

SUIELLEN CARVALHO REIS ALVES

**AVALIAÇÃO MULTIPARAMÉTRICA POR CITOMETRIA
DE FLUXO DE UM PAINEL RACIONALIZADO DE
QUATRO CORES PARA O DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

**CAMPINAS
2009**

SUIELLEN CARVALHO REIS ALVES

**AVALIAÇÃO MULTIPARAMÉTRICA POR CITOMETRIA
DE FLUXO DE UM PAINEL RACIONALIZADO DE
QUATRO CORES PARA O DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica, área Ciências Básicas.*

Orientadora: Prof. Dra. Irene Lorand-Metze

**CAMPINAS
UNICAMP
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R277a Reis-Alves, Suiellen Carvalho
Avaliação multiparamétrica por citometria de fluxo de um painel racionalizado de quatro cores para o diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicas / Suiellen Carvalho Reis-Alves. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Irene Lorand-Metze
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndromes mielodisplásicas. 2. Citometria de fluxo. 3. Diagnóstico. 4. Prognóstico. 5. Imunofenotipagem. I. Lorand-Metze, Irene Gyongyver Heidemarie. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Multiparameter assessment by flow cytometry of a small four color panel for diagnosis of myelodysplastic syndrome

Keywords: • Myelodysplastic syndrome
• Flow cytometry
• Diagnosis
• Prognosis
• Immunophenotyping

Titulação: Mestre em Ciências Básicas

Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Irene Lorand-Metze

Profa. Dra. Mihoko Yamamoto

Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

Data da defesa: 28-09-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Suiellen Carvalho Reis Alves

Orientador: Prof^a. Dr^a. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze

2. Prof^a. Dr^a. Mihoko Yamamoto

3. Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

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

Data: 28/09/2009

DEDICATÓRIA

Ao meu pai José Reis e à minha mãe Irlei por todo amor, incentivo, apoio e confiança sem os quais não poderia chegar até aqui...

Aos meus sobrinhos, nunca desista dos seus sonhos...

Ao meu marido Paulo César pelo companheirismo, cuidado, paciência, incentivo e muito amor a mim dedicado desde o início desse sonho e em todas as outras circunstâncias...

AGRADECIMENTOS

A 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, pela confiança, dedicação, aprendizado e oportunidade. Toda a minha gratidão por sua compreensão e muita paciência. Pela sua iniciativa participamos do “Young Investigator” e ganhamos o prêmio, para mim foi uma grande experiência, que Deus continue te abençoando.

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 desde o início me incentivou. Obrigada pela sua amizade, carinho, conselhos e participação direta no desenvolvimento deste trabalho, por tudo que me ensinou sobre citometria de fluxo, pelo seu profissionalismo e caráter, de fato você é um referencial para mim.

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Celulares e Criopreservação, Alan, Mariana Rezende, Eliane, Soraia, Felipe, Suellen Sant’Ana, Rosangela, Mariana, Kauê, por toda amizade, carinho, momentos especiais, ajuda, compreensão e experiências compartilhadas, tanto pessoais como profissionais, vocês moram em meu coração.

Á Dra. Gislaíne e ao Dr. Afonso, por todo apoio, incentivo e confiança.

Á Eliana Miranda, por todo carinho, amizade e incentivo.

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

Aos amigos Arlete e Leonardo, por toda amizade e carinho que sempre me trataram. Obrigada pela paciência e por sempre me auxiliar na confecção dos pôsteres.

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

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, analisaram os mielogramas e acompanharam esses pacientes.

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

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

Á Grá, minha querida e amada amiga, companheira e conselheira. Te agradeço pela sua coragem de ter sonhado junto comigo, ter acreditado no sonho de vir para Campinas, por todos os momentos que tivemos juntas. Sabemos que grande foi o propósito do Senhor para isso. Essa conquista é nossa e faz parte desse sonho. Eu Amo você!

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e pela forma maravilhosa a qual me conduziram por este caminho que me permitiu chegar até aqui, com exemplos de perseverança e dedicação, um porto seguro o qual sempre pude contar, com uma fonte inesgotável de muito amor. Obrigada por tudo, eu amo vocês!!

A minha irmã Pollyanna, por toda confiança, amor e dedicação. Essa conquista também é sua e faz parte da nossa galeria de pinturas. Obrigada por tudo e por trazer mais cores a minha vida, eu amo você!!

Aos meus irmãos, 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.

Ao meu marido Paulo César, por ser um presente de Deus na minha vida, meu companheiro, meu conselheiro, meu amigo. Obrigada pelos seus cuidados, por sua muita paciência, por sempre me incentivar e sonhar comigo. 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 e á FAPESP, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

“... pelo seu grandioso poder operando em nós [Deus] é capaz de fazer muito mais do que nós jamais ousaríamos pedir ou mesmo imaginar, infinitamente além de nossas mais sublimes orações, anseios, pensamentos ou esperança.”

Ef. 3:20 BV.

RESUMO

A análise multiparamétrica por citometria de fluxo é útil para o diagnóstico diferencial de Síndromes Mielodisplásicas (SMD) nos casos com poucos elementos displásicos na medula óssea (MO) e cariótipo normal. Vários estudos têm relatado hipogranularidade dos granulócitos, anormalidades no padrão de expressão de antígenos, alterações nas quantidades e expressões anômalas nas células CD34⁺, assim como uma diminuição das células precursoras-B, além do aumento dos monócitos. No entanto, não há um consenso sobre qual o melhor painel a ser aplicado, pois, os painéis geralmente utilizados incluem um grande número de anticorpos monoclonais (AcMo).

Neste estudo, a utilidade de um painel racionalizado (10 AcMo) foi avaliada, em combinações de quatro cores, na rotina laboratorial, permitindo o estudo de diversos parâmetros para o diagnóstico de SMD, podendo sugerir fatores prognósticos.

Foi examinado MO de pacientes com diagnóstico recente de SMD. O diagnóstico foi baseado na contagem de sangue periférico, citologia de medula óssea e cariótipo. O critério OMS foi utilizado. Foram analisados: dispersão lateral da luz (side scatter –SSC) e padrão de maturação dos granulócitos e dos monócitos, além dos subtipos presentes na população de células CD34⁺, sendo estas características comparadas com a MO normal. As combinações de AcMo utilizadas foram: HLA-DR/CD14/CD45/CD33; CD16/CD34/CD45/CD13; CD19/CD34/CD45/CD117 e HLA-DR/CD123/CD45/CD33. No mínimo 50.000 eventos/caso foram adquiridos.

Este estudo incluiu 24 casos de MO normal e 54 casos de SMD com idade mediana de 62 anos (23-93). Os tipos OMS foram 2 casos de AR, 2 SMD del 5q, 25 CRDM, 8 CRDMSA, 7 AREB-I, 10 AREB-II. Os casos foram grupados em SMD com <5% de blastos (baixo risco) e SMD >5% de blastos (alto risco) para análise e comparados com MO normal.

Foram detectadas 16 alterações: 4 nos precursores granulocíticos, 4 nos monócitos, 6 na população de blastos como o aumento das células CD34⁺, mieloblastos e células imaturas não definidas, diminuição dos precursores de células B, e 2 nas populações minoritárias. O total de número de alterações em casos com < 5% de blastos na MO foram de 6 (2-15) e nas SMD de alto risco 8(4-12). O aumento do número de alterações foi proporcional à

porcentagem de blastos na citologia ($r = 0.38$; $p = 0.001$), porcentagem de células $CD34^+$ ($r = 0.40$; $p < 0.001$), células $CD34^+/CD13^+$ ($r = 0.61$; $p < 0.0001$), e com as células imaturas não linfóides $CD34^+/CD13^-$ e $CD34^+/CD117^-$ ($r = 0.30$ $p = 0.02$ e $r = 0.55$ $p = 0.0003$, respectivamente). Os precursores de células-B ($r = -0.39$; $p = 0.001$) e a hemoglobina ($r = -0.30$; $p = 0.001$) diminuíram de acordo com a extensão do número de alterações. Houve correlação entre o número de alterações com o tipo OMS ($r = 0.38$; $p = 0.002$) e o IPSS ($r = 0.27$ $p = 0.02$).

Mesmo com o uso de um painel restrito de 10 AcMo, concluiu-se que este painel foi suficiente para fazer o diagnóstico em 91% dos casos, e permitiu detectar características associadas com a agressividade dos casos.

ABSTRACT

Flow cytometric analysis is useful for the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) in cases of few dysplastic elements in bone marrow (BM) and a normal karyotype. Several studies have reported decreased side scatter (SSC) in the granulocytic gate, abnormalities in the maturation pattern antigens, number and abnormal co-expressions in CD34⁺ cells besides decreased of B-cell precursors and increased of monocytes. There is no uniformly accepted panel for these analyses that usually comprise a large number of monoclonal antibodies (MoAbs). We examined the utility of a small panel of MoAbs in four-color combinations, used routinely in our laboratory that allows the evaluation of several parameters for the diagnosis of MDS and may suggest prognostic factors.

Bone marrow aspiration was performed in the diagnostic routine. The diagnosis was based on peripheral blood counts, BM morphology and karyotype. The WHO criteria were used. We examined: SSC and maturation pattern of granulocytes and monocytes; subsets present in the CD34⁺ population. These features were compared to the values found in normal BM. Combinations of MoAbs:HLA-DR/CD14/CD45/CD33; CD16/CD34/CD45/CD13; CD19/CD34/CD45/CD117; HLA-DR/CD123/CD45/CD33. At least 50 000 events/case were acquired. Data were acquired in a FACS CaliburTM flow cytometer and the Paint-A-Gate software was used for data analysis.

Normal BMs: 24 cases; MDS 54 cases. Median age: 62 years (23-93). WHO types: 2 RA, 2 MDS del 5q, 25 RCMD, 8 RCMD-RS, 7 RAEB-I, 10 RAEB-II. We could detect 16 alterations: 4 in granulocytic precursors, 4 in monocytes, increase in CD34⁺ cells, myeloblasts and not defined immature cells, decrease in B-cell precursors, changes in precursor lymphoid dendritic cells and basophilic precursors. The total number of changes in cases with <5% BM blasts was 6 (2-15) and in RAEB 8 (4-12). The number of alterations had a positive correlation with the WHO type, IPSS, %blasts (cytology) ($r=0.38$; $p=0.001$), %CD34⁺ cells ($r=0.40$; $p=0.001$), CD34⁺/CD13⁺ cells ($r=0.61$; $p<0.0001$), but also non-lymphoid immature cells (CD34⁺/CD13⁻ $r=0.30$; $p=0.02$ e CD34⁺/CD117⁻ $r=0.55$; $p=0.0003$). The B-precursors cells and hemoglobin decreased with the increase of number alterations ($r=-0.39$; $p=0.001$ and $r=-0.30$; $p=0.01$ respectively). We conclude that our

panel, although small, was sufficient to make the diagnosis of MDS in 91% of our cases, and permitted to detect features associated with aggressive cases.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
AcMo	Anticorpos Monoclonais
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
Bl	Blastos medulares
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
DMP	Doença Mieloproliferativa
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
F	Feminino
FAB	French-American-British
FIG	Figura
FITC	Isitiocianato de Fluoresceína
Hb	Hemoglobina
ICUS	Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado
IMF	Índice Médio de Fluorescência
IPSS	Intenational Prognostic Sistem of Score
Leu	Leucócitos

LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
M	Masculino
mL	Mililitro
MO	Medula Óssea
MoAbs	Anticorpos Monoclonais
NR	Neutropenia Refratária
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Piridina de Clorofila
Plaq	Plaquetas
rpm	Rotações por minuto
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SMD-U	Síndromes Mielodisplásicas –inclassificáveis (unclassification)
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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Medula óssea normal - Os granulócitos (vermelho) são CD45 positivo e possuem o SSC alto. Os monócitos (verde) têm expressão forte de CD45 e SSC intermediário. Os eritroblastos (azul) são CD45 negativo e têm o SSC baixo. A região de blastos (amarelo) é identificada por uma expressão intermediária de CD45 e um SSC intermediário e/ou baixo. Os linfócitos (violeta) caracterizam-se pela expressão forte de CD45 e pelo SSC baixo.... 62

Figura 2: Medula óssea normal - Cinco estágios de diferenciação são distinguidos baseados no aumento gradual da expressão de CD16 e da expressão dinâmica do CD13 em combinação com as características do SSC (A). Amarelo: mielomonoblastos; Vermelho: Promielócitos; Verde: mielócitos; Violeta: metamielócitos; Azul: Neutrófilos. (B) Expressão do antígeno CD13 nos mielomonoblastos, promielócitos, mielócitos..... 63

Figura 3: Medula óssea normal - A população monocítica é selecionada no plot HLA-DR/CD14 (A-B): monócitos em verde; precursor de células dendríticas mielóide em vermelho. A expressão dos antígenos CD33 e HLA-DR foram analisadas nesta combinação HLA-DR/CD14/CD45/CD33 (C)..... 63

Figura 4: Medula óssea normal - As células CD34+ foram identificadas no plot SSC/CD34 (A) pela expressão forte do antígeno CD34. Por esta estratégia é possível separar dois subtipos de células nas MO normais: o subtipo 1 com SSC alto (vermelha e verde) e o subtipo 2 com SSC baixo (azul). A distribuição das células CD34+ foram visualizadas no plot SSC/CD45 (B)..... 64

Figura 5: Medula óssea normal - A combinação CD34/CD117 permite analisar a maturação precoce dos mieloblastos. Células imaturas CD34+(verde); mieloblastos CD34+CD117+ (vermelha); promielócitos CD117+ (azul) 65

Figura 6: Medula óssea normal - Nesta combinação foi possível identificar os subtipos 1 e 2 (CD16FITC/CD34PE/CD45PERCP/CD13APC). No plot CD34/CD13 foi detectado três

populações: SSC baixo/CD34⁺/CD13⁻ (azul); SSC alto/CD34⁺/CD13⁻ (verde) e SSC alto/CD34⁺/CD13⁺ (vermelha). 65

Figura7: Medula óssea normal - Estratégia adotada (A-C) para seleção de células dendríticas linfóides (vermelha) e precursores de células basofílicas (verde) 66

Figura 8: Exemplos de hipogranulação (diminuição do SSC) encontrada em AREB. A) distribuição da população de granulócitos no plot SSC/CD45. B) Análise do SSC em promielócitos e mielócitos..... 75

Figura 9: A) Padrão de maturação CD13/CD16 em controle normal. B) CRDM com alteração do padrão de maturação com diminuição da expressão do CD13 nos metamielócitos e neutrófilos. C) AREB com desordem do padrão de maturação CD13/CD16..... 76

Figura 10: A) Padrão de maturação CD33/HLA-DR em controle normal. B) CRDM com população anômala com diminuição de CD33. C) AREB com diminuição da expressão de CD33..... 77

Figura 11: A) Controle normal - Granulócitos (vermelho) e monócitos (verde). B) AREB com expressão anômala de CD34 em granulócitos e monócitos..... 77

Figura 12: Representação gráfica das combinações CD13⁺CD34⁺ e CD117⁺CD34⁺ em AREB-1. A) aumento dos mieloblastos (verde) CD13⁺CD34⁺ e diminuição das hematogonias (preto). B) aumento dos mieloblastos CD117⁺CD34⁺ e diminuição das hematogonias (preto). 82

Figura 13: Representação gráfica da combinação CD34/CD19. A) MO com distribuição normal de progenitores B. B) Caso de CRDM demonstrando a diminuição/ausência das células CD34⁺/CD19⁺ 84

Figura 14: Representação gráfica da diminuição das células progenitoras B em relação às células totais (A) e entre todas as células CD34⁺ (B)..... 84

Figura 15: Representação gráfica da distribuição do número de alterações imunofenotípicas nos grupos de SMD de baixo risco e de alto risco..... 88

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Classificação FAB.....	40
Quadro 2: Classificação OMS 2001	41
Quadro 3: Classificação OMS 2008	43
Quadro 4: Classificação IPSS das SMD ^{12,13}	44
Quadro 5: Critérios diagnósticos mínimos em SMD	46
Quadro 6: Anticorpos monoclonais usados para imunofenotipagem das SMD.....	60
Quadro 7: Painel de quatro cores de anticorpos monoclonais para SMD	61
Tabela 1: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com SMD.....	71
Tabela 2: Classificação das SMD segundo a classificação OMS ⁹	72
Tabela 3: Alterações citogenéticas encontradas.	72
Tabela 4: Classificação prognóstica das SMD de acordo com o IPSS.....	73
Tabela 5: Expressão de antígenos de maturação nos granulócitos de SMD comparados com normal.	74
Tabela 6: Frequência do número de alterações detectadas na população granulocítica.....	78
Tabela 7: Expressão de antígenos nos monócitos de SMD comparados com normal.	78
Tabela 8: Frequência do número de alterações detectadas na população monocítica.....	80
Tabela 9: Medianas dos parâmetros fenotípicos analisados em todos os grupos.	81
Tabela 10: Frequência do número de alterações detectadas na população de blastos.....	85
Tabela 11: percentagem de precursores minoritários de SMD comparados com controle normal.	86
Tabela 12: Frequência de alterações observadas no estudo	87

SUMÁRIO

RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxvii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xxxiii
1. INTRODUÇÃO.....	39
Classificação.....	40
Avaliação prognóstica nas SMD	44
Critérios diagnósticos mínimos	45
ICUS: Citopenia idiopática de significado indeterminado	46
Citometria de Fluxo nas SMD	47
Análise multiparamétrica por citometria de fluxo.....	49
2. JUSTIFICATIVA	55
3. OBJETIVOS.....	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
Casuística.....	59
Materiais e Reagentes.....	59
Imunofenotipagem.....	60
Preparação das amostras para imunofenotipagem.....	61
Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo.....	61
Análise estatística:	68
5. RESULTADOS	71
Características Clínicas dos Pacientes com SMD	71
Análise por citometria de fluxo	73
Total de alterações imunofenotípicas na SMD.....	86
6. DISCUSSÃO	93
7. CONCLUSÕES	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9. ANEXOS	115

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são distúrbios clonais hematológicos caracterizados por diminuição periférica dos elementos celulares, atipia 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 e hematopoiese ineficiente.²

As SMD ocorrem predominantemente em pacientes idosos.¹ A incidência desta doença aumentou durante a última década, sobretudo em indivíduos com idade média de 65-70 anos, devido ao aumento populacional deste grupo.³ Nos países da Europa e nos Estados Unidos a idade mediana dos pacientes é de cerca de 70 anos. Em um estudo com 150 pacientes com diagnóstico confirmado de SMD, realizado pelo grupo de Campinas-SP, foi observada idade mediana de 58 anos, semelhante ao que ocorre no Japão (60 anos), Coréia (57 anos), China (80 anos) e Turquia (44 anos).¹

A anemia nesta faixa etária é um achado clínico comum e freqüente, contudo pode apresentar várias causas. O ambiente medular que sofre alterações próprias do envelhecimento favorece o surgimento de clones anormais e conseqüentemente o desenvolvimento de mielodisplasias.³

As SMD apresentam alterações na diferenciação dos progenitores de uma ou mais linhagens. Tais danos estão freqüentemente relacionados com a incapacidade dos progenitores neoplásicos de se diferenciar em células sanguíneas maduras e com a supressão dos progenitores residuais normais pelo clone neoplásico. O acúmulo de defeitos na célula tronco impede a hematopoiese normal. Depois dos danos iniciais, sejam por toxinas ou mutações à células progenitoras, várias alterações adicionais favorecem sua vantagem proliferativa.^{15, 15-17}

A presença de qualquer defeito no microambiente medular pode prejudicar a capacidade de manter a hematopoiese em pacientes com SMD. Há evidências de que citocinas inibitórias tenham participação na fisiopatologia da hematopoiese ineficaz. Postula-se que as células do clone anormal interagem com as células do estroma medular e células imunes, levando à produção exacerbada de $TNF\alpha$, $TGF\beta$, $IL1\beta$, causando

inflamação da medula óssea. Com esta elevada produção de citocinas há prejuízos fatais as células normais e o clone anormal se prolifera.^{3,5,6}

Classificação

A classificação inicial das SMD foi realizada pelo grupo French- American- British (FAB) que propuseram critérios diagnósticos para seu reconhecimento.⁷ A classificação foi descrita em 1982 e revisada em 1985, sendo utilizada como guia para melhor compreensão desse grupo heterogêneo de desordens.⁷⁻⁸ 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) (quadro 1). Estas duas últimas desordens são consideradas de alto risco e tem maior probabilidade de evoluir para leucemia mielóide aguda.⁷⁻⁸

Quadro 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 1997, sob o conselho da Organização Mundial de Saúde (OMS), um grupo de morfologistas e clínicos propôs uma nova classificação das SMD, que correlaciona os dados da citogenética aos parâmetros clínicos, morfológicos e citoquímicos utilizados na classificação FAB.⁸

Em 2001, a OMS propôs uma nova classificação das SMD, com modificações significativas nos diversos subgrupos FAB^{1,8-9}. Nesta classificação é reconhecida a importância da displasia multilineagem nos grupos de baixo risco (<5% de blastos) com duas novas categorias; citopenia refratária com displasia multilineagem (CRDM) e a citopenia refratária com displasia multilineagem com sideroblasto em anel (CRDM-SA).^{1,8-9}

Quadro 2: Classificação OMS 2001

Tipo	Sangue Periférico	Medula óssea
Anemia refratária (AR)	Anemias, blastos <1%	Displasia apenas na linhagem eritroblástica, <5% de blastos
Anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA)	Anemias, Ausências de blastos	Displasia apenas na linhagem eritroblástica, <5% de blastos, $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasias multilineagem (CRDM)	Bi ou pancitopenia, blastos <1%	Displasias em $\geq 10\%$ das células de duas ou mais linhagens, <5% de blastos
Citopenia refratária com displasia multilineagem e sideroblasto em anel (CRDMSA)	Bi ou pancitopenia, blastos <1%	Displasias em $\geq 10\%$ das células de duas ou mais linhagens, <5% de blastos e $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blastos – 1 (AREB-1)	Bi ou pancitopenia, blastos <5%	Displasia uni ou multilineagem 5%-9% de blastos
Anemia refratária com excesso de blastos – 2 (AREB-2)	Bi ou pancitopenia, blastos <5% - 19%, Monócitos < 1000/mm ³	Displasia uni ou multilineagem 10%-19% de blastos
Síndrome mielodisplásicas inclassificável	Neutropenia, ou plaquetopenia, blastos raros ou ausentes	Displasia unilinhagem, blastos <5%
Síndrome 5q-	Anemia, plaquetas normais ou elevadas < 1% blastos	Megacariócitos em números normal e elevado com núcleos unilobulados, blastos <5%, 5q-

As categorias AR e ARSA foram restritas as displasias eritróides com menos de 10% de displasia nas linhagens mielóides ou megacariocíticas. A modificação mais

impactante e controversa proposta pela OMS foi a diminuição do limite do número de blastos para o diagnóstico de LMA (de 30% para 20%), desaparecendo assim a categoria AREB-T. A AREB foi dividida em dois grupos: AREB-1, com blastos 5%-9%, e AREB-2 com blastos entre 10%-19% ⁸⁻⁹(quadro 2).

Esta classificação reconhece a importância da citogenética por adicionar a síndrome do 5q- como um grupo separado de bom prognóstico com baixo risco de transformação leucêmica e características clínicas bem definidas ⁸⁻⁹. A citometria de fluxo pode ajudar a identificar pacientes 5q- com alterações imunofenotípicas adicionais.¹⁶

A categoria de SMD inclassificável também é adicionada nesta nova classificação. A LMMC foi incorporada em uma nova categoria: doenças mieloproliferativas/mielodisplásicas, e retirada da classificação de SMD.⁸⁻⁹

Em 2008, os critérios diagnósticos da OMS foram revisados e publicados, com algumas modificações na classificação das SMD. As citopenias refratárias com displasia de única linhagem (CRDU) foram incluídas na classificação e contemplam esta categoria as AR, neutropenias refratárias (NR) e as trombocitopenias refratárias (TR). Os casos de NR e TR eram previamente agrupados como SMD inclassificável.¹⁰⁻¹¹

A fusão da CRDM e CRDM-SA em uma única categoria; a renomeação da síndrome 5q- para SMD associada com del (5q) isolada e uma melhor padronização para definição das SMD inclassificáveis, bem como a criação de uma entidade provisória de citopenia refratária na infância, também estão incluídas nas modificações feitas em 2008.¹⁰⁻¹¹

Avanços importantes com esta nova classificação foram evidenciados com o reconhecimento da necessidade de se padronizar o diagnóstico e classificação das SMD. Estabelecer requisitos mínimos, critérios diagnósticos, critérios adicionais, como achados de citometria de fluxo, citogenética e de marcadores moleculares, pode ser o meio para esta padronização^{10-11,14-15} (quadro 3).

Quadro 3: 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.		

Avaliação prognóstica nas SMD

As diferentes categorias OMS possuem características prognósticas e curso clínico que variam entre os pacientes com SMD. Enquanto alguns casos se transformam em leucemia ou evoluem para óbito por complicações de falência medular, outros não apresentam maiores problemas clínicos, e o tempo de sobrevida é mais longo.¹²⁻¹³

Para estratificar os pacientes de acordo com suas características biológicas e clínicas, um sistema de escore baseado em parâmetros prognósticos tais como: percentagem de blastos, cariótipo e número de citopenias; foi introduzido por Greenberg e colaboradores em 1997. Esse sistema conhecido como International Prognostic Scoring System (IPSS) é reconhecido como padrão ouro para avaliação de risco de pacientes com SMD de novo, e amplamente utilizado para estratificar os pacientes.¹²⁻¹³(quadro 4)

Quadro 4: Classificação IPSS das SMD^{12,13}

IPSS baseado em	
Porcentagem de células blásticas na MO (% blastos)	Escore IPSS
<5%	0,0
5%-10%	0,5
11%-20%	1,5
21%-30%	2,0
Características Citogenéticas (cariótipo)	Escore IPSS
Prognóstico favorável (normal, -y, 5q-, 20q-, 12p-, +21, 11q-, t(11)(q23), 2 anormalidades incluindo 5q-)	0,0
Prognóstico intermediário (+1q, anormalidades 3q21/q26-, +8, t(7q), +19, -21, -x)	0,5
Prognóstico desfavorável (anormal, 7q-, complexo > 3 anormalidades)	1,0
Citopenias	Escore IPSS
Nenhuma ou 1	0,0
2 ou 3	0,5

Escore IPSS Global e Sobrevida	
Escore IPSS Global	Sobrevida (anos)
Baixo (0)	5,7
Intermediário 1 (0,5 ou 1,0)	3,5
Intermediário 2 (1,5 ou 2,0)	1,2
Alto ($\geq 2,5$)	0,4

Crítérios diagnósticos mínimos

O diagnóstico de SMD na maioria dos pacientes é baseado nos critérios OMS. Contudo, em muitos casos com citopenias pode ser difícil estabelecer ou excluir o diagnóstico de SMD. Esses casos incluem: pacientes sem anormalidades citogenéticas e somente com citopenia suave, pacientes com cariótipo típico e citopenias, mas com discreta ou ausente displasia e pacientes com anemia macrocítica com dependência transfusional sem anormalidades cariotípicas e sem diagnóstico de displasia.¹⁴⁻¹⁶

Em 2007¹⁴ foram propostos critérios mínimos de diagnóstico suficientes para atender a condição de SMD como nas situações relatadas acima. Estes critérios mínimos são definidos pela introdução de dois pré-requisitos que obrigatoriamente devem ser contemplados, três critérios decisivos nos quais pelo menos um deve ser cumprido para atender a condição de SMD e vários critérios adicionais que podem auxiliar na definição diagnóstica (quadro 5).

O diagnóstico de SMD pode ser estabelecido quando ambos pré-requisitos e pelo menos um critério decisivo são contemplados. Nos casos em que os critérios decisivos não são atendidos, mas, provavelmente, o paciente é acometido por uma desordem mielóide clonal, os critérios adicionais podem ser aplicados e podem auxiliar na definição diagnóstica.¹⁴

Quadro 5: Critérios diagnósticos mínimos em SMD

(A) Critérios pré-requisitos

Constante citopenia em 1 ou mais linhagens: eritróide, neutrofílica ou megacariocítica

Exclusão de todas as outras desordens hematológicas e não hematológica 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

Anormalidade fenotípica 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.

ICUS: Citopenia idiopática de significado indeterminado

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. 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.¹⁴⁻¹⁶

A citometria de fluxo é proposta como uma ferramenta extremamente útil no aperfeiçoamento diagnóstico, pois permite refinar e/ou distinguir uma SMD precoce de uma ICUS devido a sua habilidade de quantificar os blastos de forma precisa, analisar as anormalidades desta população blástica e distinguir anormalidades imunofenotípicas da maturação mielomonocítica.¹⁴⁻¹⁶

Citometria de Fluxo nas SMD

As análises multiparamétricas por citometria de fluxo das células da medula óssea foram introduzidas como um importante critério adicional. A probabilidade dos casos de SMD pode aumentar com o número de anormalidades encontradas pelos testes adicionais, mas na ausência de displasia morfológica ou não havendo aumento de blastos o diagnóstico de SMD não deve ser estabelecido.¹⁴⁻¹⁶

Estas análises multiparamétricas são uma ferramenta útil para auxiliar no diagnóstico das SMD nos casos com poucos elementos displásicos e cariótipo normal. Estudos recentes revelam que a avaliação quantitativa e qualitativa dos multiparâmetros obtidos por citometria de fluxo como a maturação das células mielo-monocíticas e células progenitoras CD34⁺ são de grande importância para o avanço no diagnóstico e prognóstico das SMD.¹⁷⁻²⁴

Inicialmente a análise por citometria de fluxo nas SMD era restrita a caracterização das células blásticas nas LMA secundárias a SMD. Entretanto, atualmente sabe-se que a dispoiese mielóide e monocítica identificadas como anormalidades imunofenotípicas pela citometria de fluxo, correlacionam com o IPSS, dependência de transfusão e tempo de progressão da SMD, e com o resultado depois do transplante de células hematopoiéticas.¹⁴⁻¹⁶

Estudos recentes indicam que a abordagem da análise por citometria de fluxo é reproduzível e permite identificar alterações específicas tanto em compartimento maduro como imaturo dentre as diferentes linhagens celulares hematopoiéticas na medula óssea.¹⁴⁻¹⁶

Dados preliminares mostraram que a citometria de fluxo pôde contribuir para identificar os pacientes com displasia unilinhagem, de acordo com a classificação WHO, (AR ou SMD-U) que apresentam alterações imunofenotípicas em multilinhagens. Isto pode

ter um impacto numa melhor classificação das SMD, incluindo os critérios da citometria de fluxo. Os casos de AR ou SMD-U com aberrações imunofenotípicas em multi-linhagens, seriam reclassificadas como CRDM não detectáveis por avaliações citológicas de rotina.¹⁴⁻¹⁶

Um processo neoplásico é marcado pela diferença na expressão de antígenos quando comparado com a expressão normal. Nas SMD, expressões anormais são mais observadas em células maduras.^{14-16,22}

A sincronização e a regulação da expressão de antígenos são distorcidas em vários graus nas SMD, de modo que, à medida que a doença se desenvolve há uma progressiva e concomitante perda da regulação da expressão dos antígenos.^{14-16,22}

Portanto, é improvável que uma única anormalidade de expressão antigênica seja evidência de displasia, uma vez que muitas desordens não clonais podem conter uma única aberração antigênica. O acúmulo de anormalidades e não uma anormalidade individual tem sido relacionado com as SMD.^{14-16,22}

O foco da citometria de fluxo nas SMD é nos mieloblastos, na maturação das células mielóides e monocíticas. A investigação das células eritróides e megacariócitos por citometria de fluxo nas SMD é limitado, sendo necessário a realização de mais estudos para avaliar o valor diagnóstico e o prognóstico da análise dessas células.¹⁴

Em geral, a citometria de fluxo pode contribuir no diagnóstico, prognóstico e monitoração das SMD pela:¹⁴⁻¹⁶

- ✓ Contagem correta de mieloblastos junto as bases do perfil antigênico;
- ✓ Identificação de mieloblastos anormais, tanto na medula com mais de 5% de blastos, como na medula com menos que 5% de blastos;
- ✓ Reconhecimento das mudanças displásicas imunofenotípicas na maturação de células mielóides e monocíticas;
- ✓ Quantificação ou pontuação de anormalidades para prognóstico em estudos clínicos.

As diretrizes estabelecidas no consenso de 2006 ressaltam a complexidade das análises nas medulas mielodisplásicas e enfatizam a necessidade de melhorar o sistema de classificação que inclua os dados das análises multiparamétricas por citometria de fluxo.¹⁴⁻

Análise multiparamétrica por citometria de fluxo

Pela análise multiparamétrica, muitos estudos têm descrito algumas alterações que são consideradas específicas de SMD tais como perda parcial ou total de um antígeno em pelo menos 10% das células de interesse; bloqueio no processo de maturação com expressão homogênea, assincronismo de maturação, expressões aberrantes de antígenos e hipogranularidade^{23,37,38}, anormalidades quantitativas e qualitativas nas células CD34⁺, além da diminuição das células precursoras B e do aumento de monócitos.^{17,20-21,23,26,29-30}

Vários tipos de fenótipos aberrantes foram detectados nos mieloblastos tais como a expressão aberrante de antígenos de linhagem cruzada e assincronismo de maturação, o que também é encontrado em leucemia mielóide aguda (LMA)^{5,30-32,34-35}, algumas delas foram associadas com a progressão da doença ou com menor sobrevida^{17,19,22-24}.

Estudos recentes demonstraram uma diminuição das células precursoras B nas SMD^{20-21,36-38}. Esta característica tem sido proposta como um parâmetro facilmente reproduzível para diagnóstico e útil para diagnóstico diferencial entre SMD de baixo risco com cariótipo normal e desordem não clonal com presença de citopenias periféricas²¹⁻³⁷.

Entretanto, Ogata e colaboradores²⁰ e Matarraz e colaboradores³⁸ demonstraram que a redução destas células não é suficiente para um diagnóstico apropriado e que se faz necessário a avaliação das expressões aberrantes nas células CD34⁺, pois a seqüência da expressão de antígenos durante a maturação é freqüentemente desordenada nas SMD, o que resulta em uma variedade de fenótipos aberrantes nas células CD34⁺. Desarranjos similares a estes estão estabelecidos nas LMAs.

Recentemente Pirucello e colaboradores²³, ressaltaram que a relativa proporção das células CD34⁺/CD117⁺ entre todas as células CD117⁺ é um importante marcador para a progressão da doença, indicando o bloqueio de maturação. Seu estudo mostrou anormalidades no perfil de expressão do CD34/CD117 presentes em 50% da anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), 63% das citopenias refratárias com displasia de multilinhagens (CRDM) e 100% das anemias refratárias com excesso de blastos (AREB). Demonstrando que estas anormalidades também estão associadas com o aumento do grau da doença. Este estudo mostra a utilidade dessa avaliação na citometria de fluxo para o diagnóstico de SMD.

Lorand-Metze e colaboradores¹⁷ verificaram um aumento do componente monocítico na medula óssea de pacientes com SMD, apresentando alterações na expressão do CD16, CD13, CD11b e CD64, além do aumento da população condizente às células dendríticas^{23,30,39}.

Wells e colaboradores¹⁹ caracterizaram 115 MO de pacientes com SMD e de acordo com o fenótipo e as características de dispersão foi desenvolvido um sistema de pontuação das anormalidades detectadas por citometria de fluxo. Dos pacientes estudados 90 (78%) tiveram anormalidades tanto no compartimento mielóide como no monocítico, ou em ambos; isoladas ou combinadas com presença de mieloblastos fenotipicamente anormais. A anormalidade mais comum foi a presença de mieloblastos fenotipicamente anormal (62%). A mais freqüente alteração fenotípica na maturação de células mielóides e monocíticas foram a relação anormal entre CD13 e CD16 nas células mielóides (23%), assincronismo de desvio a esquerda (23%), e presença de CD56 na maturação de células mielóides (16%) e monocíticas (17%). Sessenta e nove pacientes (69%) tiveram mais de uma anormalidade.

A aplicação da citometria de fluxo nas SMD foi avaliada por van de Loosdrecht e colaboradores⁴⁰ e os resultados foram correlacionados com os padrões atuais de diagnóstico e com os parâmetros de avaliação de risco. Em 49 pacientes diagnosticados com SMD, de acordo com o critério OMS, foram observadas expressões aberrantes de antígenos em uma ou mais sub-populações.

O estudo de Stachurski e colaboradores⁴¹ demonstrou a utilidade da análise por citometria de fluxo com 4 cores na avaliação de rotina das SMD e SMD/ DMP em uma série de 248 aspirados de MO de pacientes com citopenias inexplicáveis e/ ou monocitoses. Este estudo focou as populações mielomonocítica da MO, e as separou em blastos, células mielóide e células monocíticas, mostrando que a análise por citometria de fluxo multiparamétrica no diagnóstico de displasia mielóide é altamente sensível.

Estes estudos indicam que a análise por citometria de fluxo pode contribuir significativamente para o diagnóstico e prognóstico das SMD. A aplicação da citometria de fluxo multiparamétrica no diagnóstico, prognóstico e monitoração das SMD requer um consenso de um painel mínimo de anticorpos necessários para classificar sub-populações específicas medulares, enumerando células blásticas e detectando displasias imunofenotípicas associadas às linhagens.¹⁶ A aplicação de um amplo painel de anticorpos

para o estudo do padrão anormal de maturação das células mielomonocíticas demonstrou valor diagnóstico nas SMD⁴¹.

Atualmente, não há uma conformidade de painel aceito para estas análises, pois análises multiparamétricas realizadas para detectar as anormalidades fenotípicas variam grandemente nos painéis de anticorpos utilizados, o que geralmente incluem um grande número de anticorpos monoclonais, métodos analíticos e critérios diagnósticos.

Justificativa e Objetivos

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que:

- A análise multiparamétrica por citometria de fluxo é útil para o diagnóstico de SMD;
- Vários estudos têm relatado a diminuição do SSC nos granulócitos, anormalidades nos padrões de expressão dos antígenos, número e co-expressão anormal nas células CD34⁺, além da diminuição dos precursores de células B e aumento de monócitos;
- Atualmente, não há um consenso de painel aceito para estas análises, os que são utilizados incluem um grande número de anticorpos monoclonais.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- Examinar a utilidade diagnóstica de um painel racionalizado de anticorpos monoclonais na combinação de quatro cores para o diagnóstico de SMD;
- Avaliar se os parâmetros fornecidos são úteis para o diagnóstico de SMD;
- Sugerir fatores prognósticos;
- Propor este painel para a rotina laboratorial de diagnóstico de SMD.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico recente de SMD, atendidos pelo Serviço de Hematologia – Hemocentro – Unicamp, foram examinadas e comparadas com a medula normal de doadores para transplante alogênico de medula óssea.

O diagnóstico de SMD foi feito baseado na contagem de sangue periférico, esfregaço citológico de medula óssea corado com May-Grünwald Giemsa e com Perls, além do cariótipo.

Os critérios mínimos de diagnóstico de SMD foram⁹:

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

Foram excluídos os casos de citopenias específicas: hipotireoidismo, doenças infecciosas, auto-imunes, neoplásicas, associada ao abuso de álcool, medicamentos e contato com produtos químicos, quimioterapia recente, anemias carênciais, hemoglobinúria paroxística noturna e alteração da função renal.

Os casos foram classificados de acordo pelos critérios da OMS⁹.

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado, de acordo com o Comitê de Ética local.

Materiais e Reagentes

1. Anticorpos monoclonais;
2. Meio RPMI 1640;
3. Solução lisante Becton Dickinson (BD) 10x concentrada;
4. Tampão fosfato (PBS) com 2% de soro fetal bovino e 0,5% de azida sódica pH:7,4;
5. Tubos de polietileno BD
6. Tubos de Falcon de 15ml

Imunofenotipagem

Neste estudo foram utilizados anticorpos monoclonais com marcação de quatro cores diretamente conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila de peridina (PerCP) e aloficocianina (APC). Os anticorpos monoclonais utilizados neste estudo estão relacionados na quadro 6:

Quadro 6: Anticorpos monoclonais usados para imunofenotipagem das SMD

Marcadores	Fluorocromos	Clones	Fabricantes
CD13	APC	WM15	Pharmlngen
CD14	PE	RMO52	Beckman Coulter
CD16	FITC	3G8	Pharmlngen
CD19	FITC	HD37	Dako
CD33	APC	WM53	Pharmlngen
CD34	PE	8G12	Becton Dickinson
CD45	PerCP	2D1	Becton Dickinson
CD117	APC	YB5.B8	Pharmlngen
CD123	PE	9F5	Pharmlngen
Anti- HLA-DR	FITC	AB3	Dako

O painel sugerido neste estudo utiliza 10 anticorpos e permite a análise da maturação granulocítica e monocítica, além da investigação das células presentes na janela de blastos, incluindo células CD34⁺, precursores de células B, precursores de basófilos e células dendríticas linfóides.

A combinação de quatro cores de anticorpos monoclonais aplicado neste estudo segue abaixo no quadro 7:

Quadro 7: Pannel de quatro cores de anticorpos monoclonais para SMD

Combinação de anticorpos monoclonais
HLA-DR FITC/CD14 PE/CD45 PerCP/CD33APC
CD19 FITC/CD34 PE/CD45 PerCP/CD117APC
CD16 FITC/CD34 PE/CD45 PerCP/CD13APC
HLA-DR FITC/CD123 PE/CD45 PerCP/CD33APC

Preparação das amostras para imunofenotipagem

As amostras de MO dos pacientes foram colhidas através da punção do esterno ou crista ilíaca em tubos Vacutainer de 4ml contendo EDTA. As amostras foram manipuladas em até 24h após a coleta e mantidas a temperatura ambiente (TA).

As amostras coletadas foram diluídas (1:1) com meio de cultura RPMI 1640 (Cultlab), centrifugadas a 1500 rpm na centrífuga Excelsa baby II da Fanem por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, as células (pellet) foram ressuspensas em 1ml de meio de cultura RPMI 1640, quantificadas no contador hematológico CellDyn 1700 da Abott e diluídas para concentração aproximada de $5-7 \times 10^6$ células/ml.

Na marcação direta foram incubados 100µL da suspensão de células em cada tubo de polietileno BD com 5µL dos anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis, de acordo com o pannel proposto, por 20 minutos no escuro e a TA. Para lisar as hemácias foi adicionado 2ml da solução lisante FacsLysing da BD diluída 1:10 por 10 minutos, também no escuro e a TA. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e adicionados 2 ml de tampão fosfato (PBS) 1x (pH=7,4) sendo novamente centrifugadas a 470 g por 5 minutos e o pellet ressuspendido em 500µL de PBS.

Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo

O exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizado no citômetro FACS CaliburTM da Becton Dickinson - San Jose - Califórnia - USA, calibrado através do

programa FacsComp™ (BD) com o kit Calibrite beads (BD). A aquisição foi realizada pelo programa CellQuest™ (BD) e a análise pelo Paint-A-Gate™ (BD).

Para uma melhor análise multiparamétrica, foram adquiridos 50.000 eventos, em todos os casos de SMD. As populações foram otimizadas através dos detectores, amplificadores e da compensação das fluorescências, eliminando as sobreposições.

Esta técnica tem a finalidade de quantificar, em número absoluto e porcentagem, e determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) dos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos.

As populações que compõe a medula óssea foram identificadas no “dot plot” CD45/SSC (side-scatter - granularidade celular) baseando-se na intensidade do marcador pan-leucocitário CD45 (fig 1).

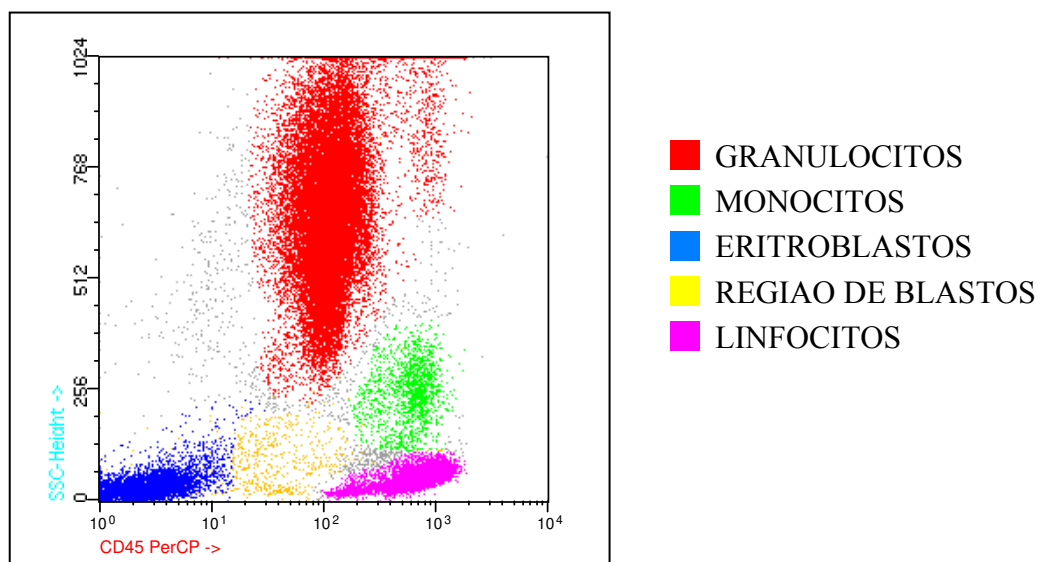


Figura 1: Medula óssea normal - Os granulócitos (vermelho) são CD45 positivo e possuem o SSC alto. Os monócitos (verde) têm expressão forte de CD45 e SSC intermediário. Os eritroblastos (azul) são CD45 negativo e têm o SSC baixo. A região de blastos (amarelo) é identificada por uma expressão intermediária de CD45 e um SSC intermediário e/ou baixo. Os linfócitos (violeta) caracterizam-se pela expressão forte de CD45 e pelo SSC baixo.

O estudo da maturação dos granulócitos foi realizado no dot plot CD13/CD16, (fig 2), no qual se pode acompanhar a expressão de CD13 e CD16 durante a maturação, além de analisar o SSC das populações mielóides imaturas.

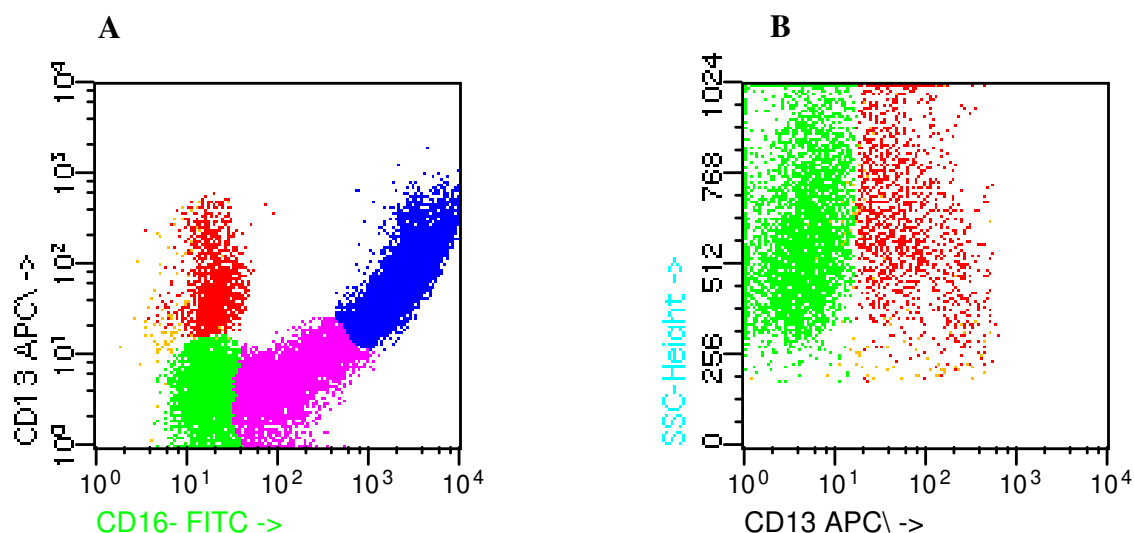


Figura 2: Medula óssea normal - Cinco estágios de diferenciação são distinguidos baseados no aumento gradual da expressão de CD16 e da expressão dinâmica do CD13 em combinação com as características do SSC (A). Amarelo: mielomonoblastos; Vermelho: Promielócitos; Verde: mielócitos; Violeta: metamielócitos; Azul: Neutrófilos. (B) Expressão do antígeno CD13 nos mielomonoblastos, promielócitos, mielócitos.

Os monócitos foram analisados no dot plot HLA-DR/CD14 (fig 3), e na combinação CD16/CD34/CD45/CD33, que também foi usado para quantificar os monócitos CD16 positivos e avaliar a expressão anômala de CD34 nos monócitos.

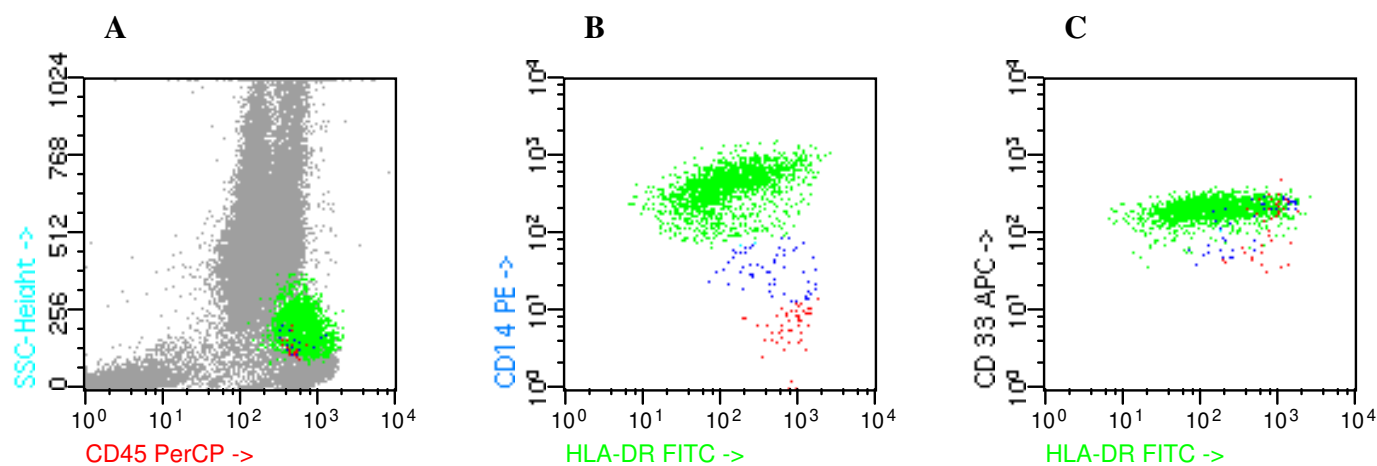


Figura 3: Medula óssea normal - A população monocítica é selecionada no plot HLA-DR/CD14 (A-B); monócitos em verde; precursor de células dendríticas mielóide em vermelho. A expressão dos antígenos CD33 e HLA-DR foram analisadas nesta combinação HLA-DR/CD14/CD45/CD33 (C).

As células $CD34^+$ foram separadas no dot plot SSC/CD34 (figura 4-A). Dois subtipos de células podem ser separados de acordo com SSC: Subtipo 1 com um SSC alto e o subtipo 2 com SSC baixo.⁴⁰ O número total de células $CD34^+$ foi determinado neste plot (fig 4). Os precursores de células B foram quantificados em relação à percentagem de células nucleadas totais e a sua proporção dentro das células $CD34^+$.

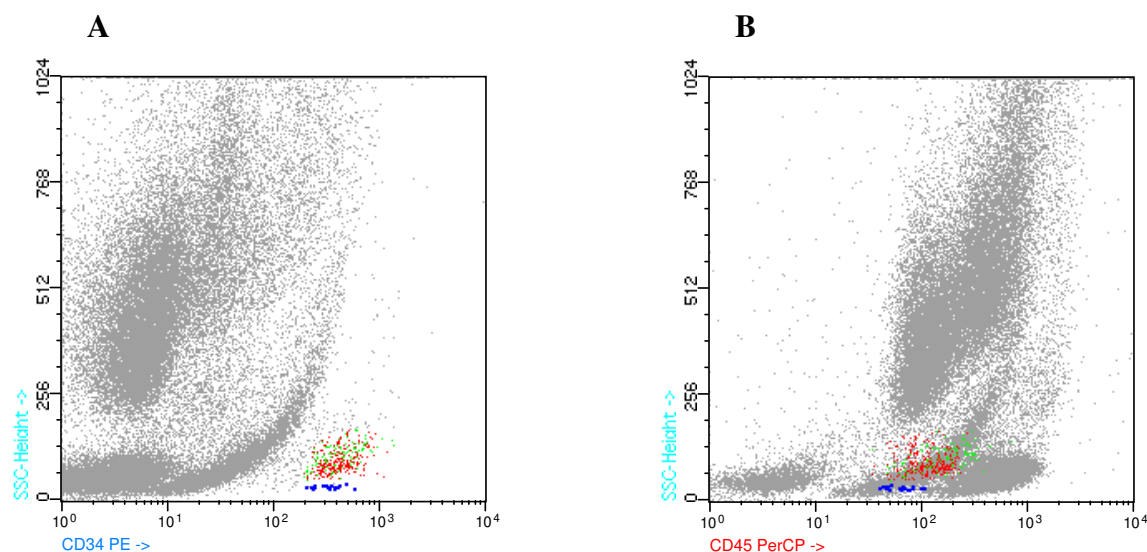


Figura 4: Medula óssea normal - As células $CD34^+$ foram identificadas no plot SSC/CD34 (A) pela expressão forte do antígeno CD34. Por esta estratégia é possível separar dois subtipos de células nas MO normais: o subtipo 1 com SSC alto (vermelha e verde) e o subtipo 2 com SSC baixo (azul). A distribuição das células $CD34^+$ foram visualizadas no plot SSC/CD45 (B).

A maturação precoce do compartimento mielóide foi examinada pela expressão de CD34/CD117 (fig5-B) e CD34/ CD13 (fig 6-B). Nesta última combinação, 3 subtipos puderam ser detectados pela expressão de CD45/SSC: precursores linfóides (SSC baixo/ CD13-), SSC alto/ CD13⁻ e SSC alto/ CD13⁺ (fig 6).

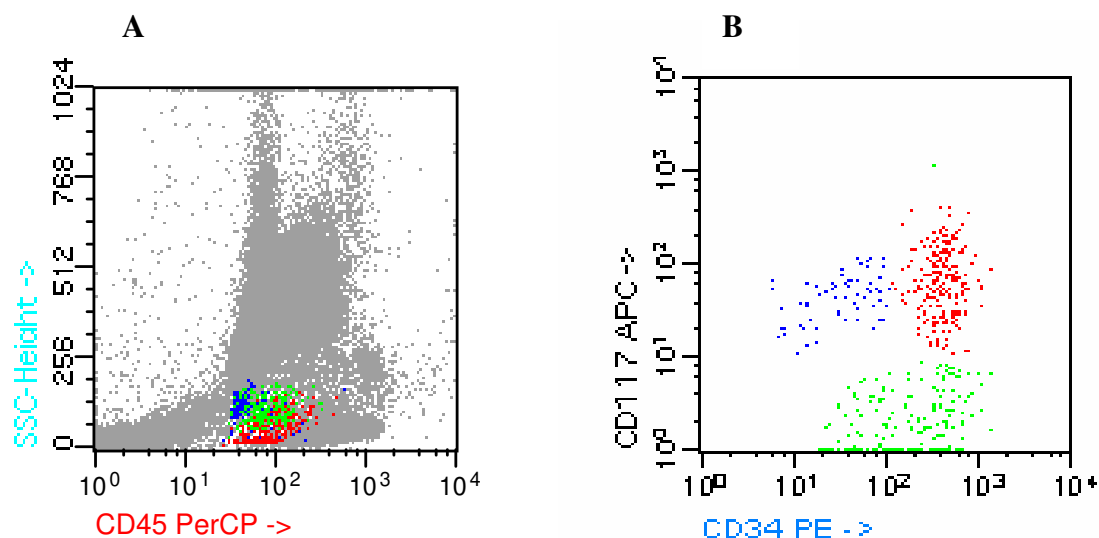


Figura 5: Medula óssea normal - A combinação CD34/CD117 permite analisar a maturação precoce dos mieloblastos. Células imaturas CD34+(verde); mieloblastos CD34+CD117+ (vermelha); promielócitos CD117+ (azul)

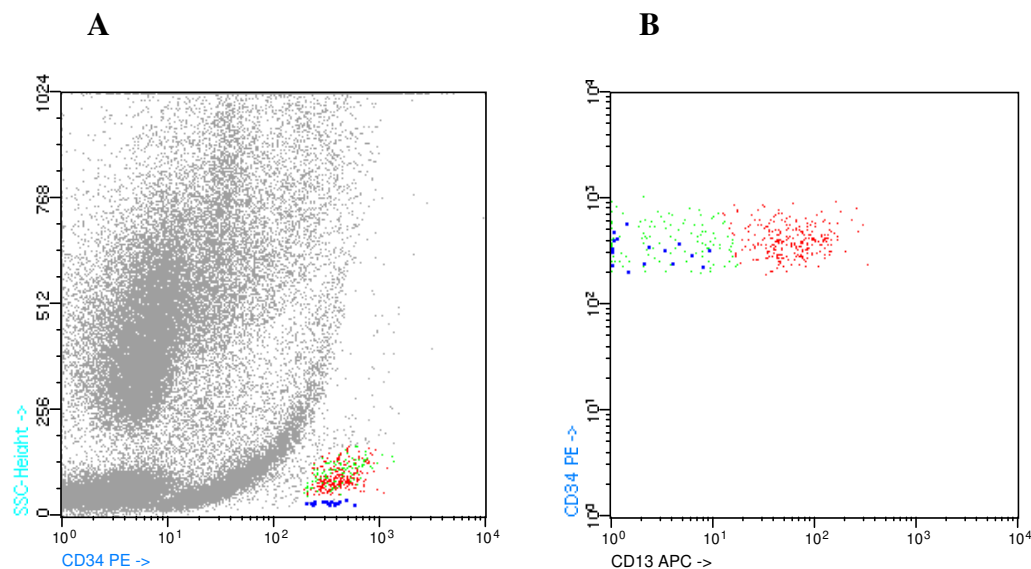


Figura 6: Medula óssea normal - Nesta combinação foi possível identificar os subtipos 1 e 2 (CD16FITC/CD34PE/CD45PERCP/CD13APC). No plot CD34/CD13 foi detectado três populações: SSC baixo/CD34⁺/CD13⁻ (azul); SSC alto/CD34⁺/CD13⁻ (verde) e SSC alto/CD34⁺/CD13⁺ (vermelha).

Os precursores de basófilos e de células dendríticas linfóide foram identificados pela combinação HLA-DR/CD123, conforme demonstrado na figura 7.

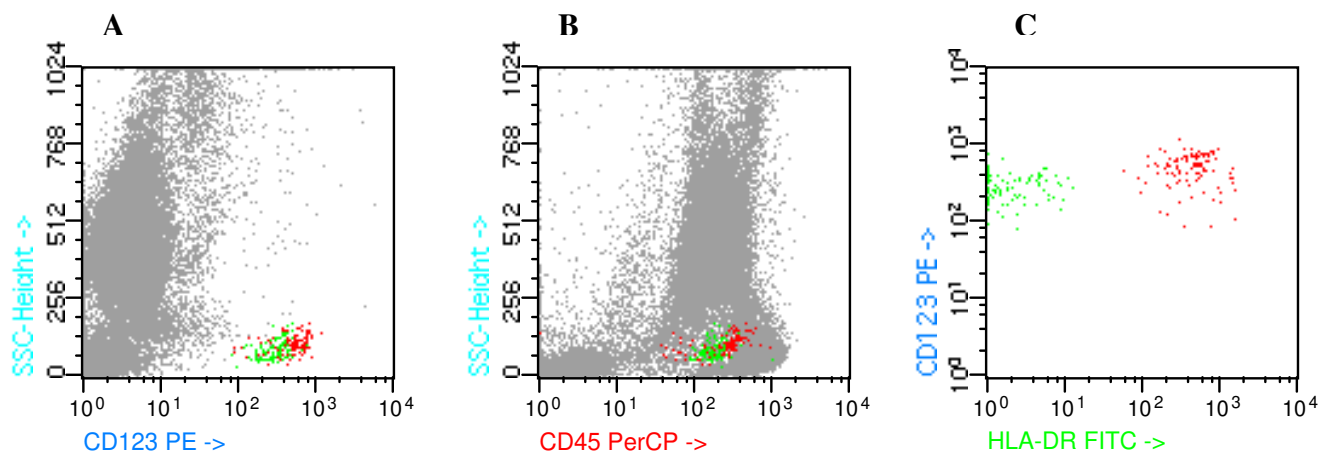


Figura7: Medula óssea normal - Estratégia adotada (A-C) para seleção de células dendríticas linfóides (vermelha) e precursores de células basofílicas (verde)

Estas características foram comparadas com os valores encontrados na MO normal. Para análise, os casos de SMD foram agrupados em dois grupos: um grupo de baixo risco com menos que 5% de blastos medulares e outro de alto risco com mais de 5% de blastos medulares.

A estratégia de análise acima foi construída para otimizar o reconhecimento de alterações na maturação da células mielomonocíticas e dos progenitores majoritários, mielóides e linfóides, e minoritários, células dendríticas linfóides e basófilos. O painel usado permitiu a detecção das seguintes alterações:

✓ *População Mielóide*

- Diminuição do SSC:

Os casos de SMD com valor de dispersão de luz (SSC) menor do que o determinado pelo intervalo de confiança, estabelecido pelos valores do IMF dos controles normais, foram considerados anormais, portanto com hipogranularidade.

- Alteração do padrão de maturação CD13/CD16 e CD33/HLA-DR

Foi considerado como anormal a falta do padrão de maturação ou assincronismo de expressão de antígenos mielóides associados na população de interesse, e o aumento

ou diminuição da intensidade antigênica dos marcadores CD13 e/ou CD16 e CD33 e/ou HLA-DR em pelo menos um dos estágios da diferenciação granulocítica, comparadas com o controle normal.

- Expressão aberrante de CD34:

Assincronismo de maturação com a presença do marcador CD34 em mais de 10% da população de granulócitos maduros.

✓ *População Monocítica*

- Aumento da percentagem de monócitos em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.

- Aumento de monócitos CD16⁺ em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.

- Alteração do padrão de expressão do CD33/ HLA-DR:

Falta do padrão de maturação ou assincronismo de expressão dos antígenos CD33 e/ou HLA-DR na população de interesse, e aumento ou diminuição da intensidade antigênica dos marcadores em pelo menos uma população da diferenciação monocítica, comparadas com o controle normal.

- Expressão aberrante de CD34

Assincronismo de maturação com a presença do marcador CD34 em mais de 10% da população de monócitos.

✓ *População de Blastos*

- Aumento da percentagem de células CD34⁺ em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.

- Diminuição dos precursores de células B ($CD34^+/CD19^+$) em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.
- Aumento dos mieloblastos $CD13^+/CD117^+/CD34^+$ em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.
- Aumento dos precursores não linfóides $CD34^+/CD117^-$ e $CD34^+/CD13^-$ em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.

✓ *Populações Minoritárias*

- Aumento ou diminuição de precursores $CD123^+/HLA-DR^+$ (células dendríticas linfóides) em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.
- Aumento ou diminuição de precursores $CD123^+/HLA-DR^-$ (basófilos) em relação à mediana do grupo de controles normais, de acordo com o limite estabelecido pelos percentis.

Análise estatística:

Foi realizada análise descritiva para obtenção da média, valores mínimos e máximos, desvio padrão, mediana e percentis. Os percentis 10% e 90% foram utilizados para determinar o intervalo de confiança, valores que não obedeceram a esse intervalo foram considerados anormais. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações de dois grupos e o de Kruskal-Wallis entre três ou mais. Para correlações foi empregado o teste de Spearman. Consideraram-se valores significativos quando o $p < 0,05$. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico Winstat versão 3.1.

Resultados

5. RESULTADOS

Características Clínicas dos Pacientes com SMD

Este estudo foi realizado em 54 pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas e 24 casos controles (doadores de medula óssea). Os casos foram analisados através do aspirado de medula óssea. Os 54 pacientes de SMD apresentaram idade mediana de 62 (23-93) anos, sendo que 57% foram do gênero masculino e 43% do gênero feminino.

Estes casos foram separados em dois grupos: menos que 5% de blastos medulares, considerados de baixo risco, e mais do que 5% de blastos medulares, considerados de alto risco. Houve um predomínio dos casos de SMD com <5% de blastos medulares. Entre esses grupos, as características hematológicas desses pacientes não mostraram diferença quanto à hemoglobina e aos leucócitos, contudo foi evidente a diminuição de plaquetas nas SMD >5% de blastos (tabela 1).

Tabela 1: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com SMD

Variáveis	SMD <5% blastos MO	SMD > 5% blastos MO
Mediana / variação	(n=37)	(n=17)
Idade (anos)	59 (23-93)	67 (40- 77)
Sexo (M/F)	20/17	11/6
Hb(g/dl)	9.8 (4.8- 16.2)	9.4 (5.1- 13.5)
Leu (x10⁹/l)	1.5 (0.3-5.3)	1.3 (0.6- 4.3)
Plaq (x10⁹/l)	221 (7-854)	77 (16-841)
% Bl	1.0 (0-4.0)	12.0 (5.5-20.0)

Abreviações - M: masculino F: feminino Hb: hemoglobina Leu: leucócitos Plaq: plaquetas Bl: blastos no mielograma.

A classificação dos pacientes pelos critérios OMS está na tabela 2. Houve predomínio de casos com CRDM.

Tabela 2: Classificação das SMD segundo a OMS.

OMS	Frequência
AR	2 (3.7%)
SMD del (5q)	2 (3.7%)
CRDM	25 (46.3%)
CRDMSA	8 (14.8%)
AREB-I	7 (12.9%)
AREB-II	10 (18.5%)
Total	54

A análise citogenética foi realizada ao diagnóstico em MO dos 54 pacientes. Quarenta e um (74,5%) pacientes apresentaram cariótipo normal, doze (21,8%) exibiram algum tipo de anormalidade genética e um caso não apresentou mitoses para avaliação (tabela 3).

Tabela 3: Alterações citogenéticas encontradas.

Cariótipo	Casos
<i>Favorável:</i>	
Normal	41
5q- isolada	2
15p+	1
<i>Intemediário:</i>	
+8	1
2 anormalidades inclusive c/+8	3
<i>Desfavorável:</i>	
Anormalidades 7	2
Complexo (>3 anormalidades)	3
Não avaliável*	1
Total	54

* Não houve mitose neste caso

A classificação de acordo com o IPSS está disposta na tabela 4. A maioria dos casos foi de baixo risco, seguido pelo grupo de risco intermediário-1.

Tabela 4: Classificação prognóstica das SMD de acordo com o IPSS

IPSS	Casos
Baixo risco	23 (41,8%)
Intermediário-1	20 (36,4%)
Intermediário-2	7 (12,7%)
Alto risco	3 (5,4%)
Não avaliável*	1 (1,8%)
Total	54

* Não houve mitose neste caso

Análise por citometria de fluxo

Com a estratégia de análise adotada foi possível determinar 16 alterações na maturação das células mielomonocíticas e das células progenitoras. Estas alterações foram determinadas nos casos de SMD de baixo e alto risco e comparadas com o grupo controle normal.

✓ População Mielóide

A mediana do IMF dos parâmetros analisados nos granulócitos da MO normal assim como nas SMD de baixo e alto risco estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Dispersão de luz e expressão de antígenos de maturação nos granulócitos de SMD comparados com normal.

	Controles	SMD<5% (n.37)	SMD>5% (n.17)	P*
Granularidade				
Mediana da dispersão de luz	514	447	425	0.02
Promielócitos				
IMF CD13	188	160	96	0.04
IMF CD33	184	245	209	ns
IMF HLA-DR	342	296	158	0.05
Mielócitos				
IMF CD13	11	13	9	ns
IMF CD16	15	14	9	ns
IMF CD33	74	104	93	ns
Metamielócitos				
IMF CD13	19	17	10	ns
IMF CD16	120	135	102	ns
Neutrófilos				
IMF CD13	162	76	36	0.006
IMF CD16	1129	1017	776	ns
Meta/Neutrófilos				
IMF CD33	29	37	44	ns
Expressão CD34 nos granulócitos				
CD34	-	7/37	7/17	0,02

* Teste de Kruskal- Wallis. Valores significantes p<0.005.

- Hipogranularidade

A hipogranularidade dos granulócitos resulta na diminuição do SSC (tabela 5 e fig 8). Um total de 25 (46.3%) casos apresentaram esta deficiência, com igual proporção nos de baixo e alto risco (tabela 12).

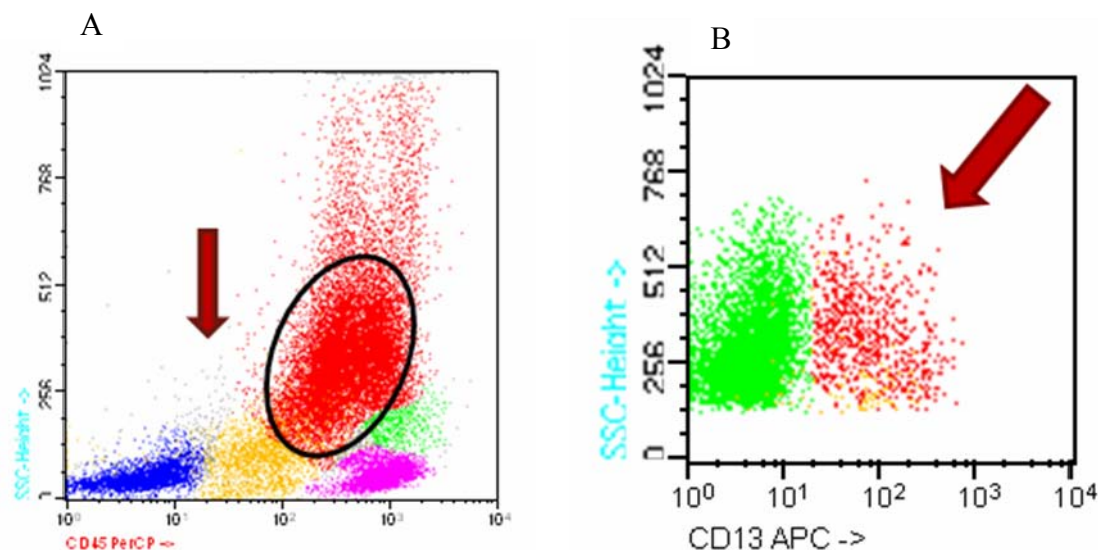


Figura 8: Exemplos de hipogranulação (diminuição do SSC) encontrada em AREB. A) distribuição da população de granulócitos no plot SSC/CD45. B) Análise do SSC em promielócitos e mielócitos.

- Alteração do padrão de maturação CD13/CD16

A avaliação do padrão de expressão dos antígenos CD13/CD16 estava mais comprometida no início da maturação (promielócitos) e nos neutrófilos maduros, do que nos outros estágios. Houve deficiência significativa da expressão de CD13 nestas populações, sendo que na população madura houve hiper-expressão de CD13 em 4 casos. Diminuição da expressão de CD16 também foi evidenciada nos granulócitos maduros (tabela 5). Entretanto 9 casos mostraram hiper-expressão de CD16.

O padrão alterado da maturação, presente em qualquer uma das fases do processo (fig 9), reconhecido pela combinação dos marcadores CD13/CD16 durante a maturação granulocítica foi observada em 46 pacientes, sendo que 33 das SMD <5% de blastos e 13 nas SMD >5% de blastos (tabela 12).

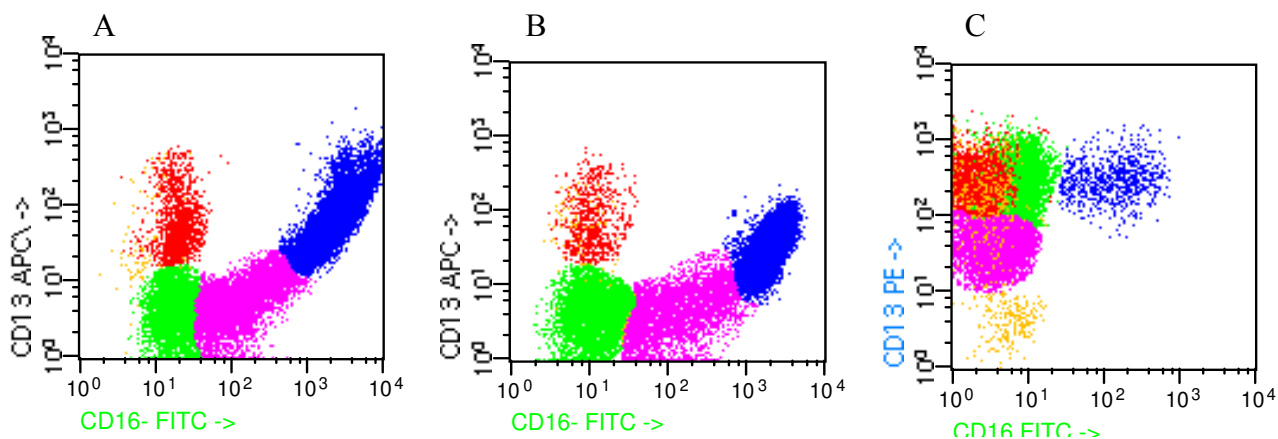


Figura 9: A) Padrão de maturação CD13/CD16 em controle normal. B) CRDM com alteração do padrão de maturação com diminuição da expressão do CD13 nos metamielócitos e neutrófilos. C) AREB com desordem do padrão de maturação CD13/CD16.

- Alteração do padrão de expressão do CD33/HLA-DR

Dezenove casos apresentaram deficiência de CD33. Assincronismo de expressão de HLA-DR foi visto nos granulócitos maduros de 15 casos.

Assim, o padrão de expressão da combinação CD33/HLA-DR mostrou-se alterado em 25 SMD de baixo risco e em 12 SMD >5% de blastos (fig 10).

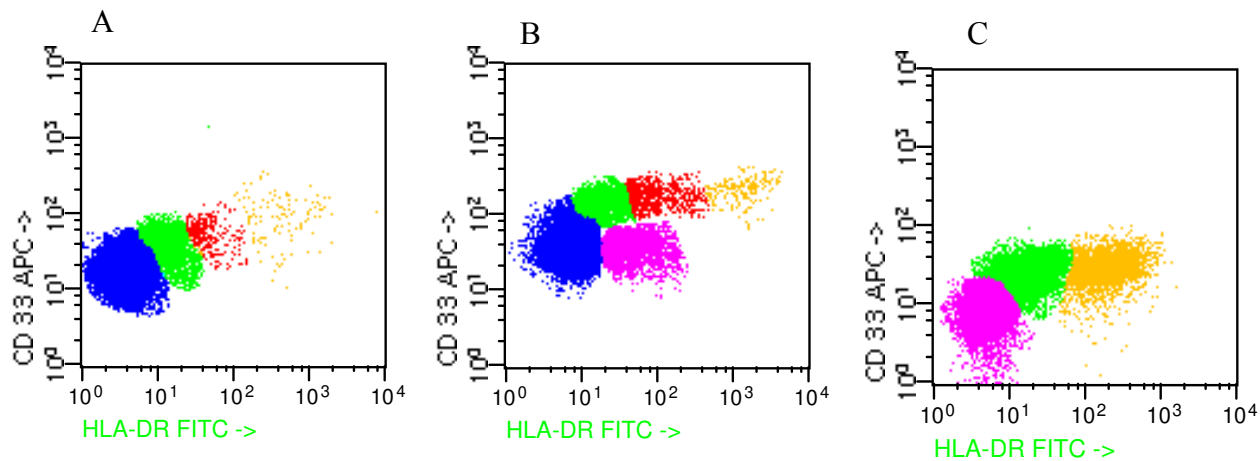


Figura 10: A) Padrão de maturação CD33/HLA-DR em controle normal. B) CRDM com população anômala com diminuição de CD33. C) AREB com diminuição da expressão de CD33.

- Expressão aberrante de CD34 nos granulócitos maduros

Quatorze casos de SMD apresentaram expressão anômala do marcador CD34 nos granulócitos maduros, sendo que 7 nas SMD <5% de blastos e 7 nas SMD >5% de blastos (fig 11).

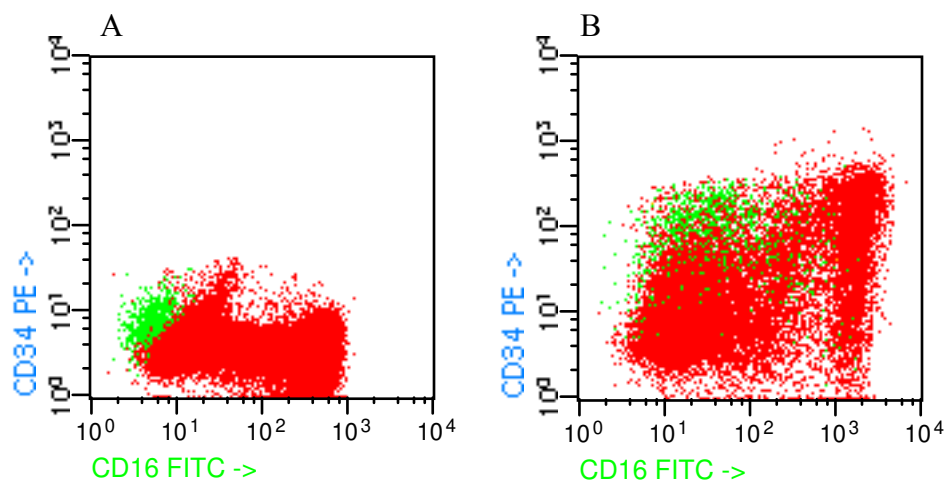


Figura 11: A) Controle normal - Granulócitos (vermelho) e monócitos (verde). B) AREB com expressão anômala de CD34 em granulócitos e monócitos.

Com o painel proposto foi possível reconhecer até quatro alterações na população granulocítica. A distribuição da frequência do número de alterações está disposta na tabela 6. Com a estratégia adotada, encontramos pelo menos 2 alterações granulocíticas em 41 casos, somente 2 casos não apresentaram nenhuma alteração. O aumento do número de alterações granulocíticas correlacionou com o aumento das células CD34⁺/CD117⁺ e CD34⁺/CD13⁺ (r=0.41 p=0.006 e r=0.34 p=0.01, respectivamente) e com o aumento das células imaturas CD34⁺/CD117⁻ (r=0.29 p=0.04).

Tabela 6: Frequência do número de alterações detectadas na população granulocítica.

Nº alterações granulocíticas	Casos
Nenhuma	2
1	11
2	19
3	16
4	6
Total	54

✓ *População Monocítica*

A mediana do IMF dos parâmetros analisados nos monócitos está apresentada na tabela 7.

Tabela 7: Expressão de antígenos nos monócitos de SMD comparados com normal.

	Controles	SMD<5%	SMD>5%	P*
% monócitos	2.2 1.1-3.6	2.5 0.6-20.3	2.7 0.3-10.8	0.12
monócitos CD16+	-	15/37	6/17	0.18
IMF CD33	167	318	231	ns
IMFHLA-DR	150	127	173	ns
IMF CD34	-	8/37	6/17	0.02

* Teste de Kruskal- Wallis. Valores significantes p<0.005.

- Aumento da percentagem de monócitos

O aumento de monócitos foi evidenciado em 14/37 casos das SMD de baixo risco e em 11/17 das SMD de alto risco (tabela 12).

Este aumento teve correlação positiva com o aumento de blastos na citologia ($r=0.22$ $p=0.04$), com o IPSS ($r=0.35$ $p=0.004$) e mostrou uma correlação negativa com a contagem de plaquetas em sangue periférico ($r=-0.25$ $p=0.03$).

- Aumento de monócitos CD16⁺

Os monócitos CD16⁺ estavam aumentados em 15/37 casos de SMD <5% de blastos e em 6/17 das SMD >5% de blastos (tabela 12).

Os monócitos CD16⁺ apresentaram uma correlação negativa com as células CD34⁺ medulares ($r=-0,42$ $p<0.0001$), células CD34⁺CD13⁺ ($r=-0,31$ $p=0.01$), células CD34⁺CD117⁺ ($r=-0,43$ $p=0.004$), CD34⁺CD13⁻ ($r=-0,23$ $p=0.05$) e células CD34⁺CD117⁻ ($r=-0,27$ $p=0.05$).

- Alteração da expressão do CD33/HLA-DR

Nas SMD de baixo risco houve uma deficiência da expressão de HLA-DR em 7 casos e outros 7 apresentaram hiper-expressão. Semelhantemente, a expressão de CD33 neste grupo estava deficiente em 4 casos e hiper-expresso em outros 4. Nas SMD de alto risco, observou-se hiper-expressão de HLA-DR em relação ao controle normal em 8 casos e apenas um mostrou deficiência de HLA-DR. Já o marcador CD33 foi deficiente em apenas um caso de alto risco.

O padrão de expressão da combinação CD33/HLA-DR mostrou-se alterada em 14 casos das SMD de baixo risco e em 9 das SMD de alto risco (tabela 12).

- Expressão aberrante de CD34

A expressão anômala do marcador CD34 nos monócitos estava presente em 14 casos de SMD, sendo que 8 foram nas SMD <5% de blastos e 6 nas SMD > de 5% de blastos (tabela 12).

A combinação de anticorpos aplicada neste estudo possibilitou detectar quatro alterações na população monocíticas. A frequência do número de alterações monocíticas encontrada nos casos de SMD está na tabela 8. Até três alterações foram encontradas em 80% dos casos.

Tabela 8: Frequência do número de alterações detectadas na população monocítica.

Nº alterações monocíticas	Casos
Nenhuma	11
1	14
2	17
3	12
4	0
Total	54

O número total de alterações monocíticas correlacionou positivamente com o IPSS ($r=0,30$ $p=0.01$), e diminuição de células precursoras B ($r=-0.21$ $p=0.05$).

✓ *População de Blastos*

De acordo com a porcentagem de blastos na citologia, os casos de SMD (54) foram agrupados em SMD com <5% de blastos, com 37 casos (68.5%), e SMD com >5% de blastos em 17 (31.5%) casos.

Os parâmetros determinados para análise nesta população, nos grupos de SMD, foram comparados com o controle normal (tabela 9), e diferenças significativas foram encontradas em todos os parâmetros.

Tabela 9: Medianas dos parâmetros fenotípicos analisados em todos os grupos.

Fenótipos	Controles	SMD<5%	SMD>5%	P*
% blastos na citologia		1.0 (0.0-4.0)	12.0 (5.5-20.0)	<0.0001
% células gate blastos	1.2 (0.4 – 2.3)	1.5 (0.06 – 6.7)	7.7 (0.6-13.9)	<0.0001
% CD34 ⁺	0.8 (0.3 – 1.7)	0.9 (0.02 – 5.3)	4,3 (0.5-13.0)	<0.0001
% CD34 ⁺ /CD13 ⁺	0.3 (0.1 – 0.8)	0.3 (0.02 – 3.4)	1,6 (0,1-9.4)	0.005
% CD34 ⁺ /CD117 ⁺	0,4 (0 – 1.1)	0.5 (0.02 – 4.6)	2.55 (0.3 – 12.9)	0.0002
% CD34 ⁺ /CD13 ⁻	0.2 (0 – 0.6)	0.1 (0 – 1.9)	1.1 (0.08-7.6)	0.0002
% CD34 ⁺ /CD117 ⁻	0.2(0 – 0.7)	0.08 (0 – 1.9)	0.5 (0.07 – 2.8)	0.01
% CD34 ⁺ /CD19 ⁺ /total	0.1 (0.04 – 0.5)	0.02 (0 – 0.4)	0.02 (0-0,3)	0.0004
% CD34 ⁺ /CD19 ⁺ /CD34 ⁺ totais	20.4 (6.0-55.2)	1.3 (0-50.0)	0.6 (0-12.6)	<0.0001

* Teste de Kruskal- Wallis. Valores significantes p<0.005.

- Aumento da porcentagem de células CD34⁺

Houve um aumento significativo das células CD34⁺ nas SMD em relação à MO normal (tabela 9). A frequência desta alteração foi observada em 30% das SMD de baixo risco e em 82% das SMD de alto risco (tabela 12). Três casos das SMD de alto risco não apresentaram aumento das células CD34⁺.

Este parâmetro correlacionou positivamente com porcentagem de blastos da citologia (r=0.71 p<0.0001), com a classificação OMS (r=0.51 p<0.0001) e com o IPSS (r=0.30 p=0.01)

- Aumento dos mieloblastos $CD34^+/CD13^+$ e $CD34^+/CD117^+$

Mieloblastos apresentaram aumento significativo tanto no fenótipo $CD34^+/CD13^+$ como no fenótipo $CD34^+/CD117^+$ (tabela 9 e fig 12). Houve correlação positiva ($r=0.8$ $p<0.0001$) entre estes dois fenótipos.

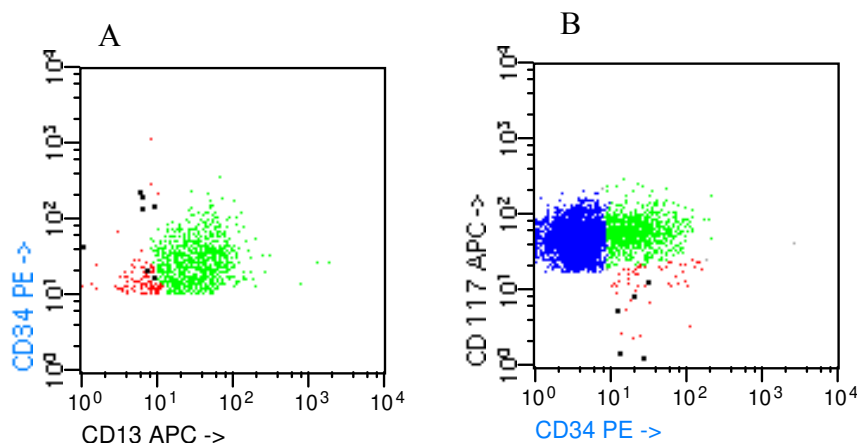


Figura 12: Representação gráfica das combinações $CD13^+CD34^+$ e $CD117^+CD34^+$ em AREB-1. A) aumento dos mieloblastos (verde) $CD13^+CD34^+$ e diminuição das hematogonias (preto). B) aumento dos mieloblastos $CD117^+CD34^+$ e diminuição das hematogonias (preto).

O aumento de $CD34^+/CD13^+$ foi observado em 31% das SMD de baixo risco e em 66% das SMD de alto risco. Enquanto que o maior número de células $CD34^+/CD117^+$ esteve presente em 22% e 83% as SMD de baixo e alto risco respectivamente (tabela 12).

Ambos os fenótipos, $CD34^+/CD13^+$ e $CD34^+/CD117^+$, tiveram correlação positiva com percentagem de blastos da citologia ($r=0.53$ $p<0.0001$ $r=0.57$ $p=0.0001$), com a classificação OMS ($r=0.45$ $p=0.0008$ $r=0.48$ $p=0.001$) e com o IPSS ($r=0.26$ $p=0.04$ $r=0.31$ $p=0.03$), respectivamente.

- Aumento dos precursores não linfóides CD34⁺/CD117⁻ e CD34⁺/CD13⁻

No grupo de baixo risco, houve uma diminuição de células com fenótipos CD34⁺/CD13⁻ e CD34⁺/CD117⁻ (tabela 9). Esses fenótipos apresentaram correlação positiva ($r=0.65$ $p<0.0001$).

Nas SMD >5% de blastos, a quantidade de células imaturas não linfóides CD34⁺/CD13⁻ e CD34⁺/CD117⁻ aumentou proporcionalmente com a percentagem de blastos no mielograma ($r=0.52$ $p=0.0001$ $r=0.40$ $p=0.007$), com o número de células CD34⁺ totais ($r=0.60$ $p=0.0001$ $r=0.58$ $p=0.0001$, respectivamente). Houve correlação do aumento dessas células com a classificação OMS ($r=0.53$ $p<0.0001$ $r=0.45$ $p=0.003$) e com o IPSS ($r=0.41$ $p=0.002$ $r=0.28$ $p=0.04$), respectivamente.

A contagem de leucócitos ($r=-0.27$ $p=0.03$) e plaquetas ($r=-0.27$ $p=0.03$) diminuiu com o aumento das células com o fenótipo CD34⁺/CD13⁻.

- Diminuição dos precursores de células B (CD34⁺/CD19⁺)

Os precursores de células B (hematogonias) foram encontrados em todas as MO normais, mas nas SMD foi observada uma diminuição e/ou ausência em 76% dos casos (tabela 12), sendo que 97% nas de baixo risco e 94% nas de alto risco. Ocorreu ausência dessas células em 46% casos de SMD.

Entretanto, entre os dois grupos os valores medianos dos precursores de células-B foram similares quando analisados na celularidade total (tabela 9). Contudo, entre todas as células CD34⁺ essa diferença é mais clara (fig 13 e 14).

A porcentagem de células precursoras-B diminuiu com o aumento das células CD34⁺/CD13⁺ ($r=-0.33$ $p=0.01$).

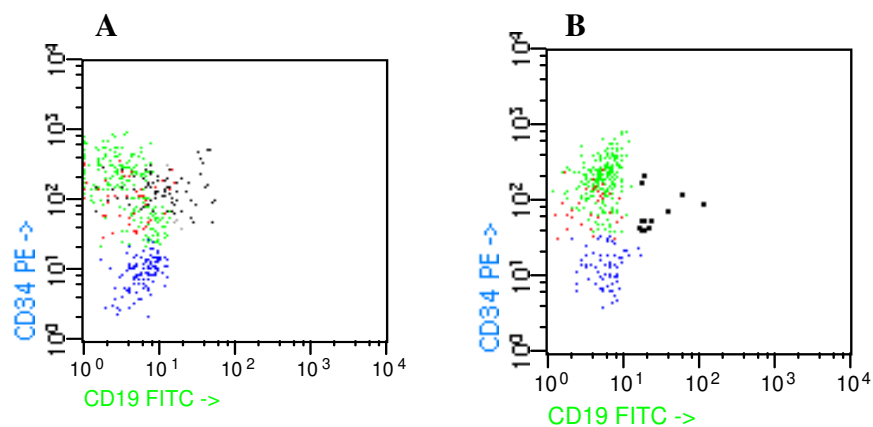


Figura 13: Representação gráfica da combinação CD34/CD19. A) MO com distribuição normal de progenitores B. B) Caso de CRDM demonstrando a diminuição/ausência das células CD34⁺/CD19⁺.

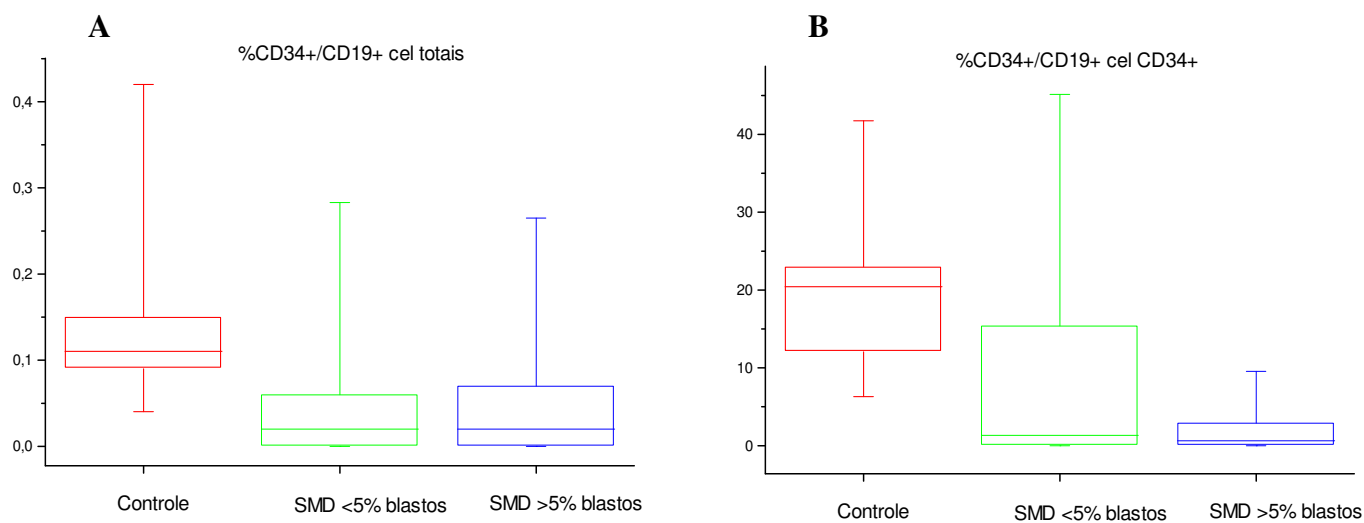


Figura 14: Representação gráfica da diminuição das células progenitoras B em relação às células totais (A) e entre todas as células CD34⁺ (B)

O número de alterações nas células do *gate* de blastos aumentou proporcionalmente com a porcentagem de blastos medulares ($r=0.55$ $p<0.0001$), com a quantidade de células $CD34^+$ ($r=0.74$ $p<0.0001$), mieloblastos $CD34^+/CD13^+$ e $CD34^+/CD117^+$ ($r=0.78$ $p<0.0001$ $r=0.79$ $p<0.0001$, respectivamente) e com a diminuição dos precursores B ($r=-0.40$ $p=0.0001$).

Com o painel proposto neste estudo foi possível encontrar até seis alterações no *gate* de blastos, tais como: aumento de células $CD34^+$ totais e dos fenótipos $CD34^+/CD13^+$, $CD34^+CD117^+$, $CD34^+CD13^-$ e $CD34^+CD117^-$, além da diminuição dos precursores B.

Pelo menos uma alteração na população de blastos foi encontrada em 83% dos casos (tabela 10) sendo que a diminuição dos precursores B foi predominante em todos os tipos de SMD (tabela 12).

Tabela 10: Frequência do número de alterações detectadas na população de blastos.

Nº alterações blastos	Casos
Nenhuma	9
1	16
2	13
3	3
4	4
5	6
6	3
Total	54

O aumento das alterações na população de blastos correlacionou com o IPSS ($r=0.26$ $p=0.02$) e com a diminuição da hemoglobina ($r=-0.26$ $p=0.02$).

✓ *Populações Minoritárias*

- Diminuição dos precursores de células dendríticas linfóides

As células dendríticas linfóides (HLA-DR⁺/CD123⁺) estavam significativamente diminuídas nas SMD de baixo risco (tabela 11). Este fenômeno foi evidenciado em 17 casos das SMD de baixo risco e em 3 das de alto risco.

Tabela 11: Porcentagem de precursores minoritários de SMD comparados com controle normal.

	Controles	SMD<5%	SMD>5%	P*
% células HLA-DR ⁺ /CD123 ⁺	0.3 (0.08 – 0.4)	0.1 (0.02 – 0.6)	0.3 (0.04- 4.0)	0,02
% células HLA-DR ⁻ /CD123 ⁺	0.1 (0 – 0.4)	0.2 (0.03 – 2.1)	0.6 (0.03 – 0.7)	0,02

* Teste de Kruskal- Wallis. Valores significantes p<0.005.

- Aumento dos precursores de basófilos

Houve um aumento significativo das células precursoras de basófilos (HLA-DR⁻/CD123⁺) nas SMD (tabela 11). Tanto nas de baixo como nas de alto risco este aumento foi visto em cerca de 30% dos casos.

O aumento desses precursores deve-se ao número elevado de células com o fenótipo CD34⁺/CD117⁻ (r=0.62 p=0.0006) e CD34⁺/CD13⁺ (r=0.52 p=0.03), o que correlaciona com tipo OMS (r=-0.40 p=0.003).

Total de alterações imunofenotípicas na SMD

Foram detectadas 16 alterações, sendo quatro na população granulocítica, quatro na população de monócitos, seis na população de blastos, quando analisado vários fenótipos, e duas alterações nas populações minoritárias: diminuição dos precursores de células dendríticas linfóides e aumento dos precursores de basófilos, conforme mostra a tabela 12.

Tabela 12: Frequência de alterações observadas no estudo

Alterações detectadas	SMD<5% Número (%)	SMD>5% Número (%)
<i>População de Granulócitos</i>		
SSC baixo	17(45.9)	8(47.1)
Alteração do padrão CD13/CD16	33(94.3)	13(100.0)
Alteração do padrão CD33/HLA-DR	25(69.4)	12(70.6)
Expressão aberrante de CD34	7(19.4)	7(41.2)
<i>População de Monócitos</i>		
Aumento de monócitos	14(37.8)	11(64.7)
Aumento de monócitos CD16 ⁺	15(40.5)	6(35.3)
Alteração do padrão CD33/HLA-DR	14(38.9)	9(52.9)
Expressão aberrante de CD34	8(22.2)	6(40.0)
<i>População de blastos</i>		
Aumento de células CD34 ⁺	11(29.7)	14 (82.3)
Aumento de células CD34 ⁺ /CD13 ⁺	10 (31.2)	8(66.6)
Aumento de células CD34 ⁺ /CD13 ⁻	3(9.4)	9(75.0)
Aumento de células CD34 ⁺ /CD117 ⁺	5(21.7)	10(83.3)
Aumento de células CD34 ⁺ /CD117 ⁻	2(5.4)	2(16.6)
Diminuição CD34 ⁺ /CD19 ⁺ /CD34 totais	25(67.5)	16(94.1)
<i>Populações minoritárias</i>		
Diminuição HLA-DR ⁺ /CD123 ⁺	15(45.4)	3(33.3)
Aumento HLA-DR ⁻ /CD123 ⁺	10(30.3)	4(44.4)

Na série granulocítica, a alteração mais freqüente foi o padrão anormal de maturação CD13/CD16, na série monocítica, as anormalidades mais comuns foram o aumento de monócitos e a alteração do padrão HLA-DR/CD33. Entretanto, na população de blastos a diminuição de precursores de células B e o aumento de células CD34⁺ freqüentemente foram encontrados nas SMD.

A mediana de alterações detectadas nas SMD de baixo risco foi de 6 (2-15). Entretanto, as SMD de alto risco apresentaram no mínimo 4 alterações detectadas, sendo

que 59% dos casos apresentaram 8 ou mais alterações. Assim, a mediana de alterações nos casos com > 5% de blastos medulares foi de 8 (4-12) (figura 15).

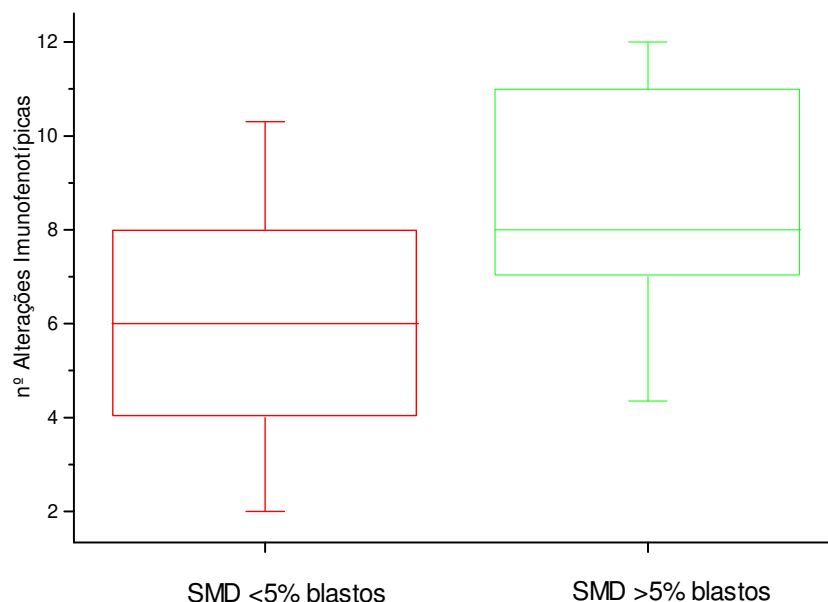


Figura 15: Representação gráfica da distribuição do número de alterações imunofenotípicas nos grupos de SMD de baixo risco e de alto risco.

O aumento do número de alterações foi proporcional a porcentagem de blastos na citologia ($r= 0.38$; $p= 0.001$), com as células $CD34^+$ ($r= 0.40$; $p= 0.001$), células $CD34^+/CD13^+$ ($r= 0.61$; $p< 0.0001$), e também com as células imaturas não linfóides ($CD34^+/CD13^-$ $r=0.30$ $p=0.02$ e $CD34^+/CD117^-$ $r= 0.55$; $p=0.0003$).

A diminuição das células precursoras B ($r=-0.39$ $p=0.001$) e da hemoglobina ($r=-0.30$ $p=0.01$) correlacionaram com o aumento do número das alterações.

O número de alterações teve uma correlação positiva com o tipo OMS ($r= 0,38$; $p=0,002$) e com o IPSS ($r=0.27$ $p=0.02$). Observou-se que no IPSS o grupo de baixo risco apresentou pelo menos 2 alterações, o de risco intermediário-1 3 alterações, o de risco intermediário-2 mais de quatro alterações e o de alto risco mais de 7.

Em todas as 54 SMD analisadas neste estudo foram encontradas pelo menos 2 alterações imunofenotípicas, sendo que, apenas 9% (5) tiveram 2 alterações. Desses cinco casos, 3 não tiveram a análise da combinação CD34/CD117, o que pode ter impactado neste resultado.

Dos casos analisados 77% apresentaram cariótipo normal e todos eles apresentaram alterações fenotípicas, sendo que 56% tiveram 6 ou mais. Os casos com alterações citogenéticas apresentaram a mediana de 8 (4-12) alterações imunofenotípicas. As alterações citogenéticas, de acordo com o grau de risco, correlacionaram com o número de alterações imunofenotípicas ($p=0.05$ $r=0.47$) e com o aumento de blastos medulares ($p=0.01$ $r=0.59$).

Com este painel foi possível detectar no mínimo 3 alterações em 91% (49) dos casos estudados

Discussão

6. DISCUSSÃO

A avaliação multiparamétrica por citometria de fluxo representa um método objetivo que permite análises quantitativas e qualitativas da maturação mielomonocítica, bem como análises das células progenitoras CD34⁺.^{14-16,43} Recentemente, vários estudos têm investigado a utilidade clínica da citometria de fluxo no diagnóstico de SMD. Muitos destes foram focados na população blástica, outros na linhagem eritróide, mas a grande maioria tem focado nas células da linhagem mielomonocítica.^{17-22, 25, 25, 29,41,43}

Recentemente, uma conferência internacional sobre SMD designou a citometria de fluxo como uma ferramenta potencial que pode acrescentar significativamente para o diagnóstico e prognóstico das SMD. Por isso, a citometria de fluxo está hoje incluída como critério adicional ao diagnóstico de SMD.^{14-16, 41}

A aplicação da imunofenotipagem por citometria de fluxo auxilia no diagnóstico de SMD nos casos com poucos elementos displásicos e cariótipo normal, baseando-se nas anormalidades de características fenotípicas encontradas nos diferentes compartimentos celulares analisados, que são relevantes tanto para o avanço do diagnóstico como para caracterizar fatores prognósticos.^{20, 21,36-38}

O uso de um amplo painel de anticorpos para o estudo do padrão anormal de maturação das células mielomonocíticas é comum e demonstrou valor diagnóstico nas SMD.^{25, 38,40-41} A utilidade da citometria de fluxo com 4 cores na avaliação de rotina das SMD, em uma série de 248 aspirados de MO de pacientes com citopenias não explicadas e/ou monocitoses, foi demonstrada por Stachurski e colaboradores⁴¹. Este estudo enfatiza que o painel de citometria de fluxo precisa incluir um número razoável de anticorpos para assegurar a sensibilidade diagnóstica e a especificidade, visto que, a frequência de muitas alterações importantes é baixa, e podem ser vistas tanto em displasias como em condições reativas.

Entretanto, Wells e colaboradores¹⁹ mostraram, em um estudo com 115 casos de SMD, que a análise por citometria de fluxo confirmou que a maioria das medulas de SMD tem características mielóide, monocítica e mieloblástica divergente do normal e significativamente diferentes de achados em pacientes com outras desordens medulares. Embora várias combinações de anticorpos sejam úteis para estudo imunofenotípico celular

nas SMD pela citometria de fluxo, o uso consistente de um painel preciso com 13 anticorpos por esse grupo, gerou um banco de dados que permitiu o desenvolvimento de um sistema de pontuação.

No presente estudo, a utilidade da citometria de fluxo foi demonstrada aplicando um painel racionalizado de 10 anticorpos na combinação de quatro cores e na avaliação de rotina laboratorial de 54 aspirados de MO de pacientes com SMD. As análises quantitativas e qualitativas foram aplicadas nas populações mielomonocíticas, blásticas e minoritárias. Para garantir a precisão das análises, o conhecimento das mudanças imunofenotípicas durante a maturação normal e a comparação com os dados de controle de MO normal foi fundamental.

A hematopoiese normal é caracterizada, na citometria de fluxo, pela alta reprodutibilidade do padrão de expressão de antígenos durante a maturação, o que permite comparar os padrões de uma MO normal com uma displásica, além de se observar as anormalidades de expressão de vários antígenos, sendo possível caracterizar a hematopoiese desregulada das SMD pelo desvio dos padrões normais.^{25, 26, 38}

Anormalidades imunofenotípicas são observadas em células maduras assim como em mieloblastos. Essas anormalidades freqüentemente afetam apenas sub-populações de células que coexistem com precursores normais. As características e a magnitude das aberrações antigênicas fornecem informações quanto à extensão da irregularidade dos produtos genéticos em um determinado tempo da diferenciação celular, assim como no curso da doença.^{19, 38}

Embora, neste estudo, um pequeno número de anticorpos monoclonais tenha sido utilizado, as combinações aplicadas permitiram uma abordagem satisfatória para detecção de alterações imunofenotípicas tanto nas populações granulocítica e monocítica, como nas populações de blastos e minoritárias.

Foram construídos padrões fenotípicos para analisar a maturação mielomonocítica, o que permitiu avaliar exatamente as mudanças na expressão de certos antígenos e detectar padrão anormal de maturação, assim como assincronismo.

Na população granulocítica, 96% dos pacientes mostraram no mínimo uma alteração, tais como assincronismo de maturação, perda parcial de um antígeno ou padrão de maturação totalmente anormal. Em 2007, Lorand-Metze e colaboradores²² em um estudo

envolvendo 31 pacientes e utilizando um painel de 3 cores, encontraram alterações na série granulocítica em 77% dos casos.

No presente estudo, alterações no padrão de maturação CD13/CD16 foram os achados mais freqüentes, sendo vista em 94% das SMD de baixo risco e em 100% dos casos de alto risco. O aumento do número de alterações granulocíticas teve correlação com o aumento dos mieloblastos e com o aumento das células imaturas CD34⁺/CD117⁻.

Wells e colaboradores¹⁹ destacam que uma das alterações imunofenóticas mais comuns na maturação de células mielóides, encontradas em seu estudo com 115 pacientes, foram a relação anormal entre CD13 e CD16 nas células mielóides, semelhante aos resultados encontrados neste estudo.

A linhagem monocítica apresentou uma alteração imunofenotípica em 80% dos casos estudados, sendo que foram mais freqüentes nas SMD de alto risco. As alterações mais comuns foram o aumento absoluto de monócitos, alteração do padrão HLA-DR/CD33 e a expressão de CD16⁺. A co-expressão de CD34, representando um assincronismo de maturação, foi observado com menor freqüência.

Lorand-Metze e colaboradores²⁴ também evidenciaram esta monocitose e o aumento proporcional de monócitos CD16⁺, favorecendo assim, o aumento de células maduras e ativadas no compartimento de monócitos. A elevação de monócitos CD16⁺ foi encontrada em infecções virais, pois estas células são consideradas como pró inflamatórias, com capacidade migratória e de produção de citocinas.^{44,45}

Os precursores B estavam diminuídos ou ausentes nos casos com mais alterações monocíticas e nos com cariótipo desfavorável. O número total de alterações monocíticas encontradas neste estudo teve correlação com o IPSS, assim como relatado na literatura.^{19,22,25}

O aumento de células CD34⁺ nas SMD é considerado um marcador de diagnóstico e prognóstico neste grupo de desordens clonais. Várias anormalidades fenotípicas têm sido descritas nestas células e estão mais freqüentemente relacionadas com a agressividade do caso e pior prognóstico.^{15-17,19-21, 38}

Na MO, as células CD34⁺ representam uma população heterogênea de células precursoras comprometidas principalmente com a linhagem mielomonocítica e precursores

de células B. Entretanto, há um subgrupo minoritário entre as células CD34⁺ composto por células precursoras dendríticas linfóides, basofílicas, entre outras.^{20,38, 42}

Diversos estudos têm demonstrado a diminuição das células progenitoras B nas SMD. Este parâmetro tem sido proposto para diagnóstico diferencial em SMD de baixo risco com cariótipo normal e sem desordens clonais presentes.^{20-21,36-38,42} No presente estudo, estas células foram encontradas no subtipo de SSC baixo na região de blastos e possui o fenótipo CD34⁺/CD19⁺.

Na medula óssea normal foram encontrados dois subtipos bem definidos na região de gate de blastos: uma apresentando SSC alto (subtipo 1) correspondendo aos mieloblastos (CD34⁺/CD117⁺ e CD34⁺/CD13⁺), e a outra com SSC baixo representando os precursores de células B (CD34⁺/CD19⁺, subtipo 2).

Nas SMD, ambos os subtipos puderam ser encontrados. Com o aumento de blastos na MO e do número de células CD34⁺ houve aumento dos mieloblastos (SSC alto, CD34⁺/CD117⁺ e CD34⁺/CD13⁺) e da população que compõe o subtipo 2, porém a quantidade de precursores de células B (células CD34⁺/CD19⁺) permaneceram baixas independentes do tipo OMS e IPSS, e ausentes em 46% dos casos com SMD.

O maior número de células no subtipo 2 nos casos de alto risco deve-se as células CD34⁺/CD117⁻ e CD34⁺/CD13⁻. O incremento das células CD34⁺/CD13⁻ foi proporcional à porcentagem de blastos medulares, ao aumento das células CD34⁺ totais e com o grau de IPSS. Este fenômeno correlaciona com a diminuição de leucócitos e plaquetas, sugerindo que se trata de um bloqueio de maturação como é visto nas leucemias agudas.³¹⁻³⁵

Isto nos faz concluir que nas SMD, ao contrário da MO normal, o subtipo 2 pode conter, além das células precursoras B, precursores não linfóides que aumentam junto com os mieloblastos. Em casos com número de blastos muito elevado, ambos os subtipos são mais difíceis de separar. Essas células precursoras podem ainda estar ou não comprometidas com a linhagem mielomonocítica com deficiência de CD13. Portanto, a diminuição do subtipo 2 é uma boa variável para o diagnóstico diferencial somente em SMD de baixo risco, mas não em casos mais avançados.

A diminuição de precursores de células B é característica de todos os tipos de SMD, confirmando a hipótese que um defeito intrínseco da produção das células B é um evento precoce nesta desordem clonal.^{15, 20, 21, 36, 38, 40, 42}

A análise das células precursoras B, entre todas as células nucleadas, mostrou quantidade de células igualmente baixas ou ausentes em todos os tipos OMS. Contudo, quando analisadas entre as células CD34⁺, os precursores B apresentaram diminuição no seu número com o aumento das células CD34⁺, podendo ser esta a causa da discrepância do número de células precursoras B entre os vários tipos OMS, encontrados na literatura.^{20, 36, 38, 42}

Ogata e colaboradores²⁰ mostraram em seus estudos que somente a redução destas células não é suficiente para um diagnóstico apropriado e que se faz necessário o uso de aberrações fenóticas nestas células para definir o diagnóstico.

Alterações na população de blastos foram encontradas em 83% dos casos sendo que a diminuição dos precursores B foi predominante em todos os tipos de SMD. A análise quantitativa de todos os tipos celulares presentes no *gate* de blastos das SMD por citometria de fluxo não é somente significativa para o diagnóstico de pacientes com citopenias periféricas e cariótipo normal, mas também dá importantes informações prognósticas como as que têm sido demonstradas pela maturação anormal dos granulócitos.^{19, 23, 38, 42} Estas variáveis de citometria de fluxo são facilmente obtidas e podem fornecer informações úteis para indicação de novos tratamentos assim como o momento do transplante de MO.

No presente estudo, outras alterações como a diminuição de precursores de células dendríticas linfóides e o aumento de basófilos foram detectadas para auxiliar o diagnóstico de SMD. Matarraz e colaboradores³⁸ relataram que o aumento de precursores imaturos estava associado com a diminuição do número de precursores de células dendríticas linfóides e basofílicas.

Anormalidades celulares detectadas pela citometria de fluxo não são necessariamente específicas de SMD, mas fornecem evidências complementares de alteração de maturação para aquelas obtidas pela morfologia.^{19, 40}

Assim, com o painel sugerido neste estudo foi possível detectar um total de 16 alterações imunofenóticas, sendo que nas populações mielomonocíticas foram 8 alterações, na população de blasto 6, e nas populações minoritárias 2 alterações. Com este

painel foi possível detectar no mínimo 3 alterações, conforme critério da OMS para SMD, em 91% dos casos estudados.

As anormalidades detectadas em pacientes SMD foram diferentes de caso para caso, como é observado nas expressões aberrantes nas leucemias agudas.³¹⁻³⁵ De modo similar ao adotado por Wells e colaboradores¹⁹, as alterações foram categorizadas e a soma delas considerada, em vez de se concentrar na diferença antigênica individual.

As SMD com alterações citogenéticas de alto risco apresentaram mais alterações imunofenóticas. Dos casos analisados, 77% apresentaram cariótipo normal e alterações fenóticas em todos eles, sendo que 56% tiveram 6 ou mais alterações. Esses dados reforçam a importância da citometria quando o cariótipo é normal.

Muitas alterações imunofenóticas em pacientes com anormalidades citogenéticas de alto risco foram demonstradas em outros estudos, assim como pacientes com cariótipo favorável apresentaram menos alterações imunofenóticas. Pacientes com cariótipo normal também apresentaram anormalidades imunofenóticas.^{19,25}

Assim, a análise por citometria de fluxo pode ser especialmente útil para a avaliação de risco das SMD nos pacientes com citogenética normal, com o mínimo de alterações displásicas identificadas pela morfologia e com contagem baixa de blastos.¹⁹⁻²¹

Stetler-Stevenson e colaboradores⁴³ sugerem que duas ou mais alterações por subpopulações são específicas de SMD. Entretanto, displasias em duas ou mais linhagens também têm sido descritas, por exemplo, em casos de desnutrição, no uso de drogas citotóxicas ou imunossupressoras, abuso de álcool e deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico⁴⁰.

Estudos anteriores mostram que o número de alterações identificadas pela citometria de fluxo aumenta com a progressão da doença ou correlacionam com características morfológicas, citogenéticas e IPSS. A identificação de alterações mielóides, monocíticas e imunofenótipos anormais nos mieloblastos de pacientes com SMD pela citometria de fluxo pode acrescentar significado prognóstico, além daqueles obtidos pela morfologia e citopenias.^{19,22,40,42}

Stachurski e colaboradores⁴¹ observaram em seus estudos que algumas alterações que qualificariam um caso como anormal, tais como a expressão de antígenos linfóides nos

blastos, poderia somente ser detectado pela citometria de fluxo, especialmente quando a porcentagem de blastos era baixa.

No presente estudo, o número de alterações aumentou proporcionalmente com a porcentagem de blastos na citologia, com as células CD34⁺, células CD34⁺/CD13⁺, com as células imaturas não linfóides e correlacionou com o IPSS e com a classificação OMS. A diminuição de células precursoras B e da hemoglobina teve correlação com o aumento do número das alterações.

Wells e colaboradores¹⁹ demonstraram que a quantidade de anormalidades fenotípicas na maturação mielóide, monocítica e blastos tiveram boa correlação com a pontuação IPSS. Além disso, em pacientes com SMD submetidos a transplante alogênico, a pontuação das alterações utilizada para avaliar a expressão anormal de antígeno teve correlação com os resultados pós-transplante¹⁹.

Van de Loosdrecht e colaboradores⁴⁰ mostraram evidências de que a citometria de fluxo identifica pacientes com alterações na linhagem mielomonocítica, embora sejam classificados como AR unilinhagem com ou sem sideroblasto em anel pela morfologia.

A análise por citometria de fluxo permite identificar pacientes com cursos clínicos distintos, não determinados pelo sistema de pontuação prognóstica clássico. Estas observações podem contribuir para definição de novos subgrupos de SMD e idealizar um sistema de pontuação prognóstica que considere as alterações imunofenotípicas, com consequências nas decisões de tratamento em um futuro próximo.^{19,40}

Embora um amplo painel tenha utilidades no estudo imunofenotípico das SMD pela citometria de fluxo, o uso consciente de um painel preciso de 10 anticorpos, com combinações que permitiram uma ampla análise multiparamétrica nos diversos grupos populacionais da MO, propiciou a detecção de 16 alterações distintas.

Vale salientar que o CD45 estava presente em todas as combinações, o que possibilitou a separação das populações pelo SSC/CD45 e a investigação da expressão dos antígenos em cada uma delas. A diminuição do SSC pôde ser visualizada em todas as combinações, por causa da presença do CD45. É fundamental o uso de controles normais para se estabelecer os padrões alterados.

A combinação HLA-DR/CD14/CD45/CD33 permitiu a análise quantitativa e qualitativa dos monócitos, e do assincronismo de HLA-DR/CD33 nos granulócitos

maduros. Os blastos foram extensamente estudados pela combinação CD19/CD34/CD45/CD117 na qual foi determinada a presença ou ausência de células precursoras B, aumento de células CD34⁺ totais, mieloblastos CD34⁺/CD117⁺, e células imaturas CD34⁺/CD117⁻. Além de possibilitar o estudo da expressão anômala de CD34 nos granulócitos e monócitos.

A combinação CD16/CD34/CD45/CD13 possibilitou o estudo do padrão de maturação mielomonocítico, a quantificação de células CD34⁺, a determinação do fenótipo CD34⁺/CD13⁺, além de permitir a investigação da expressão anômala de CD34 nos granulócitos e monócitos, e a quantificação de monócitos CD16⁺. As alterações nas populações minoritárias foram determinadas pela combinação HLA-DR/CD123/CD45/CD33.

Dessa forma, as combinações que mais forneceram informações relevantes foram: CD19/CD34/CD45/CD117 e CD16/CD34/CD45/CD13. Possivelmente o estudo de expressões anômalas com marcadores linfóides e do assincronismo de maturação nas células CD34 positivas, poderia fornecer dados prognósticos mais importantes do que a quantificação de populações minoritárias.

As expressões de antígenos linfóides aberrantes nos blastos, independentemente, colocariam o caso de SMD dentro da categoria anormal pela avaliação da citometria de fluxo. No estudo de Stachurski e colaboradores⁴¹, tais alterações foram mais freqüentes em SMD de alto risco do que nas de baixo risco e a expressão do CD56 em mais de 25% de células mielóide e monocíticas foi praticamente exclusiva nas dispoieses mielóides^{31-33,41}.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- O painel aplicado foi capaz de distinguir uma mediana de 7 (2-15) alterações/caso, das 16 possíveis.
- É necessário ter padrões de controle normal para distinguir o que é anormal nas SMD.
- Os resultados são otimizados com o uso do CD45 em todas as combinações.
- O painel, embora tenha 10 anticorpos foi suficiente para realizar o diagnóstico de SMD em 91% de nossos casos.
- A citometria de fluxo pode ser especialmente útil para a avaliação de risco das SMD nos pacientes com citogenética normal e com contagem baixa de blastos.
- O painel aplicado permitiu a detecção de características associada com a agressividade dos casos como:
 - aumento do número de alterações imunofenotípicas,
 - aumento das células CD34⁺,
 - aumento dos mieloblastos ,
 - aumento das células precursoras imaturas.
- Assim, propões-se o seguinte painel para a rotina laboratorial de diagnóstico de SMD:

Combinação de anticorpos monoclonais
HLA-DR FITC/CD14 PE/CD45 PerCP/CD33APC
CD19 FITC/CD34 PE/CD45 PerCP/CD117APC
CD16 FITC/CD34 PE/CD45 PerCP/CD13APC
HLA-DR FITC/CD123 PE/CD45 PerCP/CD33APC

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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 Jun; 28(6): 587-94.
2. Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Br. Journal of Haematology*. 1998 May; 101(2): 220-30.
3. 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 Jul; 26(7): 677-86.
4. Magalhães SM. Síndromes mielodisplásicas- diagnóstico de exclusão. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009; 28: 175-7.
5. Hofmann WK, Vos S, Komor M, Hoelzer D, Wachsman W, Koeffler HP. Characterization of gene expression of CD34+ cell from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood*. 2002 Nov; 100 (10): 3553-60.
6. Velloso ERP. Agentes imunossupressores, talidomida e ácido valpróico nas síndromes mielodisplásicas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2006; 28: 213-7.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H.R, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematological*. 1982 Jun; 51(2): 189-99.
8. Bortolheiro TC. Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2006; 28: 194-7.
9. Vardiman JW, Harris NL, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 Oct; 100(7): 2292-302.
10. Swerdlow S, Camp E, Harris N, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008
11. Bennett JM. Myelodysplastic syndromes: update on classification. *Leukemia Research*. 2009; 33(S1): S6-8.
12. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluation in MDS. *Blood*. 1997 Mar; 89(6): 2079-88.

13. Haase D, Schanz J, Tuechler H, Sole F, Mallo M, Hildebrandt B, et al. Update cytogenetic risk features in MDS – present state. *Leukemia Research*. 2009; 33(S1): S9-10.
14. 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 Jun; 31(6): 727-39.
15. 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 Jan; 32(1): 5-17.
16. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometric in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009 Aug; 94(8):1124-34.
17. Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CSP, 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 Feb; 31(2):147-55.
18. Cañizo MC, Fernández E, López A, Vidriales B, Villarón E, Arroyo JL., et al. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2003 Apr; 88(4): 402-7.
19. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisernring WM, Deeg HJ. Myeloid and monocytic dispoiesis as determinated by flow cytometry scoring in myelodysplastic syndromes correlates with the IPSS and with outcome after hemopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003 Jul; 102(1):394-405.
20. 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 Aug; 108(3):1037-44.
21. 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 May; 32(5):699-707.

22. Lorand-Metze I, Califani SMV, Ribeiro E, Lima CSP, Saad STO, Metze K. The impact of phenotypic abnormalities on survival of myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2007;31(S1): S131.
23. Pirruccello SJ, Young KH, Aoun P. Myeloblast phenotypic changes in myelodysplasia. *Am J Clin Pathol*. 2006 Jun; 125(6):884-94.
24. Lorand-Metze I, Califani SMV, Ribeiro E, Lima CSP, Metze K. The prognostic value of maturation-associated phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2008 Feb; 32(2):211-3.
25. Kussick SJ, Fromm JR, Rossini A, Li Y, Chang A, Norwood TH, Wood BL. Four-color flow cytometry shows strong concordance with bone marrow morphology and cytogenetics in the evaluation for myelodysplasia. *Am J Clin Pathol*. 2005; 124(6):170-81.
26. Lochem EG, Velden VHJ, Wind JG, Marvelde JG, Westerdal NAC, Dongen JJM, Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Cytom*. 2004 Jul; 60(1): 1-13.
27. Lorand-Metze, I. Contribuição da citometria de fluxo para o diagnóstico e prognóstico das síndromes mielodisplásicas . *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2006; 28: 178-81.
28. Ribeiro E, Lima CSP, 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. *Leukemia & Lymphoma*. 2004 Feb; 45 (2): 309-13.
29. Dunphy CH, Orton SO, Mantell J. Relative contributions of enzyme cytochemistry and flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of acute myeloid leukemias with a monocytic component evaluation of absolute monocytes. *Am J Clin Pathol*. 2004 Dec; 122(6): 865-74.
30. Szeberényi JB, Rothe G, Pállinger E, Orsó E, Falus A, Shmitz G. Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell precursor heterogeneity in whole blood. *Immunobiology*. 2000 May; 202(1): 51-8.

31. Zelezníková T, Stevulova L, Kovarikova A, Babusíková O. Increased myeloid precursors in regenerating bone marrow; implications for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2007; 54(6): 471-7.
32. Pereira FG, Metze K, Costa FPS, Lima CSP, Lorand-Metze I. Phenotypic quantitative features of patients with acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2006 53(2):155-60.
33. Zelezníková T, Babusíková O. The value of dot plot patterns and leukemia-associated phenotypes in AML diagnosis by multiparameter flow cytometry. *Neoplasma*. 2005; 52(6):517-22.
34. Béné, M.C. Immunophenotyping of acute leukemias. *Immunology Letters*. 2005 Apr; 98(1): 9-21.
35. Orfao A, Ortuño F, Santiago M, Lopez A, Miguel J. Immunophenotyping of Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. *Cytometry A*. 2004 Mar; 58(1): 62-71.
36. Ribeiro E, Matarraz Sudón S, Santiago M, Lima CSP, Metze K, Giralto M, Saad STO, Orfao A, Lorand-Metze I. Maturation-associated immunophenotypic abnormalities in bone marrow B-lymphocytes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2006 Jan; 30(1):9-16.
37. Maftoun-Banankhah S, Maleki A, Karandikar NJ, Arbini AA, Fuda FS, Wang HY, Chen W. Multiparameter flow cytometric analysis reveals low percentage of bone marrow hematogones in myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol*. 2008 Feb; 129 (2):300-8.
38. 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*. 2008 Jun; 22(6):1175-83.
39. Ma L, Delforge M, van Duppen V, Verhoef G, Emanuel B, Boogaerts M, Hagemeijer A, Van den Berghe P. Circulating myeloid and lymphoid precursor dendritic cells are clonally involved in MDS. *Leukemia*. 2004 Sep; 18(9): 1451-6.

40. van de Loosdrecht A, Westers TM, Westra AH, Dräger AM, van der Velden VHJ, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct subgroups in low and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*. 2008 Feb; 111(3):1067-77.
41. 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: Emphase on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leukemia Research*. 2008 Feb; 32(2): 215-24.
42. Reis SC, Traina F, Metze K, Saad ST, Lorand-Metze I. Variation of bone marrow CD34+ cell subsets in myelodysplastic syndromes according WHO types. *Neoplasma*. 2009; 56(5): 435-40.
43. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbor N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001 Aug; 98(4): 979-87.
44. Mizuno K, Toma T, Okamoto H, Yamazaki H, Ohta K, et al. Selective expansion of CD16^{high} CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin. Exp. Immunol*. 2005; 142: 461-70.
45. Skinner NA, MacIssac CM, Hamilton JÁ, Visvanathan K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14 (dim) CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin. Exp. Immunol*. 2005; 141: 270-8.

Anexos

9. ANEXOS

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. |

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Avaliação multiparamétrica por citometria de fluxo de um painel racionalizado de quatro cores para o diagnóstico de Síndromes Mielodisplásicas.

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:

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

- b. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
- c. 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.
- d. 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.
- e. 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.
- f. 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.
- g. 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
Fone: (19) 3521-8671

Profa. Dra. Irene Lorand-Metze

Orientadora
Fone: (19) 3521-8740

Tabela 1: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com SMD cont..

Casos	OMS	Sexo	Idade	Hb(g/dl)	Segx10 ⁹ /l	Plt x10 ⁹ /l	Cariotipo	Blastos MO(%)	IPSS
1	AREB-II	F	43	10	0,6	78	48 XX, +5, +20	17	INT-2
2	AREB-II	M	69	8,8	2,1	39	47 XY, +8, del(21)(q22)	12	HIGH
3	AREB-I	M	73	13	2	139	normal	5,5	INT-1
4	CRDMSA	F	69	7,9	0,5	87	normal	2	INT-1
5	AREB-II	F	40	9,4	2,3	198	normal	13	INT-2
6	CRDMSA	M	93	10	4,1	220	normal	1,5	LOW
7	CRDM	M	63	13,8	1,9	104	normal	1,5	LOW
8	CRDMSA	M	77	8,9	2,2	221	normal	0	LOW
9	CRDM	M	40	8,3	1,3	17	normal	1	INT-1
10	AREB-II	M	64	5,1	4,3	841	normal	20	INT-2
11	CRDM	F	54	15,1	1,2	236	normal	1	LOW
12	SMD del(5q)	F	36	6,2	2,1	277	46XX,del(5)(q13)	2	LOW
13	CRDM	M	60	8,1	2,9	262	normal	3	LOW
14	CRDM	M	29	6,6	2,2	199	normal	2	LOW
15	CRDMSA	F	74	8,4	2,1	419	normal	0	LOW
16	CRDM	M	59	16,1	1,8	137	normal	3	LOW
17	CRDM	M	59	16,2	0,9	179	normal	2,5	LOW
18	CRDM	F	34	13,3	0,5	120	normal	1	LOW
19	CRDM	M	33	12,2	0,7	53	45XY,-7	3	INT-2
20	CRDM	M	30	15,1		89	normal	2	INT-1
21	AR	M	80	13,2	4,2	229	normal	1	LOW
22	CRDM	F	46	15	2	116	normal	2,5	LOW
23	AREB-I	M	73	8,5	2,1	79	normal	6,6	INT-1
24	CRDM	F	67	10,2	0,9	228	normal	0,5	INT-1
25	AREB-I	M	58	7,1	0,9	77	normal	8,5	INT-1
26	AR	F	62	12,2	2,9	181	não avaliável	0	não avaliável
27	CRDM	F	37	12,2	1,4	226	normal	4	LOW
28	CRDMSA	M	69	10,2	5,3	322	normal	0	LOW
29	CRDMSA	M	62	10,4	0,9	26	normal	3	LOW
30	CRDM	F	60	8	1	258	normal	0	INT-1

Tabela 1: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com SMD

Casos	OMS	Sexo	Idade	Hb(g/dl)	Segx10 ⁹ /l	Plt x10 ⁹ /l	Cariotipo	Blastos MO(%)	IPSS
31	CRDM	M	41	9,6	1,3	157	47XY,+8	0	INT-1
32	CRDM	M	27	7,3	2,2	248	Normal	0	LOW
33	CRDM	M	49	12,8	2,2	116	47XY,+8, 20,t(20;21)(p11;p13)	0	LOW
34	AREB-II	F	64	9,7	1,6	25	complexo	19	HIGH
35	CRDMSA	M	55	7,5	1,7	854	normal	0	LOW
36	SMD del(5q)	F	79	8,1	2,4	746	46XX, del(5)(q13)	0	LOW
37	AREB-I	M	64	9	0,7	51	normal	8	INT-1
38	AREB-I	F	53	10,6	1,7	55	normal	7,5	INT-1
39	AREB-II	M	69	10,6	0,8	84	normal	12	INT-2
40	CRDM	M	51	5	0,3	7	46XY, 15p+	0	INT-1
41	CRDM	F	32	9,8	0,6	269	normal	0	INT-1
42	AREB-II	F	70	10,5	1	115	46XY,t(3;12)(p22;q24),del(5)(31),i(17)(q10)	12,5	INT-1
43	AREB-I	M	74	7,1	3,7	20	normal	8	INT-1
44	CRDM	F	23	8,4	1,1	34	normal	0	INT-1
45	CRDM	M	81	7,5	0,7	108	46XY	4	INT-1
46	AREB-I	M	67	6,6	1,1	28	normal	9	INT-1
47	CRDM	F	84	10,5	3,5	262	normal	3	LOW
48	AREB-II	M	77	13,5	1,3	30	45,XY,del(1)(q21),t(1;7)(q21;p12),-7,t(7;11)(p21;q13),-11	9,5	INT-2
49	CRDM	F	85	9,4	1,2	258	normal	0	INT-1
50	AREB-II	M	70	11,7	1	112	normal	16	INT-2
51	CRDM	F	43	10,8	0,8	310	normal	0,5	LOW
52	AREB-II	F	44	7,7	0,9	16	45XX,-7	12	HIGH
53	CRDM	F	80	6,5	1,3	285	normal	2,5	INT-1
54	CRDMSA	M	74	4,8	2,5	456	normal	3	LOW

Tabela 2: Características imunofenotípicas dos pacientes com SMD - Série Granulocítica (IMF) cont...

Casos	Promielócitos					Mielócitos				Metamielócitos		Neutrófilos		Metamielócitos/Neutrófilos		
	SSC	CD13	CD16	CD33	HLA-DR	CD13	CD16	CD33	HLA-DR	CD 13	CD16	CD13	CD16	CD33	HLA-DR	CD34
1	598			570	83			400	17					392	9	1
2	546			160	132			93	8					65	5	1
3	594			348	333			198	10					135	5	0
4	556															0
5	447			535	172			244	10					127	5	
6	403	118	13	272	321	29	21	78	8	17	237	116	6097	30	4	
7	494			597	605			308	18					210	7	
8	447	56	25	321	205	8	14	160	11	12	162	196	1997	127	5	
9	517	169	12	963	458	20	8	578	7	33	64	171	955	328	3	
10	538	386	11	250	148	13	11	117	8	12	90	104	1016	65	3	
11	402	330	20	519	257	12	24	269	17	18	203	279	2490	198	7	
12	390	150	13	568	450	27	16	270	12	36	120	149	1094	189	4	0
13	531	220	19	263	370	26	14	129	18	51	230	396	2420	94	4	1
14	566	181	20	436	97	36	16	196	8	48	152	216	1097	118	4	0
15	404	207	15	189	95	47	16	98	18	63	157	214	1231	104	6	1
16	447	138	16	338	316	7	15	128	8	8	122	58	1017	33	4	0
17	570	143	14	378	262	13	15	193	7	8	99	137	924	31	4	0
18	479	185	12	451	124	4	9	207	6	5	75	33	560	65	3	0
19	667	133	11	292	35	6	10	191	9	13	164	75	958	106	4	0
20	425	222	14	48	301	31	13	33	8	32	59	101	433	16	3	0
21	388	73	16	226	879	6	11	49	5	19	172	68	1123	4	5	0
22	478	191	25	128	826	4	23	45	9	2	319	37	1679	4	5	0
23	296	144	13	211	147	5	9	266	10	11	143			67	5	0
24	418	324	17	250	243	14	10	89	7	21	69	136	490	42	3	0
25	361	389	27	236	810	9	22	96	23	18	190	180	1813	23	9	0
26	462	235	34	285	627	61	34	144	23	72	369	203	3471	108	9	1
27	340	250	15	540	524	39	17	261	13	49	148	166	1246	165	5	0
28	263	302	10	511	107	39	6	196	8	58	91	333	710	119	2	0
29	274	251	19	284	112	12	21	111	9	11	113	61	555	28	5	0
30	573	215	24	169	243	13	14	69	9	21	163	90	1272	13	6	1

Tabela 2: Características imunofenotípicas dos pacientes com SMD - Série Granulocítica (IMF)

Casos	Promielócitos					Mielócitos				Metamielócitos		Neutrófilos		Metamielócitos/Neutrófilos		
	SSC	CD13	CD16	CD33	HLA-DR	CD13	CD16	CD33	HLA-DR	CD 13	CD16	CD13	CD16	CD33	HLA-DR	CD34
31	664	53	17	157	182	4	12	32	12	5	82	18	508	11	5	0
32	376	262	14	158	166	17	11	68	8	24	84	97	978	49	3	0
33	699	35	11	22	58	4	8	12	6	6	79	19	682	7	3	0
34	307	94	12	116	154	3	9	62	10	4	51	20	479	11	10	1
35	404	121	10	73	338	2	339	34	5	5	188	76	1198	3	4	0
36	324	231	17	407	296	13	10	193	12	40	136	346	1251	67	5	1
37	478	71	10	164	194	5	7	122	10	17	102	59	753	44	3	1
38	525	101	17	219	117	7	26	90	9	16	345	105	2091	37	4	0
39	429	60	10	277	75	10	9	242	9	10	66	20	409	94	4	0
40	571	73	10	80	80	11	15	22	7	4	86	24	637	8	588	0
41	358	252	7	139	190	7	10	55	7	9	67	32	566	32	3	0
42	227	52	8	209	130	33	4	91	6	10	47	35	483	51	2	0
43	388	96	8	52	257	7	11	46	10	8	117	37	816	31	5	0
44	622	73	18	119	619	7	13	36	18	8	65	44	570	16	8	0
45	339	110	13	206	640	48	14	143	20	7	286	42	2223	47	7	0
46	407	111	33	26	158	9	20	19	40	6	87	12	636	22	10	0
47	404	77	8	104	883	9	9	52	22	12	66	36	357	43	5	0
48	585	41	13	55	323	9	15	51	23	10	128	36	799	22	8	0
49	486	35	14	32	286	5	14	24	19	5	150	45	2221	14	7	0
50	340	65	9	35	354	7	8	18	31	8	216	30	1773	13	8	0
51	560	89	17	91	861	22	14	49	30	24	141	69	931	27	11	0
52	158	365	2	33	216	57	5	27	21	328	9	350	174	10	6	1
53	331	107	26	219	1022	6	18	110	40	7	79	34	470	29	20	1
54	609					34	13	11	155	31	154	59	1701	9	17	0

Tabela 3: Características imunofenotípicas dos pacientes com SMD - Série Monocítica (IMF)

Casos	%Monócitos	%Monócitos CD16	CD33	HLA-DR	CD34	Casos	%Monócitos	%Monócitos CD16	CD33	HLA-DR	CD34
1	0,3	0,1	953,5	173,2	1	31	7,0	0,6	90,0	103,5	0
2	4,7	0,2	553,1	303,1	1	32	2,9	0,6	327,9	73,2	0
3	2,7	0,3	685,6	244,2	0	33	5,7	1,3	31,2	114,1	0
4	1,7	0,1			0	34	9,2	0,3	121,9	99,5	1
5	1,6	0,2	572,6	98,9		35	1,1	0,2	30,7	163,2	1
6	2,0	0,7	383,9	212,9		36	0,9	0,2	638,0	103,9	1
7	4,1	0,3	1063,0	197,2		37	5,7	0,6	191,2	86,8	1
8	2,5	0,2	762,4	125,5		38	4,4	0,8	230,6	57,7	0
9	0,6	0,1	1876,5	261,7		39	2,7	0,2	276,6	24,8	0
10	8,2	1,3	247,5	56,6		40	1,9	0,4	65,8	29,1	0
11	2,5	0,3	1256,2	207,0		41	2,5	0,2	163,3	91,2	0
12	3,3	0,1	986,5	52,9	0	42	1,1	0,1	219,2	128,6	0
13	2,0	0,2	473,4	164,2	1	43	2,4	0,9	135,7	307,8	0
14	1,9	0,2	761,9	166,0	0	44	3,1	0,5	109,1	227,1	0
15	3,1	0,2	776,5	35,8	1	45	9,5	1,9	327,3	662,8	0
16	1,6	0,1	458,6	48,0	0	46	3,8	0,3	164,5	348,3	1
17	1,6	0,2	594,7	86,8	0	47	1,0	0,2	168,8	337,7	0
18	5,7	0,3	162,3	28,1	0	48	7,8	0,9	108,3	557,0	0
19	20,2	0,5	309,2	61,2	0	49	2,2	0,8	73,5	128,4	0
20	3,7	0,6	28,9	101,8	0	50	10,8	4,9	69,1	644,3	0
21	17,2	12,1	177,9	980,9	0	51	5,8	0,9	332,0	150,0	1
22	1,5	0,1	57,5	221,2	0	52	0,3	0,1	36,8	482,8	1
23	1,3	0,1	306,9	107,6	1	53	2,1	0,9	277,9	578,8	1
24	3,7	0,2	276,4	28,1	0	54	4,7	1,3	21,9	513,0	0
25	0,9	0,1	496,5	497,8	0						
26	1,9	0,4	708,9	503,5	1						
27	3,0	0,2	742,9	134,6	0						
28	2,0	0,2	723,8	16,0	1						
29	1,3	0,2	272,1	81,4	0						
30	0,6	0,2	227,7	96,7	0						

Tabela 4: Características imunofenotípicas dos pacientes com SMD - *Gate* de Blastos (%) cont...

Casos	<i>Gate</i> Blastos	CD34 ⁺	CD34 ⁺ CD19 ⁺	CD34 ⁺ /CD13 ⁺	CD34 ⁺ /CD13 ⁻	CD34 ⁺ /CD117 ⁻	CD34 ⁺ /CD117 ⁺	CD123 ⁺ /HLA- DR ⁻	CD123 ⁺ /HLA- DR ⁺
1	11	10	1,7					0,7	3,5
2	14	10,9	0,6					0,3	4
3	2,4	2,4	12,7					0,7	0
4	2,8	2	0					0,2	0,5
5	7,6	7,1	0					0,6	0,1
6	0,6	0,6	1,7	0,4	0,2			0,6	0,1
7	1,2	1,3	0					0,4	0,1
8	0,8	0,3	0					0,4	0,1
9	3,2	2,5	0					0,1	0,1
10	10,4	4,2	0					0,2	0,2
11	2,7	2,7	1,9					0,1	0,6
12	1,9	1,6	3,8	1	0,4			0,7	0,2
13	2,5	2,6	0,4	1,6	0			0,4	0,1
14	3,1	1,5	28,6	0,2	0,2			0	0,3
15	1,1	0,7	0	0,4	0			2,1	0
16	1,5	0,7	36,1	0,2	0,3			0,1	0,1
17	1,9	1,6	18,5	0,7	0,2			0,2	0,2
18	1,6	1,1	17	0,2	0,5			0,4	0,2
19	3,3	1,1	0	1	0,3			0,3	0
20	2	0,8	0	0,5	0,1	0	0,7	0,1	0,1
21	1,1	0,6	0	0,1	0	0	0,9	0,1	0
22	2,6	1,2	17,1	0,3	0,5	0,5	0,6	0,2	0,2
23	6,9	6,9	2,9	5,1	0,7	0,2	6,2	0,1	0,1
24	1,3	0,9	27,8	0,3	0,4	0,1	4,6	0,2	0,3
25	8	6,3	0	3,9	1,1	0,2	3,5	0,7	0,5
26	0,4	0,4	0	0,4	0	0	0,4	0,1	0,1
27	3,9	3,4	8	0,9	0	0	1,1	0,2	0,3
28	0,3	0,2	0	0,2	0	0	0,2	0,6	0,1
29	3,1	2,4	1,2	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0
30	0,5	0,5	0	0,4	0,1	0	0,5	0,1	0,2

Tabela 4: Características imunofenotípicas dos pacientes com SMD - *Gate* de Blastos (%)

Casos	<i>Gate</i> Blastos	CD34+	CD34+CD19+	CD34+/CD13+	CD34+/CD13-	CD34+/CD117-	CD34+/CD117+	CD123+/HLA- DR-	CD123+/HLA- DR+
31	0,9	0,1	0	0,1	0,1	0	0,2	0,1	0
32	0,8	0,7	15,4	0,2	0,1	0	0,6	0,2	0,1
33	0,1	0	0	0	0	0	0	0,2	0,1
34	13,9	10,9	0,3	6,4	7,6	2,8	8,2		
35	0,7	0,7	3,1	0,2	0,5	0,1	0,7	0,3	0
36	1,8	1,4	0	1,5	0,6	0,4	2	0,3	0,1
37	7,7	4,3	3	2,4	2,3	1,9	2,4		
38	4,3	2,2	3,1	0,3	1,2	0,1	2,2		
39	9,9	4,5	0	2	2,5	0,2	3,3		
40	0,6	0	50	0	0	0	0		
41	2,3	1,1	21,1	0,8	0,4	0,2	0,7		
42	13,6	13	0	9,4	3,6	0,1	12,9		
43	4	2,4	0,9	1,2	0,9	0,5	1,9		
44	0,6	0,1	50	0	0	0,1	0,1		
45	1	0,6	4,9	0,3	0,2	0,1	0,5		
46	4,7	3,6	1,7	0,3	3,3	0,4	2,7		
47	1,9	1,1	0	0,6	0,4	0,2	0,6	0,3	0,4
48	1,1	0,5	3,8	0,4	0,1	0,1	0,3	0	0,5
49	1,3	0,2	13	0,1	0,1	0,2	0,2	0,7	0,3
50	0,6	0,6	0	0,1	0,4	0,1	0,4		
51	1,6	0,2	12,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,2
52	10,2	0,8	0	0,7	0,1	0,2	1,4	0,6	0,3
53	6,8	5,3	0	3,4	1,9	1,9	3,4	0,7	0,6
54	5	3	1,4	2,9	0	2	0,8	0,8	0,1

Tabela 5: Total de alterações imunofenotípicas encontradas nos pacientes com SMD

Nº de Alterações Imunofenotípicas							Nº de Alterações Imunofenotípicas						
Casos	Granulócitos	Monócitos	CD34	Basófilos	Cel. Dendr. Linf.	Total	Casos	Granulócitos	Monócitos	CD34	Basófilos	Cel. Dendr. Linf.	Total
1	2	2	2	1	1	8	31	2	2	1	0	1	6
2	1	3	2	0	1	7	32	1	1	0	0	0	2
3	1	1	1	1	1	5	33	1	2	1	0	1	5
4	0	0	2	0	1	3	34	4	2	6			12
5	1	0	2	1	0	4	35	3	1	2	1	1	8
6	2	1	1	1	0	5	36	2	2	5	0	0	9
7	1	1	1	1	1	5	37	2	3	6			11
8	1	0	1	1	0	3	38	1	2	4			7
9	2	2	2	1	1	8	39	3	1	5			9
10	1	3	2	0	0	6	40	2	2	0			4
11	3	0	2	0	1	6	41	3	0	1			4
12	2	1	3	1	0	7	42	2	0	5			7
13	3	1	3	1	1	9	43	4	2	5			11
14	1	0	0	1	0	2	44	2	1	0			3
15	4	2	1	1	1	9	45	4	3	1			8
16	1	1	0	0	0	2	46	4	3	4			11
17	0	0	2	0	0	2	47	3	1	2	0	1	7
18	2	2	0	1	0	5	48	2	3	1	1	1	8
19	2	2	2	1	1	8	49	2	1	0	1	1	5
20	2	2	1	0	0	5	50	3	3	1			7
21	3	3	2	0	1	9	51	2	3	0	1	0	6
22	2	0	0	0	0	2	52	3	2	3	1	0	9
23	3	1	5	0	1	10	53	4	3	6	1	1	15
24	3	2	1	0	0	6	54	2	3	4	1	1	11
25	3	2	5	1	1	12							
26	3	3	1	0	0	7							
27	3	0	4	0	0	7							
28	3	2	1	1	1	8							
29	2	0	2	0	1	5							
30	3	1	1	0	0	5							

VARIATION OF BONE MARROW CD34+ CELL SUBSETS IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES ACCORDING TO WHO TYPES

S. C. REIS, F. TRAINA, K. METZE, S. T. O. SAAD, I. LORAND-METZE*

Faculty of Medicine, State University of Campinas, BR - 13081-970 Campinas - SP Brasil, e-mail: ilmetze@unicamp.br

Received November 11, 2008

Bone marrow (BM) hematopoietic progenitor cells (CD34+) are a heterogeneous population with varying degrees of commitment and maturation to several cell lineages. In myelodysplastic syndromes (MDS), this population is increased. We examined the major cell types found in the blast gate by flow cytometry in newly diagnosed patients with MDS, compared them to normal BM and studied their variation according to WHO type. Two subsets defined by SSC were found both in normal BM and MDS, corresponding to myeloblasts and B-cell precursors. The number of B-cell precursors among all nucleated cells was equally low, independent of WHO type. However, the subset with an intermediate SSC, but CD117, CD13 and CD19 negative increased with the rise of myeloblasts. Concomitantly, the ratio between CD34+/CD117+/CD34-/CD117+ increased. These two features are consistent with the maturation block occurring in the progression of the neoplastic clone. We conclude that the quantitative analysis of the cell types present in the BM blast gate by flow cytometry is not only important for the diagnosis of MDS in patients with peripheral cytopenias and a normal karyotype, but gives also important prognostic information of the patients

Key words: myelodysplasia, hematogones, blasts, SSC, WHO type, CD34+ cells

Flow cytometry has been used in MDS to examine not only the maturation abnormalities of the myelomonocytic lineage, but also to quantify CD34+ hemopoietic progenitors [1-7]. Several kinds of phenotypic abnormalities have been detected in these cells such as aberrant expression of cross-lineage antigens and asynchronous maturation, as it is also found in acute myeloid leukemia (LAIPs) [8-10]. Some of them have been associated with disease progression or a short survival [1, 2, 5-7].

A decrease of CD34+ B-cell precursors has also been repeatedly described [4, 11, 12]. Recently, Satoh et al [4] stated that the proportion of CD34+/CD19+ B-cell precursors among all CD34+ bone marrow (BM) cells is an easily reproducible parameter for the differential diagnosis between low-grade MDS and non-clonal disorders presenting peripheral cytopenias. However, the relative changes of the CD34+ cell subsets among the different WHO types of MDS and the change of the relation of these subsets during the progression of the disease have seldom been examined.

BM CD34+ cells are a heterogeneous precursor cell population with varying degree of lineage commitment, comprising mainly myelomonocytic precursors, very early erythroblasts, B-cell precursors (hematogones), and minor subsets such as immature dendritic cells, etc [13].

In a previous study we have shown that in MDS, a high SSC of the cells in the blast gate measured by flow cytometry is associated with a shorter survival of the patients [5].

Taking into consideration all these data, we examined the composition of cells in the blast gate in patients with MDS, compared it to normal BM and studied their variation according to WHO type.

Patients and methods

BM of consecutive newly diagnosed patients with MDS (45 cases) was examined and compared with normal BM (20 cases) from donors of allogeneic bone marrow transplantation. Diagnosis of MDS was based on peripheral blood (PB) counts, bone marrow (BM) cytologic smears stained with May-Grünwald Giemsa and Perl's stains as well as on karyotype evaluation. The patients were classified according to the WHO criteria [14]: 7 cases of refractory anemia, 15q- syndrome, 2 cases of

* Corresponding author

sideroblastic anemia, 19 of refractory cytopenia with multilineage dysplasia, 6 refractory cytopenias with multilineage dysplasia with ring sideroblasts, and 10 refractory anemias with excess of blasts (RAEB). According to the IPSS, 20 cases were low risk, 10 were intermediate-1, 6 were intermediate-2 and 5 were high risk. In 4 cases, no mitoses could be obtained for karyotyping. As the sample was small and IPSS could not be performed in all patients, the cases were grouped into MDS with <5% BM blasts (low risk) and MDS with >5% BM blasts (high risk) for analysis.

BM was analyzed by multiparameter flow cytometry using four-color combinations of monoclonal antibodies: CD19/CD34/CD45/CD117, CD16/CD34/CD45/CD13 and HLA-DR/CD14/CD45/CD33. Immunofluorescence staining was made using a standardized direct stain-and-then-lyse-and-wash technique [1]. A minimum of 50 000 events were acquired for each sample.

The CD34+ cells were separated in the CD34/SSC plot (Fig 1A). This cell population was then displayed on the CD45/SSC plot in order to examine their expression of CD45 and their localization in the several lineages separated by this second plot. In this gate, two subsets of cells could be separated according to SSC: subset 1 with a high and subset 2 with a low SSC (Fig. 1B). The total number of CD34+ cells was determined in the SSC/CD34 plot. Hematogones were analyzed as percentage of all nucleated cells and of all CD34+ ones. The early maturation in the myeloid compartment was examined by the expression of CD34/CD117 (Fig. 2) and CD34/CD13 (Fig 1C). In this last combination, 3 subsets could be detected by their expression of CD45 and SSC: lymphoid precursors (SSC^{low}/CD13-), SSC^{high}/CD13- and SSC^{high}/CD13+ cells. Data analysis was made using the PAINT-GATE software (BD-Biosciences). The mean fluorescence intensity of each antigen and the mean value for SSC was determined for each cell population. We also calculated the ratio between CD34+/CD117+ and CD34-

/CD117+ cells (maturation ratio) as well as the ratio between CD34+/CD117+ cells and the total number of CD117+ cells as proposed by Pirruccello et al [6]. All patients gave informed consent, according to the local Ethics' Committee.

The differences of variables studied among normal BM and both groups of MDS were assessed by the Kruskal-Wallis' test. The correlations among them were studied by the Spearman rank order correlation. The Winstat software was used.

Results

Median age of the MDS patients was 59 (27 – 80) years. The features of the several types of cells in the blast gate are shown in Tables 1 and 2. In normal BM, two subsets of cells presenting a distinctive SSC were found in the blast gate. The subset with a higher SSC (subset 1) showed a positive correlation with the CD34+/CD117+ cells ($r = 0.74$; $p < 0.005$) but not the CD34+/CD13+ ones. Subset 2 had a positive correlation with the CD34+/CD19+ cells ($r = 0.79$; $p = 0.0001$) and the subset SSC^{low}/CD34+/CD13- ($r = 0.62$; $p = 0.006$). This subset, corresponding to B-cell precursors, was found in all normal BMs.

In MDS, both subsets could also be well separated by their different SSC, independent of WHO type and IPSS and presented similar values of SSC as in normal BM (Tab. 1). However, in RAEB a "smeared effect" could be observed (Fig 1B, Fig. 2C). Subset 1 was present in all cases, and was significantly correlated with the number of blasts in cytology ($r = 0.88$; $p < 0.0005$), that of CD34+CD13- cells ($r = 0.55$; $p < 0.0005$), that of CD34+CD13+ cells ($r = 0.83$; $p < 0.0005$), CD34+/CD117- ones ($r = 0.66$; $p < 0.0005$) and that of CD34+/CD117+ cells ($r = 0.81$; $p < 0.0005$).

The ratio CD34+/CD117+ / CD34-/CD117+ cells increased with rise of total CD34+ cells ($r = 0.44$; $p = 0.02$), number of

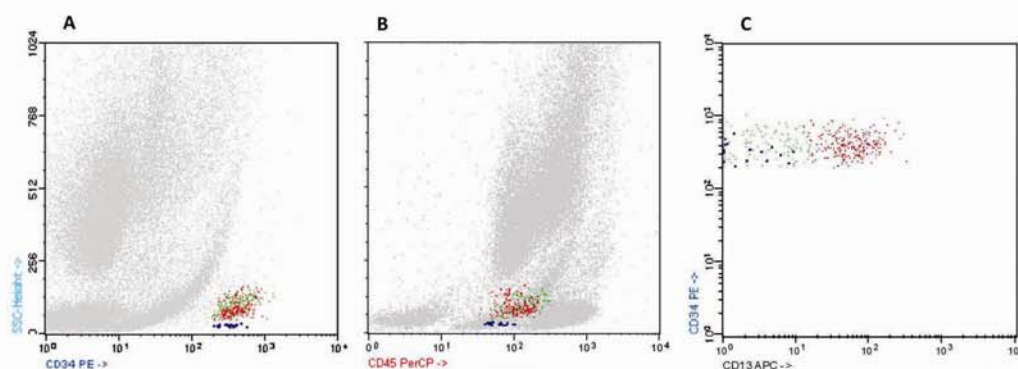


Figure 1: Analysis of the CD34+ cells in the combination CD16/CD34/CD45/CD13 (normal BM). A – separation of the CD34+ cells in the CD34/SSC bivariate plot. B – Localization of the CD34+ cells in the CD45/SSC bivariate plot. Subsets with a low and a high SSC. C – distribution of the 3 populations: SSC^{low}/CD34+/CD13- (B-cell precursors) (cyan), SSC^{high}/CD34+/CD13- (immature non-lymphoid precursors) (green), and SSC^{high}/CD34+/CD13+ myeloblasts (red).

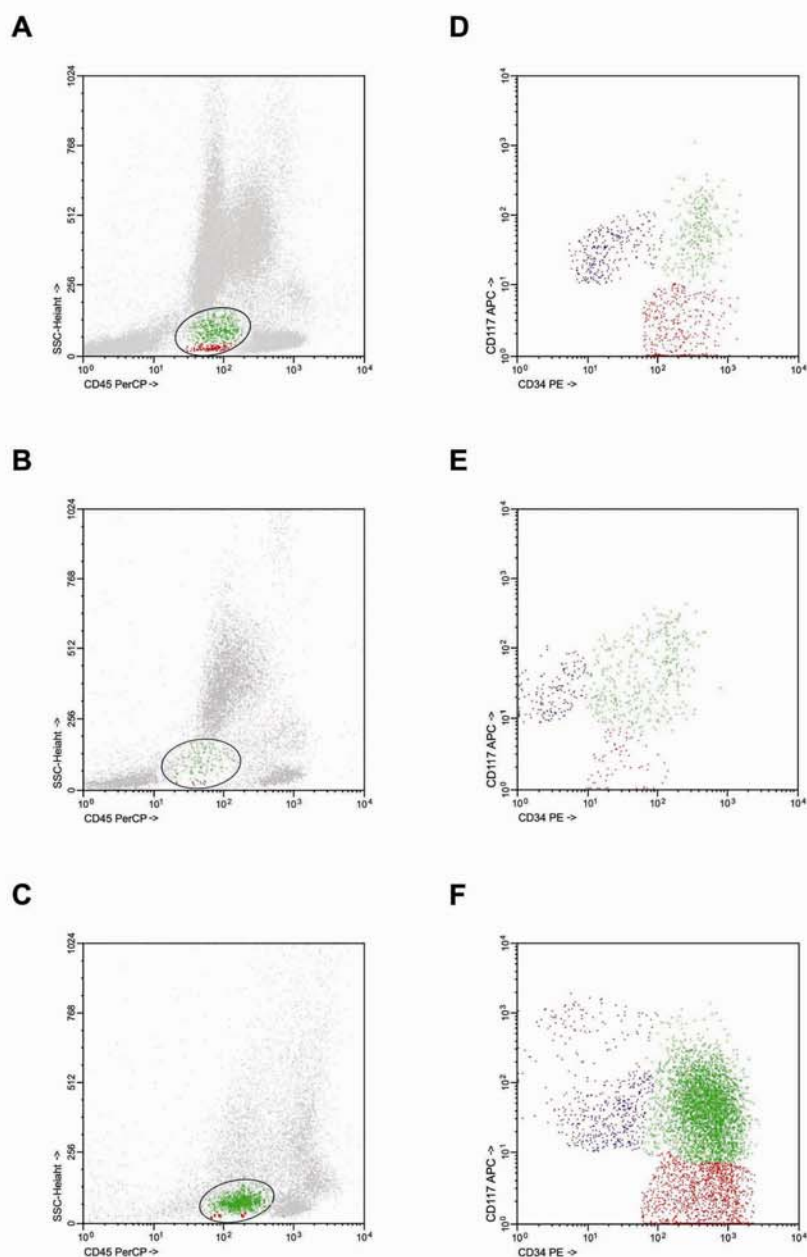


Fig. 2: A-C: subsets with a high and with a low SSC can be distinguished in the CD45/SSC plot in normal bone marrow (A) and patients with refractory anemia (B) or refractory anemia with excess of blasts (C). The proportion of cells in subset 2 is decreased in patients with MDS. D-E: early myeloid maturation analyzed in the CD34/CD117 combination. D - normal BM. E - refractory anemia (RA). F - refractory anemia with excess of blasts (RAEB). In RA, CD34+/CD117- cells are decreased, but in RAEB these cells increase.

Table 1: values of SSC in the several subsets of immature cells studied.

variable	Controls N = 20	MDS with blasts <5% n = 30	MDS with blasts >5% n = 9	P value*
% Blasts (cytology)	-	1.21 (0-4)	12.2 (5.5-19.0)	
SSC of all cells in the blast gate	110 (65-169)	106 (40-259)	113 (78-158)	0.66
SSC subset 1	113 (80-147)	117 (61-166)	107 (73-174)	0.86
SSC subset 2	38 (28-49)	36 (23-52)	47 (23-66)	0.15
SSC CD34+/CD117-	76	85	97	0.42
SSC CD34+/CD117+	109	109	107	0.96

Table 2: comparison of the variables studied between normal BM and patients with MDS (median and range)

variable	Controls N = 20	MDS with blasts <5% n = 35	MDS with blasts >5% n = 10	P value*
% Blasts (cytology)	-	1.21 (0-4)	12.2 (5.5-19.5)	<0.0005
% cells blast gate	1.26 (0.47-2.3)	1.63 (0.06-3.8)	8.04 (2.4-13.9)	<0.0005
% cells SSC ^{high} (1)	0.69 (0.24-1.5)	0.81 (0.02-2.77)	6.8 (1.6-9.9)	<0.0005
% cells SSC ^{low} (2)	0.16 (0.05-0.6)	0.03 (0-0.79)	0.31 (0-1.96)	0.001
Total CD34+ cells	0.78 (0.47-1.75)	1.18 (0.02-3.38)	6.8 (2.4-10.9)	<0.0005
% CD34+/CD19+ **	0.14 (0.04-0.53)	0.03 (0-0.42)	0.05 (0-0.30)	0.01
% CD34+/CD19+/total CD34+ cells	20.4 (6-35)	11.6 (1-36)	1.7 (0.3-12.0)	<0.0005
BI CD34+/CD13- low SSC	0.11 (0.02-0.32)	0.04 (0-0.44)	0.03 (0-0.51)	0.03
% CD34+/CD117+	0.41 (0-1.13)	0.55 (0.02-4.5)	4.86 (2.41-8.16)	0.01
BI CD34+/CD13+	0.31 (0.11-0.85)	0.26 (0.04-1.63)	4.50 (2.36-6.43)	0.004
% CD34-/CD117+	0.21 (0.02-0.47)	0.42 (0.05-1.7)	1.43 (0.18-2.79)	0.009
% CD34+/CD117-	0.27 (0-0.72)	0.11 (0-0.48)	1.03 (0.19-2.82)	0.01
BI CD34+/CD13- high SSC	0.20 (0-0.46)	0.21 (0-0.56)	1.67 (0.69-7.60)	0.003

* Kruskal-Wallis test; ** among all nucleated cells. Based only on the cases where the subset was found

cells in the subset 1 ($r = 0.60$; $p = 0.001$), CD34+/CD13+ ($r = 0.65$; $p < 0.0005$) and CD34+/CD117+ cells ($r = 0.68$; $p < 0.0005$).

The percentage of blasts in BM cytology correlated with the total CD34+ cells ($r = 0.88$; $p < 0.0005$) but also with sub-population 1 ($r = 0.76$; $p < 0.0005$), with the CD34+/CD117+ cells ($r = 0.60$; $p = 0.002$) and with the CD34+CD13+ ones ($r = 0.52$; $p = 0.001$).

In MDS, subset 2 was observed only in 24/39 cases. Correspondingly, the number of B precursors was found in only 21 cases and the SSC^{low}/CD34+/CD13- cells were found in 29/39 cases. Their number was lower as in normal BM but similar in MDS with a low or a high BM number of blasts (Tab. 2). However, the percentage of CD34+/CD19+ cells among all CD34+ ones decreased with the rise of BM blasts, and was lower in high risk MDS.

As in normal BM, in MDS, subset 2 presented a correlation with CD34+/CD19+ cells ($r = 0.62$; $p < 0.0005$) and with

that of SSC^{low}/CD34+/CD13- cells ($r = 0.87$; $p < 0.0005$). However, although CD34+/CD19+ cells and SSC^{low}/CD34+/CD13- cells were equally low in all types of MDS, the number of cells in subset 2, CD34+/CD117- cells and SSC^{high}/CD34+CD13- ones increased in the patients with RAEB. The percentage of BM blasts in cytology showed a correlation with subset 1 ($r = 0.76$; $p < 0.0005$) but also with subset 2 ($r = 0.41$; $p = 0.004$).

The maturation ratio was correlated with the percentage of cells in the blast gate ($r = 0.34$; $p = 0.06$), the number of cells in subset 1 ($r = 0.63$; $p = 0.001$), total CD34+ cells ($r = 0.44$; $p = 0.02$), CD34+/CD13+ ones ($r = 0.65$; $p < 0.0005$) and CD34+/CD117+ ones ($r = 0.68$; $p < 0.0005$). They also were positively related to the CD34+/CD117- cells ($r = 0.56$; $p = 0.003$) the SSC^{high}/CD34+/CD13- ones ($r = 0.63$; $p = 0.001$) and IPSS (0.62; $p = 0.001$). The index proposed by Pirruccello showed a correlation only with the percentage of blasts in BM cytology ($r = 0.50$; $p = 0.008$) the total cells in the blast gate

($r = 0.48$; $p = 0.001$) and the total number of CD34+ cells ($r = 0.42$; $p = 0.028$).

Discussion

CD34+ cells are increased in MDS, and are considered a hallmark in diagnosis and prognosis of this group of clonal disorders. Several phenotypic abnormalities have been described in these cells [1–4, 13, 15] which are more frequent in aggressive cases and progression to acute leukemia. Similar abnormalities have been found in acute myeloid leukemia, and have been useful for detection of residual disease after chemotherapy [8–10].

Bone marrow CD34+ cells are a heterogeneous precursor cell population comprising mainly myelomonocytic and B-cell precursors besides minor subsets [13].

Recent studies have shown that B-cell precursors are decreased in MDS [3, 4, 11–13]. This feature has been proposed as an easily reproducible parameter for diagnosis and useful for the differential diagnosis between low-grade MDS with a normal karyotype and non-clonal disorders presenting with peripheral cytopenias [4, 12]. These cells are found in the subset with a low SSC in the blast gate and have a CD34+/CD19+ phenotype. However, mainly low-grade MDS has been studied.

Our aim was to study the proportion of the major BM subsets of CD34+ cells in the blast gate in MDS, as compared to normal BM, as well as their variation according to the several WHO types and IPSS.

In normal BM we found two well-defined subsets in the blast gate: one presenting a high correspondence to myeloblasts (high SSC, CD34+/CD117+/CD13+ phenotype), and the other representing type I hematogones (low SSC, CD34+/CD19+ phenotype). In MDS both subsets could also be found. As in normal BM, subset 1 corresponded to myeloblasts, increasing in cases with a high BM blast count and a high number of CD34+ cells.

Subset 2 was absent in 39% of the cases with MDS. However, the number of these cells increased with the increase of BM blast count and that of CD34+ cells. But type I hematogones (CD34+/CD19+ cells) remained low, independent of WHO type and IPSS. The decrease in B-cell precursors is characteristic for all types of MDS, as has been already pointed out, confirming the hypothesis that an intrinsic defect of B-cell production is an early event in these clonal disorders [4, 11, 13]. Analyzing B-cell precursors in MDS, when their number was taken among all nucleated cells, they were equally low or absent in all WHO types. However, if they were calculated among total CD34+ cells, their number decreased with the rise of this last population. This may be the cause of discrepancies in the literature about the number of hematogones among the several WHO types [3, 4, 11, 13, 15].

The rise of cells in subset 2 in RAEB was due to CD34+/CD117-/CD13-/CD19- cells. In the CD34/CD13 plot we could separate 3 groups of cells: myeloblasts (high SSC, CD13+),

hematogones (low SSC, CD34+/CD19+/CD13-) and immature CD34+/CD13- cells with a higher SSC. This last population increased with the rise of BM blasts, total CD34+ cells and IPSS. This speaks in favor that in MDS, unlike in normal BM, subset 2 may contain, besides B-cell precursors, early non-lymphoid precursors that increase together with myeloblasts. In cases with a higher number of blasts, both subsets are also more difficult to separate. These cells might be committed to the myelomonocytic lineage, or may be myeloblasts or monoblasts with a deficiency of CD13. Therefore, the decrease in subset 2 is a good variable for the differential diagnosis only in early MDS but not in more advanced cases.

It was also interesting to note that, with an increase of myeloblasts, the ratio between CD34+/CD117+ and CD34-/CD117+ cells decrease, speaking in favor of a maturation block in the myeloid series, associated with progression of MDS. Recently, Pirruccello et al [6] pointed out that the relative proportion of CD34+/CD117+ cells among all CD117+ cells was an important hallmark of disease progression, indicating a progressive maturation block. In our study, this index showed a correlation with the BM blasts in cytology and the total number of CD34+ cells. However, the ratio between CD34+/CD117+ and CD34-/CD117+ cells, although showing no correlation with blasts in cytology, had a significant correlation with IPSS, subset 1 and immature non-lymphoid precursors. Therefore we hypothesize that the increase of this last subset is another feature indicative of a maturation block occurring during progression of the abnormal clone. This may be due to accumulating genetic defects of the hemopoietic precursors or to the increasingly abnormal function of the BM microenvironment in high grade MDS leading to an inability to support maturation of uncommitted progenitors as observed in acute myeloid leukemia [13].

The SSC of each subset as well as of each phenotypically defined cell type in the blast gate was quite constant for normal and clonal hemopoiesis. However, the proportion of each of them varied between normal BM and MDS, as well as with the increase of CD34+ cells in MDS. Therefore, the SSC of the whole population in the blast gate was highly dependent of the proportion of CD34+/CD117+ myeloblasts in the gate. This confirms our earlier finding of the association of a high SSC of all cells in the blast gate with a shorter survival of the patients [5].

So we conclude that the quantitative analysis of the cell types present in the blast gate in MDS by flow cytometry is not only important for the diagnosis in patients with peripheral cytopenias and a normal karyotype, but also gives important prognostic information as it has also been shown for granulocyte maturation abnormalities [2, 6, 13]. This flow cytometric variable is easy to obtain and could give useful information for indication of several new treatments as well as timing of bone marrow transplantation. It would be interesting to know if the increase of immature non-lymphoid precursors is related to progression of the MDS clone during the evolution of the disease or to a shorter survival of the patients.

Acknowledgements: This work was supported by FAEPEX, FAPESP and CNPq. Konradin Metzke, Sara TO Saad and Irene Lorand-Metze receive a research grant from CNPq (National Research Council).

References

- [1] Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CSP et al. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res* 2007; 31: 147–155 [doi:10.1016/j.leukres.2006.04.010](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.04.010) PMID:16750852
- [2] Wells DA, Benesch M, Loken MR et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometry scoring in myelodysplastic syndromes correlates with the IPSS and with outcome after hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102: 394–405. [doi:10.1182/blood-2002-09-2768](https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2768) PMID:12649150
- [3] Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C et al. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 1037–1044. [doi:10.1182/blood-2005-12-4916](https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4916) PMID:16574954
- [4] Satoh C, Dan K, Yamashita T et al. Flow cytometric parameters with little interexaminer variability for diagnosing low-grade myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2008; 32: 699–707. [doi:10.1016/j.leukres.2007.08.022](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.08.022) PMID:17936901
- [5] Lorand-Metze I, Califani SMV, Ribeiro E, Lima CSP et al. The impact of phenotypic abnormalities on survival of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2007; 31 (suppl 1): S131. [doi:10.1016/S0145-2126\(07\)70236-9](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(07)70236-9)
- [6] Pirruccello SJ, Young KH, Aoun P. Myeloblast phenotypic changes in myelodysplasia. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 884–894 [doi:10.1309/J3ET7RXDX4BKDLF](https://doi.org/10.1309/J3ET7RXDX4BKDLF) PMID:16690488
- [7] Lorand-Metze I, Califani SMV, Ribeiro E et al. The prognostic value of maturation-associated phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2008; 32: 211–213. [doi:10.1016/j.leukres.2007.06.014](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.06.014) PMID:17675154
- [8] Zelezníková T, Stevulova L, Kovarikova A et al. Increased myeloid precursors in regenerating bone marrow; implications for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Neoplasma* 2007; 54: 471–477.
- [9] Pereira FG, Metzke K, Costa FPS et al. Phenotypic quantitative features of patients with acute myeloid leukemia. *Neoplasma* 2006; 53: 155–160
- [10] Zelezníková T, Babusíková O. The value of dot plot patterns and leukemia-associated phenotypes in AML diagnosis by multiparameter flow cytometry. *Neoplasma* 2005; 52: 517–522.
- [11] Ribeiro E, Matarraz Sudón S, Santiago M et al. Maturation-associated immunophenotypic abnormalities in bone marrow B-lymphocytes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2006; 30: 9–16. [doi:10.1016/j.leukres.2005.05.019](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.05.019) PMID:16005514
- [12] Maftoun-Banankhah S, Maleki A, Karandikar NJ et al. Multiparameter flow cytometric analysis reveals low percentage of bone marrow hematogones in myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 300–308. [doi:10.1309/4W2G3NDXUPG5J33N](https://doi.org/10.1309/4W2G3NDXUPG5J33N) PMID:18208811
- [13] Matarraz S, Lopez A, Barrena S 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* 2008; 22: 1175–1183. [doi:10.1038/leu.2008.49](https://doi.org/10.1038/leu.2008.49) PMID:18337765
- [14] Vardiman JW, Harris NL, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292–2302. [doi:10.1182/blood-2002-04-1199](https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1199) PMID:12239137
- [15] Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a consensus working conference. *Leukemia Res* 2008; 32: 5–17. [doi:10.1016/j.leukres.2007.04.020](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.04.020) PMID:17576013



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 Fenoux, 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,

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