



ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DOS NEUTRÓFILOS E DOS MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM SINDROMAS MIELODISPLÁSICOS

ANA RITA ALVES AIRES

Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP

Orientador: **Prof. Doutora Margarida Lima**, HSA/CHP e ICBAS/UP

Coorientador: **Dra. Maria dos Anjos Teixeira**, HSA/CHP

Porto, 2016

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Medicina

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DOS NEUTRÓFILOS E DOS MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM SINDROMAS MIELODISPLÁSICOS

ESTUDANTE:

Ana Rita Alves Aires

ORIENTADOR:

Professora Doutora Margarida Lima
Assistente Hospitalar Graduada, Consultora de Imunohemoterapia
Responsável pelo Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do
Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto
Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar,
Universidade do Porto

COORIENTADOR:

Dra. Maria dos Anjos Teixeira
Assistente Hospitalar Graduada, Consultora de Imunohemoterapia
Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo
António, Centro Hospitalar do Porto

PORTO

2016

AGRADECIMENTOS

Acredito que por vezes agradecer é muito pouco para conseguir demonstrar o quão importante alguém foi para nós, mas considero ser uma boa forma de demonstrar gratidão.

Assim, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Margaridade Lima, por ter acreditado em mim, pela enorme disponibilidade para mais uma e outra perguntas e pelo incansável apoio na elaboração deste trabalho. Agradeço sobretudo pelo seu gosto em ensinar e pela forma como contribuiu tão positivamente para a minha formação médica.

À minha co-orientadora Dra. Maria dos Anjos Teixeira pelos conhecimentos transmitidos sobre os Síndromas Mielodisplásicos e sua análise por citometria de fluxo.

À Dra. Cláudia Moreira pela disponibilidade, pela forma como me acolheu e como contribuiu para a execução deste projeto.

À Dra. Marta Gonçalves por todo o apoio no Laboratório de Citometria e por ter contribuído para alargar os meus conhecimentos no campo laboratorial.

Aos meus pais e irmã pela presença constante, pelas palavras de ânimo e por me terem ensinado a perseguir os meus sonhos. À pequena Maria que me faz ver felicidade em coisas pequenas e que me mostra o significado de cuidar de alguém. Hoje não só se concretiza uma luta minha, mas uma luta nossa. Obrigada.

Ao André por ter surgido na minha vida e me ter mostrado que vale a pena acreditar em mim. Às florzinhas que nunca me deixaram desanimar, mesmo quando mais precisei.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Introdução: Os Síndromas Mielodisplásicos (SMD) são um grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas da linhagem mielóide, com origem nas células estaminais hematopoiéticas e caracterizam-se pela hematopoiese ineficaz de uma ou várias linhas celulares, citopenias e risco aumentado de evolução para leucemia mieloblástica aguda. Segundo a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2008, o diagnóstico e classificação dos SMD baseia-se fundamentalmente em aspetos citomorfológicos do sangue periférico (SP) e da medula óssea (MO), assim como na presença de alterações citogenéticas. De acordo com índice internacional de prognóstico (IPSS), os SMD são estratificados em “baixo risco”, “risco intermédio-1”, “risco intermédio-2” e “alto risco”. No entanto, apesar dos esforços para a uniformização dos critérios, nem sempre é fácil o diagnóstico de SMD, sobretudo nos casos de “menor risco” (SMD-MR), isto é, aqueles com IPSS de “baixo risco” ou de “risco intermédio 1”, quando as alterações morfológicas são subtis e não são detetadas alterações citogenéticas. Nos últimos anos, a citometria de fluxo (CF) tem vindo a desempenhar um papel cada vez mais relevante na avaliação da displasia das células das linhas mielóide e eritróide de doentes com SMD, sendo esta avaliada pela análise da expressão de várias moléculas à superfície das células imaturas e das células das linhas granulocítica, monocítica e eritróide em maturação na MO. Apesar das potenciais vantagens em fazer diagnóstico de mielodisplasia em amostras de SP, nomeadamente pela acessibilidade e pelo facto do procedimento de colheita ser menos invasivo, poucos estudos de CF foram realizados em amostras de SP e o valor da imunofenotipagem das células de SP para o diagnóstico dos SMD continua por esclarecer.

Objetivos: Os objetivos deste estudo foram avaliar, por CF a 8 cores, a expressão de várias moléculas na membrana dos neutrófilos e dos monócitos do SP de doentes com SMD-MR, por comparação com a observada em indivíduos saudáveis, e estabelecer o valor destas alterações para o diagnóstico de SMD.

Material e Métodos: O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde e pelo Departamento de Ensino, Formação e Investigação, e autorizado pelo Conselho de Administração do Centro Hospitalar do Porto (CHP). Foram estudadas amostras de SP de 14 doentes adultos com SMD-MR seguidos na consulta de Hematologia e de 14 dadores benévolos de sangue do CHP, que deram consentimento informado para participar no estudo. A seleção foi não aleatória, por conveniência. Foram excluídos doentes com infeções, tratamento com G-CSF, GM-CSF,

quimioterapia ou imunossupressores em curso ou nos três meses anteriores e doentes com outras neoplasias. Em simultâneo, foram recolhidos dos processos clínicos dos doentes dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais relevantes para o estudo em causa, nomeadamente o género, a idade ao diagnóstico e a idade atual, a data de diagnóstico, a classificação do SMD e o IPSS ao diagnóstico, os resultados relevantes dos estudos de SP e de MO, assim como as principais manifestações clínicas e as terapêuticas efetuadas ou em curso. Nas amostras de sangue, após realização de hemograma, foi analisada, por CF, a expressão de várias moléculas na membrana dos neutrófilos e dos monócitos; a expressão destas moléculas nas células dos doentes foi comparada com a observada nas células correspondentes, de indivíduos adultos saudáveis. As moléculas estudadas foram as seguintes: CD45 (antigénio leucocitário comum, LCA), CD34 (sialomucina), CD10 (endopeptidase neutra), CD11b (Integrina alpha M, ITGAM; recetor tipo 3 para o complemento, CR3), CD11c (Integrina alpha X, ITGAX; recetor tipo 3 para o complemento, CR3), CD13 (aminopeptidase N), CD14 (correcetor para o LPS), CD15 (N-fucosil-N-acetil-lactosamina), CD16 (recetor de baixa afinidade para o fragmento Fc da IgG, FcgammaRIII), CD56 (molécula de adesão das células neuronais, NCAM), CD64 (recetor de alta afinidade para o fragmento Fc da IgG, FcgammaRI), CD114 (recetor para o G-CSF, GCSFR), CD116 (cadeia alfa do recetor para o GM-CSF; GM-CSFRalpha), CD131 (cadeia beta do recetor para o GM-CSF; GM-CSFRbeta) e HLA-DR (molécula do Sistema Maior de Histocompatibilidade, classe II). Os resultados obtidos foram alvo de análise estatística descritiva (frequências absolutas, medianas, mínimos e máximos) e inferencial (teste t de Mann Withney) apropriada. Valores de p inferiores a 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados: Verificamos que os neutrófilos dos doentes com SMD-MR apresentavam FSC ($p=0.008$) e SSC ($p<0.001$) significativamente diminuído, bem como níveis significativamente diminuídos de CD10, CD11b, CD11c ($p<0.001$ em todos os casos), CD13 ($p=0.022$) e CD16 ($p=0.002$), comparativamente aos controlos. Não observamos diferenças significativas na expressão de CD15, CD16 e HLA-DR ($p>0.05$). Nos monócitos dos doentes com SMD-BR observamos uma expressão aumentada de CD56 ($p=0.006$) e uma expressão diminuída de CD11c ($p=0.004$), CD16 ($p=0.005$) e HLA-DR ($p=0.042$), quando comparados com os dos controlos. Ainda nos monócitos do SP dos doentes com SMD-MR, verificamos existir um aumento da razão monócitos clássicos (CD14+forte, CD16-) / monócitos próinflamatórios (CD14+fraco, CD16+), comparativamente aos controlos. Não encontramos diferenças significativas entre os monócitos dos doentes e os monócitos

dos controlos, no que respeita ao FSC e ao SSC, bem como ao nível de expressão de CD13, CD14, CD15, CD45 e CD64 ($p > 0.05$ em todos os casos). No que diz respeito ao estudo dos recetores para fatores de crescimento, observamos que havia uma grande variabilidade de expressão nos neutrófilos e nos monócitos, sobretudo nos doentes com SMD-MR, e que os monócitos próinflamatórios apresentavam níveis mais baixos de expressão de CD114 e CD116 do que os monócitos clássicos. Os níveis de CD114 e CD116 nos neutrófilos dos doentes com SMD-BR não diferiram significativamente dos observados nos monócitos dos controlos ($p > 0.05$). Já os monócitos dos doentes com SMD-MR apresentavam uma expressão aumentada de CD114 e CD116 comparativamente aos dos controlos, mas com diferenças significativas apenas para o CD114 ($p = 0.008$).

Conclusão: Este estudo confirmou, pela primeira vez, a importância potencial do estudo dos neutrófilos e monócitos do SP por CF como um método de diagnóstico dos SMD-BR. Para melhor avaliar a sensibilidade e especificidade desta abordagem para o diagnóstico de SMD é importante replicar este trabalho em estudos com um maior número de doentes, comparar as alterações observadas nas amostras de SP de doentes com SMD-MR com as observadas em doentes com SMD de “maior risco” (IPSS “risco intermédio -2 e IPSS de alto risco) e estudar doentes com citopenias de outras etiologias (não SMD). Para além disso, para implementar estes estudos na rotina, cada centro terá que estabelecer os seus próprios valores de referência, com base nos anticorpos monoclonais e nas condições experimentais usadas, sendo também essencial garantir o estudo de amostras de SP de indivíduos normais em paralelo com as amostras de SP dos doentes e a estabilidade das condições de calibração dos citómetros. A confirmarem-se os resultados obtidos, o estudo do SP por CF poderá vir a ter utilidade clínica como primeira abordagem para diagnóstico de SMD, evitando eventualmente a colheita de MO, sobretudo no caso de doentes idosos e/ou com comorbilidades, a quem há apenas para oferecer terapêutica de suporte.

NOTA INTRODUTÓRIA

O presente trabalho, apresentado para fins de obtenção do grau de Mestre em Medicina, foi desenvolvido no âmbito da Unidade Curricular opcional “Disciplina de Iniciação à Investigação Científica” (DIIC), a qual integra o plano curricular do Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar/Universidade do Porto (ICBAS/UP) e do Centro Hospitalar do Porto (CHP).

Todo o trabalho desenvolvido decorreu ao longo de dois anos letivos, sendo que o ano letivo 2014/2015 se destinou essencialmente à elaboração de uma proposta de projeto de investigação, sua submissão, aprovação pela Comissão de Ética e pelo Gabinete Coordenador da Investigação do Departamento de Ensino, Formação e Investigação, e autorização pelo Conselho de Administração do CHP. No ano lectivo 2015/2016, foi concretizado o projeto.

O estudo foi executado no Serviço de Hematologia Clínica do CHP, ao nível da Consulta de Hematologia, Hospital de dia e Laboratório de Citometria, sob orientação e supervisão da Professora Doutora Margarida Lima e coorientação da Dr.^a Maria dos Anjos Teixeira.

Do projeto resultaram quatro trabalhos: um artigo científico que será submetido a publicação, um trabalho apresentado na forma de *poster* e dois trabalhos aceites para publicação no livro de resumos de congresso médicos.

Assim, a dissertação encontra-se estruturada em três partes:

1. Artigo original a submeter para publicação em revista científica de Hematologia;
2. Trabalho apresentado na forma de *poster* em reunião monotemática de Hematologia, na área dos Síndromas Mielodisplásicos;
3. Trabalhos aceites para publicação no livro de resumos de congresso de Hematologia.

Como apêndice é apresentada a proposta do projeto de investigação, tal como foi aprovada, e, como anexos, os documentos para os participantes, o formulário usado para a recolha dos dados e os documentos de submissão do projeto.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
NOTA INTRODUTÓRIA	vi
PARTE 1. ARTIGO CIENTÍFICO	1
FLOW CYTOMETRY FOR THE DIAGNOSIS OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES IN THE PERIPHERAL BLOOD	2
ABSTRACT	3
INTRODUCTION	4
METHODS	7
RESULTS	10
DISCUSSION	17
ABBREVIATIONS	20
ACKNOWLEDGMENTS	21
FINANTIAL SUPPORT	22
REFERENCES	23
SUPPLEMENTARY MATERIAL	26
PARTE 2. TRABALHOS APRESENTADOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS.....	30
LEVELS OF G-CSF AND GM-CSF RECEPTORS IN THE PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS AND MONOCYTES FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES	31
ABSTRACT	32
<i>POSTER</i>	35
PARTE 3. TRABALHOS ACEITES PARA PUBLICAÇÃO EM LIVROS DE RESUMOS DE REUNIÕES CIENTÍFICAS	36
LOW LEVELS OF CD10, CD11b, CD13 AND CD16 IN THE PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES	37
ABSTRACT ACCEPTED FOR PUBLICATION	38
DEPLETION OF PROINFLAMMATORY CD14 ^{+low} CD16 ⁺ MONOCYTES AND INCREASED LEVELS OF CD56 EXPRESSION ON CLASSICAL CD14 ^{+high} CD16 ⁻ MONOCYTES IN THE PERIPHERAL FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES.....	41
ABSTRACT ACCEPTED FOR PUBLICATION	42

APÊNDICES	45
PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO	46
PLANO CIENTÍFICO.....	47
Introdução	47
Enquadramento teórico	51
Problemas	62
Questões	62
Objetivos do estudo	62
Intervenientes	63
Metodologia	66
Calendarização	75
Indicadores de produção	75
Referências bibliográficas	77
QUESTÕES ÉTICAS.....	80
Informação dos participantes e consentimento informado	81
Outras questões com implicações éticas	82
PLANO FINANCEIRO.....	83
Orçamento	84
Financiamento	84
GLOSSÁRIO.....	85
Abreviaturas de termos técnicos	86
Outras abreviaturas	87
ANEXOS.....	88
DOCUMENTOS PARA OS PARTICIPANTES	90
FORMULÁRIOS PARA REGISTO DE DADOS	95
DOCUMENTOS DE SUBMISSÃO	97

PARTE 1. ARTIGO CIENTÍFICO

Nesta secção é apresentada uma proposta de artigo para submeter a publicação em revista científica da área da Hematologia, com revisão por pares e indexada.

FLOW CYTOMETRY FOR THE DIAGNOSIS OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES IN THE PERIPHERAL BLOOD

Ana Aires¹, Cláudia Moreira², Marta Gonçalves^{2,3}, Ana Spínola², Renata Cabral², Ana Sofia Jorge², Vanessa Mesquita², Alexandra Mota^{1,2}, Cristina Gonçalves^{1,2}, Luciana Pinho^{1,2}, Luciana Xavier^{1,2}, Jorge Coutinho^{1,2}, Inês Freitas^{3,4}, Catarina Lau^{2,3}, Maria dos Anjos Teixeira^{2,3}, Margarida Lima^{1,2,3}

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal.

²Department of Hematology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

³Multidisciplinary Unit for Biomedical Sciences (UMIB/ICBAS/UP), Porto, Portugal.

⁴Department of Pathology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

Author's academic degrees

Ana Aires: medical student.

Marta Gonçalves: graduated in Biochemistry.

Alexandra Mota, Ana Sofia Jorge, Ana Spínola, Catarina Lau, Cláudia Moreira, Cristina Gonçalves, Inês Freitas, Jorge Coutinho, Luciana Pinho, Luciana Xavier, Maria dos Anjos Teixeira, Renata Cabral, Vanessa Mesquita: M.D.

Margarida Lima: M.D., PhD.

Corresponding author

Margarida Lima

ORCID number: 0000-0001-9702-5260

Personal e-mail: mmc.lima@clix.pt

Professional e-mail: margaridalima@chporto.min-saude.pt

Postal address: Serviço de Hematologia, Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto, Rua D. Manuel II, s/n. 4099-001, Porto, Portugal.

Telephone number: +351-22-2077500

ABSTRACT

Background: Flow cytometry (FCM) is a highly sensitive method with increasing relevance for qualitative and quantitative evaluation of the bone marrow (BM) cells from patients with suspected and confirmed Myelodysplastic Syndrome (MDS). Although the detection of abnormal maturation patterns and aberrant antigen expression in the BM cells has been extensively studied by FCM, the value of immunophenotyping the peripheral blood (PB) cells from patients with MDS has been largely ignored.

Aims: The purpose of this study was to evaluate the expression of cell surface antigens in neutrophils and monocytes using PB samples from patients with lower risk MDS (LR-MDS), compared to healthy individuals.

Material and Methods: Fourteen patients with LR-MDS (IPSS: low risk + intermediate 1 risk), and an equal number of controls were studied. PB samples were collected into EDTA-K3 containing tubes. Cell immunophenotyping was performed by 8-color FC using fluorochrome conjugated monoclonal antibodies with different specificities. A normal PB sample was run in parallel with each patient PB sample.

Results: FCM allowed identifying several immunophenotypic abnormalities in PB neutrophils and monocytes from patients with LR-MDS. Neutrophils of LR-MDS patients had a significantly lower FSC ($p=0.008$) and SSC ($p<0.001$), as well as decreased expression of CD10, CD11b and CD11c ($p<0.001$ in all cases), CD16 ($p=0.002$) and CD13 ($p=0.022$), as compared with controls. In respect to PB monocytes, patients with LR-MDS had significantly reduced levels of CD56 ($p=0.006$) and significantly increased levels of CD11c ($p=0.004$), CD16 ($p=0.005$) and HLA-DR ($p=0.042$) expression, as compared to controls. Furthermore, monocytes from LR-MDS patients showed a CD14^{high}CD16⁻ high classical / CD14^{low}CD16⁺ proinflammatory monocytes subset ratio in LR-MDS patients when compared to healthy controls.

Conclusions: Neutrophil and monocyte immunophenotyping using PB samples may provide useful information for the diagnosis of MDS, as a complement to cytomorphology, turning FCM a powerful diagnosis tool.

KEY WORDS: Myelodysplastic syndrome, flow cytometry, neutrophils, monocytes, peripheral blood

INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of myeloid neoplasms characterized by inefficient hematopoiesis in one or more cellular lineages, peripheral blood (PB) cytopenias and a high risk for leukemic progression (Malcovati, 2013; Adès, 2014; Meers, 2015). According to the World Health Organization (WHO), the diagnosis and classification of MDS are essentially based on morphologic and cytogenetic abnormalities, such as the presence of cytopenias, percentages of blasts in the PB and/or bone marrow (BM), and dysplasia in one or several hematopoietic cell lineages (Swerdlow, 2008). Furthermore, PB features provide information to think of a probable MDS, but only BM features are conceptually accepted to confirm the diagnosis (Swerdlow, 2008).

Prognosis of patients with MDS can be estimated using a number of scoring systems, which in general include PB cytopenias, percentage of blasts in the BM and in the PB, and cytogenetic features (Garcia-Manero, 2015); among them, the most commonly used is the International Prognostic Scoring System (IPSS) (Greenberg, 1997), and its revised version (IPSS-R) (Schanz, 2012), which defined new *cut off* values for cytopenias and a new cytogenetic score. According to IPSS, MDS are classified as low, intermediate - 1, intermediate - 2, and high risk categories. The low and intermediate-1 risk subgroups are considered lower-risk MDS (LR-MDS), and the intermediate-2 and high-risk subgroups are considered higher-risk MDS (HR-MDS). The degree of risk refers to whether the patient's survival time will be adversely affected, and the chance of the disease progressing to acute leukemia over time.

Because diagnosis of MDS is based on morphological assessment, it can be subjective particularly in patients with LR disease, especially in patients without cytogenetic abnormalities. Thus, efforts have been made to evaluate other diagnostic approaches, besides cytomorphologic and cytogenetic studies. One of the most studied methods is flow cytometry (FCM), which is now considered a promising tool to improve MDS diagnostics. Flow cytometry is a highly sensitive method for qualitative and quantitative evaluation of hematopoietic cells and it has been used to study patients with suspected and confirmed MDS (Stetler-Stevenson, 2001; Maynadié, 2002; Wells, 2003; Ogata, 2006; Stachurski, 2008; van de Loosdrecht, 2008; Cazzola, 2009; van de Loosdrecht, 2009; Kern, 2010; Kern, 2013); it also seems to be promising for monitoring disease progression and response to therapeutic interventions, and it appears to be crucial in cases of minimal dysplasia and absence of cytogenetic abnormalities, as well as in cases of BM hypocellularity and fibrosis (Stetler-

Stevenson, 2001; Cazzola, 2009; van de Loosdrecht, 2009; Kern, 2010; Kern, 2013). Previous studies in large series of patients had revealed that FCM studies performed in the BM has an increased diagnostic yield when added to cytomorphology and cytogenetics in patients with suspected MDS (Kern, 2010). In addition, immunophenotypic aberrancies detected in the BM cells by FCM allow the identification of distinct prognostic subgroups of MDS patients (Maynadié, 2002; Wells, 2003; van de Loosdrecht, 2008). Yet, although FCM has growing value for MDS evaluation, with increasing importance in disease diagnosis, subtyping and prognostication, it still does not take part of WHO criteria for MDS diagnosis.

Even so, the interest in FCM for MDS has been increasing, and it has been already proposed to add FCM to the WHO criteria for diagnosis of MDS (Porwit, 2014). Therefore, several immunophenotypic abnormalities have been consistently reported. In particular, aberrant antigen expression in maturing neutrophils and monocytes in the BM of MDS patients, with granulocytes being the hematopoietic cells more frequently studied and in which phenotypic abnormalities were most frequently detected (Stetler-Stevenson, 2001). When analyzed by FCM, both maturing neutrophils and monocytes have consistently abnormal light scatter properties, due to hypogranularity (Stetler-Stevenson, 2001; Maynadié, 2002; van de Loosdrecht, 2008; Kern, 2010). In maturing neutrophils and their precursor cells, some of the aberrant parameters identified to be altered are abnormal expression of CD10, CD15, CD16, CD36, CD45, CD64, CD66, in addition to expression of CD34 and HLA-DR, overexpression of CD56, abnormal CD16/CD13 and CD11b/CD13 patterns, as well as CD2, CD5, CD7 and CD19 infidelity lineage marker expression (Stetler-Stevenson, 2001; Maynadié, 2002; Wells, 2003; Ogata, 2006; Stachurski, 2008; van de Loosdrecht, 2008; van de Loosdrecht, 2009; Kern, 2010). When it comes to monocytes, FCM studies have revealed that BM monocytic cells from MDS patients frequently have aberrant immunophenotypic features, such as abnormal expression of CD11c, CD13, CD14, CD15, CD36, CD45, CD64 and HLA-DR, overexpression of CD56, expression of CD34, as well as lineage infidelity markers, such as CD5 and CD7 (Stetler-Stevenson, 2001; Wells, 2003; van de Loosdrecht, 2008; van de Loosdrecht, 2009; Kern, 2010).

Most FCM studies accomplished in MDS patients were performed in BM samples, which imply an invasive procedure. Moreover, BM samples involve more laborious sample collection, acquisition, transport and processing procedures, than PB samples. Thus, FCM study of MDS using PB samples seems to be more appealing than the use of BM. Even though PB sampling is less

invasive than BM sampling and implies a simpler processing system, only limited data have been presented concerning diagnostic significance of FCM data in the PB of MDS patients. Therefore, the diagnosis of MDS by PB immunophenotyping, besides attractive, seems to be the next step in investigation because of its advantages for clinical practice in case of favorable results.

Some of the conclusions reached with FCM-based studies performed in BM cells have already been confirmed to be present in PB cells from MDS patients, as the diminished SSC from neutrophils. Other examples of cell surface molecules already analyzed in PB cells from MDS patients were CD10, CD11a, CD11b, CD35, CD43, CD66, CD69 and CD177 (Kyriakou, 2001; Cherian, 2005a; Cherian, 2005b; Cherian Rashidi, 2012; Meyerson, 2013). However, only a few of studies were performed to date, using heterogeneous samples with a limited number of patients, and FCM-based PB analysis in MDS patients has a vast potential that needs to be explored.

Having regard to accessibility of PB samples, it would be useful to establish FCM criteria for the diagnosis of MDS in the PB. Therefore, the purpose of this study was to quantify the presence of aberrant antigenic expression in neutrophils and monocytes using PB samples from patients with LR-MDS. The results will be discussed critically to evaluate the validity and possible significance for MDS diagnosis.

METHODS

Study population

This study included patients with LR-MDS that have been followed in the Hematology Service of Hospital de Santo António integrated in Centro Hospitalar do Porto, and that had had at least one appointment at the hospital between September and November of 2015. Patients who were being treated with myeloid growth factors in the preceding three months were excluded, as did patients submitted to cytoreductive, hypomethylating and/or immunosuppressive treatments and patients with infections during the same three preceding months. Patients with other neoplasms were excluded as well. Transfusions and treatment with erythropoietin were not exclusion criteria.

Peripheral blood cell counts and cytomorphology, BM smears and trephine biopsies and cytogenetic studies obtained at the diagnosis were recorded, and the WHO classification (Swerdlow, 2008) and IPSS (Greenberg, 1997; Schanz, 2012) were reviewed. Blood cell counts and cytomorphology were also evaluated at the time of the study. Treatments enrolled before or during the study, including transfusion requirements and growth factor necessities, and clinical status were also accessed.

The control group was constituted by blood donors that came to the hospital for a blood donation from September 2015 to November 2015. First time blood donations were excluded, as well as controls with history of neoplasms and infections in the preceding three months before the study.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the local Ethics Committee, and all participants, patients and controls, have assigned an informed consent freely.

Flow cytometry analysis of peripheral blood samples

Peripheral blood samples were collected into K3-EDTA (tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid) containing tubes and were processed in a maximum period of 24 hours. Cell immunophenotyping was performed by 8-color FCM using fluorochrome conjugated monoclonal antibodies with different specificities (Table 1), and a whole blood stain-lyse-and-then wash method (BD FACS™ Lysing Solution). Two tubes with eight combinations each have been used as shown in table 2.

A normal PB sample was run in parallel with each patient PB sample. Saturating amounts of each monoclonal antibody were added into tubes containing 50µL of PB, and cells were incubated for 10 min at room temperature in the dark. After adding 2 ml of FACSlysing (BD), samples were incubated again for 10 min at room temperature in the dark. Then cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in 0.5 ml of PBS.

Sample acquisition was performed in a BD FACSCanto™ II flow cytometer, and at least 200,000 cell events were acquired for each tube. The cytometer was calibrated according to the Euroflow Standard Operating Procedure (<http://www.euroflow.org/>). Daily quality controls were performed to guarantee the quality of the study, including fluorescence standardization, linearity assessment and spectral compensation.

Data analysis was done with Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, Spain). Blood cells were identified and classified according to Side Scatter (SSC) and Forward Scatter (FSC) characteristics and antigen expression profile. Therefore, neutrophils are CD45^{+low} and CD16^{+high}; monocytes are CD45^{+int} and CD14⁺; blast cells are CD45^{+low} and CD34⁺. Monocytes were also subdivided in 2 populations, one CD14^{+low}CD16⁺ and the other CD14^{+high}CD16⁻ (proinflammatory and classical PB monocytes, respectively). The median fluorescence intensity (MFI) was recorded in neutrophils and monocytes, for each antigen analyzed.

Statistical Analysis

Results are expressed as median, minimum and maximum values of the median fluorescence intensity observed for each marker. Results obtained for PB samples of MDS patients were compared with the results obtained for PB samples of controls.

For statistical treatment, a non-parametric test, Mann-Whitney U test, was used to compare MDS patient with controls. P values <0.05 were considered statistically significant. All statistical calculations were performed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®) 23.0 version for Windows.

Table 1. Main characteristics of the monoclonal antibodies used in this study

Specificities	Clone	Isotype	Fluorochrome	Manufactory	Catalogue number
CD10	ALB1	IgG2a	PE-Cy7	BC-IOT	A46527
CD11b	D12	IgG2a	APC	BDB	333143
CD11c	S-HCL-3	IgG2b	APC	BDB	333144
CD13	L138	IgG1	PE	BDB	347406
CD14	HCD14	IgG1	APC-H7	BIOL	325620
CD15	MMA	IgM	FITC	BDB	332778
CD16	3G8	IgG1	V450	BDB	560474
CD34	8G12	IgG1	PerCP-Cy5.5	BDB	347203
CD45	J.33	IgG1	KO	BC-IOT	A96416
CD56	N901-HLDA6	IgG1	PE-Cy7	BC-IOT	A21692
CD64	22	IgG1	PE	BC-IOT	IM3601U
HLA-DR	L243	IgG2a	FITC	BDB	347400

Abbreviations: APC, allophycocyanin; Cy5.5, Cyanine 5.5; Cy7, Cyanine 7; FITC, Fluorescein isothiocyanate; KO, Khrome orange; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin chlorophyll protein; V450, Violet 450; BC, Beckman Coulter; BD, Becton Dickinson; IOT, Immunotech.

Table 2. Combinations of monoclonal antibodies used in this study

Fluorochrome	FITC	PE	PerCP-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	KO
Tube 1	CD15	CD13	CD34	CD10	CD11b	CD14	CD16	CD45
Tube 2	HLA-DR	CD64	CD34	CD56	CD11c	CD14	CD16	CD45

Abbreviations: APC, allophycocyanin, Cy5.5, Cyanine 5.5; Cy7, Cyanine 7; FITC, Fluorescein isothiocyanate; KO, Khrome orange; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin chlorophyll protein; V450, Violet 450.

RESULTS

Sociodemographic, clinical and laboratory features of the study population

After a careful review of the diagnosis and prognosis using WHO 2008 and IPSS criteria, 14 patients have enrolled the study, 8 males and 6 females (male: female ratio 1.33) with a median age of 76 years (range 66 to 88). An equal number of controls was studied, 8 males and 6 females (male: female ratio 1.33), with a median age of 55 years (range 19 to 63). Table 3 summarizes sociodemographic, clinical and laboratory data of patients.

Seven patients were classified as refractory anemia with ringed sideroblasts, 4 patients had refractory cytopenia with unilineage dysplasia and 3 patients had refractory cytopenia with multilineage dysplasia.

Using the IPSS, 8 patients had low IPSS risk and 6 patients had intermediate 1 IPSS risk. The median age from the diagnosis was 7.6 years, ranging from 0.5 to 12.6 years.

The median neutrophil count was $2590/\text{mm}^3$ (range 365 to 6945) in LR-MDS and $4181/\text{mm}^3$ (range 3083 to 8633) in controls.

The median monocyte count was $426/\text{mm}^3$ in LR-MDS (range 17 to 1132) and $482/\text{mm}^3$ (range 294 to 937) in controls.

Table 3. Sociodemographic, clinical and laboratory characterization of LR-MDS patients

DEMOGRAPHIC DATA	
Gender	
Males	8/14 (57%)
Females	6/14 (43%)
Age (years)	76 (66-88)
Diagnosis	
Refractory anemia with ringed sideroblasts	6/14 (43%)
Refractory cytopenias with unilineage dysplasia	4/14 (29%)
Refractory cytopenias with multilineage dysplasia	3/14 (21%)
Myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q)	1/14 (7%)
IPSS	
Low risk	8/14 (57%)
Intermediate 1	6/14 (43%)
Blood counts at the time of the study	
Hemoglobin (g/dL)	8.1 (6.0-11.3)
Neutrophils (/mm ³)	2590 (365-6945)
Monocytes (/mm ³)	426 (17-1132)
Platelets (/mm ³)	175 (37-303)
Cytopenias at the time of the study*	
Anemia	13/14 (93%)
One or two cytopenias	10/14 (71%)
More than two cytopenias	3/14 (21%)
Bone marrow findings	
Blasts (%)	1.4 (0.3-5.3)
Dysplasia in ≥10% cells	2/14 (14%)
Erythroid lineage only	13/14 (93%)
In one myeloid lineage	4/14 (29%)
In at least two myeloid lineages	7/14 (50%)
Ringed sideroblasts	
>15%	7/14 (50%)
Cytogenetics	
Normal	7/11 (64%)
Cytogenetic abnormalities**	4/11 (36%)
Good	2
Intermediate	1
Poor	1

Values are expressed as number of as absolute and (relative) frequencies, or as median and (range).

*Cytopenias were defined according to the IPSS: Hb < 10 g/dL; Neutrophils < 1.800/mm³; Platelets < 100.000/mm³.

** Cytogenetic abnormalities were classified according to the IPSS.

Abbreviations: IPSS, International Prognostic Scoring System

Neutrophil immunophenotyping

Neutrophils from patients with LR-MDS had a decreased FSC and SSC when compared with control's neutrophils. These differences were statistically significant with p values of 0.008 for FSC and <0.001 for SSC. Furthermore, in neutrophils there was significant decreased phenotypic expression of CD10 ($p<0.001$), CD11b ($p<0.001$), CD11c ($p<0.001$), CD13 ($p=0.022$) and CD16 ($p=0.002$) when compared to normal individuals (Figures 1 and 2). CD15 and CD45 have a slight reduction on fluorescence intensity as compared to normal expression, while in HLA-DR the opposite was observed. However, differences between patients and controls were not statistically significant for these markers ($p>0.05$).

The median, minimum, maximum and average rank values of the median fluorescence intensity observed for each antigen studied in neutrophils from controls and LR-MDS patients are shown as supplementary material (Supplementary table 1).

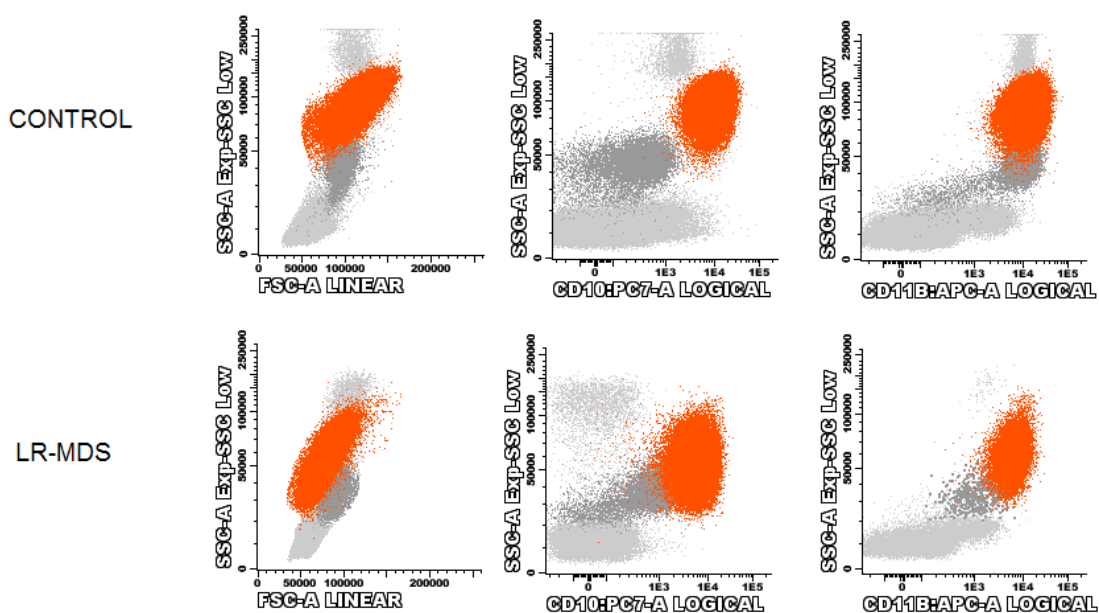


Figure 1. Representative dot plots showing the Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) and the levels of CD10, CD11b expression in peripheral blood neutrophils (red dots) from patients with LR-MDS, as compared to those observed in normal individuals (controls). Monocytes: dark gray dots; other leukocytes: light gray dots.

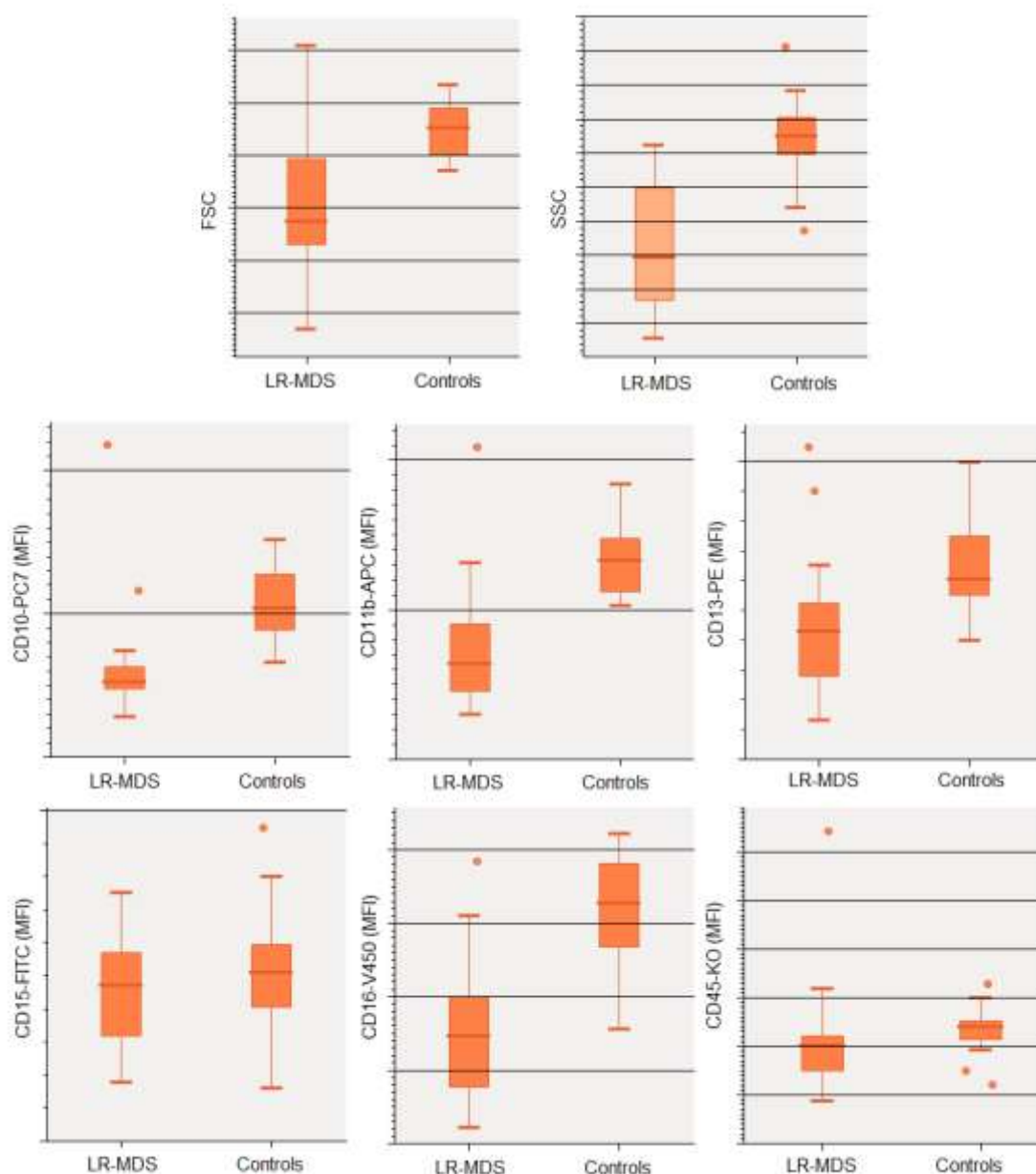


Figure 2. Forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and surface antigen expression in peripheral blood neutrophils from patients with lower risk myelodysplastic syndromes (LR-MDS) and normal individuals (Controls). Results are expressed as arbitrary units of median fluorescence intensity (MFI). Lower whiskers are 1.5 times the Inter-Quartile Range below the lower quartile, or the minimum value, whichever is closest to the middle. Upper whiskers are calculated using the same approach. Outliers are displayed.

Monocyte immunophenotyping

Monocytes from patients with LR-MDS patients had similar FSC and SSC values when compared to controls ($p>0.05$). In the same way, the overall levels of CD13, CD14, CD15, CD45 and CD64 expression on PB monocytes from patients with LR-MDS did not differ significantly from those observed in control's monocytes ($p>0.05$). In contrast, monocytes from LR-MDS patients had significant increased expression of CD56 ($p=0.006$), and decreased expression of CD11c ($p=0.004$), CD16 ($p=0.005$) and HLA-DR ($p=0.042$), as compared to normal monocytes. A tendency for a lower CD11b expression ($p=0.089$) in monocytes of LR-MDS patients than in controls was also observed (Figure 3).

Additionally, PB monocytes from LR-MDS patients had a significant decrease in the fraction of CD14^{low}CD16⁺ subset proinflammatory monocyte subset when compared with normal individuals (3.1% ranging from 0.1 to 8.1% and 11.5% ranging from 4.1 to 27.7%, respectively; $p<0.001$) (Figures 4 and 5). Moreover, CD14^{high}CD16⁻ PB monocytes from LR-MDS patients had a significantly higher percentage of CD56⁺ cells, as compared to controls (14.8% ranging from 0.1 to 98.7% and 7.1% ranging from 0.1 to 14.9%, respectively; $p=0.026$) (Figure 4). These data reflect a high classical/proinflammatory monocyte subset ratio in patients with LR-MDS.

The median, minimum, maximum and average rank values of median fluorescence intensity observed for each antigen studied in monocytes, and the percentage of CD16 and CD56 positive monocytes from controls and LR-MDS patients are shown as supplementary material (Supplementary tables 1 and 2, respectively).

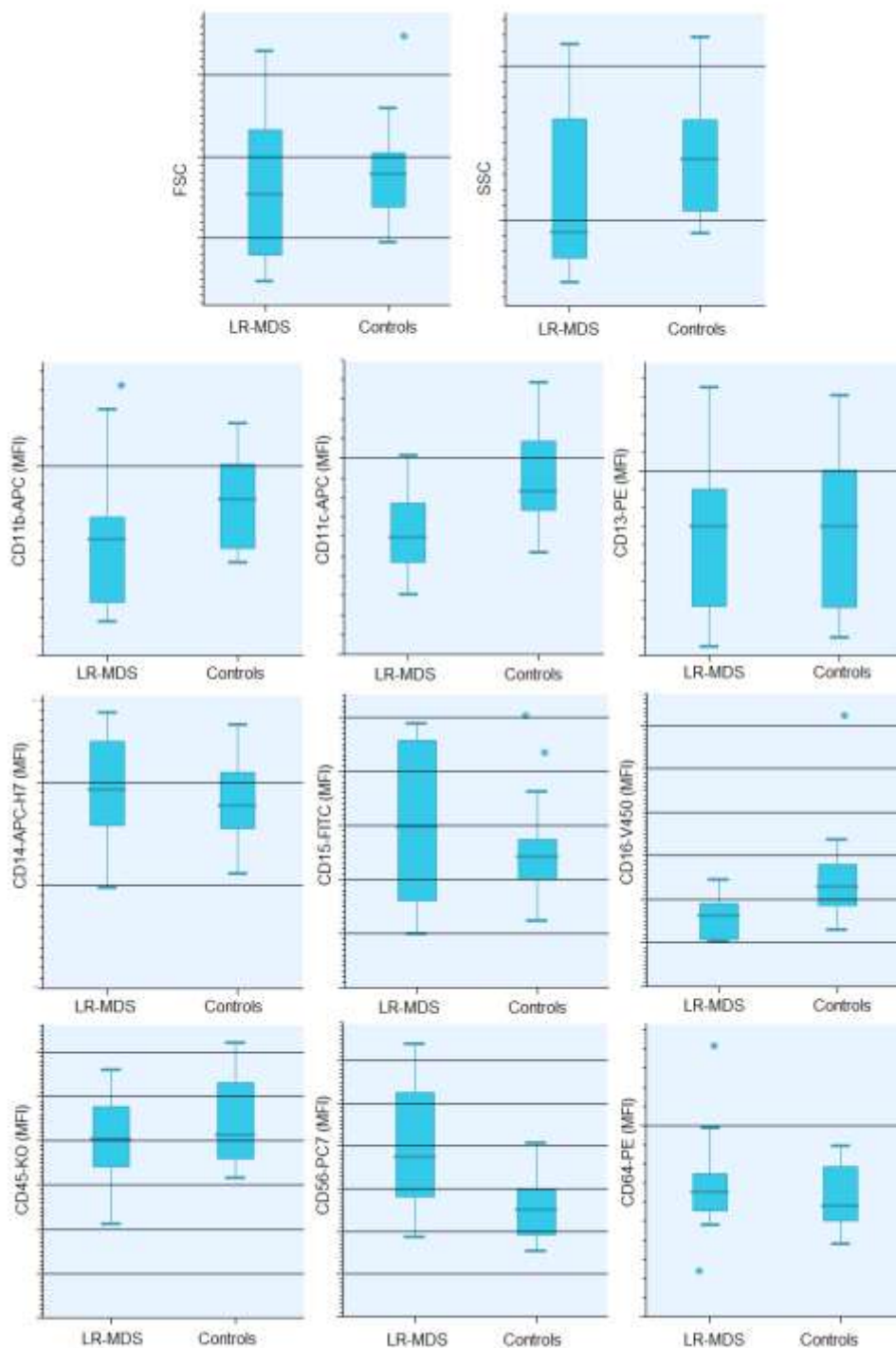


Figure 3. Forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and surface antigen expression in peripheral blood monocytes from patients with lower risk myelodysplastic syndromes (LR-MDS) and normal individuals (Controls). Results as expressed as arbitrary units of median fluorescence intensity (MFI). Lower whiskers are 1.5 times the Inter-Quartile Range below the lower quartile, or the minimum value, whichever is closest to the middle. Upper whiskers are calculated using the same approach. Outliers are displayed.

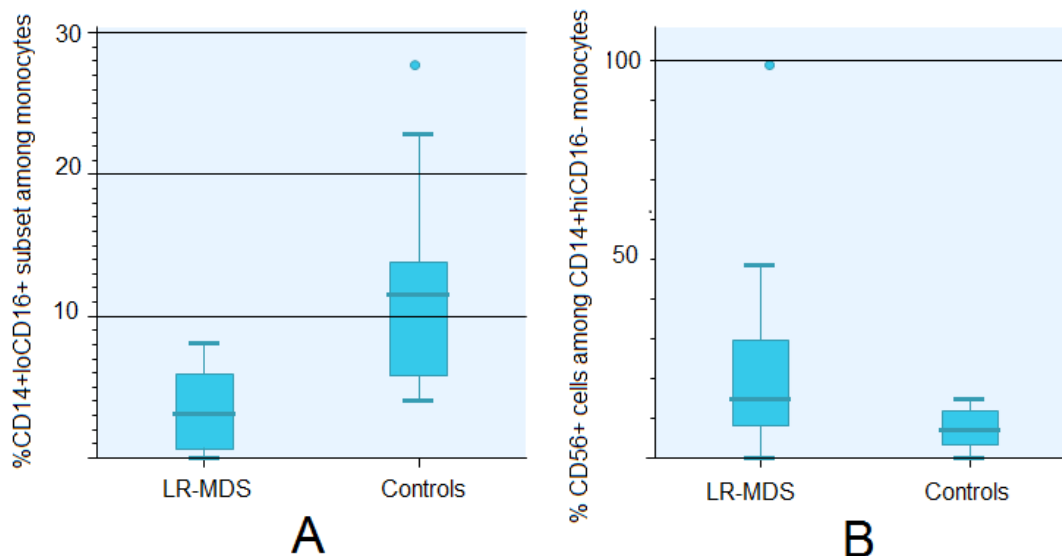


Figure 4. Percentage of CD16⁺ CD14^{low} cells among peripheral blood CD14⁺ monocytes (A) and percentage of CD56⁺ cells among CD16⁻ CD14^{high} monocytes (B) in patients with LR-MDS and in controls. Lower whiskers are 1.5 times the Inter-Quartile Range below the lower quartile, or the minimum value, whichever is closest to the middle. Upper whiskers are calculated using the same approach. Outliers are displayed.

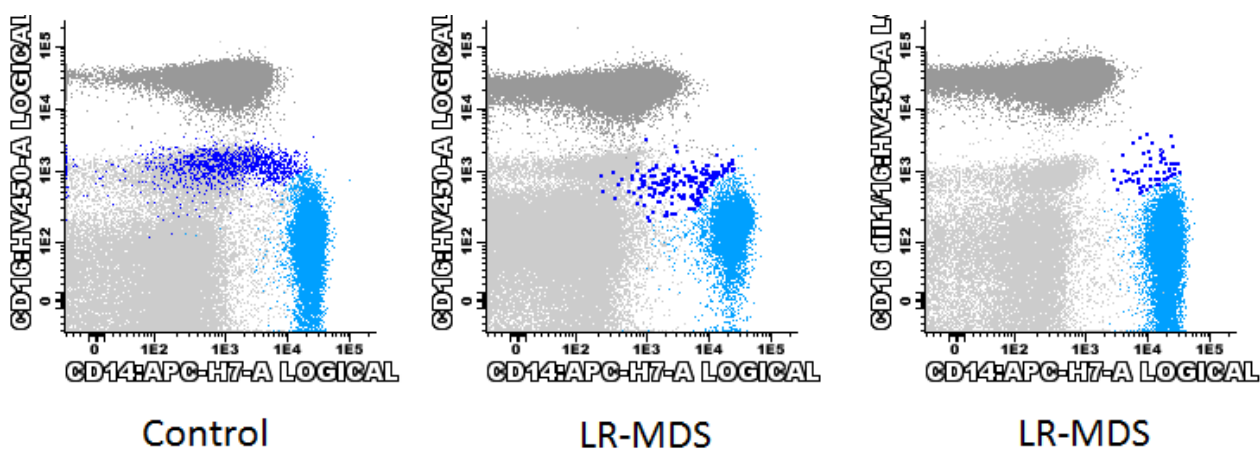


Figure 5. Representative dot plots showing the classical (CD14^{hi}CD16⁻, light blue dots) and proinflammatory (CD14^{lo}CD16⁺, dark blue dots) peripheral blood monocyte subsets from a normal individual (control) and from two patients with LR-MDS. Neutrophils: dark gray dots; other leukocytes: light gray dots.

DISCUSSION

In patients with neoplastic haematopoietic diseases, clonal hematopoietic cells suffer alterations in the expression of surface receptors. Flow cytometry takes advantage of it, and FCM-based BM analysis is being used for a long time, as a complement to cytomorphology and cytogenetics, for the diagnosis of MDS. However, its role in studying PB samples from patients with MDS is still very limited. We described an approach to evaluate the presence of aberrant antigenic expression in neutrophils and monocytes using PB samples from patients with LR-MDS.

In the present study, apart from reduced SSC, we found abnormally low levels of CD10, CD11b, CD11c, CD13 and CD16 expression in PB neutrophils from LR-MDS patients, as compared to those of healthy individuals; we also observed an abnormally low expression of CD11c, CD16, and HLA-DR and an overexpression of CD56 in PB monocytes from LR-MDS patients. Other cell surface antigens studied did not differ significantly between patients and controls. All the phenotypic alterations found in our study were already described in the BM from patients with MDS (Stetler-Stevenson, 2001; Maynadié, 2002; Ogata, 2006; Stachurski, 2008; van de Loosdrecht, 2008; Cazzola, 2009; van de Loosdrecht, 2009; Kern, 2010; Kern, 2013; Wells, 2013).

Although there are previous studies that evaluated the utility of FCM for the diagnosis of MDS in the PB, this is the first time the PB of a homogeneous group of LR-MDS patients was studied using 8-color FCM, and the first study to present relevant changes on the expression of several cell surface molecules in PB neutrophils and monocytes from patients with LR-MDS, compared with healthy controls. It is also a unique study in how attempts to combine PB monocyte and neutrophil immunophenotyping and, analyzing their immunophenotypic anomalies, may be useful for diagnosing MDS. Compared with our study, the few studies that had been published about the value of FCM for the diagnosis of MDS in the PB have limited clinical significance (Kyriakou, 2001; Cherian, 2005a; Cherian, 2005b; Rashidi, 2012; Meyerson, 2013).

In accordance, Kyriakou *et al.* (2001) described a reduced CD43 expression and an activated phenotype in PB neutrophils from patients with MDS (n=49), as compared to healthy individuals (n=19) (Kyriakou, 2001). However, this information has restricted practical applicability as it relies in only one cell marker and the study population was composed of both LR- and HR-MDS patients. In accordance, the study included 13 patients with refractory anemia with excess of blasts, 4 patients

with refractory anemia with excess of blasts in transformation to acute leukemia, and 5 patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML).

A few years later (2005), a group from Pennsylvania also explored the potential of peripheral blood FCM analysis for the diagnosis of MDS. Using 4-color flow cytometry and a heterogeneous sample of 15 patients that also included LR- and HR-MDS cases, Cherian *et al.* observed that PB neutrophils from patients with MDS frequently had lower SSC and higher expression of CD11a and CD66, as well as abnormal CD10 and/or CD116 expression, as compared to controls (Cherian, 2005a; Cherian, 2005b). Because none of these abnormalities proved consistently diagnostic, they proposed a PB scoring system for the diagnosis of MDS; and in a prospective validation study with 11 MDS patients and 20 patients with non-MDS cytopenias, they observed that this score successfully identified patients with MDS (sensitivity 73%, specificity 90%). Also in 2005, the same group extended the number patients tested to 22 MDS patients and 3 patients with myeloproliferative/myelodysplastic syndromes; they found that FCM abnormalities were seen in 64% of the MDS patients, including 9/16 patients with normal cytogenetics, suggesting that PB neutrophil immunophenotyping could play a central role in the diagnosis of MDS.

More recently (2012), Rashidi *et al.* explored the diagnostic utility of FCM in the evaluation of cytopenias and in the diagnosis of LR- vs. HR-MDS and CMML, by studying the CD10 expression on PB neutrophils from 13 patients with LR-MDS, 16 patients with HR-MDS or CMML, and 16 non-MDS cytopenic controls (Rashidi, 2012). When measuring the ratio of CD10 expression on neutrophils from patients and controls, they found a lower ratio in HR-MDS and CMML vs. LR-MDS and cytopenic controls without MDS; they observed that a CD10 ratio of <3 was only noted in the HR-MDS+CMML group and they concluded that FCM of PB neutrophils may be helpful in the work-up of patients with cytopenias and in the differential diagnosis of LR- vs. HR-MDS. However, they did not use healthy individuals for comparison, and they did not find significant differences in the neutrophil and monocyte expression of other cell surface markers (CD11b, CD13, CD14, CD16, CD33, CD56, and CD64) between MDS patients and cytopenic controls.

Finally, Meyerson *et al.* (2013), using 4-color FCM, observed that patients with clonal myeloid disorders had significantly low percentages of CD177+ neutrophils, in the BM as well as in the PB, with MDS (n=21) being the diagnostic group most strongly associated with low-levels of CD177 expression (Meyerson, 2013). However, these findings also have limited clinical application

for the diagnosis of MDS, as only one cell surface marker was investigated and the phenotypic abnormalities found were not specific for myelodysplasia.

In the present study, a homogenous sample of LR-MDS patients was analyzed, by 8-color FCM, under appropriated calibration conditions and in parallel with healthy individuals, for the expression of a large number of cell surface molecules, most of which proved to be abnormally expressed in neutrophils and/or monocytes from MDS patients. This allows certainly assert that PB neutrophil and monocyte immunophenotyping may provide useful information, with quantitative and qualitative data, for the diagnosis of LR-MDS, as a complement to cytomorphology, a qualitative method with a high interobserver variability.

Multicenter studies are needed to confirm these preliminary FCM data using PB samples. In particular, it is important to evaluate a more representative group of MDS patients and healthy controls, as well as non-MDS cytopenic patients. Besides that, FCM analysis using PB samples should be correlated with other laboratory and clinical data. Each center should establish its own normal reference values, on the basis of monoclonal antibodies (clones, fluorochromes) and experimental conditions used. In addition, special attention should be given to the conditions of calibration and stability of the cytometer.

The present study suggests the possibility of using PB flow cytometry as a screening test for MDS. In elderly patients, who frequently have several comorbidities that preclude an aggressive treatment and usually get only symptomatic / supportive care, it may inclusive avoid the need of BM collection, which is a more invasive and expensive procedure and requires more expertise for analysis, thereby reducing the cost associated with MDS diagnosis.

In conclusion, our study strongly suggests that PB neutrophil and monocyte immunophenotyping provides useful information for the diagnosis of LR-MDS. Once confirmed by other studies, this will turn FCM into a powerful method to identify myelodysplasia in PB cells, then creating a new paradigm for MDS diagnosis in clinical practice.

ABBREVIATIONS

APC, allophycocyanin

BC, Beckman Coulter

BD, Becton Dickinson

BM, Bone marrow

Cy5.5, Cyanine 5.5

Cy7, Cyanine 7

FCM, Flow cytometry

FITC, Fluorescein isothiocyanate

FSC, Forward Scatter

HR, MDS, Higher risk myelodysplastic syndromes

IOT, Immunotech

IPSS, International Prognostic Scoring System

IPSS-R, International Prognostic Scoring System revised

K3-EDTA, Tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid

KO, Khrome orange

LR-MDS, Lower risk myelodysplastic syndromes

MDS, Myelodysplastic syndromes

MFI, Median fluorescence intensity

PB, Peripheral blood

PBS, Phosphate-buffered saline

PE, Phycoerythrin

PerCP, Peridinin chlorophyll protein

SPSS, Statistical Package for the Social Sciences

SSC, Side Scatter

V450, Violet 450

WHO, World Health Organization

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to the nurses for sample collection, to the other medical doctors and technicians of the Hematology and Pathology Departments for support concerning the routine laboratory tests for the MDS diagnosis.

FINANTIAL SUPPORT

This work was financed by ICBAS/UP.

REFERENCES

- Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 383, 2239–52 (2014). doi: 10.1016/S0140-6736(13)61901-7. PMID: 24656536.
- Cazzola, M. Flow cytometry immunophenotyping for diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 94, 1041–3 (2009). doi: 10.3324/haematol.2009.007682. PMID: 19644135.
- Cherian S, Moore J, Bantly A, *et al.* Flow-cytometric analysis of peripheral blood neutrophils: a simple, objective, independent and potentially clinically useful assay to facilitate the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 79, 243–5 (2005). doi: 10.1002/ajh.20371. PMID: 15981222.
- Cherian S, Moore J, Bantly A, *et al.* Peripheral blood MDS score: a new flow cytometric tool for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin. Cytom.* 64, 9–17 (2005). doi: 10.1002/cyto.b.20041. PMID: 15668954
- Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 90, 831-41 (2015). doi: 10.1002/ajh.24102. PMID: 26294090.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89, 2079–88 (1997). Erratum in *Blood* 91, 1100 (1998). PMID: 9058730.
- Kern W, Haferlach C, Schnittger S, *et al.* Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer* 116, 4549–63 (2010). doi: 10.1002/cncr.25353. PMID: 20572043.
- Kern W, Haferlach C, Schnittger S, *et al.* Serial assessment of suspected myelodysplastic syndromes: significance of flow cytometric findings validated by cytomorphology, cytogenetics, and molecular genetics. *Haematologica* 98, 201–7 (2013). doi: 10.3324/haematol.2012.066787. PMID: 22929975.

Kyriakou D, Alexandrakis MG, Kyriakou ES, *et al.* Reduced CD43 expression on the neutrophils of MDS patients correlates with an activated phenotype of these cells. *Int. J. Hematol.* 73, 483–91 (2001). PMID: 11503963

Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, *et al.*; European Leukemia Net. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 122, 2943–64 (2013). doi: 10.1182/blood-2013-03-492884. PMID: 23980065.

Maynadié M, Picard F, Husson B, *et al.*; Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL). Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood* 100, 2349–56 (2002). doi: 10.1182/blood-2002-01-0230. PMID: 12239142.

Meers S. The myelodysplastic syndromes: the era of understanding. *Eur J Haematol.* 94, 379-90. doi: 10.1111/ejh.12443. PMID: 25186093.

Meyerson HJ, Osei E, Schweitzer K, *et al.* CD177 Expression on Neutrophils: In Search of a Clonal Assay for Myeloid Neoplasia by Flow Cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 140, 658–69 (2013). doi: 10.1309/AJCPDFBEBQZW1OI7. PMID: 24124144

Ogata, K. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 108, 1037–44 (2006). doi: 10.1182/blood-2005-12-4916. PMID: 16574954.

Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, *et al.* Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia.* 28:1793-8 (2014). doi: 10.1038/leu.2014.191. PMID: 24919805

Rashidi HH, Xu X, Wang HY, *et al.* Utility of peripheral blood flow cytometry in differentiating low grade versus high grade myelodysplastic syndromes (MDS) and in the evaluation of cytopenias. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 5, 224–30 (2012). PMID: 22558477

Schanz J, Tuchler H, Sole F, *et al.* New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived

from an international database merge. *J Clin Oncol* 30, 820–9 (2012). doi: 10.1200/JCO.2011.35.6394. PMID: 22331955.

Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, *et al.* Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk. Res.* 32, 215–24 (2008). doi: 10.1016/j.leukres.2007.06.012. PMID: 17675229.

Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, *et al.* Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 98, 979–87 (2001). doi: .org/10.1182/blood.V98.4.979. PMID: 11493442.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.* (ed.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.

van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, *et al.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 94, 1124–34 (2009). doi: 10.3324/haematol.2009.005801. PMID: 19546437.

van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, *et al.* Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 111, 1067–77 (2008). doi: 10.1182/blood-2007-07-098764. PMID: 17971483.

Wells DA, Benesch M, Loken MR, *et al.* Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102, 394–403 (2003). doi: 10.1182/blood-2002-09-2768. PMID: 12649150.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Median, average rank, minimum and maximum values of the median fluorescence intensity observed for each antigen studied in neutrophils and monocytes from 14 healthy controls and 14 LR-MDS patients.

	Neutrophils			Monocytes		
	Controls	Patients	P value	Controls	Patients	P value
FSC			0.008			0.358
Median	115 352	97 432		97 821	95 396	
Avg Rank	19	10		16	13	
Min	107 079	77 104		89 536	84 796	
Max	123 524	130 882		114 799	112 951	
SSC			<0.001			0.098
Median	115 148	79 310		43 966	39 271	
Avg Rank	20	9		17	12	
Min	87 268	55 713		39 162	36 032	
Max	141 315	112 365		51 885	51 460	
CD10			<0.001			
Median	10 432	5 291				
Avg Rank	20	9				
Min	6 627	2 835				
Max	15 221	21 796				
CD11b			<0.001			0.089
Median	13 317	6 424		8 243	6 146	
Avg Rank	20	9		17	12	
Min	10 303	3 009		4 892	1 785	
Max	18 374	20 902		12 286	14 254	
CD11c			<0.001			0.004

	Neutrophils			Monocytes		
	Controls	Patients	P value	Controls	Patients	P value
Median	4 168	1 950		8 334	5 955	
Avg Rank	21	8		19	10	
Min	3 201	1 462		5205	3 037	
Max	5 229	3 977		13 876	10 132	
CD13			0.022			0.818
Median	6 065	4 320		7 005	7 020	
Avg Rank	18	11		15	14	
Min	4 017	1 309		981	515	
Max	9 969	10 475		14 084	14 502	
CD14 (T3)						0.435
Median				16 722	17 791	
Avg Rank				13	16	
Min				10 256	9 535	
Max				25 823	27 655	
CD15			0.435			0.335
Median	5 101	4 712		243	297	
Avg Rank	16	13		13	16	
Min	1 598	1 778		123	99	
Max	9 473	7 533		502	488	
CD16			0.002			0.005
Median	31 737	14 637		229	163	
Avg Rank	18	9		18	10	
Min	15 585	2 200		133	105	
Max	42 215	38 439		622	245	
CD45			0.081			0.215
Median	2 396	2 033		4 147	4 049	

	Neutrophils			Monocytes		
	Controls	Patients	P value	Controls	Patients	P value
Avg Rank	17	12		16	13	
Min	1 222	886		3 172	2 136	
Max	3 294	6 427		6 230	5 615	
CD56						0.006
Median				252	376	
Avg Rank				10	19	
Min				156	189	
Max				409	6 861	
CD64						0.646
Median				5 786	6 522	
Avg Rank				14	15	
Min				3 843	2 384	
Max				8 941	14 165	
HLA-DR						0.042
Median				7 910	6 532	
Avg Rank				17	11	
Min				5 619	1 588	
Max				11 889	11 363	

Values were approximated to the closest full unit.

Abbreviations: LR-MDS, lower risk myelodysplastic syndromes; Min, minimum; Max, maximum; Avg rank, average rank.

Supplementary Table 2. Median, average rank, minimum and maximum values of the percentage of CD16⁺ and CD56⁺ monocytes from 14 healthy controls and 14 LR-MDS patients.

Proinflammatory CD16⁺ monocytes (% total monocytes)			
	Controls	Patients	P value
CD16⁺			<0.001
Median	11.5	3.1	
Avg Rank	20.0	9.0	
Min	4.1	0.1	
Max	27.7	8.1	
CD56⁺ expression on classical monocytes (% CD56⁺ cells)			
	Controls	Patients	P value
CD56⁺			0.026
Median	7.1	14.8	
Avg Rank	11.0	17.9	
Min	0.1	0.1	
Max	14.9	98.7	

Values were rounded to one decimal place.

Abbreviations: LR-MDS, lower risk myelodysplastic syndromes; Min, minimum; Max, maximum; Avg rank, average rank.

PARTE 2. TRABALHOS APRESENTADOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

Nesta secção é exposto um trabalho apresentado na forma de *poster* na 5ª Conferência Internacional de Síndromes Mielodisplásicas, 2016.

**LEVELS OF G-CSF AND GM-CSF RECEPTORS IN THE PERIPHERAL
BLOOD NEUTROPHILS AND MONOCYTES FROM PATIENTS WITH
LOWER RISK MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES**

5th INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES

April, 14-16, 2016

Estoril, Portugal

ABSTRACT

LEVELS OF G-CSF AND GM-CSF RECEPTORS IN THE PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS AND MONOCYTES FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES

Ana Aires¹, Cláudia Moreira², Marta Gonçalves^{2,3}, Ana Sofia Jorge², Vanessa Mesquita², Ana Helena Santos^{1,3}, Sónia Fonseca^{1,3}, Alexandra Mota^{1,2}, Cristina Gonçalves^{1,2}, Luciana Pinho^{1,2}, Luciana Xavier^{1,2}, Inês Freitas^{3,4}, Jorge Coutinho^{1,2}, Catarina Lau^{2,3}, Maria dos Anjos Teixeira^{2,3}, Margarida Lima^{1,2,3}

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal.

²Department of Hematology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

³Multidisciplinary Unit for Biomedical Sciences (UMIB/ICBAS/UP), Porto, Portugal.

⁴Department of Pathology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

Background: Despite the advent of disease-modifying therapies, supportive care remains the mainstay of treatment of patients with myelodysplastic syndromes (MDS), which includes granulocyte (G-CSF) and, less often, granulocyte-macrophage (GM-CSF) colony stimulating factors (CSF), with variable response rates.

Objectives: To evaluate, by flow cytometry (FC), the expression of G-CSF receptor (CD114) and GM-CSF receptor alpha-chain (CD116) in neutrophils and monocytes from patients with lower risk MDS (LR-MDS), as compared to normal individuals (NI).

Study population: Fourteen patients with LR-MDS (8 males, median age 76 years), and an equal number of NI (8 males, median age 55 years) were studied. Patients who were being treated with myeloid CSF were excluded, as did patients with active infections and other concomitant neoplasms. The median time from the diagnosis was 7.6 years. Seven patients had refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), 4 had refractory cytopenias with unilineage dysplasia (RCUD), and 3 had refractory cytopenias with multilineage dysplasia (RCMD). Eight patients had low IPSS-risk and 6 had intermediate 1 IPSS-risk. The median neutrophil count was of 2590/mm³ (365-6945/mm³). The median monocyte count was of 426/mm³ (17-1132/mm³).

Methods: Blood samples were collected into EDTA-K3 tubes. CD114 and CD116 expression was evaluated by 7-color-FC (CD116-FITC/CD114-PE/CD34-PerCPCy5.5/CD56-

PC7/CD14-APC-H7/CD16-V450/CD45-KO), using a whole blood stain-lyse-and-then-wash method (FACSLysing, Becton Dickinson–BD). A normal PB sample was run in parallel with each patient. Sample acquisition was performed in a FACSCanto II cytometer (BD), calibrated according to the Euroflow SOP. Data analysis was done with Infinicyt (Cytognos). Results were expressed as median, minimum-maximum values of the median fluorescence intensity observed for each marker. P values < 0.05 were considered statistically significant (Mann-Whitney U test).

Results: Neutrophils were CD114+CD116+lo and monocytes were CD114+loCD116+ in both groups. Proinflammatory (CD14+loCD16+) monocytes, which were decreased in LR-MDS patients ($p < 0.001$), had lower levels of CD114 and CD116 expression than classical (CD14+hiCD16-) monocytes. Neutrophils and monocytes from LR-MDS patients had a greater variability of CD114 and CD116 expression, as compared to NI. The overall levels of CD114 and CD116 on neutrophils did not differ significantly between patients and controls. Monocytes from LR-MDS patients had higher levels of CD114 and CD116 expression, although differences reached statistical significance only for CD114 ($p = 0.008$).

Conclusions: There is a high variability of CD114/CD116 expression on neutrophils and monocytes from LR-MDS patients. Further studies are needed in order to investigate if the levels of CD114/CD116 expression are useful to individualize subgroups with different responses to myeloid CSF.

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DOS NEUTRÓFILOS E DOS MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM
SINDROMAS MIELODISPLÁSICOS

Ana Aires, Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP, 2016

Pauline Jaillard <pauline.jaillard@univ-paris-diderot.fr>
Para: margaridamariacarvalholima@gmail.com

5th International Conference on Myelodysplastic Syndromes
Estoril Congress Center, Portugal
April 14-16, 2016
Chairs: Mario Cazzola (Pavia), Pierre Fenaux (Paris), Eva Hellström-Lindberg (Stockholm)

Dear Dr Moreira,

We are very pleased to inform you that your abstract entitled :

«Levels of G-CSF and GM-CSF receptors in the peripheral blood neutrophils and monocytes from patients with lower risk myelodysplastic syndromes»
has been selected for a **poster presentation** in Estoril.

Your poster should be mounted on Thursday, April 14 as of 8 a.m and should be displayed for the full duration of the meeting.

POSTER

LEVELS OF G-CSF AND GM-CSF RECEPTORS IN THE PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS AND MONOCYTES FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Ana Aires¹, **Cátia Moreira**², Maria Gonçalves^{2,3}, Ana Sofia Jorge², Vanessa Mesquita², Ana Helena Santos^{1,2}, Sónia Fonseca^{1,2}, Alexandra Mota^{1,2}, Cristina Gonçalves^{1,2}, Luciana Pinho^{1,2}, Luciana Xavier^{1,2}, Inês Freitas^{1,4}, Jorge Coutinho^{1,2}, Catarina Lau^{2,3}, Maria dos Anjos Teixeira^{2,3}, Margarida Lima^{1,2,3}

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal
²Department of Hematology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal
³Multidisciplinary Unit for Biomedical Sciences (UMIB/ICBAS/UP), Porto, Portugal
⁴Department of Pathology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal

Background

Despite the advent of disease-modifying therapies, supportive care remains the mainstay of treatment of Myelodysplastic Syndromes (MDS), which includes granulocyte (G-CSF) and, less often, granulocyte-macrophage (GM-CSF) colony stimulating factors (CSF), with variable response rates.

Objectives

To evaluate, by flow cytometry (FC), the expression of G-CSF receptor (CD114) and GM-CSF receptor alpha-chain (CD116) in neutrophils and monocytes from patients with lower risk MDS (LR-MDS), as compared to normal individuals (NI).

Study population

Fourteen patients with LR-MDS (8 males, median age 76 years), and an equal number of NI (8 males, median age 55 years) were studied. Patients who were being treated with myeloid CSF were excluded, as did patients with active infections and other concomitant neoplasms. The median time from the diagnosis was 7.6 years. Seven patients had refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), 4 had refractory cytopenias with unilineage dysplasia (RCUD), and 3 had refractory cytopenias with multilineage dysplasia (RCMD). Eight patients had low IPSS-risk and 6 had intermediate 1 IPSS-risk. The median neutrophil count was of 2590/mm³ (365-6945/mm³). The median monocyte count was of 426/mm³ (17-1132/mm³).

Methods

Blood samples were collected into EDTA-K3 tubes. CD114 and CD116 expression was evaluated by 7-color-FC (CD116-FITC/CD114-PE/CD34-PerCPy5.5/CD56-PC7/CD14-APC-H7/CD16-V450/CD45-KO), using a whole blood stain-lyse-and-then-wash method (FACSlysing, Becton Dickinson-BD). A normal PB sample was run in parallel with each patient. Sample acquisition was performed in a FACSCanto II cytometer (BD), calibrated according to the Euroflow SOP. Data analysis was done with Infinicyt (Cytognos). Results were expressed as median, minimum-maximum values of the median fluorescence intensity observed for each marker. P values < 0.05 were considered statistically significant (Mann-Whitney U test).

Results

Neutrophils were CD114+CD116+ in both groups (Fig. 1, panels A and B). Proinflammatory (CD14+loCD16+) monocytes, which were decreased in LR-MDS patients (p<0.001), had lower levels of CD114 and CD116 expression than classical (CD14+hiCD16-) monocytes (Fig. 1, panels A and B).

Neutrophils and monocytes from LR-MDS patients had a greater variability of CD114 and CD116 expression, as compared to NI. The overall levels of CD114 and CD116 on neutrophils did not differ significantly between patients and controls (Fig 2, panel A). Monocytes from LR-MDS patients had higher levels of CD114 and CD116 expression, although differences reached statistical significance only for CD114 (p=0.008) (Fig. 2, panel B).

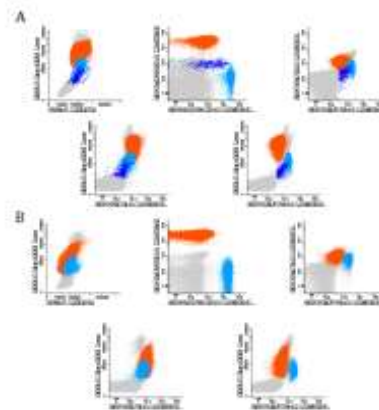


Figure 1: Representative dot plots illustrating the levels of CD114 and CD116 expression in PB neutrophils (●) and monocytes (●●) from a normal individual (A) and from a patient with LR-MDS (B). Classical (CD14+hiCD16-) monocytes (●●), proinflammatory (CD14+loCD16+) monocytes (●●).

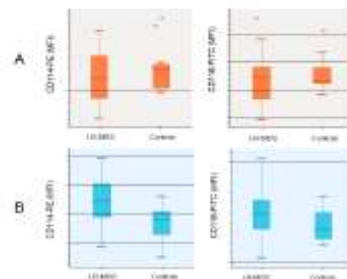


Figure 2: Levels of CD114 and CD116 expression on peripheral blood neutrophils (A) and monocytes (B) from patients with LR-MDS, as compared to controls. Lower whiskers are 1.5 times the Inter-Quartile Range below the lower quartile, or the minimum value, whichever is closest to the median. Upper whiskers are calculated using the same approach. Outliers are displayed.

Conclusions

There is a high variability of CD114/CD116 expression on neutrophils and monocytes from LR-MDS patients. Further studies with a large number of MDS patients are needed in order to investigate if the levels of CD114/CD116 expression are useful to individualize subgroups with different responses to myeloid CSF.

Acknowledges

ICBAS/UP and UMIB/ICBAS/UP for financial support.

PARTE 3. TRABALHOS ACEITES PARA PUBLICAÇÃO EM LIVROS DE RESUMOS DE REUNIÕES CIENTÍFICAS

Nesta secção são expostos dois trabalhos aceites para publicação no livro de resumos de 21º Congresso da Associação Europeia de Hematologia, 2016 – Suplemento da revista Haematologica.

**LOW LEVELS OF CD10, CD11b, CD13 AND CD16 IN THE PERIPHERAL
BLOOD NEUTROPHILS FROM PATIENTS WITH LOWER RISK
MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES**

21ST EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION CONGRESS

June, 9-12, 2016

Copenhagen, Denmark

ABSTRACT ACCEPTED FOR PUBLICATION

LOW LEVELS OF CD10, CD11b, CD13 AND CD16 IN THE PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Cláudia Moreira¹, Ana Aires², Renata Cabral¹, Marta Gonçalves^{1,3}, Ana Sofia Jorge¹, Vanessa Mesquita¹, Lurdes Oliveira^{1,3}, Marlene Santos^{1,3}, Alexandra Mota^{1,2}, Cristina Gonçalves^{1,2}, Luciana Pinho^{1,2}, Luciana Xavier^{1,2}, Jorge Coutinho^{1,2}, Inês Freitas^{3,4}, Catarina Lau^{1,3}, Maria dos Anjos Teixeira^{1,3}, Margarida Lima^{1,2,3}

¹Department of Hematology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

²Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal.

³Multidisciplinary Unit for Biomedical Sciences (UMIB/ICBAS/UP), Porto, Portugal.

⁴Department of Pathology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

Background: Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of hematologic neoplasms characterized by morphologic dysplasia, aberrant hematopoiesis and peripheral blood (PB) cytopenias, and an increased probability of transformation to acute leukemia. Diagnosis of MDS relies on well-defined cytological and cytogenetic criteria but is challenging in a significant number of patients. The detection of abnormal maturation patterns and aberrant antigen expression in the bone marrow (BM) cells has been extensively studied by flow cytometry (FC) and is now considered a promising tool to improve MDS diagnostics. However, the value of immunophenotyping the PB cells from patients with MDS has been largely ignored. Having regard to accessibility of PB samples, it would be useful to establish FC criteria for the diagnosis of MDS in the PB.

Objectives: To evaluate the levels of CD10, CD11b, CD13, CD15, CD16 and CD45 expression in PB neutrophils (PB-Neut) from patients with lower risk MDS (LR-MDS), as compared to normal individuals (NI).

Study population: Fourteen patients with previously diagnosed LR-MDS (8 males, median age 76 years), and an equal number of NI (blood donors, 8 males, median age 55 years) were studied. Patients who were being treated with myeloid growth factors were excluded, as did patients with

active infections and other concomitant neoplasms. The median time from the diagnosis was 7.6 years, ranging from 0.5 to 12.6 years. Seven patients had refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), 4 patients had refractory cytopenias with unilineage dysplasia (RCUD), and 3 patients had refractory cytopenias with multilineage dysplasia (RCMD). Eight patients had low IPSS risk and 6 patients had intermediate 1 IPSS risk. The median PB-Neut count was of 2590/mm³ (365 to 6945), in LR-MDS (<1500/mm³ in 4 cases) and 4181/mm³ (3083 to 8633), in NI (no cases with <1500/mm³).

Methods: PB samples were collected into EDTA-K3 containing tubes. Cell immunophenotyping was performed by 8-color FC using fluorochrome conjugated monoclonal antibodies with different specificities (CD15-FITC, CD13-PE, CD34-PerCPCy5.5, CD10-PC7, CD11b-APC, CD14-APC-H7, CD16-V450, CD45-KO), and a whole blood stain-lyse-and-then wash method (FACSLysing, Becton Dickinson–BD). A normal PB sample was run in parallel with each patient PB sample. Sample acquisition was performed in a FACSCanto II flow cytometer (BD), calibrated according to the Euroflow SOP. Data analysis was done with Infinicyt (Cytognos). Results are expressed as median, minimum and maximum values of the median fluorescence intensity observed for each marker. P values < 0.05 were considered statistically significant (Mann-Whitney U test).

Results: PB-Neut from patients with LR-MDS had significantly lower FSC (p=0.008) and SSC (p<0.001), as compared to those of NI. In addition, the levels of CD10 and CD11b (p<0.001 in both cases), CD16 (p=0.002) and CD13 (p=0.022) expression in PB-Neut from patients with LR-MDS were significantly decreased in patients with LR-MDS, as compared with NI. No significant differences were observed for CD15 and CD45 expression (p>0.05).

Conclusions: PB-Neut immunophenotyping may provide useful information for the diagnosis of MDS, as a complement to cytomorphology. Each center should establish its own normal reference values, on the basis of monoclonal antibodies (clones, fluorochromes) and experimental conditions used. In addition, should be given special attention to the conditions of calibration and stability of the cytometer.

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DOS NEUTRÓFILOS E DOS MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM
SINDROMAS MIELODISPLÁSICOS

Ana Aires, Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP, 2016

Dear Margarida Lima,

On behalf of the Board of the European Hematology Association, I regret to inform you that your abstract has not been selected for an oral or a poster presentation, however it will be published in the Abstract Book (an official supplement of Haematologica), the mobile app of the 21st Congress of EHA, and on the EHA Learning Center. Please find below your personal abstract information.

We very much look forward to welcoming you in Copenhagen. The deadline for early registration is May 10 (payment should be received before this date). After this date the registration fee will increase significantly. Reduced registration fees are available for EHA members and junior members. For registration, please visit the congress pages of www.ehaweb.org. To become an EHA member or to renew your membership, please visit the [membership page](#).

Should you have any questions please contact the congress secretariat, by telephone at +31 (0)20 - 570 96 00 or by e-mail: aha@mci-group.com
Thank you for your excellent contribution to the 21st Congress. I look forward to meeting you in Copenhagen.

With kind regards,



Andreas Engert
Chair Scientific Program Committee 21st Congress

Personal Abstract Information

Submission ID: EHA-4015

Title: LOW LEVELS OF CD10, CD11B, CD13, AND CD16 EXPRESSION IN THE PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

**DEPLETION OF PROINFLAMMATORY CD14^{low}CD16⁺ MONOCYTES
AND INCREASED LEVELS OF CD56 EXPRESSION ON CLASSICAL
CD14^{high}CD16⁻ MONOCYTES IN THE PERIPHERAL FROM PATIENTS
WITH LOWER RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROMES**

21ST EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION CONGRESS

June, 9-12, 2016

Copenhagen, Denmark

ABSTRACT ACCEPTED FOR PUBLICATION

DEPLETION OF PROINFLAMMATORY CD14^{low}CD16⁺ MONOCYTES AND INCREASED LEVELS OF CD56 EXPRESSION ON CLASSICAL CD14^{high}CD16⁻ MONOCYTES IN THE PERIPHERAL FROM PATIENTS WITH LOWER RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Ana Aires¹, Cláudia Moreira², Renata Cabral², Marta Gonçalves^{2,3}, Ana Sofia Jorge², Vanessa Mesquita², Maria Luís Queirós^{2,3}, Alexandra Mota^{1,2}, Cristina Gonçalves^{1,2}, Luciana Pinho^{1,2}, Luciana Xavier^{1,2}, Jorge Coutinho^{1,2}, Inês Freitas^{3,4}, Catarina Lau^{2,3}, Maria dos Anjos Teixeira^{2,3}, Margarida Lima^{1,2,3}

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal.

²Department of Hematology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

³Multidisciplinary Unit for Biomedical Sciences (UMIB/ICBAS/UP), Porto, Portugal.

⁴Department of Pathology, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

Background: Myelodysplastic syndromes (MDS) are hematologic neoplasms characterized by morphologic dysplasia and peripheral blood (PB) cytopenias. Flow cytometry (FC) studies have revealed that bone marrow monocytes (Mon) from MDS patients have abnormal maturation patterns and aberrant antigen expression. However, the immunophenotypic alterations in PB monocytes (PB-Mon) have been much less explored.

Objectives: To evaluate the levels of CD11b, CD11c, CD13, CD15, CD14, CD16, CD64 and HLA-DR expression in PB-Mon from patients with lower risk MDS (LR-MDS), as compared to normal individuals (NI). To quantify the proinflammatory (CD14^{lo}CD16⁺) and classical (CD14^{hi}CD16⁻) PB-Mon subsets and to search for abnormal CD56 expression on PB-Mon from LR-MDS patients.

Study population: Fourteen patients with LR-MDS (8 males, median age 76 years), and an equal number of NI (blood donors, 8 males, median age 55 years) were studied. Patients who were being treated with myeloid growth factors were excluded, as did patients with active infections and other concomitant neoplasms. The median time from the diagnosis was 7.6 years, ranging from 0.5 to 12.6 years. Seven patients had refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), 4 patients had refractory cytopenias with unilineage dysplasia (RCUD), and 3 patients had refractory cytopenias

with multilineage dysplasia (RCMD). Eight patients had low IPSS risk and 6 patients had intermediate 1 IPSS risk. The median PB-Mon count was of 426/mm³ (17 to 1132), in LR-MDS (>1000/mm³ in 1 case) and 482/mm³ (294 to 937), in NI (no cases with >1000/mm³).

Methods: PB samples were collected into EDTA-K3 containing tubes. Cell immunophenotyping was performed by 8-color FC using fluorochrome conjugated monoclonal antibodies with different specificities (T1: CD15-FITC, CD13-PE, CD34-PerCPCy5.5, CD10-PC7, CD11b-APC, CD14-APC-H7, CD16-V450, CD45-KO; T2: HLA-DR-FITC, CD64-PE, CD34-PerCPCy5.5, CD56-PC7, CD11c-APC, CD14-APC-H7, CD16-V450, CD45-KO), and a whole blood stain-lyse-and-then wash method (FACSLysing, Becton Dickinson–BD). A normal PB sample was run in parallel with each patient. Sample acquisition was performed in a FACSCanto II flow cytometer (BD), calibrated according to the Euroflow SOP. Data analysis was done with Infinicyt (Cytognos). Results are expressed as median, minimum and maximum values of the median fluorescence intensity observed for each marker. P values < 0.05 were considered statistically significant (Mann-Whitney U test).

Results: PB-Mon from patients with LR-MDS had FSC and SSC similar to the PB-Mon from NI (p>0.05). In the same way, the overall levels of CD13, CD14, CD15, CD45 and CD64 expression on PB-Mon from patients with LR-MDS did not differ significantly from those observed in NI (p>0.05). In contrast, PB-Mon from LR-MDS patients had significantly higher levels of CD56 (p=0.006), and lower levels of CD11c (p=0.004), CD16 (p=0.005) and HLA-DR (p=0.042), and showed a tendency for a lower CD11b expression (p=0.089), as compared to NI. Additionally, PB-Mon from LR-MDS patients had a marked decrease in the fraction of CD14+loCD16+ subset (3.1% ranging from 0.1 to 8.1% and 11.5% ranging from 4.1 to 27.7%, respectively; p<0.001). Moreover, CD14+hiCD16- PB-Mon from LR-MDS patients had a significantly higher % of CD56+ cells, as compared to NI (14.8% ranging from 0.1 to 98.7% and 7.1% ranging from 0.1 to 14.9%, respectively; p=0.026).

Conclusions: PB-Mon from patients with LR-MDS have abnormal levels of CD11b, CD11c, CD16 and CD56 expression and a high classical / proinflammatory Mon subset ratio.

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DOS NEUTRÓFILOS E DOS MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM
SINDROMAS MIELODISPLÁSICOS

Ana Aires, Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP, 2016

Dear Margarida Lima,

On behalf of the Board of the European Hematology Association, I regret to inform you that your abstract has not been selected for an oral or a poster presentation, however it will be published in the Abstract Book (an official supplement of Haematologica), the mobile app of the 21st Congress of EHA, and on the EHA Learning Center. Please find below your personal abstract information.

We very much look forward to welcoming you in Copenhagen. The deadline for early registration is May 10 (payment should be received before this date). After this date the registration fee will increase significantly. Reduced registration fees are available for EHA members and junior members. For registration, please visit the congress pages of www.ehaweb.org. To become an EHA member or to renew your membership, please visit the [membership page](#).

Should you have any questions please contact the congress secretariat, by telephone at +31 (0)20 - 570 96 00 or by e-mail: eha@mci-group.com
Thank you for your excellent contribution to the 21st Congress. I look forward to meeting you in Copenhagen.

With kind regards,



Andreas Engert
Chair Scientific Program Committee 21st Congress

Personal Abstract Information

Submission ID: EHA-3323

Title: DEPLETION OF PROINFLAMMATORY MONOCYTES AND INCREASED LEVELS OF CD56 EXPRESSION ON CLASSICAL MONOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH LOWER RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

APÊNDICES

PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

PLANO CIENTÍFICO

Introdução

As células estaminais hematopoiéticas são células multipotentes que dão origem aos diferentes tipos de células sanguíneas, sendo reguladas por fatores intrínsecos e extrínsecos, que permitem a sua proliferação e diferenciação. Estas células proliferam dando origem a um progenitor mielóide comum que, de acordo com os fatores de crescimento envolvidos, vai dar origem a linhagens celulares diferentes.²⁰ Deste modo, o fator estimulante do crescimento de colónias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF, *granulocyte monocyte-colony stimulating factor*) e as interleucinas 3 (IL-3) e 5 (IL-5) regulam a produção e ativação das células hematopoiéticas, sendo o GM-CSF também responsável pela diferenciação em monócitos e granulócitos.²¹ Por outro lado, a trombopoietina e o recetor celular correspondente (Mpl) são responsáveis pela diferenciação megacariocítica²⁰ e a eritropoietina e o seu recetor (EPOR, *erythropoietin receptor*) são responsáveis pela eritropoiese.²² E ainda, o fator estimulante da formação de colónias de granulócitos (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*) é a principal citocina responsável pela produção e função dos neutrófilos.²³ (Ilustração 1)

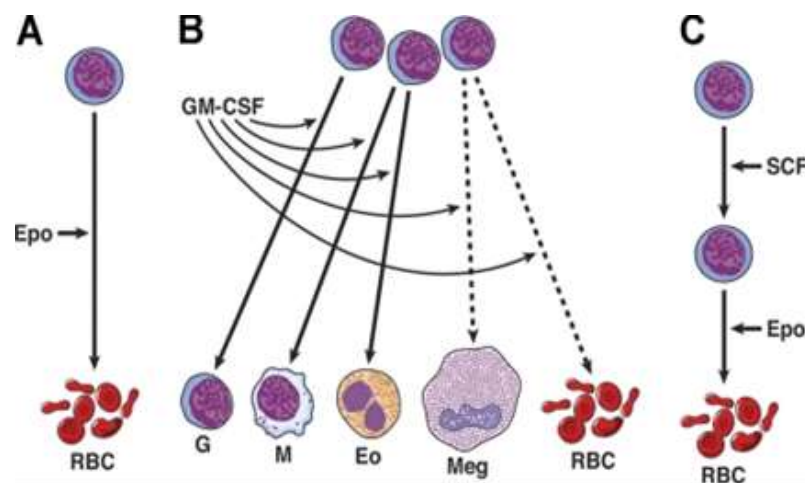


Ilustração 1: Hematopoiese e principais tipos de citocinas hematopoiéticas. A – ação restrita a uma linhagem celular; B – ação em múltiplas linhagens - as linhas a tracejado representam locais de atuação apenas em altas concentrações; C – ação sequencial, SCF atua nas células estaminais e progenitores eritróides precoces, Epo atua em células eritróides mais maduras. Abreviaturas: Epo, eritropoietina; G, granulócitos; GM-CSF, fator estimulador de colónias de granulócitos (*granulocyte colony stimulating factor*); M, monócitos e macrófagos; Eo, eosinófilos; Meg, megacariócitos; RBC, eritrócitos (*red blood cells*); SCF, fator das células estaminais (*stem cell factor*) (in Metcalf, D. *Hematopoietic cytokines*. *Blood* 111, 485–491 (2008))

O desenvolvimento e maturação das células hematopoiéticas nem sempre ocorrem de modo fisiológico. Os Síndromas Mielodisplásicos (SMD) compreendem um grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas da linhagem mielóide e caracterizam-se por uma hematopoiese ineficaz

numa ou várias linhagens celulares, citopenias e risco aumentado de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA).^{1,2,3} São, portanto, doenças das células estaminais.² Na população em geral, por ano, ocorrem 5 casos de SMD em cada 100.000 pessoas.²⁴ Este valor aumenta para 20 a 50 casos por 100.000 pessoas com idade superior a 60 anos.³ A idade média de diagnóstico é de 65 a 70 anos.¹

A causa dos SMD apenas é conhecida em 15% dos casos e compreende alterações citogenéticas, genéticas ou ambas, com possíveis alterações epigenéticas, as quais originam uma maior suscetibilidade das células progenitoras mielóides para a apoptose.¹

Quanto às alterações citogenéticas implicadas, a deleção parcial ou completa do braço longo do cromossoma 5, del(5q), é a mais frequente, ocorrendo em cerca de 10-15% dos doentes com SMD *de novo*. Quando isolada, define um subtipo específico de SMD, a síndrome 5q-, que está associada a menor risco de progressão para LMA e melhor prognóstico.²

Relativamente às alterações de genes, como mutações, deleções ou alterações no número de cópias, sabe-se que ocorrem em mais de 90% dos doentes com SMD.²⁵ Genes que codificam os fatores de transcrição (TP53 e ETV6) e genes envolvidos na regulação epigenética através da metilação (DNMT3A) ou da hidroximetilação (TET2, IDH1 e IDH2) das citosinas encontram-se frequentemente mutados. Além disso, têm sido descritas mutações recorrentes em genes implicados na modificação covalente das histonas (EZH2, UTX, ASXL1).^{1,26,27} Por outro lado, há estudos que reportam mutações nos genes envolvidos no *splicing* genético, responsáveis pelo processamento do pré-ARN mensageiro em ARN mensageiro maduro (SF3B1, SRSF2, U2AF1 e ZRSR2).^{1,2,26,27}

A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualizada pela última vez em 2008, estabelece os critérios para diagnóstico e classificação dos SMD.⁴ Baseia-se fundamentalmente em aspetos morfológicos do sangue periférico (SP) e da medula óssea (MO), nomeadamente a existência de citopenias, a percentagem de blastos, o tipo e grau de displasia, bem como na presença ou ausência de sideroblastos em anel na MO (Quadro 1). Deste modo, a classificação dos SMD baseia-se fundamentalmente em critérios morfológicos e exige o estudo da MO. Esta última pode ser normocelular ou hiper celular ou ainda, em raros casos, hipocelular, podendo também em 10% dos casos apresentar mielofibrose. A hipocelularidade e a mielofibrose são achados que tornam difícil a avaliação morfológica.⁵

As citopenias são fundamentais para o diagnóstico e geralmente correspondem às linhagens celulares que apresentam displasia, sendo que ambas podem atingir uma ou mais linhas celulares. Assim, para que se considere displasia, segundo a OMS, é necessário que esta seja observada em pelo menos 10% das células de uma mesma linhagem celular.²

Quadro 1: Classificação dos Síndromas Mielodisplásicos segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde de 2008

Síndromas mielodisplásicos	Sangue periférico	Medula óssea
Citopenias refratárias com displasia unilinhagem (anemia refratária, neutropenia refratária, trombocitopenia refratária).	Uma ou duas citopenias; blastos <1%.	Displasia observada em ≥10% de células de uma linhagem mielóide; <5% de blastos; <15% de sideroblastos em anel.
Anemia refratária com sideroblastos em anel	Anemia. Sem blastos circulantes.	Displasia restrita à linhagem eritróide; <5% blastos; ≥15% sideroblastos em anel
Citopenias refratárias com displasia multilinhagem	Citopenia(s); <1% blastos; ausência de bastonetes de Auer; monócitos <1x10 ⁹ /L.	Displasia em ≥10% de células de, no mínimo, duas linhagens; <5% blastos; ausência de bastonetes de Auer; pode haver ou não >15% sideroblastos em anel.
Anemia refratária com excesso de blastos tipo 1	Citopenia(s); <5% blastos; ausência de bastonetes de Auer; monócitos <1x10 ⁹ /L.	Displasia observada em ≥10% de células de uma ou mais linhagens; 5% a 9% blastos; ausência de bastonetes de Auer.
Anemia refratária com excesso de blastos tipo 2	Citopenia(s); 5-19% blastos; pode haver ou não bastonetes de Auer; monócitos <1x10 ⁹ /L.	Displasia observada em ≥10% de células de uma ou mais linhagens; 10% a 19% blastos; pode haver ou não bastonetes de Auer.
Síndrome mielodisplásico inclassificável	Citopenias; <5% blastos.	Displasia observada em ≥10% de células em uma ou mais linhagens mielóides quando acompanhadas de anormalidades citogenéticas presuntivas de SMD; blastos <5%.
Síndrome mielodisplásico associado a del(5q)	Anemia; contagem de plaquetas normal ou elevada; blastos <1%.	Megacariócitos normais ou aumentados com núcleos hipolobulados; blastos <5%; anormalidade citogenética del(5q) isolada; ausência de bastonetes de Auer.

Adaptado de Adès, L., Itzykson, R. & Fenaux, P. *Myelodysplastic syndromes. Lancet* 383, 2239–2252 (2014).

Para tentar determinar o prognóstico dos doentes com SMD surgiram diversos esquemas de pontuação, sendo o *International Prognostic Scoring System* (IPSS) o esquema mais usado. Neste esquema, a pontuação é atribuída conforme a percentagem de blastos na MO, número de citopenias (Quadro 2), número e tipo de alterações citogenéticas.

Quadro 2. *International Prognostic Scoring System* para os Síndromas Mielodisplásicos

	Pontuação				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Porcentagem de blastos na medula óssea	<5	5-10	-	11-20	21-30
Número de citopenias*	0-1	2-3	-	-	-
Alterações citogenéticas	Bom prognóstico: cariótipo normal, Y, del(5q), del(20q)	Prognóstico intermédio: outras anomalias cromossómicas	Mau prognóstico: ≥ 3 anomalias; anomalias do cromossoma 7	-	.

* Plaquetas $<100 \times 10^9/l$; hemoglobina <10 g/dl; neutrófilos $<1.8 \times 10^9/l$.

Adaptado de Adès, L., Itzykson, R. & Fenaux, P. *Myelodysplastic syndromes. Lancet* 383, 2239–2252 (2014).

O IPSS permite estimar o prognóstico tendo em conta a pontuação total obtida nos parâmetros acima referidos (Quadro 3). O *score* inicialmente proposto foi posteriormente revisto, usando os mesmos parâmetros mas com limiares diferentes.¹

Quadro 3. Estratificação de risco clínico dos Síndromas Mielodisplásicos, de acordo com o *International Prognostic Scoring System*

Grupo de risco	Risco			
	Baixo	Intermédio 1	Intermédio 2	Alto
Pontuação	0	0,5-1,0	1,5-2,0	≥2,5
Proporção de doentes com SMD	33%	38%	22%	7%
Sobrevida média (anos)	5,7	3,5	1,2	0,4
Tempo até à evolução para leucemia aguda em 25% dos casos (anos)	9,4	3,3	1,1	0,2

Adaptado de Adès, L., Itzykson, R. & Fenaux, P. *Myelodysplastic syndromes. Lancet* 383, 2239–2252 (2014).

Nos últimos anos, a citometria de fluxo (CF) tem vindo a desempenhar um papel cada vez mais relevante no estudo dos SMD, sobretudo nos casos em que a avaliação citomorfológica é difícil. Há estudos que demonstram que é possível distinguir, por CF, subtipos de SMD com prognóstico distinto,^{7,8} bem como entre SMD e citopenias de outra natureza.²⁸ No entanto, a maioria destes estudos foi realizada em amostras de MO e poucos se dedicaram ao estudo das células do SP. Destes últimos, alguns descreveram alterações das características de dispersão da luz dos neutrófilos de doentes com SMD, em resultado da hipogranulação.¹⁶ Outros estudos reportaram alterações na expressão de várias moléculas na membrana dos neutrófilos de doentes com SMD comparativamente

a indivíduos saudáveis, como é o caso da expressão anormal de CD10, CD11a CD11b, CD18, CD35, CD44, CD53, CD66, CD67, CD69 e CD116.^{16,18}

Dada a importância dos fatores de crescimento, G-CSF e GM-CSF, na maturação dos neutrófilos e dos monócitos é de esperar que ocorram alterações da expressão dos respetivos recetores, G-CSFR e GM-CSFR, na superfície destas células e que tenha significado funcional. No entanto, tanto quanto é do nosso conhecimento, até ao momento apenas três estudos investigaram a expressão destes recetores nas células de SP de doentes com SMD. Um estudo descreveu alterações na expressão do G-CSFR (CD114).²⁹ Outro estudo descreveu alterações da cadeia α do recetor do GM-CSF (CD116).¹⁶ Estas alterações também foram relatadas ao nível da cadeia β deste último recetor, a cadeia β comum (β_c) aos recetores do GM-CSF, da IL-3 e da IL-5 (CD131).³⁰ No entanto, o conhecimento sobre estas alterações é ainda escasso e as metodologias usadas necessitam de ser otimizadas.

Neste estudo propomos avaliar, por CF, a expressão de várias moléculas, incluindo recetores de fatores de crescimento (GM-CSFR e G-CSF-R), na membrana dos neutrófilos e dos monócitos do SP de doentes com SMD, por comparação com a observada em indivíduos saudáveis, assim como nas células blásticas eventualmente presentes no SP dos doentes. Para além de estabelecer o valor destas alterações para o diagnóstico, pretendemos investigar se existem diferenças entre os diversos subtipos de SMD, no que respeita à expressão destas moléculas.

Enquadramento teórico

A citometria de fluxo (CF) é um método altamente sensível para a avaliação quantitativa e qualitativa das células hematopoiéticas,^{6,5} e tem sido usada para estudar doentes com suspeita de SMD ou com SMD confirmado, nomeadamente para avaliar de que modo a imunofenotipagem celular pode ajudar a estabelecer o diagnóstico, estimar o prognóstico e monitorizar a doença.⁷ A maioria dos estudos foi realizada em amostras de medula óssea (MO), e neles foram avaliados quer a expressão isolada de algumas moléculas na superfície das células blásticas e das restantes células da linha mielóide, quer os perfis imunofenotípicos associados à maturação e diferenciação das células das linhas eritróide, granulocítica e monocítica, como um complemento à análise morfológica da dismielopoiese.²

De uma forma geral, a CF parece contribuir para o estudo dos casos em que existe displasia mínima, insuficiente para o diagnóstico de SMD, e dos casos sem alterações citogenéticas, visto que estas só ocorrem em 50% dos doentes.⁹ Também parece ser importante para o estudo de displasia nos casos que apresentam hipocelularidade e/ou fibrose da MO, em que os estudos citológicos e citogenéticos são difíceis e/ou inconclusivos.⁵ Por outro lado, a CF pode ajudar no diagnóstico diferencial entre SMD de baixo risco e citopenias de outra natureza.²⁸ Este exame auxiliar de diagnóstico pode contribuir para a distinção entre a anemia refratária e citopenia refratária com displasia multilinhagem, entidades que apresentam sobrevidas diferentes, sendo que os doentes com citopenias refratárias com displasia multilinhagem apresentam menor sobrevida que os doentes com anemia refratária.⁸ Além destas duas entidades referidas, a citometria pode contribuir para o diagnóstico dos restantes subtipos de SMD, inclusivamente os casos 5q-.⁷

Há estudos que indicam que a CF é mais sensível do que a avaliação morfológica para estudo da dismielopoiese. Em um desses estudos, foi detetada uma maturação anormal em 98% dos casos de SMD, ao passo que a avaliação morfológica teve uma sensibilidade de 80%, com concordância de 78% dos casos em que havia estudo morfológico e imunofenotípico; além disso, em 75% dos casos com morfologia indeterminada, a CF revelou-se informativa, uma vez que demonstrou anomalias imunofenotípicas em duas ou três linhas celulares, aspetos não presentes em indivíduos sem SMD.⁵ Segundo outro estudo, verificou-se cerca de 82% de concordância entre a citomorfologia e a CF em doentes já com diagnóstico definitivo de SMD; ainda, 22.7% dos doentes que apresentavam displasia discreta por citomorfologia, tinham evidência clara de SMD por CF. Por outro lado, 50% dos doentes sem displasia citomorfológica mas com alterações citogenéticas, apresentavam alterações imunofenotípicas que indicavam SMD e em 47.8% dos doentes com displasia discreta identificada pela citomorfologia e alterações citogenéticas, a CF identificou esses doentes com tendo SMD.¹⁰ Em um estudo mais recente, realizado em 2013, em que a CF permitiu fazer o diagnóstico de SMD na primeira avaliação, verificou-se uma concordância de 50.1% deste diagnóstico, numa fase posterior, por citomorfologia, citogenética ou genética molecular.⁹

Outro aspeto que merece ser abordado é o fato de grande parte dos estudos realizados por CF em doentes com SMD ter sido feito em amostras de medula óssea (MO). Deste modo, torna-se relevante fazer, primeiramente, uma reflexão sobre o estado da arte no que respeita ao papel da CF no estudo dos SMD em amostras de MO, sendo igualmente fundamental refletir sobre o uso desta técnica, nesta mesma patologia, tendo como amostra biológica o SP.

Medula Óssea

Células imaturas

Para a identificação de eventuais alterações fenotípicas é necessário saber o que procurar e onde procurar e, sendo assim, um estudo identificou, com base na CF, que quase todos os doentes com SMD, independentemente do subtipo, expressam CD34, CD38, HLA-DR, CD13 e CD33 nos seus precursores mielóides.³¹

Os mieloblastos, identificados como células $CD45^{low}SSC^{low/int}CD34^{+}$,⁷ encontram-se aumentados nos indivíduos com SMD, por comparação com os indivíduos sem SMD.¹¹ Os mieloblastos são caracterizados por expressar CD34, que está presente em todos os precursores hematopoiéticos.³² No entanto, em doentes com SMD pode ocorrer a perda da expressão de CD45 e até de CD34 nestas células.⁷

Ainda relativamente à displasia mielóide verifica-se portanto um aumento na percentagem de mieloblastos, uma diminuição no número total de neutrófilos, com elevado número de neutrófilos de fase I ($CD11b^{-low}$, $CD16^{-low}$), sem alteração na proporção de neutrófilos em fase II e III.³³

Por outro lado, as células B precursoras, identificadas na região $CD45^{low}SSC^{low}$, com expressão de CD34 e CD19, encontram-se significativamente diminuídas nos doentes com SMD em relação aos indivíduos sem SMD.¹¹ Segundo um estudo realizado em 2006, já havia sido constatada a diminuição das células B precursoras (hematogónias) de fase I ($CD34^{+}$, $CD10^{+}$ e $CD19^{+}$) em doentes com SMD de baixo risco, embora esta diminuição não seja, por si só, suficiente para fazer o diagnóstico.¹⁵ Esta diminuição das células B precursoras deve-se a uma redução na expressão de alguns genes envolvidos no desenvolvimento dos linfócitos B (CD24, POU2AF1, VPBEB 1, VPBEB 3, CD79B, DNMT, PAX5, LEF1 e BACH1).³⁴ Este aspeto também é apoiado pela evidência na CF de uma diminuição da maturação dos precursores das células B.³⁴

Além deste padrão de expressão de linhagens celulares identificado nos SMD a partir da CF, foram encontradas alterações imunofenotípicas ao nível da expressão de antígenos das diferentes linhas celulares. Assim, constatou-se que existiam alterações na expressão antigénica nos mieloblastos mais frequentes em doentes com SMD, classificados segundo critérios citomorfológicos, que nos doentes sem SMD ou com suspeita de SMD^{10,11,15}, estando estas alterações presentes em maior número à medida que se dava a progressão da doença.¹³

Deste modo, fizeram-se vários estudos para identificar quais as alterações que ocorriam, por exemplo, nos mieloblastos e verificou-se que os doentes com SMD apresentavam mais frequentemente alterações na expressão de CD11b, CD56, CD7 relativamente a indivíduos sem SMD, sendo que estes dois últimos antigénios bem como o CD5 são designados de marcadores de infidelidade, uma vez que se expressam em linhagens celulares onde normalmente não são identificados.^{10,11} Outras alterações identificadas foram, por exemplo, a expressão aumentada ou diminuída de CD34, HLA-DR, CD13 e CD117.^{10,11} A expressão de CD7, CD56 e CD117 foi associada a um aumento da percentagem de blastos na MO, ao passo que a expressão de CD10, CD11b e CD15 foi associada a uma menor percentagem de blastos e portanto a estádios menos avançados da doença.³⁵

Os antigénios CD11b e CD15 previamente mencionados estão relacionados com a maturação mielóide, ao passo que os CD4, CD10 e CD56 estão relacionados com a maturação linfóide e os antigénios CD13, CD33, CD117 e CD133 se expressam habitualmente nas células da linha mielóide, podendo a sua expressão estar alterada nos SMD.¹⁵

A ocorrência de uma só alteração imunofenotípica na linhagem mielóide não permite concluir que se trata de um SMD e devem ser detetadas várias anomalias imunofenotípicas nas células da linha granulocítica para que se possa afirmar que um doente apresenta mielodisplasia.^{7,36} Ainda assim, verificou-se que existe uma correlação entre o número total de antigénios anormalmente expressos e o aumento do “*International Prognosis Scoring System score*” (IPSS) tanto na linha mielóide e na linha monocítica em maturação, como nas células blásticas.^{10,11,13}

Uma vez identificados alguns aspetos que através da CF podem contribuir para o diagnóstico de SMD, tornou-se também importante determinar em que medida as alterações identificadas permitiam estimar o prognóstico. Deste modo, há estudos que sugerem que as anomalias fenotípicas nos blastos e no perfil fenotípico maturativo das células das linhas mielóide e monocítica se correlacionam com o IPSS.¹³ Assim, verificou-se existir uma relação entre a expressão de marcadores de infidelidade e a ocorrência de um prognóstico desfavorável, havendo nesses casos uma maior necessidade transfusional e maior risco de progressão da doença. Verificou-se, também, que existia uma relação entre a expressão de CD34 em células blásticas CD45^{low} e o prognóstico dos doentes com SMD. Além disso, níveis elevados de CD36 nas células blásticas CD45^{low} revelaram estar associados a pior prognóstico.²⁷ A expressão de alguns antigénios nas células blásticas, como é o caso do CD7 e CD117, parece estar associada a uma evolução clínica desfavorável, sendo a

expressão de CD7 um fator de risco independente para mau prognóstico; em contraste, a expressão de CD10 e CD15 parecem ser mais prevalentes em SMD de baixo risco.^{11,31}

Diferenciação granulocítica

Relativamente à displasia mielóide, parece existir uma relação entre a hipogranulação dos neutrófilos e uma diminuição do seu SSC (*orthogonal side scatter*), avaliado por CF. No entanto, a diminuição do SSC, por si só, não faz o diagnóstico desta patologia.^{10,11,12}

Nos neutrófilos maduros, comumente definidos pela expressão intermédia de CD45 e pelo seu perfil brilhante no SSC,⁷ a alteração na expressão de antigénios observa-se mais frequentemente em doentes com SMD confirmado por citomorfologia que nos doentes sem SMD ou com SMD suspeita segundo a citomorfologia.^{5,10}

Além disso, a disgranulopoiese está associada a alterações na expressão de alguns antigénios, nomeadamente, CD2, CD7, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD34, CD56, CD64 e HLA-DR.^{5,10,11,13,14}

Nos granulócitos, a expressão anormal de alguns antigénios é mais frequente em doentes com alteração no cariótipo do que em doentes com um cariótipo normal. É o caso da expressão anormal de CD13/CD16, CD11b/CD16, CD56, CD33 e CD64.¹⁰

No que diz respeito ao prognóstico associado a estas alterações, níveis elevados de CD36 nos granulócitos CD45^{high}SS^{high} revelaram estar associados a mau prognóstico segundo o *score* IPSS.¹²

Diferenciação monocítica

Relativamente à análise de monócitos por CF, sabe-se que estas células se caracterizam pela expressão intermédia de CD45 e SSC intermédio e que apresentam marcadores como CD14, CD33, CD36 e CD64.⁷

Nos doentes com SMD, verifica-se que os valores de SSC dos monócitos são inferiores aos dos monócitos de indivíduos saudáveis.¹¹ À semelhança do que acontece nos granulócitos, a alteração na expressão de antigénios nos monócitos observa-se mais frequentemente em doentes com SMD com diagnóstico confirmado por citomorfologia que nos doentes sem SMD ou com suspeita de SMD segundo a citomorfologia.^{10,11} Assim, os monócitos de doentes com SMD com alterações

citogenéticas, parecem apresentar mais frequentemente expressão de CD56 do que os monócitos de doentes com SMD sem alterações citogenéticas. Além desta alteração, foram referidas outras, nomeadamente ao nível da expressão de CD2, CD13 e CD16, as quais ocorriam mais frequentemente em doentes com SMD já diagnosticado por citomorfologia, ainda que também ocorressem em doentes com suspeita SMD.^{10,11} Foram, igualmente, identificadas alterações fenotípicas dos monócitos ao nível da expressão de CD14, CD36 e HLA-DR, bem como alterações na expressão de CD34 e marcadores de infidelidade como o CD5, CD7 e CD56.¹¹

Diferenciação eritróide e megacariocítica

A linhagem eritróide e megacariocítica são mais difíceis de avaliar por CF, havendo por isso informação mais escassa relativa a estas linhas celulares.^{5,36} Assim, ainda que as linhas eritróide e megacariocítica não sejam alvo de investigação no presente estudo, revela-se igualmente essencial fazer uma reflexão sumária sobre a avaliação por CF destas linhas celulares.

A displasia eritróide é um dos achados mais frequentemente encontrados nos doentes com SMD, sendo inclusivamente a única alteração morfológica encontrada na anemia refratária e na anemia refratária com sideroblastos em anel.³⁶ No entanto, o estudo das células da linha eritróide, que, por CF são identificadas pela ausência de expressão de CD45 e pelas características de dispersão da luz, tem-se revelado difícil, uma vez que existe um número mais limitado de anticorpos disponíveis para estudar a displasia eritróide. Deste modo, o conhecimento das alterações imunofenotípicas presentes nesta linhagem é mais limitado.⁷

Alguns aspetos já foram, contudo, investigados, como é o caso dos níveis anormais de CD71 (receptor da transferrina) e de CD235a (glicoforina A), assim como de expressão assíncrona de CD45, CD71 e CD235a.⁵ Assim, inferiu-se que a expressão alterada de CD71 era mais comum nos casos de SMD ou com suspeita de SMD segundo a citomorfologia em relação aos doentes sem SMD.¹⁰

Apesar da pouca informação relativa a esta linhagem, dados apontam que a partir da avaliação do metabolismo das proteínas do ferro é possível classificar mais de 90% dos SMD.³⁶

Adicionalmente, nos doentes com SMD com alterações imunofenotípicas na CF, a probabilidade de resposta ao tratamento com Epo e G-CSF é 37 vezes menor, à semelhança da diminuição da probabilidade de resposta de 10 vezes inferior no caso de níveis elevados de Epo.³⁷

Já no que respeita à linha megacariocítica, a avaliação por CF pouco tem acrescentado ao conhecimento comparativamente à avaliação morfológica.⁵

Assim, espera-se que com o futuro desenvolvimento de anticorpos destinados à linha eritróide e megacariocítica a sensibilidade da CF possa ser superior.⁵

Sangue Periférico

Apesar da colheita de SP ser menos invasiva que a colheita de MO, pouca informação existe relativamente ao uso da CF para o estudo do SP de doentes com SMD, tornando-se portanto importante a realização de mais estudos de investigação neste área.

Ainda assim, algumas conclusões são já possíveis a partir dos estudos publicados. Deste modo, tal como havia sido demonstrado em estudos na MO, também no SP se observou uma diminuição do SSC dos neutrófilos do SP de doentes com SMD comparativamente aos indivíduos sem essa patologia, refletindo este achado a hipogranulação destas células.¹⁶

Verificou-se também existir uma maior expressão de CD66 e de CD11a nos neutrófilos de SP de doentes com SMD,¹⁶ relacionada com ativação celular e com o aumento da adesão celular mediada pelo complexo CD11/CD18,³⁸ achado este que apoia a hipótese de que os polimorfonucleares dos doentes com SMD apresentam um fenótipo ativado.¹⁸ Segundo *Parker et al.*, em fases precoces da doença parece existir uma atividade apoptótica acelerada das células mielóides, ao passo que nos estadios mais avançados ocorre um aumento da atividade proliferativa destas células.³⁹

Verificou-se ainda haver uma expressão anormal de CD10 nos neutrófilos de SP de doentes com SMD,¹⁶ marcador de apoptose,⁴⁰ assim como de CD116, a subunidade α do GM-CSFR.¹⁶ Relativamente ao antigénio CD10, a partir de estudos realizados no SP, surgiu a hipótese da expressão normal deste antigénio estar relacionada com um melhor prognóstico, devido à sua associação com SMD de baixo grau. Assim, verificou-se haver uma diminuição da expressão desta molécula nos neutrófilos de doentes com SMD de alto risco e em doentes com leucemia mielomonocítica crónica em comparação com doentes com citopenias sem SMD e com doentes com SMD de baixo risco. Além disso, a expressão de CD10 parece apresentar uma relação com um índice de prognóstico, o “*World Health Organization Prognostic Scoring System*” (WPSS).¹⁷

Fatores de crescimento e seus recetores

Atualmente, vários fatores de crescimento se encontram estudados, mas, dada a especificidade do presente trabalho de investigação, será apenas feita referência a dois fatores de crescimento, o GM-CSF e G-CSF e respetivos recetores, GM-CSFR e G-CSFR.

GM-CSF e seu recetor

O GM-CSF e o seu recetor, GM-CSFR, são responsáveis por transmitir diversos sinais com impacto na função celular, nomeadamente, protegem as células da apoptose e permitem a sua progressão do ciclo celular e a sua diferenciação das células em células da linha mielóide.²¹

O GM-CSFR é um heterodímero composto por uma cadeia α (GMR α) e uma cadeia β (β c), sendo a primeira a principal subunidade de ligação do GM-CSF e a segunda a principal subunidade de sinalização. Habitualmente, ambas as subunidades se expressam nos leucócitos, mas a subunidade α expressa-se com intensidade mais forte.²¹

Estruturalmente o GM-CSFR é um complexo hexamérico formado por 2 moléculas GM-CSF, 2 cadeias α e 2 cadeias β c, havendo 3 locais de interação: o primeiro entre o GM-CSF e a cadeia α do GM-CSFR; o segundo entre o GM-CSF e a cadeia β c do GM-CSFR; e o terceiro entre as cadeias α e β c do GM-CSFR. Para que se dê a ativação do GM-CSFR é necessária a ligação da tirosina cinase Jak2 à subunidade β c, ligação esta essencial para a transfosforilação que dá início ao sinal que permite a atividade biológica. A transfosforilação da cadeia β c só é possível devido à formação de um complexo dodecamérico formado por dois complexos hexaméricos relacionados; este complexo dodecamérico permite também a interação entre cadeias α , fundamental para a transdução do sinal.²¹ (Ilustração 2).

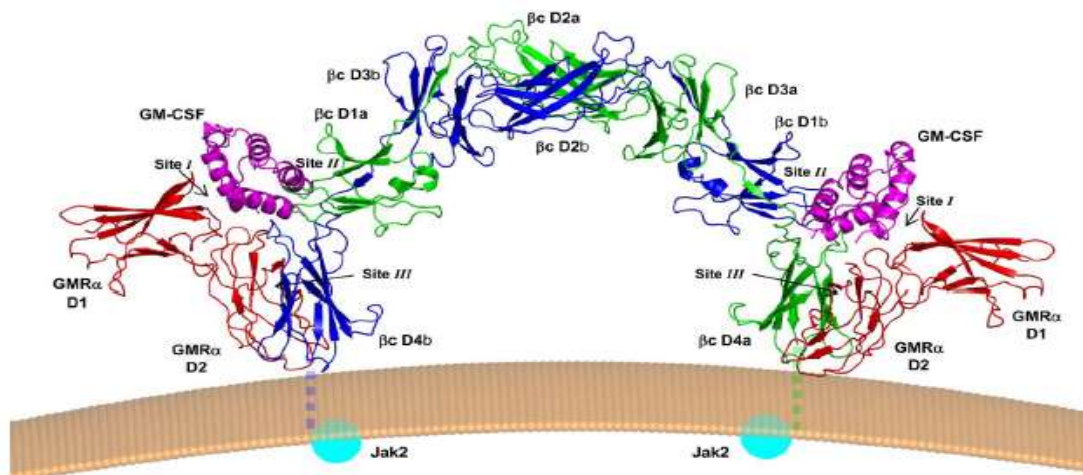


Ilustração 2: Estrutura do GM-CSFR na forma de complexo hexamérico tal qual como se encontra na superfície celular. Um monómero da cadeia β c encontra-se a verde (cadeira a) e o outro monómero a azul escuro (cadeira b). O GM-CSF encontra-se a magenta e a cadeia alfa do seu recetor, GMR α , a vermelho. Os três locais de interação também se encontram representados (*sites* I-III). A tracejado estão demonstradas as regiões transmembranares. As moléculas Jak2 encontram-se representadas a azul claro. Abreviaturas: GM-CSF, *granulocyte monocyte colony stimulating factor*; GMR, *granulocyte monocyte colony stimulating factor receptor* (in Hercus, T. R. et al. *The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. Blood* 114, 1289–1298 (2009))

Shikama et al. verificaram existir uma diminuição da expressão das cadeias β c (CD131) e α (CD116) do GM-CSFR nos neutrófilos, em cerca de 50% e de 20% dos doentes com SMD, respetivamente. Observaram também que a diminuição na expressão de β c era maior em doentes com estadios mais avançados da doença, incluindo anemia refratária com excesso de blastos (AREB)

ou com AREB em transformação do que nos doentes com anemia refratária ou com anemia refratária com sideroblastos em anel. Por outro lado, a diminuição da expressão da cadeia β_c parecia estar relacionada com níveis crescentes de hipogranulação e com uma maior incidência de infecções.³⁰

G-CSF e seu receptor

O G-CSF permite a maturação final dos neutrófilos e a sua concentração aumenta durante as infeções devido a numerosos estímulos inflamatórios como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α).^{23,41} A expressão do seu recetor, G-CSFR (CD114), na linha granulocítica aumenta em estadios tardios da maturação e correlaciona-se com a sensibilidade ao G-

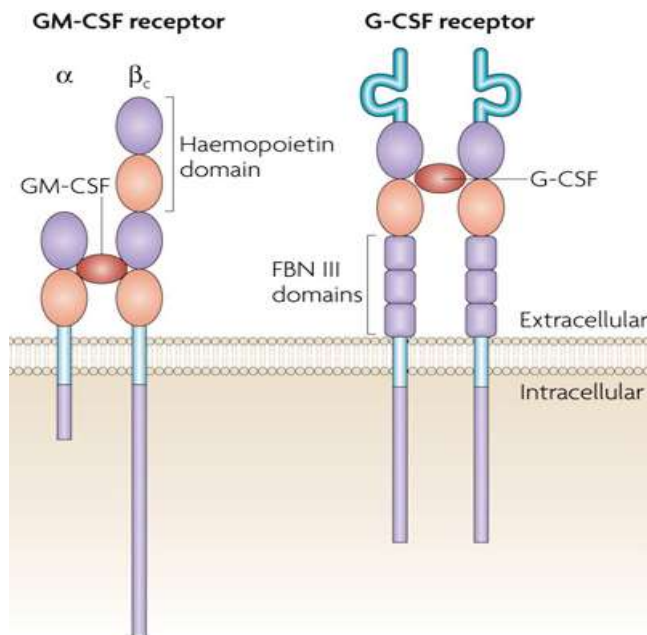


Ilustração 3: Representação esquemática do GM-CSF e G-CSF demonstrando as suas unidades estruturais. (Legenda: G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; G-CSF receptor, granulocyte colony stimulating factor receptor; GM-CSF, granulocyte monocyte colony stimulating factor; GM-CSF receptor, granulocyte monocyte colony stimulating factor receptor; FBNIII domains- domínio da fibronectina tipo II) (in Hamilton, J. A. *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 533–544 (2008))

CSF.²³ Estruturalmente, o G-CSFR é composto por um domínio homólogo recetor de citocinas (CRH *domain*), um domínio tipo Ig e três domínios semelhantes à fibronectina tipo III na região extracelular. O G-CSFR contém ainda uma região intracelular sem atividade catalítica intrínseca (Ilustração 3).

A activação deste receptor induz a transfosforilação das proteínas tirosina cinase Jak (Jak1 e Jak2), o que permite a transdução do sinal. Por outras palavras, a região proximal da membrana do G-CSFR liga-se ao passo que a região distal regula a expressão génica e a diferenciação granulocítica. Esta região contém quatro tirosinas cinase que sofrem fosforilação mediada pelo

recetor associado às cinases da família Jak, havendo assim recrutamento de moléculas de sinalização intracelular e promovendo assim a maturação granulocítica.²³

Relativamente à expressão do G-CSFR (CD114) nas células da linhagem mielóide de doentes com SMD, avaliada por CF, verifica-se que este pode apresentar uma intensidade tanto aumentada como diminuída em comparação com indivíduos sem a patologia. Em indivíduos sem SMD, a expressão de CD114 tem início numa fase precoce das células blásticas e aumenta a sua densidade numa fase tardia dos blastos, sendo o pico da densidade de CD114 alcançado na fase promielócito.²⁹

Problemas

Os critérios de diagnóstico dos SMD são essencialmente morfológicos, com recurso a amostras de MO, cuja colheita exige métodos invasivos e cuja avaliação pode ter algumas limitações, nomeadamente em casos em que existe mielofibrose e/ou em que a MO é hipocelular. Da mesma forma, a maioria dos estudos em que foi avaliada a utilidade da CF para diagnóstico de SMD foi realizada em amostras de MO. Por outro lado, embora estudos anteriores tenham documentado alterações da expressão de várias moléculas nas células de doentes com SMD, a informação sobre a expressão dos recetores dos fatores de crescimento, GM-CSF e G-CSF, nas células destes doentes é ainda muito escassa.

Deste modo, surge a necessidade de avaliar, por CF, as alterações fenotípicas das células de SP de doentes com SMD, em particular no que respeita à expressão dos recetores para fatores de crescimento, GM-CSF e G-CSF.

Questões

Quais são as alterações fenotípicas encontradas nos neutrófilos e nos monócitos de SP de doentes com SMD, por comparação com indivíduos adultos saudáveis? Em particular, quais são as alterações da expressão dos recetores para fatores de crescimento, GM-CSFR e G-CSFR? Na presença de alterações de expressão destes recetores, existirão diferenças entre os diferentes subtipos de SMD? E haverá alguma correlação com a resposta dos doentes aos fatores de crescimento?

Objetivos do estudo

Com o presente estudo pretende-se: a) avaliar, por CF, a existência de alterações na expressão de várias moléculas nos neutrófilos e nos monócitos de SP de doentes com SMD, com especial relevo para o GM-CSFR e o G-CSFR; b) avaliar se estas alterações, caso existam, diferem conforme o subtipo de SMD; e, se possível, c) avaliar se existe relação entre as alterações da expressão de GM-CSF e G-CSF e a resposta ao tratamento com fatores de crescimento. Por último, pretende-se confrontar os resultados obtidos com os dos estudos publicados até ao momento sobre este assunto.

Intervenientes

Instituições, Departamentos e Serviços

- Centro Hospitalar do Porto (CHP).
 - Hospital de Santo António (HSA).
 - Departamento de Medicina (DM).
 - Serviço de Hematologia Clínica (SHC).
 - Laboratório de Citometria (LC)

Equipa de Investigação

Constituição

Aluno

- Ana Aires, aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP

Orientadores do projeto

- Margarida Lima: médica, especialista em imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada do SHC do HSA/CHP; responsável pelo LC do SHC do HSA/CHP; professora auxiliar convidada do ICBAS/UP e responsável pela DIIC (Orientadora)
- Maria dos Anjos Teixeira: médica, especialista em imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada do LC do SHC do HSA/CHP (Coorientadora).

Supervisora

- Margarida Lima: médica, especialista em imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada do SHC do HSA/CHP; professora auxiliar convidada do ICBAS/UP e responsável pela DIIC

Outros investigadores

- Ana Spínola, médica interna de imunohemoterapia, SHC do HSA/CHP.
- Marta Gonçalves, licenciada em bioquímica, técnica superior de saúde, LC do SHC do HSA/CHP
- Cristina Gonçalves, médica especialista em hematologia clínica, assistente hospitalar graduada, SHC do HSA/CHP; diretora do Hospital de Dia do CHP; professora auxiliar convidada do ICBAS/UP.
- Ana Sofia Jorge, médica interna de hematologia clínica, SHC do HSA/CHP.
- Cláudia Moreira, médica interna de hematologia clínica, SHC do HSA/CHP.

Funções e responsabilidades

- A conceção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade da aluna;
- As orientadoras acompanharão a aluna na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados;
- A regente da DIIC supervisionará todas as fases do projeto, desde a sua conceção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados;
- Os restantes investigadores colaborarão em aspetos específicos do projeto, conforme especificado adiante.

Tempo dedicado ao projeto

O tempo dedicado ao projeto pela equipa de investigação será o indicado na Quadro 4.

Quadro 4: Tempo dedicado ao projeto

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nº de meses	Pessoas * Mês
Ana Aires	Aluna	10.0%	22	2.20
Margarida Lima	Orientadora	2.5%	22	0.55
	Supervisora	2.5%	22	0.55
Maria dos Anjos Teixeira	Coorientadora	2.5%	22	0.55
Ana Spínola	Investigadora	2.5%	22	0.55
Marta Gonçalves	Investigadora	2.5%	22	0.55
Cristina Gonçalves	Investigadora	1.0%	22	0.22
Ana Sofia Jorge	Investigadora	1.0%	22	0.22
Cláudia Moreira	Investigadora	1.0%	22	0.22
Total				5.61

Condições e motivações para a realização do estudo

Capacidades instaladas e recursos disponíveis

O presente estudo decorrerá nas instalações do LC do SHC do HSA/CHP, o qual dirige o seu estudo para as doenças hematológicas. É composto por vários profissionais da área da saúde (3 médicos, 2 técnicos superiores de saúde e 3 técnicos de diagnóstico e terapêutica) com grande experiência nesta área. Diariamente recebe amostra biológicas do CHP, mas também outras instituições da Região Norte do País, perfazendo um total de cerca de 3.500 amostras/ano.

No referido laboratório existe o equipamento necessário para a realização do presente estudo, nomeadamente quatro citómetros de fluxo (2 citómetros FACSCanto II, da Becton e Dickinson, e 2 citómetros Navios, da Beckman Coulter), um contador hematológico automático, centrífugas, frigoríficos e arcas congeladoras. Além deste equipamento, o LC dispõe também de computadores e aplicações informáticas necessárias para a análise dos dados obtidos, em concreto o *software* Infinicyt da Cytognos.

Mérito da equipa de investigação

Nos últimos anos, têm sido realizados no LC do SHC do HSA/CHP diversos projetos de investigação na área da citometria aplicada ao estudo das doenças hemato-oncológicas. A equipa de investigação tem também apoiado ao longo do tempo inúmeros trabalhos académicos nesta área. Como consequência, a mesma equipa conta mais de 80 artigos publicados em revistas indexadas na MedLine. Além disso, integra um consórcio europeu, o grupo Euroflow, vocacionado para o diagnóstico imunofenotípico das neoplasias hematológicas.

Motivações pessoais para a realização do estudo

A decisão de realizar um projeto de investigação clínica prende-se com o fato de sentir que me faltava uma formação mais específica na área da investigação. Efetivamente, a componente formativa do MIM é essencialmente dirigida às áreas clínicas. Deste modo, senti que, da minha parte, havia falhas na minha formação pessoal que queria colmatar fazendo um projeto de investigação que me iria permitir saber quais os passos necessários e quais as dificuldades para a concretização de um projeto deste tipo. Por outro lado, considero que cada vez mais um médico necessita de aliar às competências clínicas as competências de investigação e considero que este é o melhor momento para as adquirir, na tentativa de contribuir para a minha constante formação e o conhecimento em saúde.

Quanto à área do projeto tinha uma certeza: teria que ser uma área clínica da Medicina. A Hematologia, em concreto o estudo dos SMD, foi uma proposta da Professora Doutora Margarida Lima que me contagiou com o seu entusiasmo pela investigação clínica na área das doenças hemato-oncológicas. Rapidamente o interesse foi aumentando mais e mais à medida que lia sobre o assunto, e penso que a curiosidade pela área e a vontade de trabalhar foram as principais motivações que me levaram a aceitar esta área da Medicina que sempre me interessou mas que paradoxalmente me assustava porque achava uma área complexa.

Metodologia

Critérios de revisão da literatura

Para a presente revisão bibliográfica foi consultada, através da PubMed, a base de dados Medline, usando para isso alguns critérios para tornar a pesquisa mais específica, como o assunto, o tipo de artigo, a data e a língua de publicação. No que respeita ao assunto, as palavras-chave selecionadas foram: *myelodysplastic syndromes, diagnosis, classification, flow cytometry, bone marrow, peripheral blood, GM-CSF, GM-CFS receptor, G-CSF, G-CSF receptor, neutrophils e monocytes*. A pesquisa foi restrita aos artigos redigidos em inglês e foi dada preferência aos artigos publicados durante os últimos 5 anos. No entanto, foram também consultados, pela sua relevância, alguns artigos publicados mais antigos. Na primeira fase, para uma visão geral sobre o tema, foram consultados artigos de revisão, e, numa segunda fase, a pesquisa restringiu-se apenas a artigos originais. Outras fontes de informação foram facultadas pela orientadora Prof. Doutora Margarida Lima e pela coorientadora Dra. Maria dos Anjos Teixeira.

Desenho do estudo

Tipo de estudo

Estudo de investigação clínica, nacional e institucional, de carácter analítico, observacional e transversal, de tipo caso-controlo e de âmbito laboratorial, aplicado à clínica.

Universo, população e amostra

Universo: Doentes adultos com SMD

População: Doentes adultos com SMD com diagnóstico estabelecido através dos critérios de classificação da OMS, seguidos na Consulta de Hematologia do CHP.

Amostra: Tamanho pretendido para os casos: 30 doentes; Tamanho pretendido para os controlos: 30 indivíduos adultos saudáveis;

Seleção dos participantes

Amostragem não aleatória, por conveniência, consecutiva até ser atingido o tamanho pretendido para a amostra.

Casos: Serão selecionados os doentes com SMD seguidos na consulta de Hematologia do HSA/CHP entre setembro de 2015 e junho de 2015, até atingir o tamanho pretendido para a amostra.

Controlos: Serão selecionados dadores benévolos de sangue do SHC do HSA/CHP, de entre aqueles que se apresentem para doar sangue durante o período acima referido, até atingir o tamanho pretendido para a amostra.

Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão

Doentes: Ter idade igual ou superior a 18 anos; ter diagnóstico de SMD, de acordo com os critérios estabelecidos pela classificação da OMS de 2008; frequentar a consulta de Hematologia do HSA/CHP; ter assinado, de forma livre e esclarecida, o termo de consentimento informado, concordando com a colheita de SP para a realização das análises de investigação propostas.

Controlos: Ter idade igual ou superior a 18 anos; ser dador benévolo de sangue do SHC do HSA/CHP; preencher os requisitos que permitam a dádiva de sangue; assinar, de forma livre e esclarecida, o termo de consentimento informado, concordando com a colheita de uma amostra de SP para a realização das análises de investigação propostas.

Critérios de exclusão

Doentes: Estar a fazer ou ter feito, nos 3 meses precedentes, tratamento com quimioterapia, fatores de crescimento (GM-CSF ou G-CSF) ou imunossupressores; ter ou ter tido infeções nos 3 meses precedentes; ter ou ter tido outra doença oncológica (Nota: transfusões sanguíneas e terapêutica com EPO não são fatores de exclusão).

Controlos: Ser a primeira dádiva de sangue; ter antecedentes de doença oncológica; ter ou ter tido infeções nos 3 meses precedentes.

Plano de trabalho

Tarefas associadas ao projeto

Lista de tarefas

Durante a execução do projeto estão previstas as tarefas mencionadas na Quadro 5.

Quadro 5: Tarefas associadas ao projeto

Nº da tarefa	Designação da tarefa	Investigadores e colaboradores envolvidos	Data de início (dia/mês/ano)	Data de conclusão (dia/mês/ano)
1	Seleção dos doentes	Ana Aires Ana Spínola Cristina Gonçalves	1/maio/2015	1/junho/2015
2	Recolha de dados clínicos	Ana Aires Ana Spínola Ana Sofia Jorge Cláudia Moreira	1/maio/2015	30/set/2015
3	Colheita de amostras de SP	Enfermeiros do Hospital de Dia e do Setor de Dádivas de Sangue do SHC do HSA/CHP	1/junho/2015	30/set/2015
4	Contagem de células em contador hematológico	Ana Aires Marta Gonçalves	1/junho/2015	30/set/2015
5	Imunofenotipagem dos leucócitos	Ana Aires Marta Gonçalves	1/junho/2015	30/set/2015
6	Análise fenotípica	Ana Aires Maria dos Anjos Teixeira Margarida Lima	1/junho/2015	30/set/2015
7	Construção da base de dados	Ana Aires Ana Spínola Margarida Lima	1/junho/2015	30/set/2015
8	Tratamento estatístico dos dados	Ana Aires Ana Spínola Margarida Lima	1/set/2015	30/nov/2015
9	Interpretação dos resultados	Todos os investigadores	1/out/2015	4/jan/2016
10	Elaboração do relatório de investigação	Ana Aires, com a colaboração dos orientadores	1/nov/2015	1/junho/2016

Material e métodos

Os doentes e os dadores benévolos de sangue serão informados sobre o estudo por um dos médicos da equipa de investigação, será entregue um folheto informativo sobre o mesmo (ver anexos) e será solicitada a sua participação, mediante assinatura de termo de consentimento informado (ver anexos).

Caso os doentes concordem participar, será feita a recolha dos dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais (Quadro 6), utilizando um formulário próprio (ver anexos).

Quadro 6: Dados socio-demográficos, clínicos e laboratoriais a obter dos doentes admitidos no estudo

Dados sócio-demográficos	Idade, género
Dados clínicos	Data de diagnóstico do SMD Classificação do SMD (OMS, 2008) Prognóstico de acordo com o IPSS
Dados clínicos	Manifestações clínicas (relacionadas com a anemia, infeções e hemorragias) Terapêutica previa com fatores de crescimento, EPO, G-CSF ou GM-CSF (datas e resposta) Necessidades transfusionais durante o último ano (tipo e frequência) Tratamento prévio com quimioterapia (tipo, datas e resposta) Tratamento prévio com imunossupressores (tipo, datas e resposta)
Dados laboratoriais ao diagnóstico	Resultados do hemograma Resultados do estudo medular Resultados do estudo citogenético, se disponível

Serão colhidas amostras de SP (2 tubos de sangue com anticoagulante EDTA-K3) a 30 doentes com o diagnóstico de SMD segundo os critérios da OMS 2008 e a 30 dadores benévolos de sangue, após consentimento informado. Todas as colheitas serão feitas nos dias de consulta de Hematologia ou nos dias de comparência no Hospital de Dia dos doentes que integrarão o estudo e, no caso dos controlos, no dia da dádiva de sangue.

As amostras de sangue serão enviadas ao Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica, acompanhadas de uma requisição específica do estudo, do termo de

consentimento informado e do formulário de recolha de dados clínicos, em envelope fechado. Os documentos ficarão arquivados em pasta própria, nas instalações do laboratório.

As amostras de SP serão processadas no máximo de 24h após a colheita. Primeiramente, as amostras serão sujeitas à marcação das células com anticorpos monoclonais específicos para diferentes antigénios expressos na membrana, seguida de lise dos eritrócitos e fixação dos leucócitos. Estes anticorpos monoclonais serão combinados de acordo com os painéis discriminados no Quadro 7. Parte destes anticorpos já são usados por rotina no laboratório para estudo dos SMD, enquanto outros serão apenas usados para fins de investigação. De notar que em paralelo com as amostras de cada um dos doentes avaliados será processada uma amostra de SP normal.

Quadro 7: Combinações de anticorpos monoclonais a usar no presente estudo

Tubos	Fluorocromos	FITC	PE	PerCP-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	KO
Tubo 1	Especificidades	CD15	CD13	CD34	CD10	CD11b	CD14*	CD16	CD45
Tubo 2		HLA-DR	CD64	CD34	CD56	CD11c	CD14*	CD16	CD45
Tubo 3		CD116*	CD114*	CD34	CD56	CD131*	CD14*	CD16	CD45

Os anticorpos assinalados com * são usados exclusivamente para fins de investigação. Os restantes anticorpos já são habitualmente usados na rotina para estudo dos SMD.

Abreviaturas: APC, allophycocyanin (aloficocianina), Cy5.5, Cyanine 5.5 (cianina 5.5); Cy7, Cyanine 7 (cianina 7); FITC, Fluorescein, isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína; KO, Khrome Orange; PE, Phycoerythrin (ficoeritrina), PerCP, Peridinin chlorophyll protein (proteína peridina clorófilica) V450, Violet 450 (violeta 450).

O significado biológico das moléculas a avaliar é descrito de forma sumária no Quadro 8.

Quadro 8: Principais características das moléculas que serão avaliadas no presente estudo

CD	Outras designações	Principais Características	Referência
CD10	MME	Endopeptidase neutra expressa nas células imaturas da linhagem linfóide e nas células B e T dos centros germinativos dos órgãos linfóides secundários, assim como nos neutrófilos maduros.	Maguer-Satta V, 2011- PMID: 21425402
CD11b	ITGAM CR3	Molécula de adesão da família das integrinas; forma heterodímeros com o CD18 (integrina β 2); funciona como receptor para o complemento (CR3); é expresso em células das linhas granulocítica e monocítica, incluindo neutrófilos e monócitos maduros, nas células NK e em subpopulações de células T citotóxicas.	Cabañas C, 1999- PMID: 10503737
CD11c	CR4	Molécula de adesão da família das integrinas; CD11c corresponde à subunidade α que com o CD18 (integrina β 2) forma heterodímeros; funciona como receptor para o complemento (CR4); é expressa nos monócitos, granulócitos e em subpopulações de células NK e de células T citotóxicas; parece ser fundamental na mediação de interações dos monócitos ao nível da adesão celular.	Mazzone A, 1995- PMID: 7628754
CD13	ANPEP, Aminopeptidas e N, gp150	Aminopeptidase expressa nas células progenitoras dos granulócitos e monócitos e nas células das linhas granulocítica e monocítica em diferentes fases de diferenciação.	Look T, 1989- PMID: 2564851.
CD14	MDA-CD14	Co-recetor (juntamente com recetores “Toll-like”) para o LPS bacteriano; expresso em monócitos.	Landmann R, 2000- PMID: 10758406
CD15	3-fucosil-N-acetil-lactosamina Lewis X	Molécula envolvida na adesão e ativação celular, presente em células da linha granulocítica e monocítica, sobretudo nos neutrófilos maduros, em que é expressa com intensidade forte.	Kerr M., 1992- PMID: 1362195
CD16	Fc γ RIII	Recetor de baixa afinidade para o fragmento Fc da IgG; expresso nas células da linha granulocítica, sendo a sua intensidade superior nos neutrófilos maduros, mas também em subpopulações de monócitos e na maioria das células NK.	Moldovan I, 1999- PMID: 10397167
CD34	HSCA-CD34	Glicoproteína da família das sialomucinas, expressa nas células hematopoiéticas imaturas e também no endotélio vascular; funciona como molécula de adesão.	Lanza F, 2004- PMID: 11388737
CD45	LCA	Molécula expressa, com diferentes intensidades,	Gratama JW, 2001-

CD	Outras designações	Principais Características	Referência
		em todos os leucócitos, da qual existem várias isoformas; tem atividade enzimática de fosfatase da tirosina.	PMID 11388740
CD56	NCAM	Molécula de adesão presente em células neuronais, mas também nas células NK e em células T citotóxicas; tem como ligando o próprio CD56 presente noutras células (interação homofílica); é expressa de forma aberrante em várias neoplasias hematológicas em particular nas que têm origem em plasmócitos, monócitos e células dendríticas.	Warren HS, 2000- PMID: 11215829
CD64	FcγRI	Recetor de alta afinidade para o fragmento Fc da IgG (CD64) é expresso constitutivamente nos monócitos e fracamente nos neutrófilos; a sua expressão nos neutrófilos aumenta grandemente num contexto inflamatório devido à ação de citocinas.	Venet F, 2011- PMID: 22017882
CD114	G-CSFR CSF3R	Recetor do G-CSF; expresso em células mielóides da linha granulocítica, incluindo neutrófilos maduros.	Panopoulos AD- PMID: 18400509
CD116	GM-CSFR-A CSF2RA	Cadeia alfa do recetor do GM-CSF; expressa em células mielóides da linha granulocítica e monocítica, incluindo neutrófilos e monócitos maduros.	Francisco-Cruz A, 2013- PMID: 24264600
CD131	CSF2RB GM-CSFR-B IL-3R-B IL-5R-B	Cadeia beta do recetor do GM-CSF, comum ao recetor da IL-3 e IL-5; na forma de heterodímero com CD116 é expressa em células mielóides da linha granulocítica e monocítica, incluindo neutrófilos e monócitos maduros.	Francisco-Cruz A, 2013- PMID: 24264600
HLA-DR		Molécula do MHC (<i>Major Histocompatibility Complex</i>), classe II, envolvida na apresentação dos antígenos aos linfócitos T; expressa-se nas células apresentadoras de antígenos, ou seja, nas células dendríticas, monócitos e linfócitos B, mas também nos linfócitos T ativados.	Lukaszewicz AC, 2010- PMID: 20820152

Abreviaturas: ANPEP, alanil aminopeptidase; CR, complement receptor; CSF, *colony stimulating factor*; CSFR, *colony stimulating factor receptor*; FcγRI, *Fc-gamma receptor 1*; FcγRIII, receptor de baixa afinidade para o fragmento Fc da IgG; G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor*; GM-CSF, *granulocyte monocyte colony stimulating factor*; gp, glicoproteína; HSCA-CD34, *hematopoietic progenitor cell antigen*, CD34; IL, interleucina; ICAM-1, intercelular adhesion molecule-1; ITGAM, integrin alfa M; LCA, leukocyte common antigen; LCA, *leukocyte common antigen*; LFA-1, leukocyte function associated antigen-1; LMA, Leucemia Mielóide Aguda; LPS, lipopolissacarídeo bacteriano; MDA-CD14, *monocyte differentiation antigen* CD14; MHC, major histocompatibility complex; MME, membrane metalloendopeptidase; NCAM, *neural cell adhesion molecule*.

Análise de resultados

Na análise dos resultados obtidos por CF será usada uma aplicação informática específica (Infinicyt, da Cytognos, versão 17).

Os neutrófilos, os monócitos e as células blásticas serão identificados e selecionados com base nas suas características de dispersão lateral (SSS, *Side Scatter*) e frontal (FSC, *Forward Scatter*) da luz, na intensidade de expressão de CD45 e no perfil de expressão de alguns dos antígenos avaliados. Assim, os neutrófilos são CD45^{+fraco} e CD16^{+forte}; por seu lado, os monócitos são CD45^{+intermédio} e CD14⁺; por último, as células blásticas são CD45^{+fraco} e CD34⁺. Posteriormente será avaliada a expressão de CD114, CD116 e CD131, assim como a expressão das restantes moléculas nestas 3 populações celulares, neutrófilos, monócitos e blastos. Com este objetivo serão analisadas, em particular, a percentagem de células positivas para cada antígeno e a sua intensidade de expressão, avaliada pela mediana da intensidade mediana de fluorescência, assim como o coeficiente de variação.

Os resultados obtidos nas amostras de SP dos doentes com SMD serão comparados com os resultados obtidos nas amostras de SP de indivíduos normais.

Análise estatística de dados

A análise dos dados obtidos será feita através de tratamento estatístico apropriado utilizando o programa informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) versão 22.0 para o Windows.

Para a análise serão usadas formas de estatística descritiva como a frequência absoluta e relativa, medidas de distribuição central (medianas), medidas de dispersão (mínimos, máximos, intervalos interquartis). Além disso, serão também usadas formas de estatística inferencial, usando-se assim testes não paramétricos para comparar variáveis numéricas contínuas entre dois (Mann-Whitney) ou mais (Kruskal-Wallis) grupos e para comparar as frequências de variáveis entre dois grupos (teste de Qui-Quadrado). Quando apropriado, usar-se-á também a correlação de Pearson para procurar a existência de correlação entre duas variáveis numéricas contínuas.

Equipamento

Para o presente estudo de investigação será necessário usar os citómetros de fluxo e o contador hematológico, bem como outros equipamentos de laboratório existentes no LC do SHC do HSA/CHP, incluindo centrífugas, equipamento de frio (frigoríficos e arcas congeladoras) e equipamento informático (Quadro 9).

Quadro 9: Principal equipamento do estudo

Tipo de equipamento	Marca	Modelo	Local
Contador hematológico	Beckman Coulter	LH780	LC do SHC do HSA/CHP
Citómetro de Fluxo	Becton-Dickinson	FACScanto II	LC do SHC do HSA/CHP

Reagentes

Neste estudo serão usados diferentes tipos de anticorpos monoclonais, conjugados com diversos fluorocromos (Quadro 10), assim como soluções para lise dos eritrócitos, fixação dos leucócitos e lavagem das células (Quadro 11).

Quadro 10: Anticorpos monoclonais que serão usadas neste estudo

Especificidade	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Fabricante	Referência	Fornecedor
CD10*	ALB1	IgG2a	PE-Cy7	BC-IOT	A46527	BC
CD11b*	D12	IgG2a	APC	BDB	333143	Enzifarma
CD11c*	S-HCL-3	IgG2b	APC	BDB	333144	Enzifarma
CD13*	L138	IgG1	PE	BDB	347406	Enzifarma
CD14**	HCD14	IgG1	APC-H7	BIOL	325620	Grupo Taper
CD15*	MMA	IgM	FITC	BDB	332778	Enzifarma
CD16*	3G8	IgG1	V450	BDB	560474	Enzifarma
CD34*	8G12	IgG1	PerCP-Cy5.5	BDB	347203	Enzifarma
CD45*	J.33	IgG1	KO	BC-IOT	A96416	BC
CD56*	N901-HLDA6	IgG1	PE-Cy7	BC-IOT	A21692	BC
CD64*	22	IgG1	PE	BC-IOT	IM3601U	BC
CD114**	LMM741	IgG1	PE	MB	130-097-309	Citomed
CD116**	REA211	IgG1	FITC	MB	130-101-001	Citomed
CD131**	REA249	IgG1	APC	MB	130-104-003	Citomed
HLA-DR	L243	IgG2a	FITC	BDB	347400	Enzifarma

Os anticorpos assinalados com * já são habitualmente usados na rotina para estudo dos SMD. Os anticorpos assinalados com ** serão usados exclusivamente para fins de investigação.

Abreviaturas: APC, allophycocyanin (aloficocianina), Cy5.5, Cyanine 5.5 (cianina 5.5); Cy5.5, Cyanine 7 (cianina 7); FITC, Fluorescein, isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína; KO, Khrome Orange; PE, Phycoerythrin (ficoeritrina), PerCP, Peridinin chlorophyll protein (proteína peridina clorófilica) V450, Violet 450 (violeta 450); BC, Beckman Coulter; BDB, Becton Dickinson Bioscience; IOT, Immunotech; BIOL, Biologend; MB, Miltenyl Biotec.

Quadro 11: Soluções para lavagem das células, lise dos eritrócitos e fixação de células

Descrição	Fabricante	Referência	Fornecedor
FACSlising solution	BDB	349202	Enzifarma
PBS	BC	6603369	BC

Abreviaturas: BC, Beckman Coulter; BDB, Becton Dickinson; IOT, Immunotech; PBS, phosphate buffered saline

Outros consumíveis

Tubos de polipropileno, pontas para pipetas, luvas, etc.

Calendarização

Datas de início e conclusão (duração meses):

Global: setembro de 2014 a julho de 2016 (22 meses)

Planeamento, redação e submissão da proposta: setembro de 2014 a abril de 2015 (7 meses)

Execução: junho de 2015 a setembro de 2015 (4 meses)

Análise dos resultados e relatório: setembro de 2015 a julho de 2016

Indicadores de produção

Comunicações orais e posters

- Apresentação oral da proposta em reunião de Serviço (maio / junho de 2015)
- Apresentação oral da proposta nas JIIC (junho de 2015)
- Apresentação oral dos resultados em reunião de Serviço (maio / junho de 2016)
- Apresentação oral dos resultados nas JIIC (junho 2016)
- Apresentação dos resultados em reunião científica (2016)

Trabalhos escritos

- Proposta de projeto de investigação (maio de 2015)
- Dissertação de MIM (julho de 2016)
- Artigo para publicação em revista médica internacional (2016)

Cronograma

Mês	ANO LETIVO 2014/2015												ANO LETIVO 2015/2016											
	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	
Escolha da área	X																							
Integração na equipa		X																						
Escolha do tema e do assunto		X																						
Identificação de problemas		X																						
Formulação das questões		X																						
Delineamento das hipóteses		X																						
Definição dos objetivos		X																						
Revisão bibliográfica		X	X																					
Conceção do estudo			X	X	X																			
Redação da proposta						X	X	X																
Submissão da proposta								X																
Apresentação da proposta									X	a														
Execução do projeto									X	X	X	X												
Análise dos resultados													X	X	X									
Apresentação de resultados																			X	b			X	
Elaboração da dissertação																X	X	X	X	X	X	X	X	
Prova de dissertação																							X	

a) Apresentação nas JIC; b) Apresentação no SHC

Referências bibliográficas

1. De Graaf, C. A. & Metcalf, D. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 10 1582-1589 (2011).
2. Hercus, T. R. *et al.* The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* 114, 1289-1298 (2009).
3. Broxmeyer, H. E. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *J Exp Med* 210, 205-208 (2013).
4. Panopoulos, A. D. & Watowich, S. S. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine* 42, 277-288 (2008).
5. Adès, L., *et al.* Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 383, 2239-2252 (2014).
6. Meers, S. The myelodysplastic syndromes: the era of understanding. *Eur J Haematol* 94, 379-390 (2014).
7. Malcovati, L. *et al.* Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 122, 2943-2964 (2013).
8. Aul, C., *et al.* Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *Int J Hematol* 73, 405-410 (2001).
9. Haferlach, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241-247 (2014).
10. Nikoloski, G., *et al.* Mutations in epigenetic regulators in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 95, 8-16 (2012).
11. Abdel-Wahab, O. & Figueroa, M. E. Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am Soc Hematol Educ Program* 2012, 56-64 (2012).
12. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (International Agency for Research on Cancer).
13. Stetler-Stevenson, M. *et al.* Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 98, 979-987 (2001).
14. Van de Loosdrecht, A. A. *et al.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 94, 1124-1134 (2009).
15. Malcovati, L. *et al.* Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 23, 7594-7603 (2005).
16. Valent, P. *et al.* Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 31, 727-736 (2007).
17. Cherian, S. *et al.* Peripheral blood MDS score: a new flow cytometric tool for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom* 64, 9-17 (2005).
18. Kyriakou, D. *et al.* Reduced CD43 expression on the neutrophils of MDS patients correlates with an activated phenotype of these cells. *Int J Hematol* 73, 483-491 (2001).

19. Hanumanthu, V. S. & Pirruccello, S. J. GCSF-R expression in myelodysplastic and myeloproliferative disorders and blast dysmaturation in CML. *Am J Clin Pathol* 140, 155-164 (2013).
20. Shikama, Y., *et al.* Neutrophil-specific reduction in the expression of granulocyte--macrophage colony-stimulating factor receptor subunits in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 111, 863-872 (2000).
21. Cazzola, M. Flow cytometry immunophenotyping for diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 94, 1041-1043 (2009).
22. Kern, W., *et al.* Serial assessment of suspected myelodysplastic syndromes: significance of flow cytometric findings validated by cytomorphology, cytogenetics, and molecular genetics. *Haematologica* 98, 201-207 (2013).
23. Kern, W., *et al.* Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer* 116, 4549-4563 (2010).
24. Ogata, K. *et al.* Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 100, 3887-3896 (2002).
25. Van de Loosdrecht, A. A. *et al.* Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 111, 1067-1077 (2008).
26. Loken, M. R., *et al.* Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 32, 5-17 (2008).
27. Monaghan, S. A., *et al.* Altered neutrophil maturation patterns that limit identification of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom* 82, 217-228 (2012).
28. Ogata, K. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 108, 1037-1044 (2006).
29. Sternberg, A. *et al.* Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. *Blood* 106, 2982-2991 (2005).
30. Wells, D. A. *et al.* Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102, 394-403 (2003).
31. Ogata, K. *et al.* Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 28, 1171-1175 (2004).
32. Della Porta, M. G., *et al.*; Italian Society of Cytometry (GIC). Flow cytometry immunophenotyping for the evaluation of bone marrow dysplasia. *Cytometry B Clin. Cytom.* 80, 201-211 (2011).
33. Maynadié, M. *et al.* Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood* 100, 2349-2356 (2002).
34. Stachurski, D. *et al.* Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res* 32, 215-224 (2008).

35. Westers, T. M. *et al.* Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood* 115, 1779-1784 (2010).
36. Skubitz, K. M., *et al.* Synthetic peptides from the N-domains of CEACAMs activate neutrophils. *J. Pept. Res.* 58, 515-526 (2001).
37. Parker, J. E. *et al.* The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* 96, 3932–3938 (2000).
38. Cutrona, G. *et al.* CD10 is a marker for cycling cells with propensity to apoptosis in childhood ALL. *Br J Cancer* 86, 1776-1785 (2002).
39. Rashidi, H. H. *et al.* Utility of peripheral blood flow cytometry in differentiating low grade versus high grade myelodysplastic syndromes (MDS) and in the evaluation of cytopenias. *Int. J Clin Exp Pathol* 5, 224-230 (2012).
40. Watari, K. *et al.* Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 73, 117-122 (1989).

QUESTÕES ÉTICAS

Informação dos participantes e consentimento informado

Para o presente estudo seleccionar-se-á previamente os doentes com SMD que pareçam ser elegíveis para o estudo. Numa segunda fase, a aluna e investigadora principal Ana Aires, ou uma das co-investigadoras Dra. Ana Sofia Jorge, Dra. Cláudia Moreira informarão os doentes sobre o estudo, de modo claro e com linguagem acessível, e entregando-lhes um folheto informativo (em anexo) e, caso o doente decida participar no estudo, o termo de consentimento informado (em anexo). De seguida, após verificar que o doente cumpre todos os critérios de inclusão e não apresenta critérios de exclusão, ser-lhe-ão colhidas amostras de SP, bem como colhida a informação necessária ao preenchimento do formulário com informação socio-demográfica, clínica e laboratorial do doente (em anexo). Este contacto com os doentes decorrerá em dias em que estes tenham consulta ou venham ao Hospital de Dia do HSA/CHP, não havendo, por isso, deslocações especificamente para o estudo de investigação. As colheitas de sangue serão feitas pelas enfermeiras do Hospital de Dia do CHP.

Relativamente aos controlos, que serão dadores benévolos de sangue do SHC do CHP/HSA, os quais serão escolhidos de modo não aleatório, por conveniência até perfazer o número de casos pretendido, desde que preencham os critérios de inclusão e exclusão do presente estudo. Novamente, uma vez que os dadores de sangue serão selecionados tendo em conta o facto de se terem apresentado no SHC do CHP/HSA para doar sangue, não haverá qualquer deslocação específica para o estudo. Aos dadores de sangue será aplicado o mesmo modo de contacto que no caso dos doentes, havendo igualmente uma conversa que visa informar os dadores de sangue selecionados sobre o âmbito do estudo, altura em que será entregue um folheto informativo (em Anexo) e o termo de consentimento informado (em Anexo). As colheitas de sangue serão feitas no mesmo dia, pelas enfermeiras do Setor de Dadores de Sangue do SHC do CHP.

Outras questões com implicações éticas

Riscos e benefícios

Não há riscos associados à participação no estudo, para além dos riscos mínimos associados à punção venosa. Também não existem benefícios diretos para as participantes. Ainda assim, o presente estudo poderá contribuir para aprofundar o conhecimento sobre os SMD e para otimizar o seu diagnóstico, pelo que se esperam, a médio e longo prazo, benefícios para os doentes em geral.

Confidencialidade e anonimização

A confidencialidade dos dados será garantida.

As amostras de SP bem como o formulário com informação sócio-demográfica, clínica e laboratorial do doente encontram-se numerados, de forma a fazer corresponder a cada participante um código de identificação. No registo dos dados em ficheiro eletrónico, serão usados apenas os códigos de identificação dos participantes; a correspondência entre esses códigos e a identificação dos mesmos será do conhecimento e responsabilidade das orientadoras, Prof. Doutora Margarida Lima e Dra. Maria dos Anjos Teixeira.

Outros aspetos

As amostras de SP serão estudadas no LC do SHC do CHP/HSA, logo as amostras não serão transferidas para nenhuma outra instituição. Além disso, as amostras de SP serão estudadas no prazo máximo de 24h e não serão usadas para outros fins que não os do estudo em causa; no final do estudo as amostras excedentárias serão destruídas. Não serão realizados estudos genéticos.

Serão consultados dados dos processos clínicos dos doentes com SMD admitidos no estudo cumprindo as normas estabelecidas pelo CHP; a consulta decorrerá nas instalações da consulta de Hematologia e do Hospital de Dia do CHP.

PLANO FINANCEIRO

Orçamento

	Custo estimado (€)
Reagentes para usar nas análises de investigação (ver tabela seguinte)	2000,00
Material administrativo (fotocópias, folhas, etc.)	00,00
Contratação de serviços	00,00
Pagamento de despesas aos participantes (deslocações) *	00,00
Exames realizados no CHP (análises e outros meios complementares) **	00,00
Taxas moderadoras de exames (análises, exames de imagem, etc.) **	00,00
Taxas moderadoras de episódios (consultas, internamentos, etc.) ***	00,00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluno em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
TOTAL	€2300,00

* Não haverá deslocações dos doentes ao hospital, especificamente para participação no projeto

** Não serão realizados exames ou análises para além das análises de investigação referidas

*** Não serão feitas consultas ou internamentos no âmbito do projeto.

Reagentes a adquirir para este estudo de investigação							
Finalidade	Designação	Fabricante	Referência	Fornecedor	Preço unitário (€)	Nº unidades	Preço (€) Sem IVA
Anticorpos monoclonais	CD14	BIOL	325620	Grupo Taper	325,00	3	650,00
	CD114	MB	130-097-308	Citomed	325,00	1	325,00
	CD116	MB	130-101-001	Citomed	325,00	1	325,00
	CD131	MB	130-104-003	Citomed	325,00	1	325,00
TOTAL sem IVA							1625,00
TOTAL com IVA (23%)							1998,35

Os valores referidos são estimativas feitas com base nos valores atuais,

Abreviaturas: BIOL, Biolegend; MB, Miltenyl Biotec.

Financiamento

O estudo será financiado pelo ICBAS/UP, através de uma bolsa atribuída à DIIC. O financiamento será feito mediante compra dos reagentes acima referidos, que serão adquiridos pelo ICBAS/UP e entregues no LC do SHC do CHP.

GLOSSÁRIO

Abreviaturas de termos técnicos

APC, *Allophycocyanin* (aloficocianina).

APC-H7, *Allophycocyanin H7* (aloficocianina H7).

AREB, Anemia Refratária com Excesso de Blastos.

CF, Citometria de Fluxo.

Cy5.5, *Cyanine 5.5* (cianina 5.5).

Cy7, *Cyanine 7* (cianina 7).

Epo, Eritropoietina.

EPOR, Recetor da Eritropoietina.

FITC, *Fluorescein, isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína).

FSC, *Forward Side Scatter* (dispersão da luz no plano frontal).

G-CSF, *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (fator estimulante do crescimento de colónias de granulócitos).

G-CSFR, *Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor* (receptor do G-CSF).

GM-CSF, *Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor* (fator estimulante do crescimento de colónias de granulócitos e monócitos).

GM-CSFR, Recetor do G-CSF.

GMR α , subunidade α do GM-CSFR.

CRH *domain, cytokine receptor homologous domain* (domínio homólogo recetor de citocinas).

IL, Interleucina.

IPSS, *International Prognostic Scoring System*

KO, *Khrome Orange*.

LMA, Leucemia Mielóide Aguda.

MO, Medula Óssea.

Mpl, Recetor da Trombopoietina.

PE, *Phycoerythrin* (ficoeritrina).

PerCP, *Peridinin chlorophyll protein* (proteína peridina clorófilica).

SMD, Síndrome Mielodisplásico.

SP, Sangue Periférico.

SSC, *Orthogonal Side Scatter* (dispersão da luz no plano ortogonal).

TNF- α , *Tumor Necrosis Factor α* (fator de necrose tumoral α).

V450, *Violet 450* (violeta 450).

β c, subunidade β do GM-CSFR.

Outras abreviaturas

BC, Beckman Coulter.

BDB, Becton Dickinson Bioscience.

BIOL, Biolegend.

CHP, Centro Hospitalar do Porto.

DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

DM, Departamento de Medicina.

HSA, Hospital de Santo António.

ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

IOT, Immunotech.

JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica.

LC, Laboratório de Citometria.

MB, Miltenyl Biotec.

MIM, Mestrado Integrado em Medicina.

SHC, Serviço de Hematologia Clínica.

SPSS, Statistic Package for the Social Sciences.

UP, Universidade do Porto.

ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

- Documentos para os participantes
 - Termos de consentimento informado (doentes e dadores de sangue)
 - Folhetos informativos (doentes e dadores de sangue)
- Formulários para recolha de dados
 - Formulário de recolha de dados clínicos e laboratoriais (doentes)
- Documentos de submissão
 - Lista de documentos
 - Folha de rosto
 - Pedidos de autorização
 - Termos de responsabilidade
 - Termos de autorização local

DOCUMENTOS PARA OS PARTICIPANTES

Termo de consentimento informado dos doentes

Recetores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos

Eu, abaixo-assinado _____
(nome completo do indivíduo participante do estudo)

Fui informado de que o estudo de investigação acima mencionado se destina a estudar a presença de alterações de algumas moléculas nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos.

Sei que neste estudo está prevista a colheita de duas amostras de sangue para a realização dessas análises.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado e concordo que seja efetuada a colheita de sangue para as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo

Data Assinatura
___/___/___ _____

Nome do Médico Responsável ou Nome do Investigador [conforme o caso]

Data Assinatura
___/___/___ _____

Termo de consentimento informado dos dadores de sangue participantes

Recetores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos

Eu, abaixo-assinado _____

(nome completo do indivíduo participante do estudo)

Fui informado de que o estudo de investigação acima mencionado se destina a estudar a presença de alterações de algumas moléculas nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos.

Sei que neste estudo está prevista a colheita de duas amostras de sangue para a realização dessas análises.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos Participantes neste estudo são confidenciais.

Sei que posso recusar-me a participar ou interromper a qualquer momento a participação no estudo, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado e concordo que seja efetuada a colheita de sangue para as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do Participante no estudo

Data

Assinatura

___/___/___

Nome do Médico Responsável ou Nome do Investigador [conforme o caso]

Data

Assinatura

___/___/___

Folheto informativo para os doentes participantes

Recetores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos

Caro utente do Centro Hospitalar do Porto,

O meu nome é Ana Aires e sou aluna do 5º ano de Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António.

Com a supervisão da Professora Doutora Margarida Lima e da Dra. Maria dos Anjos Teixeira do Serviço de Hematologia Clínica deste Hospital, estou a realizar o presente estudo, intitulado RECETORES DO GM-CSF E G-CSF NAS CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM SÍNDROMAS MIELODISPLÁSICOS, no âmbito da minha dissertação final de Mestrado Integrado em Medicina.

Os Síndromas Mielodisplásicos são doenças do sangue caracterizadas por uma produção ineficaz de diversos tipos de células sanguíneas, como os glóbulos vermelhos (importantes para fornecer oxigénio aos tecidos), as plaquetas (importantes para a coagulação do sangue), os neutrófilos e os monócitos (importantes na defesa contra as infeções).

Este trabalho de investigação, para o qual solicitamos a sua participação, tem como objetivo aprofundar os conhecimentos sobre os Síndromas Mielodisplásicos, avaliando-se a presença de alterações em determinadas moléculas essenciais para a maturação e funções das células do sangue.

Para realizar as análises deste estudo (que não incluem estudos genéticos) é necessário que autorize a colheita de duas amostras de sangue (2 tubos de 4.5mL) e o registo de alguns dados do seu processo clínico. Estes dados, assim como os resultados do estudo, serão mantidos confidenciais.

A participação neste estudo não acarreta riscos para si. Também não terá benefícios diretos, mas estará a contribuir para aprofundarmos o conhecimento sobre esta doença.

Se tiver qualquer questão ou dúvida, poderá perguntar a um dos médicos que participam neste estudo ou, se desejar, contatar-me diretamente através do nº 912133909.

Agradeço a sua participação,

Ana Aires

Folheto informativo para os dadores de sangue

Recetores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos

Caro Dador de Sangue do Centro Hospitalar do Porto,

O meu nome é Ana Aires e sou aluna do 5º ano de Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar / Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António.

Com a supervisão da Professora Doutora Margarida Lima e da Dra. Maria dos Anjos Teixeira do Serviço de Hematologia Clínica deste Hospital, estou a realizar o presente estudo, intitulado RECETORES DO GM-CSF E G-CSF NAS CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM SÍNDROMAS MIELODISPLÁSICOS, no âmbito da minha dissertação final de Mestrado Integrado em Medicina.

Os Síndromas Mielodisplásicos são doenças do sangue caracterizadas por uma produção ineficaz de diversos tipos de células sanguíneas, como os glóbulos vermelhos (importantes para fornecer oxigénio aos tecidos), as plaquetas (importantes para a coagulação do sangue), os neutrófilos e os monócitos (importantes na defesa contra as infeções).

Este trabalho de investigação, para o qual solicitamos a sua participação, tem como objetivo aprofundar os conhecimentos sobre os Síndromas Mielodisplásicos, avaliando-se a presença de alterações em determinadas moléculas essenciais para a maturação e funções das células do sangue.

O estudo será feito em doentes com Síndromas Mielodisplásicos, mas são necessárias amostras de sangue, para comparação. É precisamente por isso que pedimos a sua colaboração.

Para realizar as análises deste estudo (que não incluem estudos genéticos) é necessário que autorize a colheita de duas amostras de sangue (2 tubos de 4.5mL). Os resultados do estudo, serão mantidos confidenciais.

A participação neste estudo não acarreta riscos para si. Também não terá benefícios diretos, mas estará a contribuir para aprofundarmos o conhecimento sobre esta doença.

Se tiver qualquer questão ou dúvida, poderá perguntar a um dos médicos que participam neste estudo ou, se desejar, contatar-me diretamente através do nº 912133909.

Agradeço a sua participação,

Ana Aires

FORMULÁRIOS PARA REGISTO DE DADOS

Formulário de registo de dados clínicos e laboratoriais

Recetores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos

Nome (Iniciais): _____ Código: SMD-Nº _____

Idade: _____ Género: Feminino Masculino

Data de diagnóstico do Síndrome Mielodisplásico (SMD): ____/____/____

Classificação do SMD ao diagnóstico (OMS, 2008):

- Citopenia refratária com displasia unilinhagem
- Anemia refratária Neutropenia refratária Trombocitopenia refratária
- Anemia refratária com sideroblastos em anel
- Citopenia refratária com displasia multilinhagem
- Anemia refratária com excesso de blastos
- Tipo 1 Tipo 2
- Síndrome mielodisplásico não classificável
- Síndrome mielodisplásico associado a del(5q) isolada

Dados ao diagnóstico

Sangue periférico: ND

Hemoglobina (g/L) Neutrófilos ($\times 10^3/L$) Plaquetas ($\times 10^3/L$).....

% Blastos:

Displasia eritróide (GR): Sim: Não:

Displasia granulocítica (neutrófilos): Sim: Não:

Displasia megacariocítica (plaquetas): Sim: Não:

Medula óssea:

Mielograma: ND

% Blastos % sideroblastos em anel

Displasia eritróide: Sim: Não: ND

Displasia granulocítica: Sim: Não: ND

Displasia megacariocítica: Sim: Não: ND

Biopsia: ND

Celularidade: Hipocelular: Normocelular: Hiper celular: ND

Displasia eritróide: Sim: Não: ND

Displasia granulocítica: Sim: Não: ND

Displasia megacariocítica: Sim: Não: ND

Fibrose: Sim: Não: ND

Alterações citogenéticas Sim: Não: ND

Descrever

Tratamentos

Suporte transfusional: Sim: Não:

Eritrócitos Frequência: semanal ; quinzenal ; mensal ; ocasional

Plaquetas Frequência: semanal ; quinzenal ; mensal ; ocasional

Terapêutica com fatores de crescimento: Sim: Não:

Epo Prévia: Em curso: Resposta: Sim: Não:

G-GSF: Prévia: Resposta: Sim: Não:

GM-GSF: Prévia: Resposta: Sim: Não:

Quimioterapia prévia: Sim: Não:

Tipo: Resposta: Sim: Não:

Tratamento prévio com imunossupressores: Sim: Não:

Tipo: Resposta: Sim: Não:

Nota: São critérios de exclusão terapêutica com fatores de crescimento (excluindo Epo), infeções, quimioterapia ou imunossupressores nos últimos 3 meses.

Manifestações clínicas

Relacionadas com a anemia: Sim: Não:

Infeções: Sim: Não:

- Frequência

Hemorragias: Sim: Não:

Outras doenças oncológicas prévias:

Qual(ais)?

OBSERVAÇÕES:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

DOCUMENTOS DE SUBMISSÃO

Lista de documentos para TRABALHOS ACADÉMICOS DE INVESTIGAÇÃO (que conferem grau)

	Data de entrega (ou NA, não aplicável)	Secretariado (Assinatura)
Documentos comprovativos		
Inscrição em Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	NA	
Cartas do Aluno, a solicitar autorização institucional		
Presidente do Conselho de Administração	√	
Presidente da CES	√	
Diretor do DEFI	√	
Termos de responsabilidade de Alunos e Orientadores		
Aluno	√	
Orientador do Projeto	√	
Supervisor do Projeto, Docente responsável pela DIIC	√	
Termos de autorização local (no CHP)		
Responsáveis por Unidades / Gabinetes / Setores	√	
Diretores de Serviço	√	
Diretores / Conselhos de Gestão de Departamentos	√	
Proposta		
Folha de Rosto do Estudo de Investigação (modelo próprio)	√	
Proposta de Trabalho Académico de Investigação	√	
Anexos		
Curriculum Vitae do Aluno	NA	
Termo de Consentimento Informado	√	
Folheto com informação para dar aos Participantes	√	
Carta a solicitar dispensa de Consentimento Informado	NA	
Inquéritos / questionários ou guiões de entrevistas	NA	
Formulário para recolha de dados dos processos clínicos	√	
Outros documentos	NA	

NA, não aplicável

SECRETARIADO:

Data
____/____/____

Assinatura

Folha de rosto do estudo de investigação

TÍTULO

RECEPTORES DO GM-CSF E G-CSF NAS CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM SÍNDROMAS MIELODISPLÁSICOS

CLASSIFICAÇÃO

Trabalho Académico de Investigação X (Mestrado Integrado em Medicina)

Projeto de Investigação X

Ensaio Clínico Medicamentos Dispositivos médicos

Outro Qual?

VERSÃO

Novo X Modificação / Adenda Prolongamento

CALENDARIZAÇÃO

Data início: outubro/2015 Data conclusão: junho/2016

Início da execução do projeto: outubro 2015

Prazo a cumprir: junho 2016

ALUNOS E ORIENTADORES

Aluno

Ana Rita Alves Aires; Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; Mestrado Integrado em Medicina; 6º ano (mim10041@icbas.up.pt, 912133909)

Orientadores do projeto

Prof. Doutora Margarida Lima; médica, especialista de Imunohemoterapia, SHC, CHP
Professora auxiliar convidada do ICBAS/UP
(margaridalima@chporto.min-saude.pt; mmc.lima@clix.pt; 966327115)

Dra. Maria dos Anjos Teixeira, médica especialista de Imunohemoterapia, SHC, CHP

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Margarida Lima; médica, especialista de Imunohemoterapia, SHC, CHP
Professora auxiliar convidada do ICBAS/UP
(margaridalima@chporto.min-saude.pt; mmc.lima@clix.pt; 966327115)

OUTROS INVESTIGADORES

Dra. Cristina Gonçalves, médica especialista de Hematologia Clínica, SHC, CHP
Dra. Ana Spínola, médica interna de especialidade de Imunohemoterapia, SHC, CHP
Dra. Ana Sofia Jorge, médica interna de especialidade de Hematologia Clínica, SHC, CHP
Dra. Cláudia Moreira, médica interna de especialidade de Hematologia Clínica, SHC, CHP

PROMOTOR O próprio X

INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS

Unidades, Departamentos e Serviço do CHP

Laboratório de Citometria, Serviço de Hematologia Clínica, Departamento de Medicina

Outras Instituições intervenientes

ICBAS/UP

CARACTERÍSTICAS do estudo

Alvo do estudo
 Animais Humanos **Países / Instituições envolvidos**
 Multinacional Nacional
 Multicêntrico Institucional

Natureza do estudo

Clínico Terapêutico **Caraterísticas do estudo (desenho)**
 Epidemiológico Laboratorial Descritivo Analítico
 Observacional Experimental
 Transversal Longitudinal
 (Retrospetivo Prospetivo)

Estudo de síntese (Revisão narrativa Revisão sistemática Revisão sistemática meta-análise)

Participantes

Existência de grupo controlo: Não Sim
 Seleção dos Participantes: Aleatória Não aleatória

Estudos observacionais:

Tipo: Caso Série de casos Casos-controlos Coortes Outro

Estudos experimentais:

Conhecimento: Aberto Cego (Duplamente cego)
 Ensaio Clínicos: Fase I Fase II Fase III Fase IV

Outros aspetos relevantes para a apreciação do estudo:

Participação de grupos vulneráveis Não Sim (Crianças Grávidas Outros:)
 Convocação de doentes / participantes Não Sim (especificamente para participar no Estudo)
 Consentimento informado Não Sim (Carta a solicitar dispensa: Não Sim)
 Inquéritos / questionários Não Sim (Contato Investigadores/Participantes: Não Sim)
 Entrevistas Não Sim
 Colheita de produtos biológicos Não Sim (CHP Noutro local
 (Não anonimizados Anonimizados
 (Anonimização reversível irreversível)
 Armazenamento de produtos biológicos Não Sim (No CHP Noutro local)
 Criação de bancos de produtos biológicos Não Sim (No CHP Noutro local (ADN Outros
 (Não anonimizados Anonimizados)
 Realização de exames / análises Não Sim (No CHP Noutro local)
 Realização de estudos genéticos Não Sim (No CHP Noutro local)
 Recolha de dados Não Sim (Dados: clínicos laboratoriais: analíticos)
 Criação de bases de dados Não Sim (Não anonimizadas Anonimizadas (Excel)
 Saída para outras instituições Não Sim (Produtos biológicos Dados
 (Públicas Privadas Nacionais Estrangeiras
 (Anonimização dos produtos biológicos / dados saídos)

ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Orçamento total: 2300 Euros Contrato financeiro em anexo: Não Sim
 Financiamento: Interno (CHP) _____ Euros Externo (Outros) 2300 Euros
 Entidades financiadoras: ICBAS/UP – Bolsa DIIC

INDICADORES

Relatórios de progresso (periodicidade:) Relatório final
 Outros Quais? Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina
 Data: _____ Assinatura do proponente (Aluno): _____

Pedidos de autorização institucional

Trabalho académico de investigação: **Receptores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos**

Aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: **Ana Rita Alves Aires**

Presidente do Conselho de Administração do CHP

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP

Ana Rita Alves Aires, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Ex. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data ____/____/____	Assinatura _____
------------------------	---------------------

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Ana Rita Alves Aires, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Ex. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data ____/____/____	Assinatura _____
------------------------	---------------------

Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Exma. Senhora Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Ana Rita Alves Aires, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Ex. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data ____/____/____	Assinatura _____
------------------------	---------------------

Termos de responsabilidade

Trabalho académico de investigação: **Receptores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos**

Aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: **Ana Rita Alves Aires**

Aluno

Na qualidade de Aluna, comprometo-me a executar o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados, respeitando os princípios éticos e deontológicos e as normas internas da instituição.

Aluno	Data	Assinatura
Ana Aires	___/___/___	_____

Orientador do projeto

Na qualidade de Orientadora, solicito autorização do Conselho de Administração para que o Aluno acima referido possa desenvolver no CHP o seu estudo de investigação. Informo que me comprometo a prestar a orientação necessária para uma boa execução do mesmo e a acompanhar o Aluno nas diferentes fases da sua realização, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Margarida Lima	___/___/___	_____
Instituição	Departamento	Serviço / Setor
CHP	Medicina	Hematologia Clínica / Citometria

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Na qualidade de Docente Responsável pela DIIC / Supervisor do Aluno no CHP, comprometo-me a prestar a orientação necessária para uma boa execução do estudo de investigação, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados. Mais declaro que acompanharei o Aluno, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no CHP, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Margarida Lima	___/___/___	_____
Docente	responsável	pela _____ DIIC

Termos de autorização local

Estudo de investigação: **Recetores do GM-CSF e G-CSF nas células do sangue periférico de doentes com Síndromas Mielodisplásicos**

Aluna da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: **Ana Rita Alves Aires**

Responsáveis por Unidades, Gabinetes ou Setores (se aplicável)

Na qualidade de **Responsável pelo Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHP**, dou parecer favorável à execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Unidade / Gabinete / Setor	Nome do Responsável	Data	Assinatura
Laboratório de Citometria	Prof. Doutora Margarida Lima	___/___/___	_____

Diretores de Serviço

Na qualidade de **Diretor do Serviço de Hematologia Clínica do CHP**, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Hematologia Clínica	Dr. Jorge Coutinho	___/___/___	_____

Na qualidade de **Diretora do Hospital de Dia**, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Hospital de Dia	Dra. Cristina Gonçalves	___/___/___	_____

Diretores / Conselhos de Gestão de Departamento

Na qualidade de Diretor do **Departamento de Medicina do CHP**, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Departamento	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Medicina	Prof. Doutor Rui Sarmiento e Castro	___/___/___	_____