitativas de monócitos ao FCSS (25, 37) poderia aumentar a sensibilidade e a especificidade desta pontuação.

Sujeitos e Métodos

4. SUJEITOS E MÉTODOS

Casuística

Desde 2009, a imunofenotipagem foi incluída na rotina diagnóstica de citopenias periférica em nosso laboratório. Amostras de medula óssea de pacientes com citopenias periférica, atendidos pelo Serviço de Hematologia – Hemocentro – UNICAMP foram examinadas e comparadas com medula normal obtidas de doadores para transplante alogênico de medula óssea.

O diagnóstico de SMD foi feito a partir do hemograma, mielograma (esfregaço citológico de medula óssea corado com May-Grünwald Giemsa e corados com Perls) e cariótipo de cada caso.

Para as análises imunofenotípicas foi coletado 1 ml da amostra de MO após a coleta do mielograma.

Critérios mínimos de inclusão de casos com SMD (4, 6):

- ✓ Presença de citopenias no sangue periférico por mais de 6 meses
- ✓ Citologia de medula óssea com atipias (10% das células) em pelo menos duas linhagens hematopoiéticas;
- ✓ Presença de alterações citogenéticas clonais.

Critérios de exclusão do diagnóstico de SMD

- ✓ Anemias carências,
- ✓ Infecção viral,
- ✓ Hipotireoidismo,
- ✓ Doenças auto-imunes,
- ✓ Outras neoplasias hematológicas e não hematológicas
- ✓ Citopenias associadas ao abuso de álcool, medicamentos, quimioterapia recente,
- ✓ Hemoglobinúria paroxística noturna,
- ✓ Alteração da função renal.

Durante o período do estudo, foram confirmados 56 casos de SMD, 33 casos de citopenias reacionais e 25 casos foram excluídos por falta de dados clínicos completos, incerteza diagnóstica ou impossibilidade de confirmar o diagnóstico final.

A classificação das SMD foi feita pelos critérios da OMS, IPSS, IPSS-R (50) e o WPSS foi aplicado com os valores de hemoglobina em vez da "dependência transfusional" (52).

Amostras da MO normal foram obtidas a partir de 41 doadores saudáveis de transplante de medula óssea alogênico para padronizar um perfil imunofenotípico normal em nosso laboratório.

Todas as amostras de MO foram obtidos após o consentimento informado que foi aplicado em cada pessoa, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética local (proc. n.º. 0627.0.146.000-09).

A análise citogenética da MO foi realizada depois de 24 horas de cultura de acordo com o método padrão. Em cada caso, pelo menos 20 mitoses foram analisadas e os cariótipos foram notificados de acordo com o Sistema de Nomenclatura Internacional de Citogenética Humana (50, 54)

Materiais e Reagentes

- ✓ Anticorpos monoclonais;
- ✓ Meio RPMI 1640;
- ✓ Solução lisante *FacsLysing* da Becton Dickinson (BD) 10x concentrada;
- ✓ Tampão fosfato (PBS) com 2% de soro fetal bovino e 0,1% de azida sódica, com pH:7,4;
- ✓ Tubos de polietileno BD
- ✓ Tubos de Falcon de 15ml

Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi realizada como descrito previamente (24, 27). Em resumo, amostras de MO coletadas com anticoagulante EDTA foram processadas na concentração de $5-7 \times 10^6$ células/ml em 100µL por teste, utilizando a técnica padronizada “lisa e lava” dentro de 24 horas após a aspiração da medula óssea (13).

A expressão antigênica foi estudada com a utilização de anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila de peridina (PerCP) e alofococianina (APC). A seguinte combinação de anticorpos monoclonais foi utilizada para estudar a maturação mielomonocítica e populações de células progenitoras (tabela 8):

Tabela 8: Painel de quatro cores de anticorpos monoclonais para SMD

Combinações de anticorpos monoclonais
HLA-DR FITC/CD14 PE/CD45 PerCP/CD33APC
CD16 FITC/CD11b PE/CD45 PerCP/CD13APC
CD13FITC/CD34 PE/CD45 PerCP/CD117APC
CD10FITC/CD19 PE/CD45 PerCP/CD34APC
CD7FITC/CD56 PE/CD45 PerCP/CD34APC

A especificidade e a fonte de todos os reagentes estão descritos em detalhe na tabela 9.

Imediatamente após a incubação, as amostras foram adquiridas no citômetro fluxo FACS Calibur™ (Becton Dickinson - BD Biosciences), pelo programa CellQuest (BD Biosciences). O controle de qualidade, a calibração com o programa FacsComp™ (BD) e a compensação foram realizados diariamente. Foram adquiridas pelo menos 100.000 células nucleadas de cada amostra. A análise dos dados foi realizada no programa Infinicyt (EuroFlow).

Tabela 9: Anticorpos monoclonais usados

Anticorpos monoclonais	Fluorocromos	Clones	Origem	Fabricantes
CD7	FITC	M-T701	Pharmingen	San Diego, CA
CD10	FITC	LT10	Exbio	Czech Republic
CD13	FITC	WM-47	Dako	Glostrup, Denmark
CD13	APC	WM15	Pharmingen	San Diego, CA
CD14	PE	RMO52	Beckman Coulter	Marseille, France
CD16	FITC	3G8	Pharmingen	San Diego, CA
CD19	PE	HIB19	Pharmingen	San Diego, CA
CD33	APC	WM53	Pharmingen	San Diego, CA
CD34	PE	8G12	Becton Dickinson	San Jose, CA
CD34	APC	8G12	Becton Dickinson	San Jose, CA
CD45	PerCP	2D1	Becton Dickinson	San Jose, CA
CD56	PE	MEM-188	Caltag	Burlingame, CA
CD117	APC	YB5.B8	Pharmingen	San Diego, CA
HLA-DR	FITC	AB3	Dako	Glostrup, Denmark

Análise Imunofenotípica

A análise de séries mielomonocíticas foi realizada como descrito anteriormente (27) de acordo com a ELN (30). Resumidamente, as populações que compõem a medula óssea foram identificadas no “dot plot” CD45/SSC baseando-se na intensidade do marcador pan-leucocitário CD45 (figura 1).

O padrão de maturação dos neutrófilos foi analisado pela expressão de CD13, CD16, CD11b, CD33 e HLA-DR (figura 2). A dispersão lateral (SSC) da população granulocítica e as expressões de antígenos foram consideradas anormais se estivessem acima ou abaixo dos valores de referência obtidos para os casos normais.

Os monócitos foram analisados pela expressão de HLA-DR, CD64 e CD14 (figura 3). A combinação CD16/CD11b/CD45/CD13 foi usada para quantificar os monócitos CD16⁺.

Sujeitos e Métodos

A expressão aberrante de CD34, CD7, CD56 e CD19 foi investigada em cada população considerando pelo menos 10% de co-expressão.

Células CD34⁺ foram separadas no *dot plot* SSC/CD34 (24, 27) e suas co-expressões de CD19, CD10, CD13, CD117, CD7 e CD56 foram avaliadas (figura 4 e 5). Os precursores de células-B (CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺) foram quantificados com a percentagem total de células nucleadas (figura 6).

Todas as características imunofenotípicas foram comparadas com os valores encontrados na MO normal. Computamos o número total de anormalidades na série granulócítica e monocítica, bem como aqueles das células CD34⁺. Assim somamos todas as alterações imunofenotípicas encontradas.

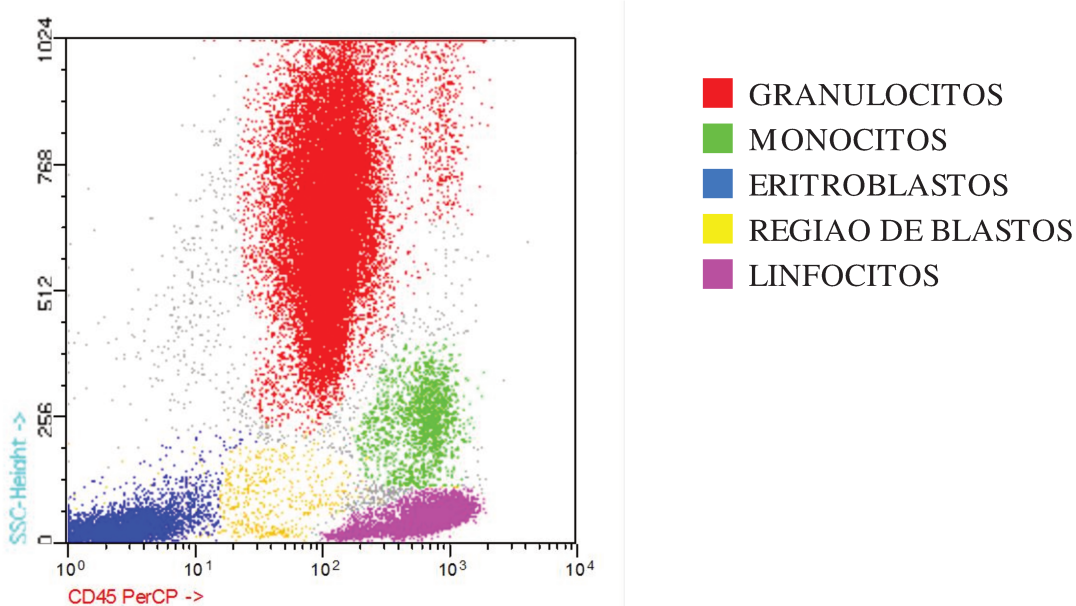


Figura 1: Separação das populações. Os granulócitos (vermelho) são CD45 positivos e possuem o SSC alto. Os monócitos (verde) têm expressão forte de CD45 e SSC intermediário. Os eritroblastos (azul) são CD45 negativos e têm SSC baixo. A região de blastos (amarelo) é identificada por uma expressão intermediária de CD45 e um SSC intermediário a baixo. Os linfócitos (violeta) caracterizam-se pela expressão forte de CD45 e pelo SSC baixo.

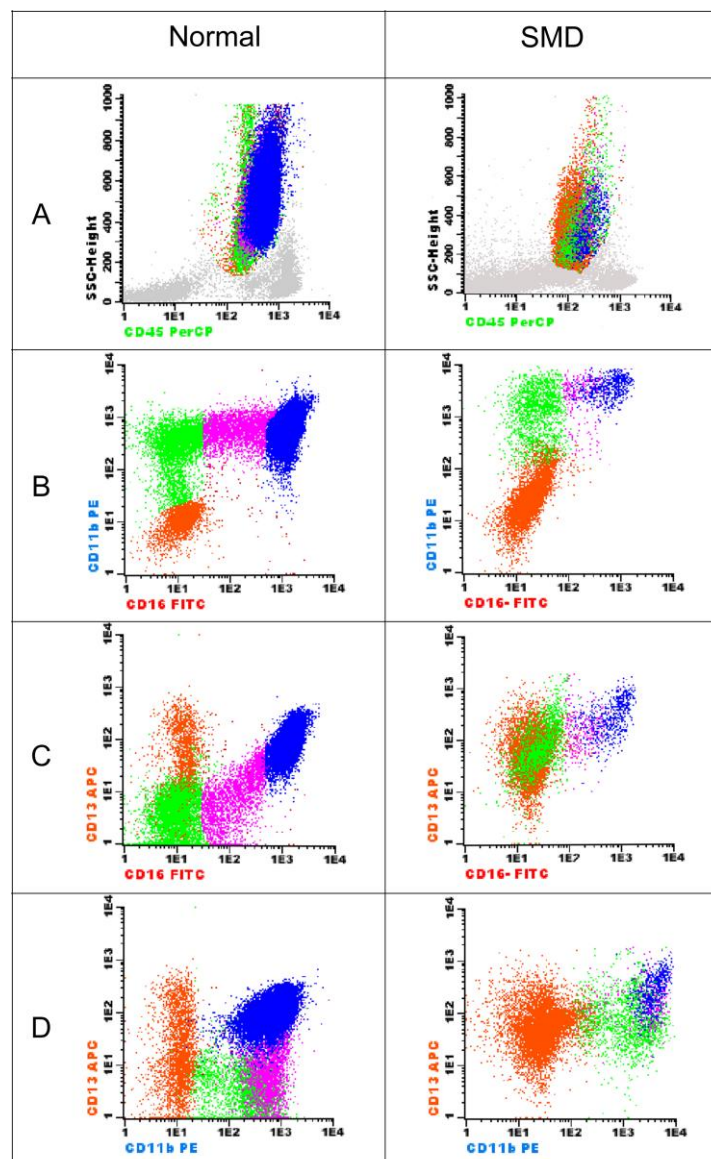


Figura 2: Detecção de anormalidades na maturação de granulócitos pela combinação CD16/CD11b/CD45/CD13: temos uma MO normal, à esquerda, e um caso de CRDM à direita. A população de granulócitos foi selecionada no plot SSC/CD45 (A). Os quatro estágios de diferenciação são distinguíveis com base na expressão de CD11b, CD16 e CD13 (B-D: laranja: promielócitos; verdes: mielócitos; roxo: metamielócitos e azuis: neutrófilos maduros). A maturação granulocítica apresenta uma diminuição da granularidade anormal demonstrada por um SSC baixo no caso de CRDM (A). Assim como um aumento da população com o fenótipo CD11b^{baixo}/CD13^{baixo}/CD16⁻ (promielócitos) com um intervalo de maturação entre eles e os mielócitos. Além da alta expressão de CD13 em mielócitos e metamielócitos (C e D)

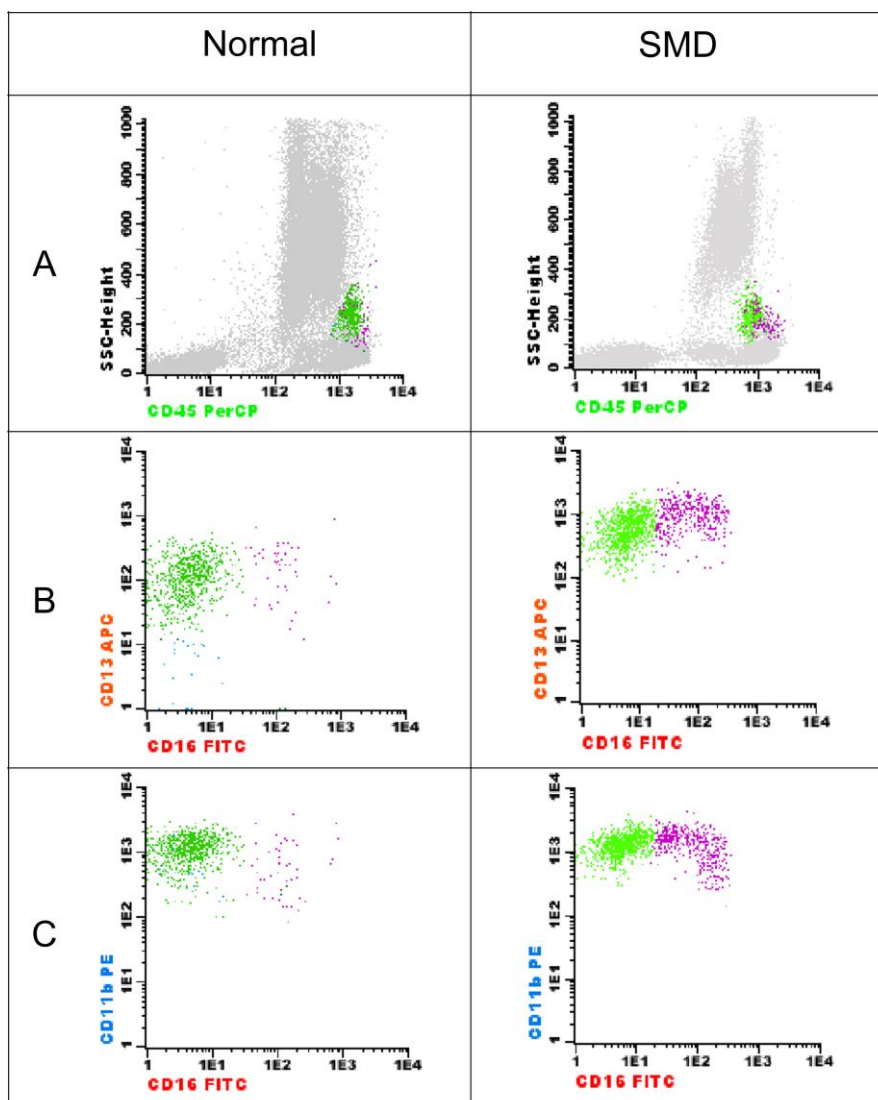


Figura 3. Estratégia de detecção de anormalidades em monócitos na combinação CD16/CD11b/CD45/CD13. Esquerda: MO normal. Direita: um caso de CRDM (monócitos = 2,4%). Aquisição contínua anormal de CD16 em monócitos maduros (B).

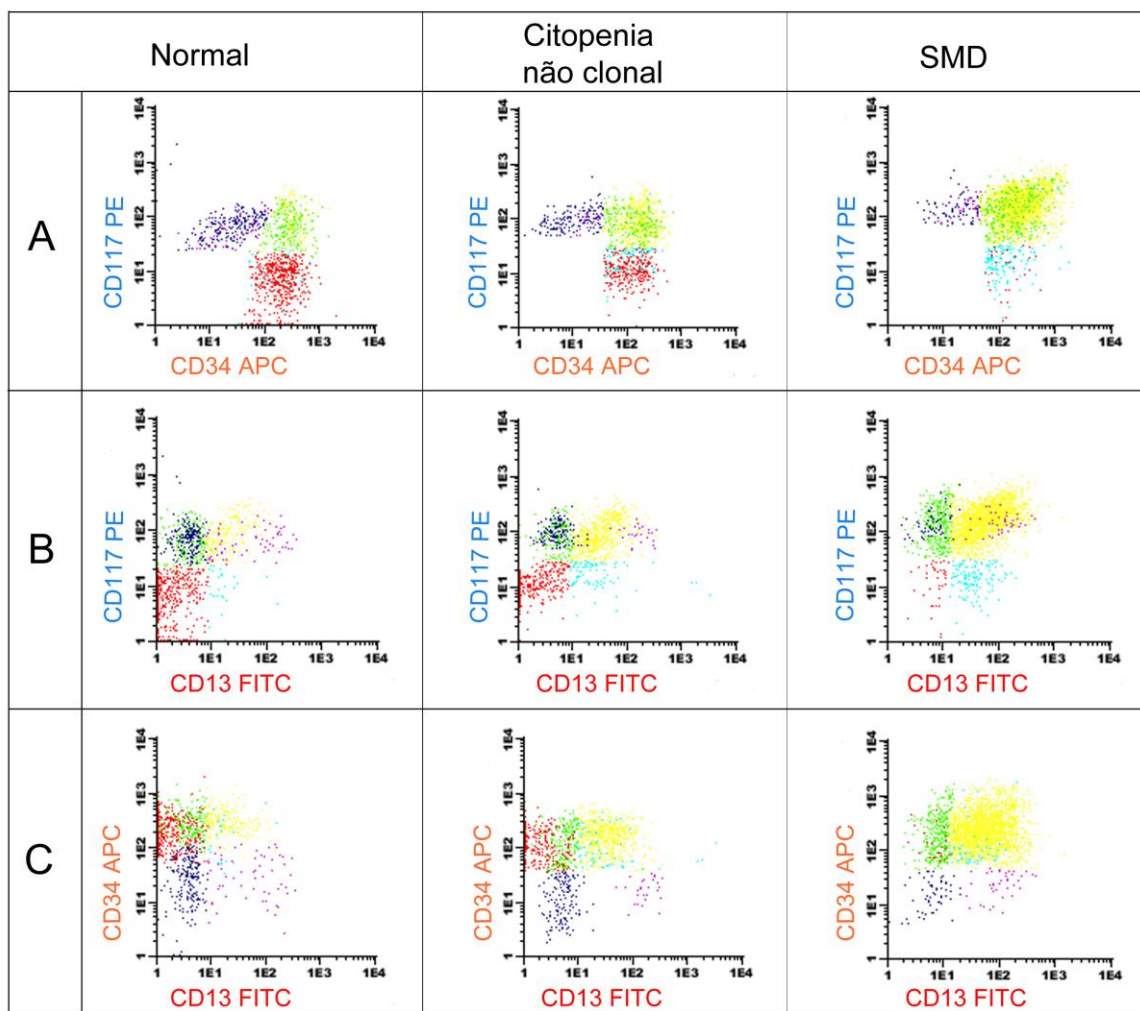


Figura 4: Subpopulações CD34⁺ em casos normais, reacionais (trombocitopenia idiopática) e SMD (CRDM) analisadas na combinação CD13/CD34/CD45/CD117. Vermelho: células CD34⁺/CD117⁻/CD13⁻ que representam os precursores imaturos e precursores de células B. Ciano: células CD34⁺/CD117⁻/CD13⁺ caracterizam os precursores mielóides imaturos. Verde: células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁻, os mieloblastos precoce e pró-eritroblastos imaturos. Amarelo: células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺, os mieloblastos. Violeta: células CD13⁺/CD34⁻/CD117⁺, promielócitos. Azul: células CD34⁻/CD117⁺/CD13⁻, proeritroblastos. Os padrões de maturação podem ser analisados na combinação CD34/CD117 (A), combinação CD13/CD117 (B) e uma combinação de CD13/CD34 (C). Os mieloblastos (amarelos) estão aumentados nas SMD.

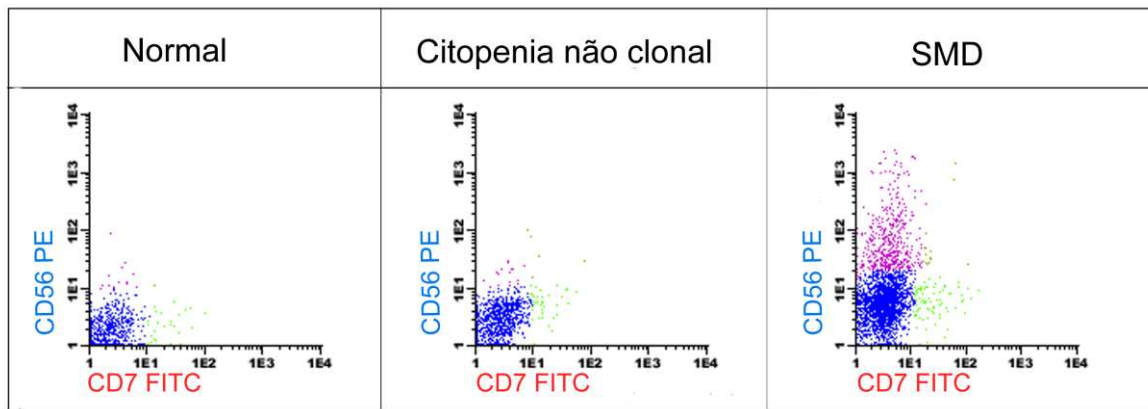


Figura 5: Estratégia de análise das co-expressões anômalas de CD7 e CD56 em células CD34⁺.

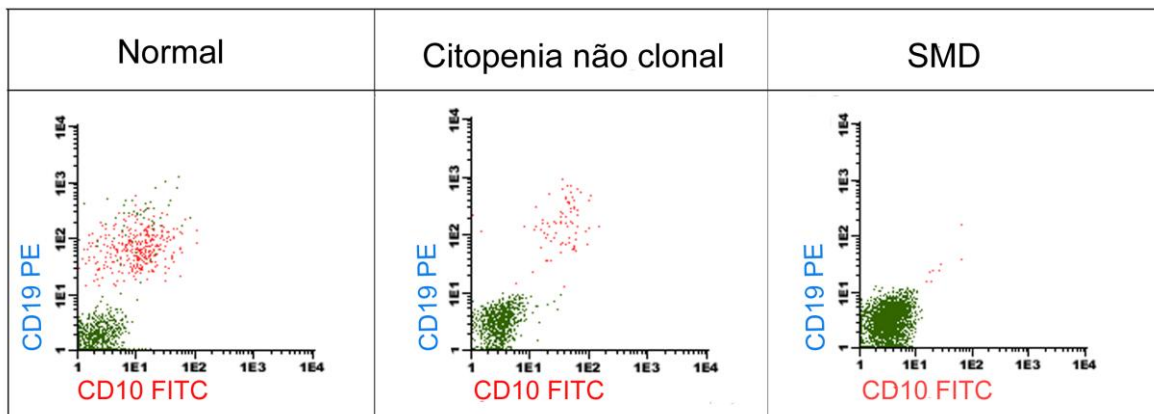


Figura 6: Caracterização de hematogonias em casos normais, reacionais (trombocitopenia idiopática) e SMD (CRDM).

Padronização dos valores normais de referência

Com as amostras da MO normal obtidas de 41 doadores de transplante de medula óssea alogênico, padronizamos um perfil imunofenotípico normal em nosso laboratório. A análise de séries mielomonocíticas e das células CD34⁺ foi realizada conforme descrito anteriormente.

Das variáveis categóricas observamos a frequência das alterações e das variáveis contínuas utilizamos os valores médios obtidos ± 2 desvios-padrão para estabelecer os valores de referência, exceto para IMF de SSC das linhas de células mielomonocíticas e para as células precursoras B por não apresentarem distribuição normal, logo foram utilizados os percentil 5% e 95%.

FCSS

Em 2003, o grupo de Seattle propôs um sistema de pontuação por citometria de fluxo (FCSS) (37) com o objetivo de condensar as múltiplas anormalidades imunofenotípicas. As pontuações foram calculadas de acordo com os tipos de alterações na maturação das células mieloides e nos monócitos, contagem de blastos por citometria de fluxo e grau de deficiência da mielopoiese com base na relação de células linfóides e mieloides. Peso adicional foi dado às amostras que apresentaram marcadores de linhagem cruzada ou pela presença de assincronismo de maturação como observado pela presença de CD34 nas células mielomonocíticas. Os detalhes deste FCSS estão na tabela 10.

A pontuação total do FCSS é composta pela soma de todas as alterações observadas para cada paciente e refletem o nível de alterações imunofenotípicas. Estas foram agrupadas nas seguintes categorias: 0-1 ponto normal/ leve; 2-3 pontos moderada e 4-9 pontos severa.

Tabela 10: Definição do FCSS (37)

Pontos	Definição de anormalidades mielóides	Definição de anormalidades monocíticas
0	Distribuição apropriada do CD45/SSC Heterogeneidade de CD11b ⁺ , HLA-DR- Relação normal de CD13 e CD16 CD33 ⁺ CD19/CD5/CD34/CD56/CD7 ⁺	Distribuição apropriada do CD45/SSC CD11b ⁺ , heterogeneidade de HLA-DR Co-expressão CD13/CD11b Co-expressão CD33/CD14 CD19/CD5/CD34/CD56/CD7 ⁺
1	Presença de uma das seguintes alterações: Granularidade anormal Diminuição anormal da expressão de CD45 Presença de HLA-DR ou ausência de CD11b Relação anormal entre CD13/CD16/CD11b Presença de CD56 na subpopulação de células mielóides (>20%) Falta de expressão de CD33(pode ser uma variante normal) Desvio a esquerda assíncrono	Presença de uma das seguintes alterações: Granularidade anormal Expressão anormal de CD11b ou HLA-DR Perda de CD13 ou CD16 Presença de CD56 (>50%) Falta de CD33 ou CD14
2	2-3 das alterações acima ou Presença de CD34 nas células mielóides ou Presença de antígenos linfóides nas células mielóides	2-3 das alterações acima ou Presença de CD34 nas células monocíticas ou Presença de antígenos linfóides nas células monocíticas (exceto CD4)
3	4 ou mais alterações acima ou 1 ou mais alterações mais a presença de CD34 ou antígenos linfóides expressos nas células mielóides	4 ou mais alterações acima ou 1 ou mais alterações mais a presença de CD34 ou antígenos linfóides expressos nas células monocíticas
Pontos Adicionais	Definição	
1 ponto adicional	Aumento da relação linfóide-mielóide (> 1) ou porcentagem de células progenitoras mielóides menor do que 5% mas claramente anormal	
2 pontos adicionais	Aumento da porcentagem de células progenitoras mielóides anormal (5%-10%)	
3 pontos adicionais	Aumento da porcentagem de células progenitoras mielóides anormal (11%-20%)	
4 pontos adicionais	Aumento da porcentagem de células progenitoras mielóides anormal (>20%)	

Sistema de Pontuação por citometria de fluxo modificado (FCSS-R)

No FCSS-R mantivemos as mesmas variáveis descritas no FCSS (37) para anormalidades na maturação mielóide, mas acrescentamos as variáveis quantitativas de monócitos ("% de monócitos" e "% CD16 + monócitos") para a linhagem monocítica (14, 24, 27). Além disso, incluímos anormalidades qualitativas e quantitativas de células CD34⁺ (tabela 11): adotamos a severidade da

anormalidade em relação ao normal com base nos valores de desvios padrão obtidos nos controles normais, tal como utilizado por Matarraz et al (40).

A presença de porcentagens anormais de células CD34⁺ e células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ foi definida sobre os desvios numéricos maiores do que a média $\pm$ 2 desvios-padrão (DP) dos valores obtidos na MO normal (40). A pontuação de 0 (zero) foi dada quando o valor obtido ficou dentro da média $\pm$ 2 SD, a pontuação de 1 para valores entre a média $\pm$ 2 DP e a média $\pm$ 3 DP, a pontuação de 2 para valores entre a média $\pm$ 3 DP e a média $\pm$ 4 DP, e a pontuação de 3 sobre valores maiores do que a média $\pm$ 4 DP.

Nossa pontuação foi calculada com base nos tipos de alterações da maturação mieloide e monocítica, anormalidades das células CD34⁺. Peso adicional foi dado a co-expressão aberrante ou deficiência de antígeno nas células CD34⁺.

Com a soma dos pontos obtidos, cada paciente foi fenotipicamente classificado como: normal / leve (0 até 2 pontos), moderada (3 ou 4 pontos) ou severa (5 ou mais pontos).

O FCSS e FCSS-R foram aplicados a todos os casos; nas SMD, bem como para os casos de citopenias reacionais. Nos casos de SMD, também correlacionamos ambas as pontuações com a porcentagem de blastos na citologia, classificação OMS, categorizações WPSS e IPSS-R.

Tabela 11: Definição do sistema de pontuação por citometria fluxo modificado (FCSS-R)

Pontos	Definição de anormalidades mieloides	Definição de anormalidades monocíticas	Definição de anormalidades de células CD34 ⁺
0	Distribuição apropriada do CD45/SSC Heterogeneidade de CD11b ⁺ , HLA-DR- Relação normal de CD13 e CD16 CD33 ⁺ CD19/CD5/CD34/CD56/CD7 ⁻	Distribuição apropriada do CD45/SSC CD11b ⁺ , heterogeneidade de HLA-DR Co-expressão CD13/CD11b Co-expressão CD33/CD14 CD19/CD5/CD34/CD56/CD7 ⁻	Distribuição apropriada: % de células no gate de blastos % de células CD34 ⁺ % de células CD34 ⁺ /CD117 ⁺ /CD13 ⁺ %de células CD34 ⁺ /CD19 ⁺
1	Presença de uma das seguintes alterações: Granularidade anormal (SSC<423) Diminuição anormal da expressão de CD45 (IMF45<138) Presença de HLA-DR ou ausência de CD11b Relação anormal entre CD13/CD16/CD11b Presença de CD56 na subpopulação de células mielóides (>20%) Falta de expressão de CD33(pode ser uma variante normal) Desvio a esquerda assíncrono	Presença de uma das seguintes alterações: Granularidade anormal (SSC<166) Expressão anormal de CD11b ou HLA-DR Perda de CD13 Presença de CD56 (>50%) Falta de CD33 ou CD14 Aumento da % de monócitos e/ou aumento da % de monócitos CD16⁺	Presença de uma das seguintes alterações: Diminuição das células CD34⁺/CD19⁺ (<0,05) (média+2DP>x< Média+3DP) Aumento das células CD34⁺ (1,60>x<1,98) Aumento das células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ (0,62>x<0,77)
2	2-3 das alterações acima ou Presença de CD34 nas células mielóides ou Presença de antígenos linfóides nas células mieloides	2-3 das alterações acima ou Presença de CD34 nas células monocíticas ou Presença de antígenos linfóides nas células monocíticas (exceto CD4)	2-3 das alterações acima ou (média+3DP>x< média+4DP) Aumento das células % CD34⁺ (1,98>x<2,35) e/ou Aumento das células %CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ (0,77>x<x0,92)
3	4 ou mais alterações acima ou 1 ou mais alterações mais a presença de CD34 ou antígenos linfóide expressos nas células mieloides	4 ou mais alterações acima ou 1 ou mais alterações mais a presença de CD34 ou antígenos linfóide expressos nas células monocíticas	(x>média+4DP) Aumento das células % CD34⁺ (x>2,35) e/ou Aumento das células %CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ (x>0,92)
1	Atribuir 1 ponto adicional para cada expressão anormal ou deficiência de antígeno nas células CD34⁺.		

Análise Estatística

Para todas as variáveis obtidas no estudo realizamos a análise descritiva. A diferença entre os grupos para todas as variáveis estudadas foi avaliada por análise de variância (ANOVA). A distribuição normal das variáveis do grupo controle foi examinada pelo teste Kolmogorov-Smirnov test. Para comparação entre as variáveis categóricas utilizamos o teste qui-quadrado. As correlações entre as variáveis foram estudadas pelo teste de Spearman. A área sob a curva de ROC foi utilizada para avaliar a sensibilidade e especificidade, este teste foi aplicado considerando todos os grupos, e considerando todos os casos de SMD e citopenias reacionais. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O programa SPSS 17 foi utilizado.

Resultados

5. RESULTADOS

Características Clínicas das SMD

Foram incluídos 56 casos com diagnóstico confirmado de SMD.

Tabela 12: Características clínicas e hematológicas das SMD.

Nº de pacientes	56
Sexo (masc/fem.), nº (%) de pacientes	35/21 (62,5/37,5)
Idade, mediana (anos) (min-max)	69 (15-84)
Blastos medulares, mediana (%) (min-max)	1,5 (0,5-18,0)
Hemoglobina (g/dl), mediana g/dl (min-max)	8,7 (5,5-13,5)
Plaquetas ($\times 10^9/L$), mediana g/dl (min-max)	82,5 (5-588)
Neutrófilos ($\times 10^9/L$), mediana g/dl (min-max)	1,3 (0,05-5,7)
Classificação OMS, nº (%) de pacientes	
AR	7 (12,5)
CRDM	25 (44,6)
CRDM-AS	11 (19,6)
AREB-1	6 (10,7)
AREB-2	7 (12,5)
Risco Citogenético*, nº (%) de pacientes	
Muito Bom	2 (3,6)
Bom	39 (69,6)
Intermediário	5 (8,9)
Ruim	0
Muito Ruim	5 (8,9)
Sem mitose	5 (8,9)
Risco IPSS-R*, nº (%) de pacientes	
Muito Baixo	5 (9,8)
Baixo	17 (33,3)
Intermediário	16 (31,4)
Alto	10 (19,6)
Muito Alto	3 (5,9)
WPSS*, nº (%) de pacientes	
Muito Baixo	3 (5,9)
Baixo	12 (23,5)
Intermediário	22 (43,1)
Alto	12 (23,5)
Muito Alto	2 (3,9)

* 5 casos sem análise do cariótipo

A maioria dos casos foi de CRDM (tabela 12). Em 5 casos não houve mitose para realização do cariótipo. Como os grupos dos pacientes de acordo com o IPSS-R eram pequenos, agrupamos os casos com <5% blastos medulares (baixo risco) e SMD com > 5% de blastos medulares (alto risco) para análise. A maior parte dos casos foi de baixo risco baixo e risco intermediário em todas as pontuações clínicas analisadas e tinha blastos medulares <5%.

Características Clínicas dos casos com citopenias reacionais

Foram incluídos 33 casos com citopenia periférica reacionais e 41 controles de MO normal.

Os casos de citopenias reacionais incluídos (tabela 13) foram diagnosticados com anemias carenciais (n = 11), citopenias induzidas por drogas (n = 6), anemia aplástica (n = 3), púrpura trombocitopênica idiopática (n = 4), doenças auto-imunes (n = 3), disfunção da tireóide (n = 3), e leucopenia associada a infecção (n = 3).

Tabela 13: Características hematológicas das citopenias reacionais.

Nº de pacientes	33
Sexo (masc./fem.), nº (%) de pacientes	14/19 (41/59)
Idade, mediana (anos) (min-max)	60 (14 - 86)
Hemoglobina (g/dl), mediana g/dl (min-max)	11,9 (7 - 15,9)
Plaquetas ($\times 10^9/L$), mediana g/dl (min-max)	93 (1 - 487)
Neutrófilos ($\times 10^9/L$), mediana g/dl (min-max)	1,4 (0,08 - 10)

Análise por citometria de Fluxo

Os valores normais foram estabelecidos por meio da análise de 41 amostras de medula óssea de doadores normais de transplante de medula óssea alogênico com idade média de 32 anos (15 - 69); sendo que 25 foram homens e 16 mulheres (tabela 14).

Tabela 14: Padronização do perfil imunofenotípico normal.

Variáveis	Média	DP	Referência
Série Granulocítica			
SSC IMF*	522	75	396-658
CD45 IMF*	308	157	127-643
Série Monocítica			
SSC IMF*	253	43,44	195-325
% monócitos	2,2	0,69	0,8-3,6
% monócitos CD16 ⁺	0,2	0,14	<0,48
Células no <i>gate</i> de blastos			
% Células no <i>gate</i> de blastos	1,17	0,46	<2,09
% Células CD34 ⁺	0,85	0,37	<1,59
% Células precursoras B*	0,18	0,14	>0,05
% CD34 ⁺ /CD13 ⁺ /CD117 ⁺	0,32	0,15	<0,62
% CD34 ⁺ /CD7 ⁺	0,03	0,027	<0,08
% CD34 ⁺ /CD56 ⁺	0,02	0,013	<0,05

*Para estas variáveis utilizamos percentil 5-95 como referência

A frequência das alterações imunofenotípicas na série granulocítica das citopenias reacionais estão demonstradas na tabela 15. Não houve nenhuma anormalidade no SSC de granulócitos. Desvio à esquerda, com assincronismo de expressão dos antígenos, foi encontrado em 7 casos. Em dois casos, a expressão anormal de CD13 ou CD16 foi observada na maturação de granulócitos.

Houve um caso de doença autoimune que apresentou expressão anômala de CD34 na maturação dos granulócitos, sem qualquer outra anormalidade, e em outro caso de hepatite C que houve expressão de CD7 nos granulócitos.

Tabela 15: Frequência das alterações imunofenotípicas na série granulocítica encontradas nas citopenias reacionais e nas SMD.

Alterações	Citopenias Reacionais (n=33)	SMD <5% blastos (n=43)	SMD >5% blastos (n=13)	p^a
Série Granulocítica				
Granularidade anormal	0/33 (0%)	24/43 (56%)	5/13 (39%)	0,001
Diminuição anormal da expressão CD45	3/33 (9%)	9/43 (21%)	1/13 (8%)	0,245
Padrão anormal no CD13/CD16	2/33 (6%)	23/43 (53%)	8/13 (61%)	0,001
Padrão anormal no CD33/HLA-DR	7/33 (21%)	26/43 (60%)	9/13 (69%)	0,001
Expressão de CD56	0/33 (0%)	9/43 (21%)	1/13 (8%)	0,049
Expressão aberrante de CD34	1/33 (3%)	7/43 (16%)	3/13 (23%)	0,09
Expressão aberrante de CD7	1/33 (3%)	2/43 (5%)	1/13 (8%)	0,776
Expressão aberrante de CD19	0/33 (0%)	4/43 (9%)	0/13 (0%)	0,101
Desvio a esquerda com assincronismo	7/33 (21%)	11/43 (26%)	6/13 (46%)	0,227
Total de alterações	1 (0-2)	2 (1-5)	3 (1-5)	<0,0001 ^b

a- Teste qui-quadrado
b- ANOVA

A frequência das alterações imunofenotípicas na série monocítica das citopenias reacionais estão demonstradas na tabela 16. Em 11 casos (33%), o aumento da porcentagem de monócitos foi encontrado, mas não houve diferença significativa entre os três grupos analisados. Houve expressão de CD56 nos monócitos em dois casos, enquanto o CD7 e o CD19 foram expressos em um dos casos. Em relação aos monócitos CD16⁺, houve um aumento em 8 casos de citopenias reacionais. (tabela 17).

Tabela 16: Frequência das alterações imunofenotípicas na série monocítica encontradas nas citopenias reacionais e nas SMD.

Alterações	Citopenias Reacionais (n=33)	SMD <5% blastos (n=43)	SMD >5% blastos (n=13)	p ^a
Série Monocítica				
Granularidade anormal	7/33 (21%)	12/43 (28%)	0/13 (0%)	0,036*
Aumento da % Monócitos	11/33 (33%)	27/43 (63%)	9/13 (69%)	0,051*
Aumento da % Monócitos CD16 ⁺	8/33 (24%)	19/43 (44%)	8/13 (62%)	0,355
Padrão anormal no CD33/HLA-DR	5/33 (15%)	21/43 (49%)	2/13 (15%)	<0,0001
Expressão de CD56	2/33 (6%)	14/43 (33%)	3/13 (23%)	0,045
Expressão aberrante de CD34	1/33 (3%)	17/43 (40%)	6/13 (46%)	<0,0001
Expressão aberrante de CD7	1/33 (3%)	9/43 (21%)	5/13 (39%)	0,008
Expressão aberrante de CD19	1/33 (3%)	5/43 (12%)	2/13 (15%)	0,278
Total de alterações	1 (0-3)	3 (0-6)	3 (1-6)	<0,0001 ^b

a- Teste qui-quadrado

b- ANOVA

*o resultado foi diferente quando comparamos SMD<5% blastos e citopenias reacionais

A respeito das subpopulações de células CD34⁺, a porcentagem do total de células CD34⁺ apresentou aumento em apenas um caso de doença autoimune e 4 casos apresentaram aumento não expressivo das células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ (tabela 17). O CD56 foi expresso em dois casos (0,06% e 0,09% das células). Precusores de células B estavam abaixo do valor normal em 13 casos (39%). Todas essas alterações resultaram no aumento do número total de anormalidades.

Tabela 17: Frequência das alterações imunofenotípicas nas células CD34⁺ encontradas nas citopenias reacionais e nas SMD.

Alterações	Citopenias Reacionais (n=33)	SMD <5% blastos (n=43)	SMD >5% blastos (n=13)	p ^a
Células no <i>gate</i> de blastos				
Aumento da % CD34 ⁺	1/33 (3%)	11/43 (26%)	10/13 (77%)	<0,0001
Diminuição das % células precursoras B	13/33 (39%)	32/43 (75%)	12/13 (92%)	0,001
Aumento da % CD34 ⁺ /CD13 ⁺ /CD117 ⁺	4/33 (12%)	18/43 (42%)	9/13 (69%)	0,001
Expressão anormal de CD7	0/33 (0%)	9/43 (21%)	8/13 (62%)	<0,0001*
Expressão anormal de CD56	2/33 (6%)	15/43 (35%)	9/13 (69%)	<0,0001
Total de alterações	1 (0-2)	2 (0-5)	4 (1-5)	<0,0001 ^b

a- Teste qui-quadrado

b- ANOVA

*o resultado foi diferente quando comparamos SMD<5% blastos e citopenias reacionais

As alterações nas SMD estão também apresentadas nas tabelas 15 a 18. Todas as variáveis estudadas, com exceção de IMF de CD45 em granulócitos e número e SSC de monócitos apresentaram valores significativamente diferentes entre as SMD e os casos de citopenias reacionais. Nestes não encontramos células CD34⁺/CD7⁺, mas nas SMD de baixo risco, e principalmente nas de alto risco esta co-expressão anormal foi encontrada (tabela 17).

Considerando que os pacientes com citopenias reacionais e aqueles com SMD tinham idades comparáveis, os últimos tiveram significativamente menos precursores de células B. (0,05 (0-0,33) e 0 (0-0,18); p=0,001, respectivamente).

Todos os casos de SMD apresentaram no mínimo três alterações imunofenotípicas enquanto as citopenias reacionais apresentaram no máximo cinco alterações (tabela 18).

Tabela 18: Comparações dos dados imunofenotípicos entre as citopenias reacionais e as SMD.

Alterações	Citopenias Reacionais (n=33)	SMD <5% blastos (n=43)	SMD >5% blastos (n=13)	p^a
Série Granulocítica				
SSC IMF	534 (340-628)	394 (236-619)	462 (319-648)	<0,0001
CD45 IMF	265 (107-683)	216 (34-770)	270 (89-551)	ns
Série Monocítica				
SSC IMF	237 (149-390)	233 (66-399)	203 (184-322)	ns
% monócitos	3,0 (0,7-8,8)	3,7 (0,2-18,7)	3,3 (0,1-21,1)	0,01*
% CD16+ monócitos	0,3 (0,1-3,4)	0,4 (0-10,5)	0,9 (0,05-4)	0,003*
Células no gate de blastos				
% blastos MO	0,7 (0,5-4,0)	1,0 (0,5-5,0)	12 (7,7-18,0)	<0,0001*
% células no gate de blastos	0,8 (0,3-2,3)	1,9 (0,05-7,6)	4,7 (0,6-32,1)	<0,0001
% Células CD34 ⁺	0,6 (0,02-2,21)	1,0 (0,02-5,1)	3,6 (0,2-28,6)	<0,0001
% Precusores de células B *	0,05 (0-0,7)	0,0 (0-0,7)	0,0 (0-0,1)	<0,0001
% CD34 ⁺ /CD13 ⁺ /CD117 ⁺	0,3 (0,01-0,8)	0,5 (0,01-4,2)	1,4 (0-24,1)	0,001
% CD34 ⁺ /CD7 ⁺	0,05 (0-0,09)	0,04 (0-0,7)	0,13 (0,04-26,4)	<0,0001*
% CD34 ⁺ /CD56 ⁺	0,01 (0-0,09)	0,03 (0-1,9)	0,13 (0,02-27,1)	<0,0001
Total de alterações imunofenotípicas	2 (0-5)	7 (3-13)	9 (6-16)	<0,0001 ^b
Pontuação FCSS	1 (0-4)	5 (2-7)	6 (2-11)	<0,0001 ^b
Pontuação FCSS-R	2 (0-4)	7 (4-11)	9 (5-11)	<0,0001 ^b

^a ANOVA

*o resultado foi diferente quando comparamos SMD<5% blastos e citopenias reacionais

FCSS-R x FCSS

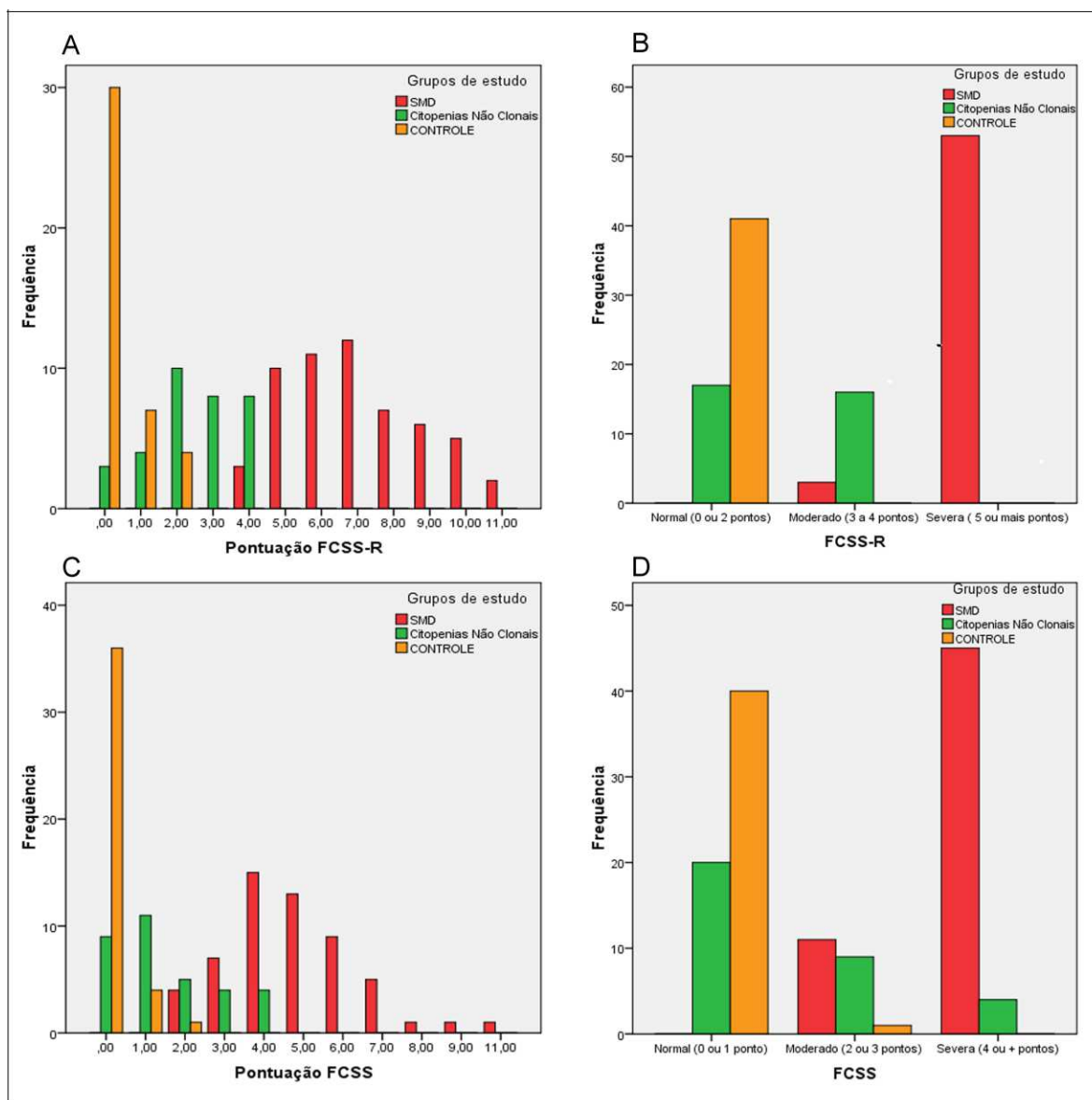
Ambas as pontuações, bem como o número total de alterações imunofenotípicas, permitiram discriminar SMD de citopenias reacionais. No entanto, de acordo com a área sob a curva ROC, o FCSS-R apresentou estimativa de acurácia diagnóstica com maior sensibilidade (94,6%) para a discriminação entre o SMD e citopenias reacionais do que as outras variáveis, para um “cutt-off” definido com especificidade de 100% (tabela 19). Nos histogramas notamos que no FCSS-R praticamente não há sobreposição entre as categorias “reacionais” e “clonal” (figura 7).

Tabela 19: Área sob a curva ROC para discriminar as citopenias reacionais e das SMD.

Variáveis	Área	p	Valores de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Pontuação FCSS-R	0,997	<0.001	4,5	94,6	100
Pontuação FCSS	0,972	<0.001	4,5	53,6	100
Total de alterações imunofenotípicas	0,991	<0.001	5,5	85,7	100

Algumas citopenias reacionais apresentaram anormalidades imunofenotípicas moderadas (49%) pelo FCSS-R (tabela 20). No entanto, nenhum dos casos teve mais de 4 pontos. Em contraste, a maioria dos casos de SMD (95%) apresentou um número de anormalidades imunofenotípicas graves e apenas três casos (5%) apresentaram um número moderado. Nenhum caso de SMD foi classificado como normal. Porém, a pontuação no FCSS-R das SMD aumentou das SMD de baixo risco (<5% blastos) para SMD de alto risco ($p = 0,001$) (tabela 18).

Figura 7: Distribuição dos casos de acordo com ambas as pontuações. A e B: FCSS-R. C e D: FCSS. O FCSS-R foi capaz de discriminar melhor os grupos.



De acordo com FCSS, todas as amostras de MO normal foram classificadas como normal, assim como a maioria das citopenias reacionais (61%). As SMD foram distribuídas nas categorias moderada (20%) e grave (80%) (tabela 20). Não houve diferença entre as pontuações de SMD de baixo risco e de alto risco (tabela 18).

Tabela 20: Distribuição das categorias de risco imunofenotípico pelo FCSS-R e FCSS entre os grupos estudados.

	Controle (n=41)	Citopenias reacionais (n=33)	SMD (n=56)
FCSS-R			
Normal/Leve (0-2 pontos)	41 (100%)	17 (51%)	-
Moderado (3-4 pontos)	-	16 (49%)	3 (5%)
Severa (≥ 5 pontos)	-	-	53 (95%)
FCSS			
Normal/Leve (0-1 ponto)	40 (98%)	20 (61%)	-
Moderate (2 or 3 pontos)	1 (2%)	9 (27%)	11 (20%)
Severa (>3 pontos)	-	4 (12%)	45 (80%)

Nas SMD, a pontuação FCSS-R apresentou uma correlação positiva com as características clínicas da doença, como aumento dos blastos medulares na citologia ($r=0,45$; $p < 0,0001$), grupo de risco IPSS-R ($r=0,49$; $p < 0,0001$), WPSS ($r=0,32$; $p=0,02$), novo risco citogenético ($r=0,35$; $p=0,01$), % de células CD34⁺ ($r=0,72$; $p < 0,0001$), % de células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ ($r=0,67$; $p < 0,0001$) e expressões anômalas de CD7 ($r=0,37$; $p = 0,004$) e CD56 ($r=0,56$; $p < 0,0001$) nas células CD34⁺.

A pontuação mais alta do FCSS mostrou associação apenas com o aumento do total de células CD34⁺ ($r = 0,32$, $p = 0,01$), % células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ ($r = 0,29$, $p = 0,02$) e com a diminuição do nível de hemoglobina ($r = -0,26$; $p = 0,04$).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Nas SMD, várias anormalidades imunofenotípicas já foram descritas tais como a diminuição do SSC (hipogranularidade) nos precursores granulocíticos, assincronismos de expressão de antígenos ao longo da maturação mielóide, expressão aberrante de antígenos de linhagem diferente, assim como anormalidades quantitativas e qualitativas nas células CD34⁺, além da diminuição de precursores de células B (12, 14, 23-26, 28, 30, 33-38, 41). Contudo nenhuma destas é específica de SMD.

De acordo com as recomendações OMS 2008 (2, 4), o achado de três ou mais anormalidades imunofenotípicas é considerado provável de SMD. Assim, a presença de anormalidades imunofenotípicas é um método auxiliar útil para o diagnóstico de SMD, principalmente em casos com baixa porcentagem de blastos medulares e cariótipo normal (6).

O conhecimento da expressão normal de antígenos das células hematopoéticas é essencial para avaliar as anormalidade e definir imunofenótipos associados à leucemia (LAIPs) (36, 61). Em indivíduos normais, a maturação dos precursores da MO é rigidamente controlada o que leva a padrões previsíveis de expressão de antígenos em diferentes estágios da maturação celular (12, 36, 62). Células neoplásicas são caracterizadas pelo desvio deste padrão normal. É aconselhável que cada laboratório de rotina estabeleça os valores normais de referência para cada painel de anticorpos monoclonais utilizado.

Em nossos estudos anteriores (24, 27, 46), nós demonstramos a utilidade de um painel resumido de anticorpos monoclonais em quatro cores para analisar a linhagem mielomonocítica e os subtipos de células CD34⁺ e este foi adequado para confirmar o diagnóstico de SMD. Dentre as anormalidades imunofenotípicas detectadas, as referentes às células CD34⁺ foram as mais importantes para predizer uma menor sobrevida dos pacientes.

Nas citopenias reacionais pudemos observar em alguns casos expressão anormal de CD45, desvio à esquerda assíncrono, aumento de células CD34⁺ e até diminuição de hematogônias, porém nunca encontramos

hipogranularidade, bloqueio de maturação e LAIPs. Isto está de acordo com o princípio de que nestes casos não houve ruptura do controle genético da diferenciação celular das linhagens analisadas. Em relação às SMD, o FCSS-R contemplou melhor as anormalidades nas células CD34⁺.

Para ilustrar a importância da quantificação das células CD34⁺/CD13⁺, recentemente (46) demonstramos nas SMD, três grupos não sobrepostos de pacientes com sobrevida diferente. Estes grupos separaram principalmente pacientes com baixo número de células SSC^{int}/CD34⁺/CD13⁺ e uma baixa porcentagem de blastos medulares, enfatizando novamente a importância de considerar anormalidades sutis nos progenitores hematopoéticos para avaliação da agressividade do clone anormal.

A fim de melhorar a sensibilidade e a especificidade do nosso painel diagnóstico, nós substituímos a combinação de análise de células dendríticas e basófilos e incluímos a combinação CD7/CD56/CD45/CD34 para avaliar as LAIPs.

A identificação de anormalidades no compartimento eritróide é útil, mas não é exigido pelo ELN (30). Em um estudo anterior de nosso grupo (14), demonstramos que a combinação CD71/CD235a foi capaz de detectar vários tipos de anormalidades. Mas a análise destas células é baseada em poucos marcadores. Além disso, a técnica lisa e lava afeta a quantificação dos eritroblastos (30). Assim, decidimos focar nosso painel atual na série mielomonocítica e nas células CD34⁺, como vários outros grupos de estudo têm feito.

Neste presente trabalho, nosso objetivo foi examinar se as variáveis detectadas pelo nosso painel seriam capazes de discriminar entre citopenias periféricas reacionais e SMD, especialmente em casos com poucos blastos e cariótipo normal. Nós também avaliamos se com a inclusão de variáveis imunofenotípicas prognósticas ao FCSS (25, 37) seria possível aumentar a sensibilidade e a especificidade deste sistema.

Em relação às variáveis analisadas, nossos casos de citopenias reacionais não apresentaram diminuição do SSC ou bloqueio de maturação dos granulócitos. Desvio à esquerda foi evidenciado em 7 casos e dois casos

apresentaram expressão anormal de CD13. Estes achados estão de acordo com o fato de que a ruptura do padrão normal é indicativa de uma doença clonal. Estas alterações ocorrem em todos os tipos de SMD e não tem impacto prognóstico como características isoladas.

Alguns casos de citopenias reacionais apresentaram monocitose e aumento de monócitos ativados CD16⁺, além de um ligeiro aumento de células CD34⁺ com a co-expressão de CD7 ou CD56. Isso pode ser um problema técnico, mas esses pacientes devem ser acompanhados para detectar uma possível evolução para SMD.

De maneira semelhante, notamos que 39% dos casos com citopenias reacionais apresentaram uma diminuição do número de células precursoras B. Esta diminuição é reconhecida como um marcador de SMD. Entretanto, o número de hematogônias diminui com o aumento da idade. Tendo em vista que os pacientes com citopenias reacionais e os de SMD eram de faixas etárias semelhantes, esta diminuição pode ser indicativa de uma desordem clonal em instalação. Por isto, estes pacientes deveriam ser seguidos com hemograma para melhor esclarecimento do caso. A baixa concentração ou ausência de células precursoras B está descrita em desordens hematológicas como as SMD e a anemia aplástica, possivelmente devido à inibição da hematopoese mediadas por células T. (13, 23, 24, 29, 33, 34, 38, 63, 64). Assim, esta inibição poderia ocorrer também em casos reacionais onde houvesse um processo inflamatório medular. Esta questão precisaria ser esclarecida num estudo específico das células imunes na medula. Mas, neste caso, a diminuição de hematogônias na medula não seria tão específica de SMD, como alguns autores têm preconizado (33, 34, 47).

No entanto, as principais características imunofenotípicas que distinguiram as SMD de baixo risco das citopenias reacionais foram: o aumento de células CD34⁺, especialmente na presença de quantidades normais de blastos na medula óssea pela citologia, aumento das células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺, diminuição das células precursoras B e co-expressão aberrante nas células CD34⁺ (CD7, CD56 ou diminuição de CD13). A presença da expressão anômala de CD7 nas células CD34⁺ é comum nas SMD de alto risco e pode estar relacionada com a

progressão para leucemia aguda. (48, 65). O total de alterações imunofenotípicas também foi significativamente maior nas desordens clonais.

Nossos resultados mostram que a porcentagem de células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ é maior nas SMD de alto risco do que nas SMD de baixo risco e esta porcentagem apresentou correlação com o IPSS-R. Anormalidades na expressão de CD117 e CD34 são frequentes nas SMD principalmente nas de alto risco (41) e alguns estudos demonstram o valor prognóstico destas anormalidades e a expressão anormal de CD117 está associada com a progressão para leucemia aguda (27, 41, 45). Nós sugerimos que o fenótipo CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ pode ser um potencial marcador para a progressão da doença nas SMD.

Contudo, quando nenhuma anormalidade é encontrada nas células CD34⁺, algumas alterações imunofenotípicas de maturação mielomonocítica são importantes para distinguir citopenia reacional de SMD de baixo risco, como a hipogranularidade dos granulócitos, características displásicas identificadas pela relação anormal entre os antígenos, assincronismo, bloqueio de maturação e expressão aberrante de antígenos.

Recentemente, vários grupos elaboraram sistema de pontuação por citometria de fluxo para o diagnóstico de SMD. (14, 33-35, 38, 40, 42, 45, 48). Wells *et al* (37) descreveram um FCSS baseado nos tipos de anormalidades mielomonocíticas e número de células CD34⁺. A pontuação ≥ 3 apresentou uma especificidade de 100% com sensibilidade de 55%. Além disso, nos pacientes submetidos ao transplante, as altas pontuações do FCSS correlacionaram com a evolução desfavorável pacientes após transplante. Este grupo também demonstrou a utilidade deste FCSS para o diagnóstico diferencial e valor prognóstico (25).

Ogata *et al* (33) propuseram uma pontuação (FCM score) para o diagnóstico diferencial entre citopenias reacionais e SMD de baixo risco, baseado nas anormalidades imunofenotípicas de células CD34⁺, apresentando sensibilidade de 58% e especificidade de 100%. Xu *et al* (48) demonstraram a aplicabilidade de um sistema de pontuação progressiva (FCM) baseado na

expressão de CD19, CD38, CD117, e CD7 nas células CD34⁺ que apresentaram 63.3% de sensibilidade e especificidade de 100%.

Matarraz *et al* (40) desenvolveram uma pontuação baseada em 83 variáveis de compartimentos de maturação em várias linhagens celulares e nas células progenitoras. Eles demonstraram que o número, o tipo e o grau de desvio dos valores normais refletem a extensão do dano genético no clone maligno.

O grupo europeu *LeukemiaNet*, em um estudo multicêntrico, (47) descreveram uma pontuação (FCM *score*) com 69% de sensibilidade e 92% de especificidade, para diagnóstico de SMD, baseado em quatro parâmetros reproduzíveis: número de mieloblastos CD34⁺ e de células precursoras-B; expressão aberrante de CD45 e redução dos valores de SSC nos granulócitos.

No presente estudo foi examinada a utilidade diagnóstica da inclusão de alterações quantitativas de monócitos e da adição de pontos às anormalidades específicas de células CD34⁺ ao FCSS de Wells *et al* (37), tendo como referência o padrão das MO normais. Assim o FCSS-R apresentou maior sensibilidade (95%; com especificidade de 100%) do que outros sistemas de pontuação descritos, provavelmente pela junção de anormalidades específicas de células CD34⁺ às anormalidades de maturação mielomonocíticas. Todavia, este estudo deveria ser validado com mais casos. Além disso, a avaliação do impacto do FCSS-R na sobrevida global dos pacientes precisa ser estudada.

Expressões anômalas de células CD34⁺ (LAIPs) são frequentemente encontradas em SMD (30%-45%), principalmente nos casos de alto risco (29, 66). A presença destas anormalidades está associada com a progressão para leucemia aguda. Além disso, vários estudos demonstraram que as anormalidades fenotípicas quantitativas e qualitativas nos blastos medulares apresenta uma boa relação com a sobrevida dos pacientes (24, 25, 27, 40, 45, 46, 48).

Nós utilizamos um simples painel de quatro cores que nos permitiu distinguir citopenias reacionais de SMD através da análise de várias anormalidades imunofenotípicas na série mielomonocítica e nas células CD34⁺, utilizando como referência o padrão normal de expressão. Assim, nós desenvolvemos um sistema de pontuação modificado (FCSS-R) baseado nas

recomendações da padronização ELN (30) e no FCSS publicado por Wells *et al* (37).

Aplicamos o FCSS-R e o FCSS em todos os casos e notamos que ambas as pontuações discriminaram SMD de citopenias reacionais. Entretanto, o FCSS-R é mais específico e sensível. No FCSS-R, nenhum caso de SMD foi classificado como normal e houve apenas 3 casos com pontuação moderada. A maioria dos casos de SMD foi classificada como severa.

De acordo com o FCSS-R, as SMD mostraram relação entre as pontuações mais altas do FCSS-R e outras características relevantes da desordem como o aumento de blastos medulares, com as categorias de risco do IPSS, IPSS-R, WPSS, novo risco citogenético, assim como com o aumento de células CD34⁺, de células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ e da expressão anômala de CD7 e CD56 nas células CD34⁺.

Por outro lado, um número alto de pontos no FCSS teve associação com o aumento de células CD34⁺, células CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺, com a diminuição da hemoglobina. Além disso, Wells *et al* (37) demonstraram correlação entre a pontuação FCSS e o IPSS, e Chu *et al* (25) evidenciaram uma associação entre a pontuação FCSS com os subgrupos OMS, IPSS, WPSS e dependência transfusional. Provavelmente a diferença entre os estudos é devido ao número de pacientes analisados.

O FCSS-R apresentou em nosso estudo uma maior sensibilidade do que o FCSS devido a maior pontuação dada às anormalidades de células CD34⁺, que são mais específicas, além de serem importantes fatores de risco independente nas SMD. (14, 23, 27, 29, 46). Após um seguimento maior dos nossos pacientes realizaremos estudos de sobrevida.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- As variáveis detectadas pelo nosso painel diagnóstico são capazes de discriminar entre citopenias periféricas reacionais e SMD, especialmente em casos com poucos blastos e cariótipo normal.
- A inclusão de valores quantitativos de expressão anormal nas células CD34+ e nos monócitos no FCSS-R melhora o painel para o diagnóstico de SMD e mostra uma excelente sensibilidade e especificidade para auxiliar o diagnóstico diferencial principalmente nas SMD de baixo risco. O FCSS-R é fácil de realizar no laboratório de diagnóstico e a maior pontuação pode ser um marcador prognóstico útil nas SMD.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51(2):189-99.
2. Swerdlow S, Camp E, Harris N, et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon :IARC. 2008.
3. Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms--comments on the 2008 WHO classification. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2010;32(5):461-76.
4. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
5. Ribeiro E, Lima CS, Metze K, Lorand-Metze I. Flow cytometric analysis of the expression of Fas/FasL in bone marrow CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(2):309-13.
6. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research*. 2007;31(6):727-36.
7. Lorand-Metze I, Pinheiro MP, Ribeiro E, de Paula EV, Metze K. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. *Leukemia Research*. 2004;28(6):587-94.
8. Flores-Figueroa E, Espindola GG, Montesinos JJ, Trejo RMA, Mayani H. In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*. 2002;26(7):677-86.
9. Wang W, Wang H, Wang XQ, Lin GW. First report of incidence of adult myelodysplastic syndrome in China. *Ann Hematol*. 2012;91(8):1321-2.
10. Marcondes AM, Ramakrishnan A, Deeg HJ. Myeloid Malignancies and the Marrow Microenvironment: Some Recent Studies in Patients with MDS. *Curr Cancer Ther Rev*. 2009;5(4):310-4.
11. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611.

12. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leukemia Research*. 2008;32(1):5-17.
13. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Drager AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1124-34.
14. Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CS, Batista LS, Metze K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leukemia Research*. 2007;31(2):147-55.
15. Hamdi W, Ogawara H, Handa H, Tsukamoto N, Murakami H. Clinical significance of Th1/Th2 ratio in patients with myelodysplastic syndrome. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2009;31(6):630-8.
16. Kondo A, Yamashita T, Tamura H, Zhao W, Tsuji T, Shimizu M, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2010;116(7):1124-31.
17. Vardiman J. The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leukemia Research*. 2012;36(12):1453-8.
18. Vardiman J, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-302.
19. Bowen D, Culligan D, Jowitt S, Kelsey S, Mufti G, Oscier D, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2003;120(2):187-200.
20. Vardiman J. Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc of Hematol Education Program*. 2006:199-204.
21. Giagounidis A, Haase D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013;26(4):337-53.
22. Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Myelodysplastic syndromes: the role of flow cytometry in diagnosis and prognosis. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2009;31(5):479-83.

23. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores J, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia Research*. 2008;22(6):1175-83.
24. Reis SC, Traina F, Metze K, Saad ST, Lorand-Metze I. Variation of bone marrow CD34+ cell subsets in myelodysplastic syndromes according to who types. *Neoplasma*. 2009;56(5):435-40.
25. Chu SC, Wang TF, Li CC, Kao RH, Li DK, Su YC, et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2011;35(7):868-73.
26. Ribeiro E, Matarraz Sudon S, de Santiago M, Lima CS, Metze K, Giralt M, et al. Maturation-associated immunophenotypic abnormalities in bone marrow B-lymphocytes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2006;30(1):9-16.
27. Reis-Alves SC, Traina F, Saad ST, Metze K, Lorand-Metze I. The impact of several phenotypic features at diagnosis on survival of patients with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma*. 2010;57(6):530-6.
28. Lorand-Metze I, Califani SM, Ribeiro E, Lima CS, Metze K. The prognostic value of maturation-associated phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2008;32(2):211-3.
29. Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Br J Haematol*. 2011;153(4):421-36.
30. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012;26(7):1730-41.
31. Sandes AF, Kerbaui DM, Matarraz S, Chauffaille Mde L, Lopez A, Orfao A, et al. Combined flow cytometric assessment of CD45, HLA-DR, CD34, and CD117 expression is a useful approach for reliable quantification of blast cells in myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013 May;84(3):157-66.
32. Westers TM, van der Velden VH, Alhan C, Bekkema R, Bijkerk A, Brooimans RA, et al. Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. *Leukemia Research*. 2012;36(4):422-30.

33. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108(3):1037-44.
34. Satoh C, Dan K, Yamashita T, Jo R, Tamura H, Ogata K. Flow cytometric parameters with little interexaminer variability for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2008;32(5):699-707.
35. Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, Li Y, Chang A, Norwood TH, et al. Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(2):170-81.
36. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;60(1):1-13.
37. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, et al. 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*. 2003;102(1):394-403.
38. Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, Andersen M, Xiao Z, Raza A, et al. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leukemia Research*. 2008;32(2):215-24.
39. Cutler JA, Wells DA, van de Loosdrecht AA, de Baca ME, Kalnoski MH, Zehentner BK, et al. Phenotypic abnormalities strongly reflect genotype in patients with unexplained cytopenias. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(3):150-7.
40. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(3):154-68.
41. Pirruccello SJ, Young KH, Aoun P. Myeloblast phenotypic changes in myelodysplasia. CD34 and CD117 expression abnormalities are common. *Am J Clin Pathol*. 2006;125(6):884-94.
42. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic

syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer*. 2010;116(19):4549-63.

43. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*. 2008;111(3):1067-77.

44. Kusenda J. Quantitative identification of blood cell markers in human hematopoietic malignancies with diagnostic and prognostic significance. *Neoplasma*. 2008;55(5):381-6.

45. Falco P, Levis A, Stacchini A, Ciriello MM, Geuna M, Notari P, et al. Prognostic relevance of cytometric quantitative assessment in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2011;87(5):409-18.

46. Reis-Alves SC, Traina F, Harada G, Campos PM, Saad ST, Metze K, et al. Immunophenotyping in myelodysplastic syndromes can add prognostic information to well-established and new clinical scores. *PLoS One*. 2013;8(12):e81048.

47. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica*. 2012;97(8):1209-17.

48. Xu F, Guo J, Wu LY, He Q, Zhang Z, Chang CK, et al. Diagnostic application and clinical significance of FCM progress scoring system based on immunophenotyping in CD34+ blasts in myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(4):267-78.

49. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079-88.

50. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-65.

51. Pardanani A, Tefferi A. Cytogenetic risk stratification in myelodysplastic syndromes: are we there yet? *Journal of clinical oncology* 2012;30(21):2703-4.

52. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Nachtkamp K, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*. 2011;96(10):1433-40.

53. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Tuechler H, et al. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes

indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. J Clin Oncol. 2011;29(15):1963-70.

54. Schanz J, Tuchler H, Sole F, Mallo M, Luno E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. Journal of clinical oncology. 2012;30(8):820-9.

55. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY. 2007;25(23):3503-10.

56. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med. 2011 Jun 30;364(26):2496-506.

57. Thol F, Yun H, Sonntag AK, Damm F, Weissinger EM, Krauter J, et al. Prognostic significance of combined MN1, ERG, BAALC, and EVI1 (MEBE) expression in patients with myelodysplastic syndromes. Ann Hematol. 2012 Aug;91(8):1221-33.

58. Reis-Alves SC, Traina F, Saad ST, Lorand-Metze I. Imunofenotipagem nas síndromes mielodisplásicas: Seu valor para o seguimento dos pacientes. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular HEMO2010. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2010;32:171.

59. Reis-Alves SC, Campos PM, Traina F, Pereira-Cunha FG, Rocha FF, Lorand-Metze I. Multiparametric flow cytometry is able to disclose features predictive for disease progression in MDS. In: 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS). Leukemia Research. 2011;35:s126.

60. Reis-Alves SC, Rocha FF, Pereira-Cunha FG, Saad ST, Lorand-Metze I. Importância da análise imunofenotípica seriada nas síndromes mielodisplásicas. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular HEMO2013. Rev Bras Hematol Hemoter. 2013;35(1):223.

61. Olaru D, Campos L, Flandrin P, Nadal N, Duval A, Chautard S, et al. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes. Cytometry B Clin Cytom. 2008;74(1):17-24.

62. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23(3):379-90.
63. Della Porta MG, Lanza F, Del Vecchio L. Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80(4):201-11.
64. Chantepie SP, Cornet E, Salaun V, Reman O. Hematogones: an overview. *Leukemia Research.* [Review]. 2013 Nov;37(11):1404-11.
65. Ogata K, Kakumoto K, Matsuda A, Tohyama K, Tamura H, Ueda Y, et al. Differences in blast immunophenotypes among disease types in myelodysplastic syndromes: a multicenter validation study. *Leukemia Research.* 2012;36(10):1229-36.
66. Kern W, Bacher U, Schnittger S, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T. Multiparameter flow cytometry reveals myelodysplasia-related aberrant antigen expression in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013;84(3):194-7.

Anexos

9. ANEXOS

Anexo 1

QUESTIONÁRIO – Data da Coleta: __/__/__

Nome do Voluntário:

HC:

Data de nascimento:

Idade:

Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino

Origem étnica: ☐ Caucasiano ☐ Afro descendente ☐ Asiático Obs.:

Confirmar ou não se os exames abaixo foram realizados para excluir as doenças que simulam SMD

- ☐ SIM ☐ NÃO Avaliação das carências vitamínicas: dosagens de ferro sérico, transferrina e ferritina, ácido fólico e vitamina B12.
- ☐ SIM ☐ NÃO Avaliação da função da tireóide: dosagens de T4L e TSH.
- ☐ SIM ☐ NÃO Avaliação da função renal: uréia, creatinina e clearance da creatinina.
- ☐ SIM ☐ NÃO Avaliação da função hepática: transaminase, bilirrubinas, eletroforese de proteínas séricas e do tempo de protrombina.
- ☐ SIM ☐ NÃO Avaliação das doenças auto-imunes: células LE, fator anti-núcleo, fator reumatóide, fator anti-DNA, Coombs direto e indireto.
- ☐ SIM ☐ NÃO Avaliação das doenças infecciosas: sorologias para toxoplasmose, mononucleose infecciosa, hepatite B e C, citomegalovírus e HIV.
- ☐ SIM ☐ NÃO Investigação das doenças neoplásicas: raio-X tórax e ultrasonografia abdominal.
- ☐ SIM ☐ NÃO Investigação da hemoglobinúria paroxística noturna: teste de Ham e da sacarose.

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Imunofenotipagem nas Síndromes Mielodisplásicas: seu valor para seguimento dos casos e relevância prognóstica.

Responsáveis pelo projeto: SUIELLEN CARVALHO REIS ALVES

Profa. Dra. IRENE LORAND-METZE

Eu, _____, idade: _____, Data de Nascimento: _____, RG: _____, HC: _____, Residente à Rua/Av.: _____

_____, Telefone: _____.

Concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido (a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito de pesquisa: _____,

Idade: _____, RG: _____, Grau de Parentesco: _____,

Residente à Rua/Av. _____,

_____, Telefone: _____.

Trata-se de um estudo que pretende descrever as alterações de maturação da linhagem monocítica nas Síndromes Mielodisplásicas (SMD); será realizado com voluntários diagnosticados com SMD.

Deveremos coletar aproximadamente 2 ml de aspirado de medula para a análise imunofenotípica com a finalidade de comprovar alguma alteração na maturação da linhagem monocítica.

Eventualmente, o senhor(a) será reconvocado a comparecer ao hospital, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame imunofenotípico.

Os riscos a que o voluntário estará sujeito ao participar do estudo são equimose (mancha roxa) e/ou dor no local da aspiração medular. Este estudo não oferecerá ao voluntário outros riscos importantes.

O benefício esperado na sua participação seria a sua contribuição para melhor entendimento desta doença e conseqüentemente um diagnóstico mais eficaz.

Outras informações:

Haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação para comparecimento ao hospital, exclusivamente para a pesquisa.

O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.

O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que apareçam durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que este material possa ser armazenado.

Caso seja realizado um outro estudo com este material, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo deverá ser novamente submetido à apreciação do CEP.

Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e sua identidade será sempre preservada.

A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente em qualquer serviço de nosso hospital.

Qualquer tipo de queixa ou reclamação relacionada a esta pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, Fone: (19) 3521.8936.

Campinas ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Suiellen Carvalho Reis Alves
Aluna de pós-graduação
Telefone: (19) 3521-8671

Profa. Dra. Irene Lorand-Metze
Orientadora
Telefone: (19) 3521-8740

Anexo 3

Andamento do projeto - CAAE - 0627.0.146.000-09				
Título do Projeto de Pesquisa				
IMUNOFENOTIPAGEM NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS: SEU VALOR PARA O SEGUIMENTO DOS CASOS E RELEVÂNCIA PROGNOSTICA.				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	08/09/2009 10:12:05	15/10/2009 10:22:54		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	08/09/2009 10:12:05	Folha de Rosto	0627.0.146.000-09	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	27/08/2009 16:04:51	Folha de Rosto	FR286715	Pesquisador
3 - Protocolo Pendente no CEP	23/09/2009 09:17:17	Folha de Rosto	800/2009	CEP
4 - Protocolo Aprovado no CEP	15/10/2009 10:22:54	Folha de Rosto	800/2009	CEP

Anexo 4

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Cytometry: Part B - Clinical Cytometry*.

Manuscript ID:	14-011
Title:	A MODIFIED FLOW CYTOMETRIC SCORE SYSTEM IMPROVES THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS BETWEEN MDS AND NON-CLONAL PERIPHERAL CYTOPENIAS
Authors:	Reis-Alves, Suiellen Traina, Fabíola Saad, Sara Lorand-Metze, Irene
Date Submitted:	17-Feb-2014

 Print  Return to Dashboard

Anexo 5

Apoio Financeiro

- ✓ FAPESP proc. 04/08882-3
- ✓ CNPq/INCTS proc. 2008-57895/1
- ✓ FAEPEX proc. 1208/11
- ✓ Prêmio MDS Foundation (Tito Bastianello Young Investigator- 2009)
- ✓ Bolsa de pesquisa CNPq (Dra Irene Lorand Metze) proc. 302277/2009-9

Anexo 6



BOARD OF DIRECTORS

John M. Bennett, MD

University of Rochester
Rochester, New York, USA

David T. Bowen, MD

The Leeds Teaching Hospitals
Leeds General Infirmary
Leeds, United Kingdom

Mario Cazzola, MD

University of Pavia
School of Medicine
Pavia, Italy

Theo J.M. de Witte, MD, PhD

University Medical Center
Nijmegen St. Radboud
Nijmegen, The Netherlands

Elihu Estey, MD

Fred Hutchinson Cancer Research Center
University of Washington
Seattle Cancer Care Alliance
Seattle, Washington, USA

Pierre Fenaux, MD

Hôpital Avicenne, University Paris 13
Bobigny, France

Peter L. Greenberg, MD

Stanford University
School of Medicine
Stanford, California, USA

Terry Hamblin, DM, FRCP, FRC Path

Southampton University
Bournemouth, United Kingdom

Eva Hellström-Lindberg, MD, PhD

Karolinska Institute at
Huddinge University Hospital
Stockholm, Sweden

Kathy Heptinstall, BSN, RN

Operating Director
The MDS Foundation, Inc.

Alan F. List, MD

University of South Florida
Tampa, Florida, USA

Ghulam J. Mufti, MD

King's College Hospital
London, United Kingdom

Charlotte M. Niemeyer, MD

University Children's Hospital
Freiburg, Germany

Stephen D. Nimer, MD

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
New York, New York, USA

Robert J. Weinberg, Esq.

Pepper Hamilton LLP
Philadelphia, Pennsylvania, USA

Member Emeritus

Franz Schmalzl, MD

Innsbruck, Austria

MDS Headquarters:

36 Front Street, PO Box 353
Crosswicks, NJ 08515
Within the US: 1-800-MDS-0839
Outside the US: 609-298-6746
Fax: 609-298-0590

Suiellen Carvalho Reis-Alves
State University of Campinas
Campinas
Brazil

Dear Suiellen:

On behalf of the MDS Foundation, its Board of Directors, and Mrs. Francesca Bastianello, sponsor of the Tito Bastianello Young Investigator Awards we congratulate you on the exemplary research that led to your being chosen as a recipient of this prestigious award.

You have received or will receive the amount of 4,000€ for furthering your MDS research. These funds have been deposited into the account that you provided to us. This award can be used to defray your expenses for travel to the 10th International Symposium and the remainder is your honorarium.

We congratulate you on receiving this award and look forward to updates on your progress.

Sincerely,

A handwritten signature in purple ink that reads 'Kathy Heptinstall'.

Kathy Heptinstall

Operating Director

EU Office:

The Rayne Institute
Denmark Hill Campus
123 Coldharbour Lane
London SE5 9NU, UK
Tel/Fax: +44 20 7733 7558

Anexo 7

FCSS-R para SMD

Nome: _____ HC: _____
 Leu: _____ Hb: _____ Plaq: _____ %Bl: _____ N°cito: _____

A. Anormalidades Mielóides		B. Anormalidades Monocíticas	
	Diminuição SCC – IMF < 423		Diminuição SCC – IMF <166
	Diminuição da expressão de CD45 (IMF< 138)		Expressão anormal de HLA-DR
	Presença de HLA-DR na subpopulação (>10%)		Expressão anormal de CD11b
	Falta de expressão de CD33		Perda de CD13
	Falta ou deficiência de CD11b e/ou CD15		Falta de CD33 ou CD14
	Relação anormal entre CD13 e CD16		Falta de CD14
	Expressão de CD56 na subpopulação (>20%)		Presença de CD56 na subpopulação (>50%)
	Assincronismo de maturação desvio a esquerda		Aumento da % de monócitos(>3,6%) e/ ou aumento da % monócitos CD16 ⁺ (<0,48%)
	Presença de CD34 na subpopulação (>10%)		Presença de CD34 na subpopulação (>10%)
	Presença de antígenos linfóides na subpopulação (>10%)		Presença de antígenos linfóides na subpopulação (exceto CD4) (>10%)
Pontos Granulócitos =		Pontos Monócitos =	
C. Anormalidades de células CD34⁺			
	Aumento das células CD34 ⁺ (>1,60%)		
	Aumento da células CD34 ⁺ /CD13 ⁺ /CD117 ⁺ (>0,62%)		
	Diminuição das células CD34 ⁺ /CD19 ⁺ (<0,05%)		
Pontos células CD34⁺=			
D. Pontos adicionais			
	Presença de expressões anômalas: CD7(>0,09%)		
	Presença de expressões anômalas: CD56 (>0,05%)		
	Presença de outras expressões anômalas ou deficiência de antígenos nas células CD34 ⁺		
Pontos Adicionais =			
Total de pontos = _____		Categorias FCSS: _____	
A-normal/leve (0 or 2 pontos); B-moderado (3 - 5 pontos); C-severa (mais de 5 pontos)			