

Flávia Arandas de Sousa

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA DE CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS EM MEDULA ÓSSEA NORMAL POR
CITOMETRIA DE FLUXO: análise em 10 cores**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

São Paulo

2022

Flávia Arandas de Sousa

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA DE CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS EM MEDULA ÓSSEA NORMAL POR
CITOMETRIA DE FLUXO: análise em 10 cores**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Cavaleiro
Marti

São Paulo

2022

Sousa, Flávia Arandas de

Determinação de valores de referência de células hematopoiéticas em medula óssea normal por citometria de fluxo : análise em 10 cores /

Flávia Arandas de Sousa. -- São Paulo, 2022.

xii, 86 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Determination of reference values for hematopoietic cells in normal bone marrow by flow cytometry: 10-color analysis.*

1. Citometria de fluxo. 2. Células-tronco hematopoéticas. 3. Medula óssea. 4. Padrões de referência. 5. Valores de referência.

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Flávia Arandas de Sousa

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA DE CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS EM MEDULA ÓSSEA NORMAL POR
CITOMETRIA DE FLUXO: análise em 10 cores**

Presidente da banca: Profa. Dra. Luciana Cavalheiro Marti

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. João Carlos de Campos Guerra

Prof. Dr. Alex Freire Sandes

Dra. Mariana Pereira Pinho

Membros suplentes:

Prof. Dr. Welbert de Oliveira Pereira

Dr. Alessandro Marins dos Santos

Dra. Amanda Braga de Figueiredo

Aprovada em: 25/11/2022.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que me ajudou a superar os obstáculos, me dando forças para concluir essa dissertação de mestrado que tanto me ajudou a evoluir.

Aos meus pais amados, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

À minha família, que durante a minha vida inteira me deu suporte e incentivo para que eu alcançasse meus sonhos.

À minha filha e ao meu marido que sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Luciana Marti, pela paciência e suporte e por tornar possível a realização da presente dissertação, que foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional e científico.

Ao Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein, pela infraestrutura, amparo e apoio financeiro fundamental para a realização deste projeto.

À equipe de Citometria de Fluxo do Hospital Israelita Albert Einstein, pelo apoio, conselhos e companheirismo diário.

Ao Dr. Luiz Fabiano Presente Taniguchi e equipe do Hospital Municipal Dr. Moysés Deustsch, pelo auxílio na coleta de amostras utilizadas no projeto.

Em especial à Dra. Nydia Strachman Bacal por acreditar em mim, permitir e incentivar a realização deste projeto.

Enfim, quero demonstrar o meu agradecimento a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização da presente dissertação. A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este fato, expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas e quadros	ix
Lista de abreviaturas e símbolos	x
Resumo	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Citometria de fluxo.....	3
1.2 Anticorpos monoclonais.....	6
1.3 Caracterização imunofenotípica	8
1.4 Medula óssea na ontogenia normal.....	9
1.4.1 Células-tronco hematopoéticas (<i>stem cell</i>).....	12
1.4.2 Linhagem eritroide	12
1.4.3 Linhagem mieloide.....	14
1.4.4 Linhagem linfoide	20
1.4.5 Células dendríticas plasmocitoides	24
1.5 Objetivos.....	24
2 MÉTODOS	25
2.1 Pacientes.....	25
2.2 Aspectos éticos da pesquisa	25
2.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	26
2.4 Análise de dados e estratégias de <i>gate</i>	30
2.5 Análise estatística.....	40
3 RESULTADOS	42
3.1 Pacientes.....	42
3.2 Celularidade	42
3.3 Viabilidade celular	43
3.4 Pureza da amostra	45
3.5 Quantificação de linfócitos (B, T) e células <i>natural killer</i>	45
3.6 Avaliação da linhagem granulocítica	53
3.7 Avaliação da linhagem monocítica e células dendríticas (mieloides e plasmocitoides)	59

3.8 Avaliação da linhagem eritroide.....	63
3.9 Avaliação de <i>score</i> de Ogata.....	66
3.10 Avaliação de <i>red score</i>	68
4 DISCUSSÃO	70
5 CONCLUSÃO	81
6 REFERÊNCIAS	82
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. <i>Side scatter</i> x <i>Forward scatter</i>	4
Figura 2. <i>Side scatter</i> x CD45.....	7
Figura 3. Diferenciação hematopoiética a partir de uma célula-tronco hematopoiética	11
Figura 4. Curvas de maturação da linhagem neutrofílica	16
Figura 5. Estratégia de análise para identificar as <i>beads</i> e purificação da população leucocitária	31
Figura 6. Estratégia de análise para quantificação de células viáveis	32
Figura 7. Estratégia de análise para quantificação de células em valores absolutos por citometria de fluxo	33
Figura 8. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 2.....	34
Figura 9. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 3.....	35
Figura 10. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 4.....	36
Figura 11. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 5.....	37
Figura 12. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 6.....	38
Figura 13. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 8.....	39
Figura 14. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 7	40
Figura 15. Análise de correlação entre as plataformas.....	43
Figura 16. Período entre a coleta e o processamento com a porcentagem de células viáveis	45
Figura 17. Curva de maturação da linhagem granulocítica	59
Figura 18. Curva de maturação da linhagem monocítica	63
Figura 19. Curva de maturação linhagem eritroide.....	66
Figura 20. Estratégia de <i>gate</i> para avaliar a pontuação de displasia (<i>score</i> de Ogata)	68
Figura 21. Estratégia de <i>gate</i> para avaliar o CV do CD36 e CD71 (<i>red score</i>).....	69

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1. Expressões antigênicas da linhagem eritroide	14
Tabela 2. Expressões antigênicas da linhagem neutrofílica	16
Tabela 3. Expressões antigênicas da linhagem eosinofílica, basofílica e mastocitária	18
Tabela 4. Expressões antigênicas da linhagem monocítica.....	19
Tabela 5. Expressões antigênicas da linhagem linfóide B	22
Tabela 6. Reagentes e anticorpos monoclonais utilizados	26
Tabela 7. Painel para a caracterização e identificação das linhagens celulares estudadas	28
Tabela 8. Número de doadores por faixa etária.....	42
Tabela 9. Características clínicas	42
Tabela 10. Total de células (plataforma única x plataforma dupla)	43
Tabela 11. Resultados de viabilidade celular e tempo entre a coleta e o processamento da amostra.....	44
Tabela 12. Pureza celular de amostras de medula óssea normais por faixa etária	45
Tabela 13. Resultados de linfócitos B por idade	46
Tabela 14. Resultados de linfócitos B por sexo	48
Tabela 15. Resultados de linfócitos T por idade	50
Tabela 16. Resultados linfócitos T por sexo	51
Tabela 17. Resultados de células <i>natural killer</i> por idade.....	52
Tabela 18. Resultados células <i>natural killer</i> por sexo	53
Tabela 19. Resultados de linhagem granulocítica por idade.....	55
Tabela 20. Resultados de linhagem granulocítica por sexo.....	57
Tabela 21. Resultados de linhagem monocítica por idade	60
Tabela 22. Resultados linhagem monocítica por sexo.....	61
Tabela 23. Resultados da linhagem eritroide por idade	64
Tabela 24. Resultados da linhagem eritroide por sexo	65
Tabela 25. Resultados de avaliação de displasia (<i>score</i> de Ogata)	67
Tabela 26. Resultados de avaliação de displasia eritroide (<i>red score</i>)	69
Tabela 27. Comparação dos resultados deste estudo com resultados de publicações relevantes	78
Quadro 1. Procedimento técnico “ <i>Lyse no Wash</i> ”	29
Quadro 2. Procedimento técnico “ <i>Lyse and Wash</i> ”	29
Quadro 3. Procedimento técnico para marcação intracitoplasmática	30

Lista de abreviaturas e símbolos

7AAD	Corante 7-actinomicina D
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CFM	Citometria de fluxo multiparamétrica
CFU-B	Células precursoras pré-B
CFU-L	Progenitor linfoide comum
CFU-T	Células precursoras pré-T
CTH	Célula-tronco hematopoiética
DC	Células dendríticas
DRM	Doença residual mensurável
EDTA	Anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético potássico
EPO	Eritropoetina
FEC	Fator estimulador de colônia
FSC	Dispersão direta/frontal (<i>Forward scatter</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
MEP	Progenitores megacariocíticos/eritroides
MO	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NK	<i>Natural killer</i>
PBS	Solução tampão fosfato
PMD	Progenitores da linhagem monocítica e dendrítica
RPM	Rotações por minuto
SMD	Síndrome mielodisplásica
SSC	Dispersão lateral (<i>Side scatter</i>)
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>

Resumo

Introdução: A análise de células hematopoiéticas por citometria de fluxo representa uma ferramenta importante na prática clínica para o diagnóstico e monitoramento de doenças oncohematológicas. Avanços tecnológicos em equipamentos e *softwares* de análise vêm abrindo portas para explorar padrões específicos que auxiliam na diferenciação entre o padrão celular normal e o anormal. **Objetivo:** Determinar valores de referência relativos e absolutos de normalidade em medula óssea de indivíduos sem doença hematológica por este método, bem como padrões normais de maturação das diferentes linhagens hematopoiéticas. **Métodos:** Utilizamos amostras de medula óssea de 46 pacientes hígidos submetidos à cirurgia ortopédica, com idade entre 18 e 87 anos (mediana 36 anos), sendo 16 do sexo feminino e 30 do sexo masculino. Por meio da aquisição de 8 tubos em equipamento com configuração de 10 cores, foi possível avaliar e quantificar (% e mm³) linfócitos B (imaturos e maduros), linfócitos T (auxiliares, citotóxicos, duplo negativo, duplo positivo), células *natural killer*, granulócitos (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e neutrófilos), monócitos (monoblastos, promonócitos, monócitos maduros, clássico, intermediário e não clássico), eritroblastos (imaturado e maduros), plasmócitos, basófilos, mastócitos, células dendríticas mieloides e células dendríticas plasmocitoides. Foram avaliados de acordo com o sexo (feminino e masculino), faixa etária (<40, 40 a 60, >60 anos) e descritos em percentual de mediana e valores absolutos. **Resultados:** Na avaliação dos resultados de acordo com a faixa etária, identificamos que indivíduos mais velhos apresentam aumento de células plasmocitárias que expressam CD56 (p=0,031 em valores absolutos), na relação CD4/CD8 (p=0,002), mastócitos (p=0,004 em percentuais), monócitos não clássicos (p=0,016 em percentuais), e diminuição de linfócitos T citotóxicos (p=0,031 em valores absolutos), linfócitos T duplo negativos (p=0,018 em valores absolutos), células *natural killer* que expressam CD56 (p=0,002 em valores absolutos e p=0,012 em percentuais), células *natural killer* que expressam CD56 e CD16 (p=0,024 em valores absolutos), mieloblastos (p=0,048 em valores absolutos), Metamielócitos/Bastonetes (p=0,038 em valores absolutos), neutrófilos (p=0,006 em valores absolutos), monoblastos (p=0,030 em valores absolutos), monócitos maduros (p=0,024 em valores absolutos), monócitos clássicos (p=0,017) e células dendríticas plasmocitoides (p=0,027 em valores absolutos), eritroblastos maduros (p=0,004 em valores absolutos). Na avaliação dos resultados de

acordo com sexo, identificamos que a população de linfócitos B maduros ($p=0,013$) e linfócitos B que expressam CD5 ($p=0,014$) são elevadas em indivíduos do sexo feminino, enquanto o percentual de células *natural killer* é relativamente maior em indivíduos do sexo masculino ($p=0,007$), principalmente na população de células que expressa CD56 e CD16 ($p=0,013$). **Conclusões:** Este estudo estabeleceu valores de referência (absoluto e relativo) para as populações linfócitos B (imaturos e maduros), linfócitos T (auxiliares, citotóxicos, duplo negativo, duplo positivo), células *natural killer*, granulócitos (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e neutrófilos), monócitos (monoblastos, promonócitos, monócitos maduros, clássico, intermediário e não clássico), eritroblastos (imaturado e maduros), plasmócitos, basófilos, mastócitos, células dendríticas mieloides e células dendríticas plasmocitoides de acordo com o sexo e faixa etária em amostras de medula óssea de doadores sem doença hematológica. Além disso, também demonstramos a identificação dos estágios maturacionais de linfócitos B, granulócitos, monócitos e eritroblastos os quais se mantêm estáveis apesar do sexo e da faixa etária.

Descritores: Citometria de fluxo; Células-tronco hematopoéticas; Medula óssea; Padrões de referência; Valores de referência

1 INTRODUÇÃO

A medula óssea (MO) é o tecido responsável pela produção, desenvolvimento e diferenciação de diversas linhagens celulares, através de um processo conhecido como hematopoiese.⁽¹⁻⁶⁾ Indivíduos saudáveis apresentam células precursoras suficientes para garantir a produção contínua das linhagens celulares ao longo de sua vida.^(1,5-7) Durante o processo normal da hematopoiese, a presença de algumas anormalidades genéticas pode resultar em alterações clonais que podem impactar a produção e a diferenciação de células hematopoiéticas.^(1,3,4,6,8,9) Essas alterações podem levar ao desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas, tais como leucemias, linfomas, tumores, neoplasias mieloproliferativas e outras doenças hematológicas malignas.^(1,3,5,6,8-14)

As anormalidades mais frequentes ocorrem nas células hematopoiéticas e estão associadas a desvios na expressão antigênica, quando comparadas com células normais.^(1,4,6,8,15) Dentre esses desvios é comum observar nas células hematopoiéticas a ausência de expressão de antígenos associados aos estágios maturacionais, a presença de expressões anormais de acordo com a linhagem, a diminuição de expressão, o aumento da expressão e/ou a expressão de marcadores associados a outras linhagens (linhagem mista).^(1,5,6,10,15) Consequentemente, esses desvios podem demonstrar desde uma parada maturativa durante a diferenciação celular, regeneração de MO após terapia imunossupressora, transplantes e presença de displasia de uma ou mais linhagens.^(1,4-7,11,15) Nas condições patológicas de mielodisplasia ou leucemia/linfomas, as células hematopoiéticas se envolvem em vias de diferenciação anormais ou são interrompidas em um determinado estágio de diferenciação.^(1,4-8,10,16)

O conhecimento e compreensão desses antígenos associados a linhagem celular e estágios maturativos são importantes para entender o processo de maturação normal e reconhecer quando houver alterações imunofenotípicas relacionadas a processos anômalos.^(4,5) Na prática clínica e de acordo com os critérios e classificação de neoplasias hematológicas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a utilização de anticorpos monoclonais tem sido muito útil para classificar tecidos e tumores de acordo com sua expressão antigênica que reflete a gênese tecidual ou celular.^{(4,7,17-}

²⁰⁾ Os anticorpos monoclonais são obtidos através de células cultivadas em laboratório,

sendo úteis no diagnóstico laboratorial, devido a sua especificidade para seus alvos pretendidos, sendo útil até em imunoterapias, onde são utilizados como agentes terapêuticos contra as células cancerígenas no corpo humano.⁽¹⁷⁾

A introdução de anticorpos monoclonais nos estudos de MO confirmaram uma grande heterogeneidade de precursores hematopoiéticos e linhagens celulares em diferentes estágios maturativos, demonstrando que alterações morfológicas coexistem com os padrões anormais de expressão imunofenotípica associados à diferenciação celular.^(4,15,18) Esses achados, em conjunto, podem identificar e classificar diversos tipos de neoplasias hematopoiéticas nas principais linhagens leucocitárias.^(5,15,18)

É através da análise imunofenotípica de células hematopoiéticas por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) que avaliamos o perfil imunofenotípico por meio da adição de anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos⁽¹⁵⁾ tornando a CFM uma ferramenta importante para o auxílio diagnóstico, classificação e monitoramento de diferentes tipos de neoplasias derivadas de células da MO.^(4,5,7,15,18,20–22)

Embora a imunofenotipagem por CFM em MO seja um exame conceituado e aplicado na prática clínica para o diagnóstico e monitoramento de doenças oncohematológicas, os recentes avanços da tecnologia de CFM e em *softwares* de análise, vêm abrindo portas para explorar padrões específicos de diferenciação na MO normal.^(3,9,14,15) Além disso, algumas destas alterações fenotípicas podem estar associadas a alterações genéticas e moleculares recorrentes, podendo ser usadas como preditoras de tais alterações e direcionar análises moleculares complementares.^(15,20)

Até o momento, existem poucos estudos que avaliam valores de referência em MO sabidamente normal de células hematopoéticas por metodologia de 10 cores em CFM e com quantificação absoluta através da utilização de *beads* de quantificação.^(3–5,14,15,19) A maioria dos estudos que avaliam valores de referência de MO normal utilizam material de MO da rotina diagnóstica, ou seja, amostras sem alterações imunofenotípicas evidentes, mas com investigação clínica de doenças oncohematológicas.^(3,9,15,19)

Ainda é discutida a necessidade de novos estudos em MO de indivíduos saudáveis. Por este motivo, a proposta deste estudo foi avaliar e quantificar populações de células hematopoiéticas por CFM em amostras de MO provenientes de indivíduos sem hipótese diagnóstica de doenças oncohematológicas, com o objetivo de fornecer uma base de referência para os estudos relacionados à MO em humanos e que

através da definição da variação normal do número de células presentes na MO e expressão de marcadores antigênicos específicos, é possível elaborar um padrão de referência para ser utilizado como termo de comparação para o diagnóstico diferencial de neoplasias hematológicas.

1.1 Citometria de fluxo

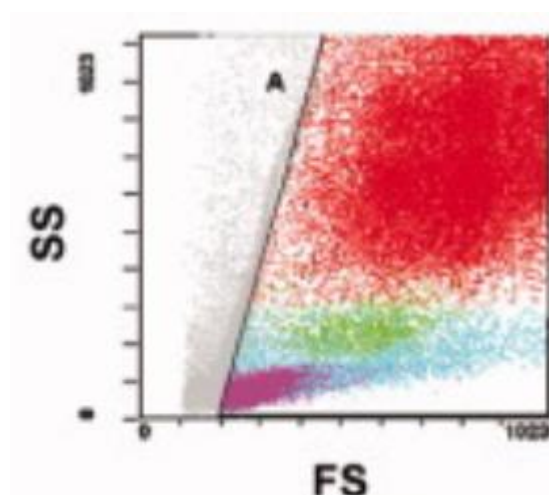
A CFM surgiu no início dos anos 80 com o aparecimento de anticorpos monoclonais utilizados para a identificação, avaliação de frequência e caracterização adicional das várias populações leucocitárias. Esta técnica é utilizada, principalmente, quando há suspeita de hematopoiese anormal e se tornou uma ferramenta importante para o diagnóstico rápido e preciso de doenças hematológicas.^(4,18,20) Estas análises geram informações importantes para o diagnóstico, estadiamento, prognóstico, alvo terapêutico e monitoramento da doença residual mensurável (DRM).^(18,20) A compreensão da heterogeneidade fenotípica de precursores hematopoiéticos através da diferença dos níveis de expressão de proteínas pelas células vem permitindo descobertas importantes durante o processo de maturação celular.^(3,7,18-20,23) A análise de CFM em células hematopoiéticas normais contribui para destacar a rígida regulação dos níveis de expressão de proteínas a que as células individuais são submetidas durante sua maturação.^(3,4,7,15,20)

A CFM é uma tecnologia que permite a análise simultânea e quantitativa de várias características de centenas a milhões de células individuais em suspensão à medida que passam por um ou vários *lasers* em uma solução tamponada à base de sal, em um tempo relativamente curto.^(15,22,24) Os equipamentos em CFM são compostos por um conjunto de *lasers* que, ao produzir sinais de luz difusa e fluorescente, são lidos por detectores, como fotodiodos ou tubos fotomultiplicadores e convertidos em sinais eletrônicos.⁽²⁴⁾

A dispersão de luz é independente da fluorescência. As amostras são preparadas para medição de fluorescência por meio de transfecção e expressão de proteínas fluorescentes, marcação com corantes fluorescentes ou marcação com anticorpos conjugados fluorescentes. Uma variedade de reagentes acoplados a corantes fluorescentes é utilizada na CFM, dentre eles os anticorpos monoclonais, corantes de ligação ao DNA e corantes de viabilidade.⁽²⁴⁾ Com o desenvolvimento de novos

fluorocromos e detectores espectrais ampliou-se ainda mais o potencial analítico dos instrumentos em CFM, permitindo uma caracterização simultânea de populações celulares em amostras de sangue periférico, MO, linfonodos, baço, tecidos da mucosa, tumores sólidos, entre outros.^(3,15,24)

A medição de luz visível ocorre em duas direções, na direta – dispersão direta/frontal (FSC – *forward scatter*), que pode indicar o tamanho relativo da célula, e a medição a 90° – dispersão lateral (SSC – *side scatter*), que indica a complexidade interna ou granularidade da célula. Quando esses sinais são convertidos por um sistema eletrônico gera-se um arquivo de dados em formato padronizado (FCS).⁽²⁴⁾ A seguir, podemos observar na figura 1 um exemplo de gráfico biparamétrico cruzando parâmetros SSC no eixo y e FSC no eixo x, onde visualmente podemos discriminar os leucócitos de acordo com o seu tamanho e complexidade/granularidade.



Roxo: linfócitos; verde: monócitos; vermelho: neutrófilos.

Fonte: Adaptado de Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, et al. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(1):4-10.

Figure 1. Display strategy; p. 6.⁽³⁾

Figura 1. Side scatter x Forward scatter

O desenvolvimento desta tecnologia, incluindo *hardware*, reagentes e algoritmos de análise, vem permitindo uma análise de, geralmente, até 20 parâmetros independentes em cada célula, e a aquisição de milhares de células por segundo, contribuindo para a identificação e caracterização precisa das populações celulares

coexistentes em uma amostra, estabelecendo uma relação precisa entre elas e discriminando entre as curvas de maturação normais.^(3,7,13,20,23,24) Além disso, existem novas plataformas em CFM com a adição de cinco ou mais *lasers*, com um poder de captação aumentado, podendo chegar em até 50 parâmetros independentes em cada célula, entretanto essas plataformas são menos comuns na prática clínica.⁽²⁴⁾

Com o aumento no número de parâmetros e a complexidade em experimentos, vem surgindo também a utilização de algoritmos de análise de dados, como PCA, SPADE e tSNE,⁽²⁴⁾ assim como a utilização de análise de dados de alta dimensão na nuvem, através das plataformas, como o Cytobank, em que os usuários assinam e adquirem o acesso à plataforma disponível na *internet*.⁽²⁴⁾

A CFM tornou-se uma ferramenta poderosa com aplicações nas áreas de imunologia, biologia molecular, bacteriologia, virologia, biologia do câncer e monitoramento de doenças infecciosas. Nos últimos 30 anos tem sido a principal ferramenta utilizada para análise de células hematopoiéticas, desde sua invenção em 1960.^(3,15,23) Com os avanços no reconhecimento e caracterização de novas populações leucocitárias, a CFM vem permitindo a análise simultânea de várias características celulares.^(3,15,23)

Por muitos anos a discriminação entre as linhagens e estágios maturativos ocorria através do exame morfológico, utilizando colorações universais, como May Grünwald Giemsa e Wright Giemsa, frequentemente complementadas por reações citoquímicas com capacidade de identificar atividades enzimáticas em diversas populações leucocitárias.^(3,20) O exame morfológico continua sendo o padrão-ouro e permanece entre as primeiras etapas de diagnóstico em suspeitas de distúrbios hematopoiéticos. Entretanto, a CFM contribuiu muito para a correlação diagnóstica, na precisão, no tempo relativamente curto e para a terapêutica adequada.^(3,20)

A maioria das neoplasias hematopoiéticas apresentam sintomatologia como febre ou perda de peso, que pode levar à investigação de uma neoplasia hematolinfoide.⁽¹⁸⁾ A infiltração significativa dos tecidos por células neoplásicas pode se apresentar como lesões de massa, como linfadenopatia ou organomegalia, lesões líticas ósseas ou lesões difusas, como erupções cutâneas ou efusões, levando a uma quantidade de células anômalas extremamente significativa, podendo causar até supressão das demais linhagens hematopoiéticas, além das células expressarem alterações aberrantes em seu imunofenótipo, tornando-se diferentes de uma população normal.^(7,18) O conhecimento de padrões de diferenciação imunofenotípica na maturação

celular normal facilita o reconhecimento dessas alterações, mesmo que ocorram em baixa frequência, como na pesquisa DRM.^(7,18)

A avaliação simultânea em plataformas com mais de 8 cores vem permitindo a redução significativa do volume de amostra utilizado, diminuição do número de tubos realizados, de carga do trabalho de preparação da amostra e de tempo de aquisição de dados, em comparação com as colorações convencionais de alíquotas de várias amostras. Esses avanços contribuíram para a identificação e caracterização das populações estudadas em uma amostra, a comparação precisa entre elas e melhor discriminação entre as vias de maturação normal e neoplásica.^(14,15)

1.2 Anticorpos monoclonais

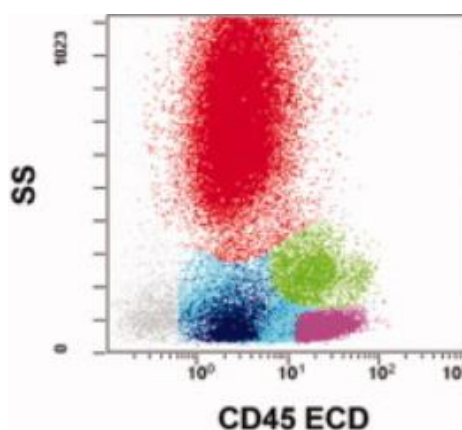
Através da CFM é possível caracterizar padrões de expressão de proteínas na superfície celular, no citoplasma e no núcleo das células por intermédio da marcação com anticorpos monoclonais, que são proteínas que se ligam com alta avidéz e especificidade a antígenos específicos.^(17,25)

Esses anticorpos monoclonais receberam uma designação de *cluster* de diferenciação (CD) de acordo com a sua associação a proteínas, as quais podem estar relacionadas a linhagem celular, receptores, ligantes ou função como moléculas de adesão. Grande parte da coleta de dados e o subsequente delineamento de antígenos de superfície celular para números específicos de CDs foram realizados em uma série de trabalhos e estudos internacionais, que mapearam a expressão de vários antígenos de CD em células e tecidos específicos.^(17,24,25) Alguns antígenos de superfície celular exibem expressão restrita a apenas uma linhagem celular, e outros são mais amplamente expressos, mas com níveis diferentes dependendo do estágio de maturação ou estado de ativação celular. Os níveis de expressão desses marcadores podem ser definidos como positivo (+), negativo (-) ou de acordo com a sua intensidade de expressão conforme descrito a seguir: negativa a fraca expressão (-/+), fraca expressão (+), moderada expressão (++) e forte expressão (+++).⁽²⁵⁾ Muitos desses antígenos podem ser utilizados para auxiliar a identificação de estágios de maturação celular e quantificação de linhagens específicas, uma vez que seus padrões de expressão sejam conhecidos. Além de definir curvas de maturação normais, frequentemente é possível identificar neoplasias por alterações ou perda na expressão antigênica, refletindo em

anormalidades na maturação ou função. Essas alterações podem ser utilizadas no diagnóstico e monitoramento de neoplasias.⁽²⁵⁾

Os anticorpos monoclonais são acoplados a diferentes fluorocromos, estes estão relacionados aos detectores presentes em equipamentos de CFM. Os detectores identificam diferentes faixas de comprimento de onda e podem variar na capacidade de detecção de 4 até 20 canais, sendo assim possível utilizar estratégias combinando mais de um anticorpo monoclonal na amostra. Para isso, é importante harmonizar as combinações desses anticorpos monoclonais de acordo com a população celular que será estudada e/ou com a hipótese diagnóstica.⁽⁷⁾

Um exemplo do uso de anticorpos para distinguir grupos celulares é a utilização do anticorpo CD45, também conhecido como pan-leucocitário, que fornece informações úteis sobre as principais populações leucocitárias, uma vez que o antígeno CD45 é expresso de forma variável e específica entre as várias linhagens e estágios de diferenciação.⁽⁷⁾ A expressão de CD45 é alta em linfócitos e monócitos e baixa a moderada em granulócitos, precursores linfoides e mieloides e em eritroblastos. Já eritrócitos são, normalmente, CD45 negativo. Portanto, quando combinado com SSC, o CD45 pode ajudar a separar e definir as populações de leucócitos.^(7,20) Na figura 2 podemos observar em um gráfico biparamétrico o cruzamento dos parâmetros SSC x CD45, que é capaz de separar os leucócitos de acordo com a expressão de CD45 e complexidade/granularidade.



Roxo: linfócitos; verde: monócitos; vermelho: neutrófilos; azul: células precursoras.

Fonte: Adaptado de Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, et al. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(1):4-10. Figure 3. CD34 expression in the “bermudes” region; p. 7.⁽³⁾

Figura 2. Side scatter x CD45

Além disso, ao adicionar *beads* de quantificação associadas à utilização de anticorpos monoclonais para selecionar populações de interesse em experimentos, podemos determinar valores absolutos sem a correlação com os resultados obtidos através de um contador hematológico e este procedimento é conhecido como quantificação por plataforma única. As *beads* de quantificação podem ser adicionadas em qualquer experimento realizado por CFM, sendo a sua concentração conhecida e definida pelo fabricante.⁽²⁴⁾ O melhor fluorocromo para esta aplicação é o PE.⁽²⁴⁾ Para a quantificação da celularidade em valores absolutos é necessário aplicar a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número total de eventos adquiridos X concentração de } beads}{\text{Número de eventos de } beads}$$

1.3 Caracterização imunofenotípica

Um dos princípios do diagnóstico de neoplasias hematológicas por CFM nos laboratórios clínicos é a comparação do padrão fenotípico da doença com o padrão fenotípico de uma MO normal nas diferentes linhagens hematopoiéticas, principalmente em casos de leucemias agudas e síndrome mielodisplásica (SMD).^(5,7,10,21,26) O conhecimento dos níveis de expressão de vários marcadores específicos de cada linhagem, imaturos e maduros no desenvolvimento hematopoiético normal, fornece um quadro de referência para o reconhecimento de padrões de diferenciação anormais. Esse conceito envolve o conhecimento da ontogenia normal das células hematopoiéticas e a utilização de *softwares* modernos de análise de dados.^(7,21)

Entretanto, existe dificuldade na obtenção de MO normal para a determinação de padrões fenotípicos de normalidade e valores de referência tanto em nível nacional, quanto internacional. Devido à dificuldade na obtenção de padrões fenotípicos de normalidade na literatura, é comum aos laboratórios clínicos utilizarem casos da rotina diagnóstica que não apresentem alterações fenotípicas, de acordo com a hipótese diagnóstica, e utilizá-los como “amostras normais”. Utiliza-se também populações residuais sem anormalidades fenotípicas da própria amostra, como padrão de diferenciação entre fenótipos normais e anormais.⁽⁷⁾

1.4 Medula óssea na ontogenia normal

A ontogenia do sistema hematopoiético em humanos é caracterizada por duas fases de hematopoiese embrionária, a primeira fase gera populações de células hematopoiéticas transitórias, como eritrócitos primitivos e algumas células mieloides; e a fase definitiva, que se origina posteriormente com a presença das células-tronco hematopoiéticas (CTH), que permanecem até a vida adulta originando as linhagens celulares eritroide, mieloide e linfoide.^(16,27-29) O sistema hematopoiético é composto por órgãos e tecidos como o fígado, baço, MO, linfonodos e timo, responsáveis pela formação, maturação e destruição de células sanguíneas.^(16,27-29) O processo conhecido como hematopoiese ocorre na MO e envolve a produção, diferenciação e maturação de células, executando um papel importante em processos respiratórios, imunológicos e homeostáticos.^(13,16,27,29)

A MO humana é um sistema complexo que abriga todos os estágios de maturação hematopoiética, desde uma célula-tronco indiferenciada até células altamente especializadas.^(1,8,27,28,30) É composta por várias linhagens celulares, cada uma com suas características fenotípicas, reguladas de acordo com seu estágio de maturação.^(1,8,27,28,30) Isso é controlado pela atividade proliferativa das células progenitoras e de acordo com o número de células em processo de maturação e em apoptose.^(5,30) O tecido da MO não é cineticamente homogêneo, mas é composto por diversas linhagens celulares hematopoiéticas relacionadas, cada uma com funções diferentes.^(5,30)

O processo de produção de progenitores comprometidos acontece devido à capacidade que as CTH têm de se autorrenovar através de divisão mitótica simétrica, e/ou divisão assimétrica (em que uma célula filha é diferenciada enquanto a outra é uma réplica indiferenciada).^(31,32) À medida que ocorre a diferenciação das CTH, as células mais diferenciadas se multiplicam e perdem progressivamente sua capacidade de se autorrenovar, aumentam a expressão de genes específicos de linhagem e se tornam cada vez mais comprometidas com determinada linhagem.^(31,32)

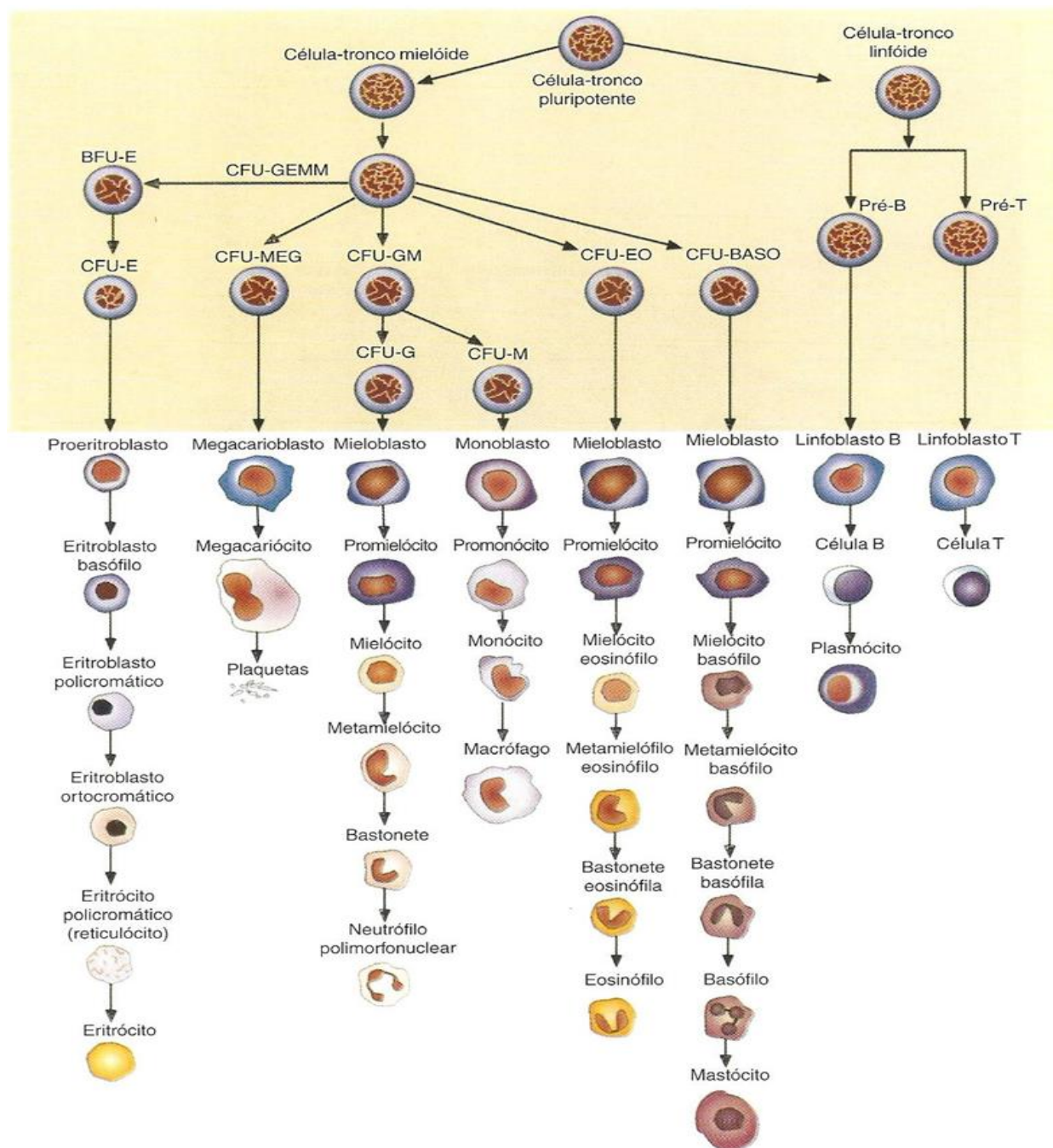
O equilíbrio entre se autorrenovar e se diferenciar é regulado por fatores extrínsecos e intrínsecos à célula, dentre eles a presença de citocinas, interações com o nicho, expressão de marcadores celulares e receptores, reguladores de transdução de sinal, fatores de transcrição, reguladores epigenéticos e microRNAs.^(16,33)

Esta sequência coordenada de sinalizações induz a expressão de fatores restritos à linhagem e suprime fatores que promovem outras linhagens, resultando na expressão de conjuntos apropriados de fatores e receptores específicos de linhagem.^(16,31,32)

A linhagem hematopoiética, através de um ciclo lento, inicia com CTH que origina os progenitores linfoide comum e/ou mieloide por meio de estímulos mediados por fatores estimuladores de colônia (FEC), atuando especialmente em células de origem mieloide, e as interleucinas (IL) que terão papel fundamental na diferenciação de células linfocitárias.^(33,34)

O progenitor mieloide comum, através de estímulos de fatores de transcrição e citocinas, se diferencia em precursores da linhagem eritroide, megacariocítica, mieloide, monocítica, eosinofílica, mastocitária ou basofílica. Já o progenitor linfoide comum (CFU-L) irá se diferenciar em células precursoras pré-B (CFU-B) ou pré-T (CFU-T).⁽³⁵⁾

Considerando o grau de diferenciação celular, podemos distinguir um número variável de estágios de maturação de cada uma das linhagens hematopoiéticas, dependendo de critérios e métodos pré-definidos e conhecidos da hematopoiese normal. Assim, de acordo com o padrão de expressão de múltiplas proteínas analisadas por CMF, podemos estabelecer aproximadamente 20 diferentes estágios de maturação para cada linhagem.^(16,29,35) Na figura 3 podemos observar a diferenciação hematopoiética a partir de uma CTH, através do estímulo de unidades formadoras de colônia de acordo com a linhagem.⁽³⁵⁾



BFU-E: unidade formadora de *burst* – eritroide; CFU-GEMM: unidade formadora de colônia – granulocítica, eritroide, monocítica e megacariocítica; CFU-E: unidade formadora de colônia – eritroide; CFU-MEG: unidade formadora de colônia – megacariocítica; CFU-GM: unidade formadora de colônia granulocítica e monocítica; CFU-EO: unidade formadora de colônia – eosinófilos; CFU-BASO: unidade formadora de colônia – basófilos; CFU-G: unidade formadora de colônia – granulócitos; CFU-M: unidade formadora de colônia – monócitos.

Fonte: Carr JH, Rodak BF. Atlas de hematologia clínica. São Paulo: Santos; 2000. Figura 2-1, Gráfico da hematopoiese. p. 11.⁽³⁵⁾

Figura 3. Diferenciação hematopoiética a partir de uma célula-tronco hematopoiética

1.4.1 Células-tronco hematopoéticas (*stem cell*)

As CTH são encontradas na MO e são caracterizadas por uma população rara de células com capacidade de auto renovação, mantendo seu número e produzindo progenitores imaturos, que por meio de uma série de eventos de proliferação e diferenciação, produzem células das linhagens eritroide, megacariocítica, mieloide e linfoide.^(6,16,28,30,33) A autorregulação e autorrenovação destas células garante um equilíbrio adequado da produção das linhagens celulares ao longo da vida.^(8,28,30)

As CTH são as células com propriedades de se autorrenovar e se diferenciar, sua função biológica é heterogênea como também a expressão de marcadores, mas sem expressar nenhum marcador associado à linhagem.^(25,30) Essas células têm marcadores de membrana característicos, como CD45 de moderada intensidade, CD90 (antígeno Thy-1), CD117 de fraca intensidade (receptor de fator *stem cell*, c-kit), HLA-DR (molécula de complexo principal de histocompatibilidade classe II) e CD38 de negativa a fraca intensidade (antígeno T10), menor FSC e SSC.⁽¹⁶⁾ O marcador chave destas células em humanos é o CD34 (antígeno de células precursoras), a avaliação desta expressão é comumente usada na clínica e tem grande significância na pesquisa destas células e seus progenitores, além de sua importante participação no diagnóstico de leucemias agudas, SMD, entre outras.^(16,20,25,30)

À medida que as CTHs amadurecem e se tornam mais diferenciadas, perdem a capacidade de autorrenovação e mudam fenotipicamente, embora ainda compartilhem certas características, como expressão de CD34 e CD45 (moderada expressão) e adquirem a expressão de CD38.^(16,30,36)

As CTHs em processo de maturação mostram positividade para alguns antígenos específicos de linhagem e iniciam seu compromisso com a maturação dando origem a precursores granulocíticos, monocíticos, eritroides, megacariocíticos ou linfoides.^(7,16,20,37,38)

1.4.2 Linhagem eritroide

Na MO, no nicho endosteal e através do estímulo da eritropoietina (EPO), ocorre a indução de progenitores megacariocíticos/eritroides (MEP), que se diferenciam em progenitores comprometidos com esta linhagem. O primeiro estágio do

desenvolvimento da linhagem eritroide é o eritroblasto, que se distingue das células eritroides mais maduras pela presença de um nucléolo proeminente. À medida que as células se dividem e se diferenciam progressivamente, elas tornam-se mais numerosas, diminuem de tamanho, condensam sua cromatina nuclear e aumentam a concentração de hemoglobina citoplasmática.^(31,32)

O ritmo da divisão celular e da maturação da cromatina geralmente segue o mesmo da síntese de hemoglobina, à medida que a hemoglobina se acumula, as células tornam-se progressivamente menores e a atividade transcricional diminui. O grupo heme regula sua própria síntese, bem como a globina, pois, quando um nível específico de grupo heme não associado à hemoglobina é atingido, uma fração significativa do heme livre é localizada no núcleo da célula, a captação de ferro e a divisão celular são interrompidas e o núcleo é expulso, ocorrendo a formação de um reticulócito, também chamado de eritrócito policromático.⁽²⁹⁾

A linhagem eritroide também é originada de um precursor mieloide comum, com perda progressiva da expressão de CD34, HLA-DR, CD117, CD45 e CD105 (endoglina).^(26,29) Em paralelo, esta célula adquire a forte expressão de CD36 (receptor de trombospondina), CD71 (receptor de transferrina), CD235a (glicoforina A), com moderado SSC, entre outros marcadores.^(26,29) Sendo assim, a diferenciação ao longo da linhagem eritroide é caracterizada pela aquisição de CD71 (forte expressão) com a perda de CD45, HLA-DR, CD13 e CD33.⁽²⁵⁾ Embora não haja correspondência exata com as etapas de diferenciação definidas de acordo com as características morfológicas do precursor eritroide, do ponto de vista fenotípico, conseguimos identificar até quatro estágios de maturação até a hemácia. Na tabela 1 podemos observar as expressões antigênicas presentes de acordo com o estágio maturativo.^(36,38)

As curvas maturativas da linhagem eritroide podem ser observadas através dos cruzamentos entre marcadores-chave expressos em determinados estágios, como por exemplo CD105 com CD117, CD117 com CD36, CD117 com CD71, CD105 com CD36, CD105 com CD71 e CD71 com CD36.^(10,22,26,39)

É importante ressaltar que na grande maioria das técnicas de imunofenotipagem, após a etapa de marcação com anticorpos monoclonais, são utilizadas soluções de hemólise, com o objetivo de reduzir/eliminar a população eritroide madura. Quando removemos a maioria dos eritrócitos maduros, conseguimos concentrar as células eritroides nucleadas (mais imaturas) que estão presentes numa concentração

menor, além disso, parâmetros morfológicos podem ser prejudicados ou perdidos ao analisar amostras de aspirado de MO sem depleção de eritrócitos.^(22,26,39)

Tabela 1. Expressões antigênicas da linhagem eritroide

Antígenos	Pró-eritroblasto	Eritroblasto basofílico e policromático	Eritroblasto ortocromático	Reticulócitos e eritrócito maduro
CD34	Positivo (+)	Negativo	Negativo	Negativo
CD33	Positivo (-/+)	Negativo	Negativo	Negativo
CD36	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (++)	Negativo
CD45	Positivo (+)	Positivo (-/+)	Negativo	Negativo
CD71	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Negativo
CD105	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (-/+)	Negativo
CD117	Positivo (++)	Positivo (++)	Negativo	Negativo
CD235a	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
HLA-DR	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Negativa a fraca expressão - (-/+); fraca expressão - (+); moderada expressão - (++); forte expressão - (+++).

Fonte: Van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;60(1):1-13.⁽⁷⁾
Orfao A, Matarraz S, Pérez-Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. *J Immunol Methods.* 2019; 475:112684.⁽¹⁵⁾

Jafari K, Tierens A, Rajab A, Musani R, Schuh A, Porwit A. Visualization of cell composition and maturation in the bone marrow using 10-color flow cytometry and radar plots. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(2):219-29.⁽²²⁾

Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(2):184-96.⁽²⁶⁾

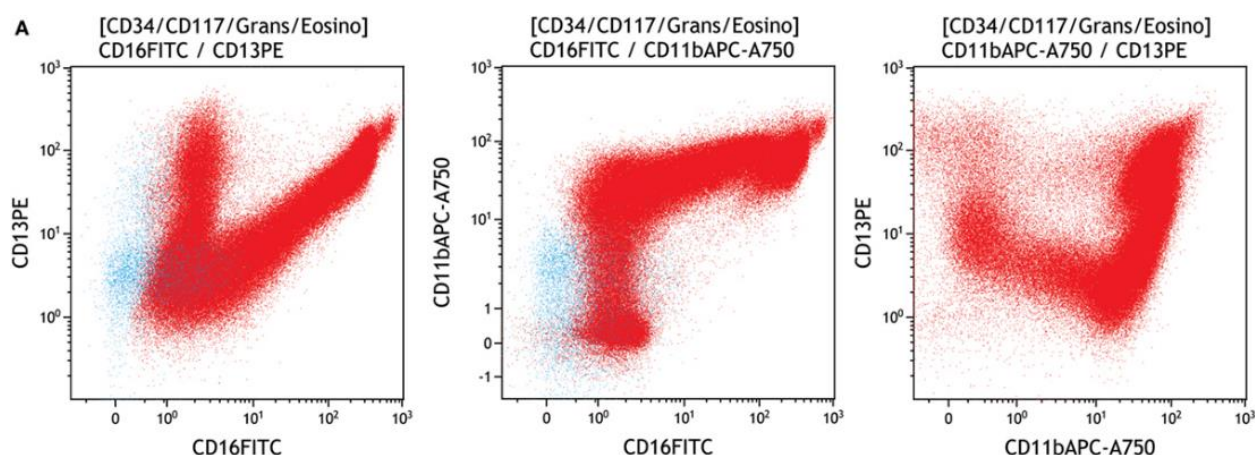
Violidakis D, Axler O, Jafari K, Bild F, Nilsson L, Mazur J, et al. Analysis of erythroid maturation in the nonlysed bone marrow with help of radar plots facilitates detection of flow cytometric aberrations in myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020;98(5):399-411.⁽³⁹⁾

1.4.3 Linhagem mieloide

As células mieloides derivam do mesmo progenitor mieloide comum que é regulado por fatores de transcrição, como GATA-1, GATA-2, PU.1 e C/EBP- α em estágios específicos de maturação e por citocinas mielopoiéticas (SCF, TPO, IL-3, GM-CSF, IL-6). Conforme ocorre a maturação dessas células há uma perda gradual das expressões antigênicas associada à imaturidade e ganho gradual de expressões antigênicas de marcadores associados à linhagem granulocítica.^(31,32,36,38)

Na diferenciação da linhagem granulocítica (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), as primeiras células diferenciadas a partir do progenitor mieloide multipotente são os mieloblastos, morfologicamente é possível observar que os mieloblastos têm nucléolo e uma alta proporção entre o núcleo e o citoplasma.^(31,32) No segundo estágio podemos identificar as células classificadas como promielócitos que, morfologicamente, são células ligeiramente maiores que os mieloblastos e são caracterizados pela presença de pequenos grânulos azurófilos primários. Posteriormente, no último estágio de divisão, temos os mielócitos que possuem grânulos secundários proeminentes, embora grânulos primários ainda possam estar presentes. É a presença dos grânulos secundários que vai definir a linhagem dos granulócitos como: neutrofílica, eosinofílica ou basofílica.^(31,32)

A linhagem neutrofílica é responsável por desempenhar um papel fundamental na eliminação de patógenos.⁽¹⁵⁾ Através da CFM é possível definir pelo menos quatro estágios de maturação de acordo com as expressões antigênicas, que se correlacionam com a morfologia.^(7,20) As curvas maturativas desta linhagem podem ser observadas através dos cruzamentos entre marcadores-chave expressos em determinados estágios, como por exemplo CD13 com CD16 e CD11b, conforme podemos observar na figura 4.^(7,10) O CD13 é um marcador único na diferenciação granulocítica, pois este marcador é expresso dinamicamente, apresentando níveis elevados em estágios imaturos, perda de expressão progressiva em estágios intermediários e é gradualmente regulado até níveis elevados conforme as células granulocíticas tornam-se maduras. O mesmo ocorre, em conjunto, com os antígenos CD11b e CD16, que são inicialmente expressos em níveis baixos, entretanto, a expressão é aumentada durante o processo de maturação, particularmente nas últimas duas fases.^(7,10) Além disso, os neutrófilos exibem um aumento de SSC.⁽¹⁵⁾ Na tabela 2 podemos observar as expressões antigênicas presentes de acordo com o estágio maturativo.



Fonte: Bento LC, Correia RP, Pitangueiras Manguiera CL, De Souza Barroso R, Rocha FA, Bacal NS, et al. The use of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a review. Front Oncol. 2017; 7:270. Figure 5, Evaluation of neutrophil maturation in a regular versus dysplastic sample; p. 7.⁽¹⁰⁾

Figura 4. Curvas de maturação da linhagem neutrofílica

Tabela 2. Expressões antigênicas da linhagem neutrofílica

Antígeno	Mieloblasto	Promielócito	Mielócito	Metamielócito	Bastonete	Neutrófilo
CD34	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CD10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
CD11c	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
CD11b	Negativo	Negativo	Positivo (+/-)	Positivo	Positivo (++)	Positivo (+++)
CD13	Positivo (+++)	Positivo (++)	Positivo (-/+)	Positivo (-/+)	Positivo (++)	Positivo (+++)
CD15	Negativo	Positivo (+)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
CD16	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (+/-)	Positivo (+/-)	Positivo (+++)
CD33	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (++)	Positivo	Positivo	Positivo
CD38	Positivo (+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CD45	Positivo (+)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo (++)	Positivo (++)
CD117	Positivo (+++)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
MPO (i)	Positivo	Positivo (+++)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
HLA-DR	Positivo (++)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Negativa a fraca expressão - (-/+); fraca expressão - (+); moderada expressão - (++) ; forte expressão - (+++); intracitoplasmático - (i); MPO: mieloperoxidase.

Fonte: Van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. Cytometry B Clin Cytom. 2004;60(1):1-13.⁽⁷⁾ Orfao A, Matarraz S, Pérez-Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. J Immunol Methods. 2019;475:112684.⁽¹⁵⁾

A maturação da linhagem eosinofílica acontece em conjunto com a neutrofílica, entretanto o estímulo para esta diferenciação ocorre a partir de uma unidade

formadora de colônia eosinofílica, no estágio maturativo de metamielócitos.^(31,32) Estas células são caracterizadas pela presença de grânulos de heparina e morfologicamente os eosinófilos maduros são caracterizados por um núcleo com dois ou três lobos, que além de heparina, contém peroxidase e enzimas hidrolíticas.^(31,32) Possuem atividade fagocítica, citotóxica e expressam receptores Fc, atuando no combate de certas infecções parasitárias, particularmente vermes.^(31,32) O imunofenótipo dos eosinófilos é caracterizado por apresentar alto SSC, CD45 em um nível ligeiramente mais alto do que neutrófilos e marcadores associados a linhagem granulocítica, exceto pela falta de expressão de CD16.^(31,32) A transição para o eosinófilo maduro é acompanhada pelo aumento da expressão de CD45, aumento na expressão de CD11b e diminuição em CD33.^(31,32)

A maturação da linhagem basofílica também está associada a marcadores da linhagem granulocítica, entretanto os basófilos são menos comumente encontrados na circulação, suas funções pró e anti-inflamatórias estão associadas ao estímulo de CFU com diferenciação basofílica/mastocitária.^(7,15,25,40) Existem muitas semelhanças entre basófilos e mastócitos, entretanto diferente dos mastócitos, as células da linhagem dos basófilos completam seu processo de maturação na MO.⁽¹⁵⁾ A granulação dos basófilos apresenta receptores de IgE de alta afinidade.^(31,32,40) Seu fenótipo é caracterizado por apresentar um baixo SSC, CD45 (fraca a moderada expressão), CD123 (forte expressão), CD11b, CD11c (fraca expressão), CD13, CD22 (Clone Leu-14 e 5.8HK), CD33 e CD38 (forte expressão) e CD203c. Essas células apresentam expressão negativa para HLA-DR, CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD64 e CD117.⁽⁴⁰⁾ Apesar dos basófilos expressarem o marcador linfóide B CD22, eles são negativos para outros marcadores desta linhagem.^(7,25,40)

A maturação da linhagem mastocitária não ocorre na MO, os progenitores de mastócitos deixam a MO e entram na circulação, onde migram para os tecidos periféricos (pele, coração, pulmão e submucosa gastrointestinal). Normalmente são infrequentes na MO (<1%).⁽¹⁵⁾ Dentro dos tecidos mucosos e conjuntivos, eles sofrem proliferação, diferenciação e maturação, apresentando fenótipos heterogêneos dependendo de seu destino tecidual.⁽¹⁵⁾ Os mastócitos maduros se distinguem pela expressão de receptores IgE e expressão de CD203c da mesma forma que os basófilos. Seu imunofenótipo é caracterizado por expressão forte de CD117 e CD203c.^(15,40)

Na tabela 3 podemos observar as expressões antigênicas presentes em eosinófilos, basófilos e mastócitos.

Tabela 3. Expressões antigênicas da linhagem eosinofílica, basofílica e mastocitária

Antígeno	Eosinófilos	Basófilos	Mastócitos
CD34	Negativo	Negativo	Negativo
CD10	Positivo	Positivo	Negativo
CD11c	Positivo	Positivo (+)	Negativo
CD11b	Positivo (+/-)	Positivo	Positivo (+)
CD13	Positivo (++)	Positivo (+)	Positivo
CD15	Positivo	Negativo	Positivo
CD16	Negativo	Negativo	Negativo
CD22	Negativo	Positivo (+)	Negativo
CD33	Positivo (-/+)	Positivo	Positivo (+++)
CD38	Negativo	Positivo (+++)	Positivo (+)
CD45	Positivo (++)	Positivo (+++)	Positivo (+)
CD117	Negativo	Negativo	Positivo (+++)
CD123	Negativo	Positivo (+++)	Negativo
CD203c	Negativo	Positivo	Positivo
HLA-DR	Negativo	Negativo	Negativo

Negativa a fraca expressão - (-/+); fraca expressão - (+); moderada expressão - (++); forte expressão - (+++).

Fonte: Orfao A, Matarraz S, Pérez-Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. J Immunol Methods. 2019; 475:112684.⁽¹⁵⁾

Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, Schlette E, Huh YO, Shi Y, et al. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. Arch Pathol Lab Med. 2008;132(5):813-9.⁽⁴⁰⁾

Os progenitores da linhagem monocítica e dendrítica (PMD) são classificadas como células mononucleares, fagocitárias e de apresentação de antígenos.^(31,32) Monócitos, células dendríticas (DC) e macrófagos são conhecidos pela sua função na imunidade inata e adaptativa e são vitais para o controle de patógenos e início da resposta imunológica celular, bem como responsáveis por dar suporte às funções dos tecidos. Essas propriedades as tornam alvos em terapias imunológicas, vacinação e tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias.⁽⁴¹⁾

Na linhagem monocítica, as primeiras células a serem diferenciadas são os precursores monocíticos (monoblastos), seguidos dos monócitos imaturos (promonócitos) que, ao migrarem para o sangue periférico, são denominados monócitos maduros. Quando recrutados para o sítio de inflamação os monócitos migram para os tecidos e se diferenciam em macrófagos.^(7,20) O imunofenótipo das células desta

linhagem é caracterizado por uma forte expressão de HLA-DR, CD33, CD64 e CD4.^(7,10,20,42) À medida que as células monocíticas amadurecem, elas adquirem níveis crescentes de CD13 e CD14.^(43–46) As curvas de maturação desta linhagem podem ser observadas através dos cruzamentos de CD11b com HLA-DR, CD33 com CD14, CD64 com CD14 e/ou substituindo o CD14 por CD300e. O CD300e, também conhecido como IREM-2, é um marcador muito útil na diferenciação de promonócitos e monócitos maduros, pois diferente do CD14, o CD300e é expresso somente por monócitos maduros.⁽⁴⁷⁾

Além da classificação dos monócitos de acordo com seu estágio maturativo, existe uma classificação de monócitos maduros com base nas expressões de CD14 e CD16, distinguindo os monócitos em 03 subtipos: monócitos clássicos, intermediários e não clássicos. Os monócitos clássicos correspondem a aproximadamente 80 a 85% de todos os monócitos e são considerados melhores na secreção de citocinas pró-inflamatórias, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio.^(42–46) Os monócitos intermediários também estão envolvidos na fagocitose e inflamação, já os monócitos não clássicos se assemelham a macrófagos de tecido “residentes” com a expressão mais alta de HLA-DR.^(42–46) Na tabela 4 podemos observar as expressões antigênicas presentes de acordo com o estágio maturativo da linhagem monocítica.

Tabela 4. Expressões antigênicas da linhagem monocítica

Antígenos	Monoblasto	Promonócito	Monócito maduro	Clássico	Intermediário	Não clássico
CD11b	Negativo	Positivo (-/+)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
CD13	Negativo	Positivo (++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)
CD14	Negativo	Positivo (+)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+)	Positivo (+)
CD16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (+)	Positivo (+)
CD33	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (++)	Positivo (++)
CD34	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CD36	Negativo (+)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
CD38	Positivo (++)	Positivo (++)	Positivo (++)	Positivo (++)	Positivo (++)	Positivo (++)
CD45	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)
CD64	Positivo	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (++)	Positivo (++)

continua...

...continuação

CD117	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CD300e	Negativo	Negativo	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)
HLA-DR	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)

Negativa a fraca expressão - (-/+); fraca expressão - (+); moderada expressão - (++) , forte expressão - (+++).

Fonte: Van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;60(1):1-13.⁽⁷⁾

Orfao A, Matarraz S, Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. *J Immunol Methods.* 2019;475:112684.⁽¹⁵⁾

Marti LC, Bacal NS, Bento LC, Correia RP, Rocha FA. Lymphoid hematopoiesis and lymphocytes differentiation and maturation. In: Isvoranu G, editor. *Lymphocyte updates - cancer, autoimmunity and infection.* London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Aug 19]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/55460>.⁽³³⁾

Lambert C, Preijers FW, Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017;92(3):180-88.⁽⁴²⁾

Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(5):799-806.⁽⁴³⁾

1.4.4 Linhagem linfoide

A maturação da linhagem linfoide começa a partir de uma unidade formadora de colônia ou célula CFU-L, que irá se diferenciar em linfócitos B, T ou células *natural killer* (NK).^(33,48,49) Esses progenitores iniciam gradualmente a expressão do fator de transcrição e regulação negativa do gene Id-1, evento importante para a ativação dos genes de recombinação 1 e 2 (RAG1 e RAG2), clivando o DNA em sequências de sinais de recombinações específicas para formar a região V da cadeia, que é codificada pelos genes V (variável), D (diversidade) e J (junção), enquanto a região V da cadeia é codificada por segmentos V e J com a ausência de segmentos D nos loci da cadeia leve,^(33,48,49) gerando a organização nas regiões C (constante) dos diferentes isótipos de imunoglobulina que são importantes no desenvolvimento da recombinação V (D) J para formar uma imunoglobulina completa, indispensáveis para o rearranjo dos genes TCR e Ig (imunoglobulina), essenciais para a diferenciação linfoide T e B.^(33,48,49) Existem sete genes de receptores de antígenos, são estes: os genes das cadeias α (alfa) e β (beta) do receptor de linfócitos T $\alpha\beta$ (TCR), os genes das cadeias γ (gama) e δ (delta) do receptor de linfócitos T $\gamma\delta$ (TCR) e o receptor de células B (BCR), que é composto por uma cadeia pesada codificada pelo locus H da Ig e uma cadeia leve Kappa ou Lambda.^(33,48,49)

Sabe-se que a IL-7 é uma citocina fundamental para a formação de linfócitos B e funciona na regulação, proliferação, sobrevivência e no rearranjo inicial do gene da Ig.^(33,50) O primeiro estágio de diferenciação da linhagem B é a Pró-B, que ocorre através do estímulo da IL-7.^(33,50) O próximo estágio de maturação é o Pré-B I, quando ocorre a recombinação do gene de Ig no *locus* da cadeia pesada, que apresenta segmentos que codificam as regiões VDJ e C e a expressão de *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT), que catalisa e adiciona nucleotídeos juncionais (N).^(15,33,50) No estágio pré-B II, o rearranjo VDJ está adjacente à região C μ constante e cria um gene ativo que codifica a cadeia pesada, cuja síntese origina a cadeia intracitoplasmática IgM.⁽³³⁾ O linfócito B expressa um complexo BCR que é formado por uma cadeia pesada associada a uma cadeia leve, ligada a um heterodímero Ig α (CD79a) e Ig β (CD79b).^(15,33) Os sinais gerados pelo pré-BCR estimulam a diferenciação em pré-B II e são responsáveis por sua proliferação na MO, inibindo a recombinação da cadeia pesada e estimulando a recombinação da cadeia leve.⁽³³⁾ O rearranjo da cadeia leve compreende a junção de um segmento V com um segmento J formando um exon VJ associado a uma cadeia Ig μ . Esta associação ativa a tradução das proteínas kappa e lambda, levando à formação de uma molécula IgM completa. O linfócito B que expressam uma molécula de IgM na membrana celular são denominados linfócitos B imaturos e passam por um processo de seleção positiva e negativa antes de completar seu estado de maturação.⁽³³⁾ Durante esse processo, os linfócitos B que completam, com sucesso, o programa de rearranjo gênico são selecionados positivamente, desligando-se dos genes RAG e recebendo sinais de sobrevivência para prosseguir no processo de maturação.⁽³³⁾ Os linfócitos B selecionados positivamente deixam a MO e completam seu estágio de maturação final nos órgãos linfoides secundários. Um subtipo destes linfócitos B sofrem diferenciação para células plasmocitárias e uma parte delas retornam à MO.⁽³³⁾

A presença de linfócitos B na MO normalmente consiste em uma mistura de linfócitos B em maturação, linfócitos B maduros e “Naive” e um pequeno número de células plasmocitárias.^(16,18,19,25) Os linfócitos B iniciais apresentam expressão antigênica de CD45 (negativa a fraca expressão) e passam a expressar CD10 e CD19, mantendo a expressão de HLA-DR.^(16,18,19,25) Na tabela 5 podemos observar as principais expressões antigênicas presentes nesta linhagem.

Tabela 5. Expressões antigênicas da linhagem linfóide B

Antígenos	Pró-B	Pré-B I	Pré-B II	Linfócito B transicional	Linfócito B maduro	Plasmócitos
CD10	Negativo	Positivo (+++)	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo	Negativo
CD138	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
CD19	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
CD20	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (+++)	Positivo	Negativo
CD22	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo (+++)	Negativo
CD34	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CD38	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+)	Positivo (-/+)	Positivo (+++)
CD45	Positivo (+)	Positivo (++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)	Positivo (-/+)
CD79a (i)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
CD79b	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
Kappa	Negativo	Negativo	Positivo (i)	Positivo (s)	Positivo (s)	Positivo (i)
Lambda	Negativo	Negativo	Positivo (i)	Positivo (s)	Positivo (s)	Positivo (i)
HLA-DR	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
TdT (n)	Positivo	Positivo (+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
IgM	Negativo	Negativo	Positivo (i)	Positivo (s)	Positivo (s)	Positivo (i)
IgD	Negativo	Negativo	Positivo (i)	Positivo (s)	Positivo (s)	Positivo (i)
IgG	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (s)	Positivo (s)	Positivo (i)
CD5	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo (+)	Negativo	Negativo

Negativa a fraca expressão - (-/+); fraca expressão - (+); moderada expressão - (++) ; forte expressão - (+++); intracitoplasmático – (i); superfície - (s); nuclear - (n).

Fonte: Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood*. 1987;70(5):1316-24.⁽¹⁹⁾

Marti LC, Bacal NS, Bento LC, Correia RP, Rocha FA. Lymphoid hematopoiesis and lymphocytes differentiation and maturation. In: Isvoranu G, editor. *Lymphocyte updates - cancer, autoimmunity and infection*. London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Aug 19]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/55460>.⁽³³⁾

Carrion C, Guérin E, Gachard N, le Guyader A, Giraut S, Feuillard J. Adult bone marrow three-dimensional phenotypic landscape of B-cell differentiation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019;96(1):30-8.⁽⁵¹⁾

Diferente dos linfócitos B, os precursores de linfócitos T da MO migram para o timo e, através de seleções positivas e negativas envolvendo interações com as células epiteliais do timo e sinalização por quimiocinas completam seu estágio maturativo. Dentre as principais quimiocinas que participam deste processo, se destacam a CC-ligante 21 (CCL21) e CCL25 e seus respectivos receptores CCR7 e CCR9.^(15,31–33,49) Na MO, a identificação dos precursores comprometidos com a linhagem T ou NK não é muito clara. Isso pode ocorrer devido à existência de um precursor comum para estas duas linhagens e DC, que é caracterizado pela expressão de CD7 e

CD34.^(15,31–33,49) Essas células também expressam CD117, CD135, CD38, CD44, CD45RA, e HLA-DR e tem a expressão variável de marcadores mieloides CD13 e CD33. Os precursores específicos linfoides T migram para o timo, diferenciando-se dos precursores das células NK.^(15,31–33,49)

No timo, os precursores linfoides T são chamados inicialmente de duplo negativos (DN) e não expressam CD4 ou CD8. Através de sinais mediados por Notch-1 e IL-7 passam a expressar CD4 e CD8, inicialmente expressando CD8 e, em seguida, expressando CD4 para formar uma população duplo-positiva (DP) CD4+/CD8+. Os timócitos DP selecionados positivamente migram para a região medular do timo e são induzidos a iniciar a diferenciação de linfócitos T CD4+CD8- ou CD8+CD4-.^(15,31–33) Nesta fase, os precursores de linfoides T também apresentam a expressão antigênica de CD2 e CD5.⁽¹⁵⁾ A diferenciação adicional para linfócitos está associada a uma ligeira diminuição dos níveis de CD3 intracitoplasmático e CD1a, acompanhado pela expressão de CD3 de superfície e complexo TCR na membrana da célula e um fenótipo de células T.⁽¹⁵⁾

A população de células T encontrada na MO normal compreende linfócitos T derivados de sangue periférico, portanto suas características fenotípicas apresentam padrões de linfócitos T maduros. No sangue periférico, a caracterização imunofenotípica é realizada através da expressão positiva para o marcador CD3. Observa-se três principais populações de linfócitos T maduros, os linfócitos T TCR gama/delta, os linfócitos T TCR alfa/beta CD4+CD8- e os CD8+CD4-.^(33,49)

A diferenciação de células NK foi originalmente identificada na MO, no entanto, experimentos subsequentes revelaram que células progenitoras hematopoiéticas e/ou precursores comprometidos com células NK podem trafegar da MO para tecidos periféricos, identificando que o desenvolvimento das células NK ocorre não apenas na MO, mas também em tecidos linfoides periféricos e órgãos não linfoides. Além disso alguns estudos demonstraram que células precursoras isoladas de diferentes locais de tecidos podem diferenciar-se em células NK maduras. O compromisso das CTH com a diferenciação das células NK inclui fatores de transcrição como ID2, PU.1, Ets - 1, TOX e NFIL3, e na sua maturação os fatores de transcrição Eomes e Tbet.⁽³³⁾

As células NK são identificadas devido à expressão simultânea de CD56 e CD16. Existem dois grupos principais de células NK que podem ser identificados em relação aos níveis de expressão de CD56, sendo elas: células NK CD56 (fraca expressão) e CD56 (forte expressão). As células NK CD56 (fraca expressão) estão

principalmente no sangue periférico e apresentam atividade citolítica potente e liberação rápida de interferon (IFN)- γ e outras citocinas ou quimiocinas após ativação através dos receptores de NK. As células NK CD56 (forte expressão) representam uma população menor no sangue periférico, enquanto são predominantes em tecidos e órgãos linfoides secundários e provavelmente são responsáveis pela produção de longa duração de quimiocinas e citocinas.⁽³³⁾

1.4.5 Células dendríticas plasmocitoides

As DC plasmocitoides podem surgir diretamente de CTH, de progenitores mieloides comuns e progenitores linfoides comuns.^(31,32) As DC plasmocitoides são positivas para HLA-DR, proteína associada a CD2 (CD2AP), CD4, CD68, CD123, CD303. Essas células apresentam expressão negativa para marcadores específicos de outras linhagens, como CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, mieloperoxidase (MPO), lisozima, CD11c, CD56 (na maior parte), CD34 e TdT. Em alguns casos a fraca expressão dos marcadores CD2, CD5, CD7, CD22, CD33 ou CD56 pode ser observada em DC plasmocitoides normais.^(15,52)

1.5 Objetivos

1. Determinar valores de referência relativos e absolutos de normalidade em medula óssea saudável por citometria de fluxo multiparamétrica, bem como padrões normais de maturação celular das diferentes linhagens hematopoiéticas.

2 MÉTODOS

2.1 Pacientes

O estudo foi composto por amostras de punção aspirativa de MO de pacientes do Hospital M'Boi Mirim – Dr. Moysés Deutsch com indicação de cirurgia ortopédica e resultados de hemograma com parâmetros dentro da normalidade. Foi estipulado que seriam realizadas 50 amostras, pois este valor já está acima do que é encontrado na literatura até o momento, a maioria dos estudos trabalha com um número relativamente pequeno de amostras.

A seleção dos pacientes foi realizada de acordo com os critérios de inclusão: indivíduos saudáveis maiores de 18 anos, sem acompanhamento clínico por enfermidade hematológica e sem tratamento com fatores de crescimento, drogas quimioterápicas, citotóxicas ou imunossupressoras.

Os critérios de exclusão do estudo foram indivíduos menores de 18 anos, realização de tratamentos prévios (quimioterapia, radioterapia, corticoides em altas doses e medicamentos para doenças autoimunes), uso de drogas ilícitas e a identificação de populações anômalas na análise imunofenotípica.

A MO foi obtida do mesmo local da cirurgia ortopédica ou da crista ilíaca anterior, uma vez que a MO é um tecido intraósseo presente na região da bacia, fêmur, vértebras, costela e esterno. O material foi coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético potássico (EDTA), respeitando o volume máximo de 2mL para evitar a hemodiluição do material.

2.2 Aspectos éticos da pesquisa

Trata-se de um estudo prospectivo, que utilizou amostras de MO coletadas de pacientes hígidos submetidos à cirurgia ortopédica, cuja assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ocorreu antes da cirurgia. A indicação clínica da cirurgia ortopédica não está relacionada à coleta de MO. Este estudo não interferiu na terapêutica, conduta clínica ou diagnóstica dos pacientes, além de não incluir grupos vulneráveis.

A análise crítica de desconfortos, riscos e benefícios do projeto demonstra que os riscos e desconforto previsíveis para a coleta do material foram mínimos para os pacientes, uma vez que o material foi obtido do mesmo local da cirurgia ortopédica. Foram adotadas medidas de confidencialidade e os dados foram analisados e tabulados de forma anônima.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Israelita Albert Einstein com o nº CAAE 82751318.2.0000.0071 e nº SGPP 3262-17 desde 23 de fevereiro de 2018. Os custos e insumos deste projeto foram aprovados pelo Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein – setor de Citometria Fluxo, responsável pelo desenvolvimento deste projeto.

2.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Os aspirados de MO foram processados dentro do período de até 48 horas após a coleta, a viabilidade celular do material foi avaliada através da marcação com 7-Actinomicina D (7-AAD).

Como critério de inclusão foram processadas as amostras que apresentaram viabilidade maior ou igual a 90% de células viáveis. Foram confeccionadas lâminas para a visualização morfológica dos materiais recebidos acondicionados em tubo com anticoagulante EDTA. As amostras foram processadas no contador hematológico XN10 (Sysmex®) número de série: 21543.

Na tabela 6 está a relação dos insumos utilizados (anticorpos e reagentes).

Tabela 6. Reagentes e anticorpos monoclonais utilizados

CD/ Corante	Fluorocromos	Clone	Referência	Fabricante
7-AAD			A07704	Beckman Coulter
CD45 FITC	FITC	J33	A07782	Beckman Coulter
CD4 FITC	FITC	13B8.2	A07750	Beckman Coulter
KAPPA FITC	FITC	Polyclonal	A64828	Beckman Coulter
CD16 FITC	FITC	3G8	IM0814U	Beckman Coulter
CD36 FITC	FITC	FA6.152	IM0766U	Beckman Coulter
CD38 FITC	FITC	T16	A07778	Beckman Coulter
CD57 FITC	FITC	NC1	IM0466U	Beckman Coulter
CD8 PE	PE	B9.11	A07757	Beckman Coulter

continua...

...continuação

LAMBDA PE	PE	Polyclonal	PN64827	Beckman Coulter
CD13 PE	PE	L138	L138	BD
CD14 PE	PE	MoP9	347497	BD
CD105 PE	PE	1G2	B76299	Beckman Coulter
CD203c PE	PE	97A6	IM3575	Beckman Coulter
CD56 PE	PE	N901	IM2073U	Beckman Coulter
CD16 PE	PE	3G8	A07766	Beckman Coulter
CD3 ECD	ECD	UCHT1	A07748	Beckman Coulter
CD14 ECD	ECD	RMO52	IM2707U	Beckman Coulter
CD38 ECD	ECD	LS198-4-3	A99022	Beckman Coulter
CD64 ECD	ECD	22	A98434	Beckman Coulter
CD8 ECD	ECD	SFC121Thy2D3	737659	Beckman Coulter
CD33 PC5.5	PC5.5	D3HL60.251	B36289	Beckman Coulter
CD34 Percp.5.5	Percp.cy.5	8G12	347203	BD
CD11c PC5.5	PC5.5	BU15	B19719	Beckman Coulter
CD3 PC5.5	PC5.5	UCHT1	A66327	Beckman Coulter
CD20 PC7	PC7	B9E9	IM3629	Beckman Coulter
CD56 PC7	PC7	N902 (NKH-1)	A21692	Beckman Coulter
CD117 PC7	PC7	104D2D1	IM3698	Beckman Coulter
CD19 PC7	PC7	J3-119	IM3628	Beckman Coulter
CD34 APC	APC	581	IM2472	Beckman Coulter
IREM-2	APC	UP-H2	656158	BD
CD123 APC	APC	SSDCLY107D2	B06376	Beckman Coulter
CD2 APC	APC	39C1.5	A60794	Beckman Coulter
KAPPA APC	APC	TB28-2	1A-674-T100	EXBIO
CD326 APC	APC	9C4	324208	Biolegend
CD19 A700	APC-A700	J3-119	A78837	Beckman Coulter
CD10 A700	APC-A700	ALB1	A86353	Beckman Coulter
CD71 A700	APC-A700	YDJ1.2.2	A97051	Beckman Coulter
CD7 A700	APC-A700	8H8.1	B36290	Beckman Coulter
CD10 A750	APC-A750	ALB1	A86353	Beckman Coulter
CD11b A750	APC-A750	Baer1	B36295	Beckman Coulter
CD38 A750	APC-A750	LS198-4-3	A86049	Beckman Coulter
CD4 A750	APC-A750	13B8.2	A94682	Beckman Coulter
Lambda	APC-H7	1-155-2	656648	BD
CD5 PB	Pacific Blue	BL1a	A82790	Beckman Coulter
CD15 PB	Pacific Blue	80H5	A74775	Beckman Coulter
HLA-DR PB	Pacific Blue	Immu-357	B36291	Beckman Coulter
CD45 V450	V450		642275	BD
CD45 KO	Krome Orange	J33	B36294	Beckman Coulter
CD138 V500	V500	MI15	650659	BD
Excellyse Live			ED706B	EXBIO
Flow Count			7547053	Beckman Coulter
PBS			70011-044	GIBCO
FIX & PERM			GAS-002-1	Nordic MUBio

As combinações de anticorpos monoclonais utilizadas foram decididas com base na literatura de dados para classificar diferentes linhagens de células hematopoiéticas, através de um painel de 10 cores (Tabela 7).^(1,3,6,8,15,17,18) A combinação de anticorpos utilizados no tubo 2 foi seguida de acordo com a estratégia utilizada no estudo de Rajab et al.⁽¹⁴⁾ Todos os anticorpos utilizados neste estudo foram previamente titulados.

A escolha da combinação de anticorpos em 10 fluorescências diferentes para os 8 tubos utilizados foi projetada respeitando a quantidade de detectores disponíveis no equipamento para identificar as linhagens presentes na MO e expressões de antígenos aberrantes nas células imaturas, a fim de demonstrar as populações linfoides B e T (tubos 1 e 8 respectivamente), as maturações granulocítica, monocítica e eritroide (tubos 3, 4 e 5, respectivamente), além da identificação das populações de basófilos, dendríticas plasmocitoides e plasmócitos (tubo 6) e a clonalidade de plasmócitos (tubo 7).

Tabela 7. Painel para a caracterização e identificação das linhagens celulares estudadas

Canal	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
FITC	CD45	CD4 CLK(s)	CD16	CD16	CD36	CD45	CD38	CD57
PE		CD8 CLL(s)	CD13	CD14	CD105	CD203c	CD56	CD16
ECD		CD3 CD14	CD38	CD64	CD64	CD38		CD8
PC5	7-AAD	CD33	CD33	CD34	CD33	CD33		CD3
PC7		CD20 CD56	CD117	CD117	CD117	CD56	CD19	CD56
APC		CD34	CD34	CD300e	CD34	CD123	CLK(i)	CD2
APC A700		CD19	CD10		CD71			CD7
APC A750		CD10	CD11b	CD11b		CD19	CLL(i)	CD4
PB		CD5	CD15	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	CD45	CD5
KO		CD45	CD45	CD45	CD45	CD138	CD138	CD45

CLK: cadeia leve kappa intracitoplasmática; CLL: cadeia leve lambda intracitoplasmática; (i): intracitoplasmático e (s): superfície.

Para minimizar o ruído ao medir os leucócitos, os eritrócitos nas amostras de MO foram lisados através da solução de cloreto de amônio (NH₄Cl) EXBIO®, que preserva somente os eritrócitos nucleados que são resistentes a hemólise,⁽⁷⁾ além de evitar a perda seletiva de células e conservar as características de SSC. Para os tubos 1 a 6 e 8 as hemácias foram lisadas utilizando solução de hemólise NH₄Cl pelas técnicas “Lyse and Wash” ou “Lyse no Wash” (Quadros 1 e 2).

Para marcação intracitoplasmática de Kappa e Lambda (tubo 7), as células foram fixadas e permeabilizadas, utilizando o kit para marcações intracitoplasmáticas FIX & PERM (Nordic MUBio®), que consiste em dois reagentes: fixador e permeabilizante/hemolisante (Quadro 3).

O processo técnico de marcação seguiu o procedimento operacional padrão previamente validado no setor de CFM do Hospital Israelita Albert Einstein.

Quadro 1. Procedimento técnico “*Lyse no Wash*”

- a) Utilizar 1×10^6 de células de MO e marcar com os respectivos anticorpos, conforme descrito na tabela 1;
- b) Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz;
- c) Adicionar 2mL de solução de hemólise (cloreto de amônio);
- d) Incubar por 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz;
- e) Adicionar 100µL de *beads* (Beckman Coulter®.) com o auxílio da pipeta eletrônica por pipetagem inversa;
- f) Homogeneizar o tubo em vórtex (velocidade de 4 a 5) e a amostra está pronta para aquisição no citômetro.

Fonte: Roa-Higuera DC, Fiorentino S, Rodríguez-Pardo VM, Campos-Arenas AM, Infante-Acosta EA, Cardozo-Romero CC, et al. Immunophenotypic analysis of normal cell samples from bone marrow: applications in quality control of cytometry laboratories. *Univ Sci (Bogota)*. 2010;15(3):206-23.⁽⁴⁾

Nies KP, Kraaijvanger R, Lindelauf KH, Drent RJ, Rutten RM, Ramaekers FC, et al. Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. *Cytometry Part A*. 2018;93(11):1097-105.⁽¹³⁾

Correia RP, Rajab A, Bento LC, Alexandre AM, Vaz AC, Schimidell D, et al. A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(2):136-43.⁽⁵³⁾

Quadro 2. Procedimento técnico “*Lyse and Wash*”

- a) Utilizar 1×10^6 células de MO e marcar com os respectivos anticorpos, conforme descrito na tabela 1;
- b) Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz;
- c) Adicionar 2mL de solução de hemólise (cloreto de amônio);
- d) Incubar por 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz;
- e) Adicionar 2 mL de tampão de fosfato salino (PBS);
- f) Centrifugar a 1800 RPM por 5 minutos;
- g) Ressuspender a amostra em 0,5mL de PBS para aquisição em citômetro de fluxo.

Fonte: Roa-Higuera DC, Fiorentino S, Rodríguez-Pardo VM, Campos-Arenas AM, Infante-Acosta EA, Cardozo-Romero CC, et al. Immunophenotypic analysis of normal cell samples from bone marrow: applications in quality control of cytometry laboratories. *Univ Sci (Bogota)*. 2010;15(3):206-23.⁽⁴⁾

Nies KP, Kraaijvanger R, Lindelauf KH, Drent RJ, Rutten RM, Ramaekers FC, et al. Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. *Cytometry Part A*. 2018;93(11):1097-105.⁽¹³⁾

Correia RP, Rajab A, Bento LC, Alexandre AM, Vaz AC, Schimidell D, et al. A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(2):136-43.⁽⁵³⁾

Quadro 3. Procedimento técnico para marcação intracitoplasmática

- a) Utilizar 1×10^6 de células de MO e marcar com os respectivos anticorpos, conforme descrito na tabela 1; exceto os marcadores intracitoplasmáticos (em vermelho);
- b) Incubar por 20 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz;
- c) Adicionar 100µL de solução A do kit intracitoplasmático FIX & PERM Incubar por 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz;
- d) Adicionar 4mL de tampão de fosfato salino (PBS);
- e) Centrifugar a 1800 RPM por 5 minutos;
- f) Ressuspender a amostra e adicionar 100µL de solução A do kit intracitoplasmático FIX & PERM Incubar por 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz;
- g) Adicionar 4mL de tampão de fosfato salino (PBS);
- h) Centrifugar a 1800 RPM por 5 minutos;
- i) Ressuspender a amostra em 0,5mL de PBS para aquisição em citômetro de fluxo.

Fonte: Roa-Higuera DC, Fiorentino S, Rodríguez-Pardo VM, Campos-Arenas AM, Infante-Acosta EA, Cardozo-Romero CC, et al. Immunophenotypic analysis of normal cell samples from bone marrow: applications in quality control of cytometry laboratories. Univ Sci (Bogota). 2010;15(3):206-23.⁽⁴⁾

Adaptado de Nies KP, Kraaijvanger R, Lindelauf KH, Drent RJ, Rutten RM, Ramaekers FC, et al. Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. Cytometry Part A. 2018;93(11):1097-105.⁽¹³⁾

Correia RP, Rajab A, Bento LC, Alexandre AM, Vaz AC, Schimidell D, et al. A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. Int J Lab Hematol. 2018;40(2):136-43.⁽⁵³⁾

O equipamento de CF utilizado para a aquisição das amostras foi o Navios Flow Cytometer número de série AZ12241 e AZ45345 (Beckman Coulter®). A verificação diária do sistema de alinhamento óptico e fluídico do citômetro foi realizada através das Fluoresferas Flow check™ e FlowSet (Beckman Coulter®). A compensação foi realizada semestralmente e/ou a cada manutenção preventiva executada no equipamento, seguindo as recomendações do fabricante. Foram adquiridos aproximadamente 500.000 eventos na região de celularidade total, incluindo a população de eritroblastos.

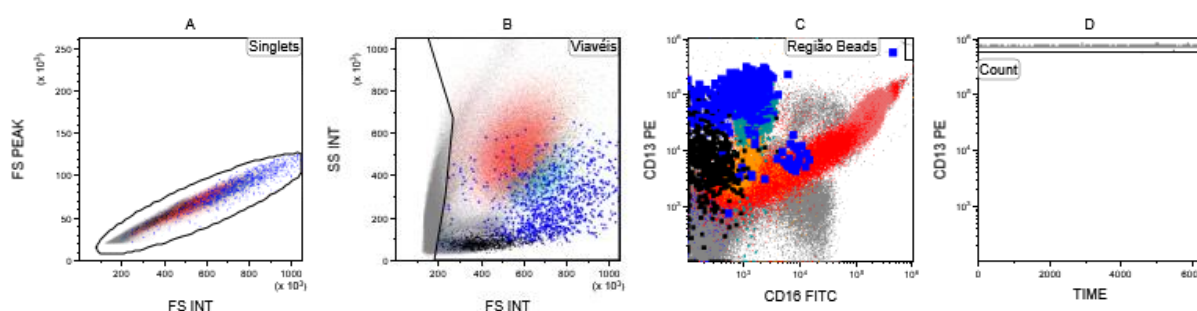
2.4 Análise de dados e estratégias de *gate*

A análise de dados foi realizada utilizando o *software* Kaluza (Beckman Coulter®). Foi criado um protocolo de análise para cada tubo e replicado para todas as amostras do estudo, mantendo assim a padronização na análise e interpretação dos dados. Devido à diferença de anticorpos utilizados para cada tudo, as estratégias de análise utilizadas foram padronizadas de acordo com a população de interesse. O *software* de análise foi selecionado devido à disponibilidade, fácil manuseio, padronização de estratégias de análise dos *dot plots* e histogramas, análise booleanas, cálculos padronizados e ajuste de compensação quando necessário.

O cálculo realizado para quantificação da celularidade em valores absolutos por plataforma única foi realizado através da adição de *beads* de quantificação no material a ser analisado no citômetro de fluxo. Após a aquisição dos dados, na estratégia de análise, foi realizado um cálculo através dos valores do número total de eventos adquiridos dividido pelo número de eventos de *beads*, o resultado foi multiplicado pela concentração de *beads* disponível na bula do fornecedor.

A estratégia de análise inicial foi realizada através de um histograma biparamétrico plotando FSC-H (FS PEAK) x FSC para remover células em que passaram ao mesmo tempo pelo laser, formando duplas. Seguida pela estratégia FSC *versus* SSC, em que, usando limiares baixos para esses parâmetros, permitiu excluir restos celulares, plaquetas, detritos e glóbulos lipídicos. Em todos os tubos realizados está presente o marcador CD45, que também é um parâmetro importante para purificar as populações de interesse de acordo com a expressão de CD45 *versus* SSC.

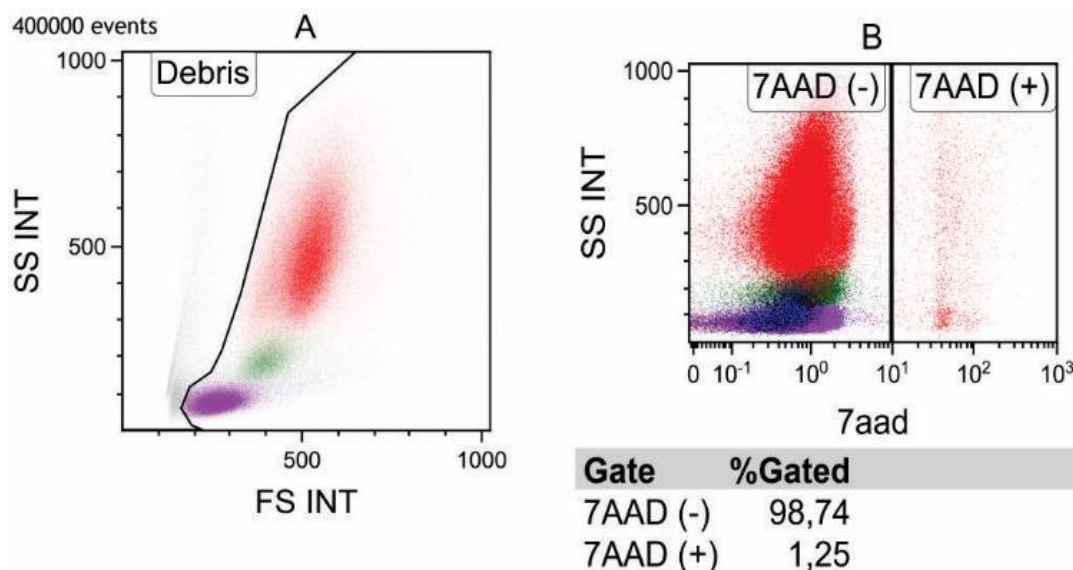
Na figura 5 é evidenciada a estratégia de análise utilizada para identificação e seleção das *beads*, assim como das populações estudadas.



A: Na região “total de células” (*ungate*) apresentadas em um cruzamento de FSC-H (FS PEAK) x FSC (FS) foi selecionado a população de “*singlets*”; **B:** Na região de “*singlets*” em um cruzamento de SSC com FSC foi selecionado a população de “células viáveis”; **C:** Na região de “células viáveis” apresentadas, em um cruzamento nos canais de fluorescência FITC e PE, foi selecionada a população “região de *beads*” fluorescente nestes canais no final da escala do *dot plot* em 10^6 ; **D:** Na região de “região de *beads*”, em um *dot plot* de PE x TIME foi selecionado a população de “*count*”.

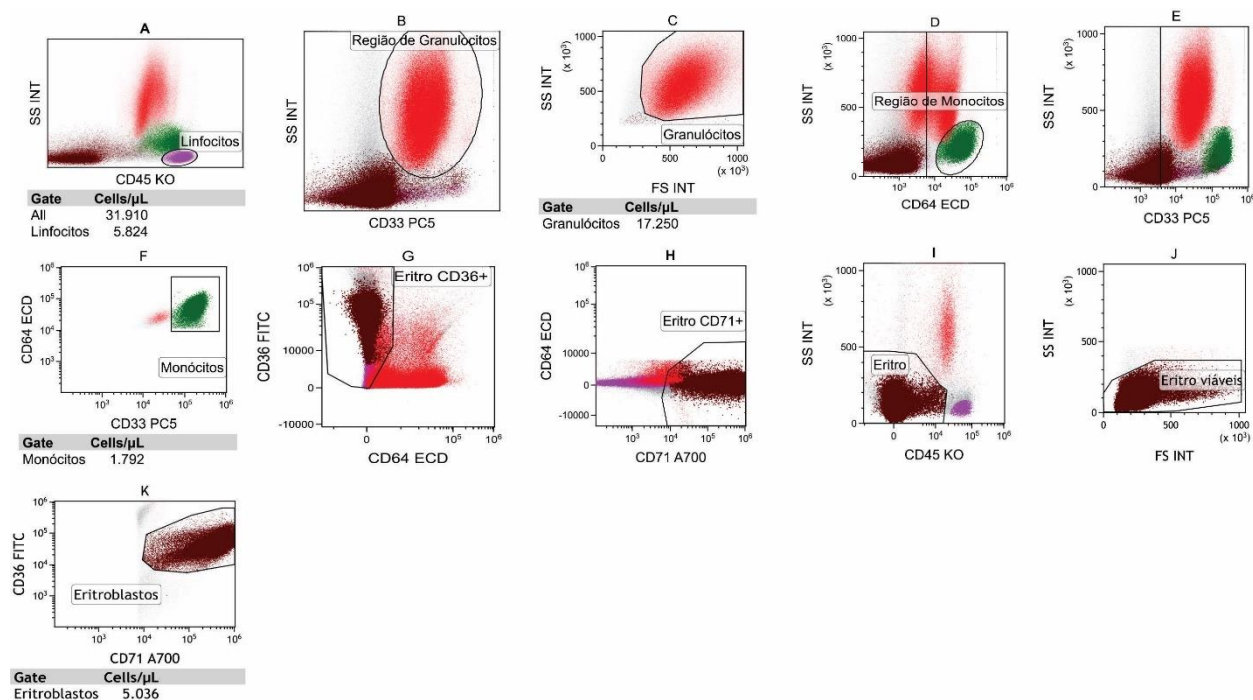
Figura 5. Estratégia de análise para identificar as *beads* e purificação da população leucocitária

Para determinar a viabilidade celular das amostras foi realizada a marcação com o corante de viabilidade corante 7-actinomicina D (7AAD) (tubo 1). A estratégia de análise pode ser observada na figura 6.



A: Região total de células total de células (total de células), apresentadas em um cruzamento de FSC e SSC, foi excluída a população de “*debris*”; **B:** Na região de total células (sem *debris*) foram classificadas duas populações de acordo com a expressão do corante 7AAD, células inviáveis “7AAD (+)” e células viáveis “7AAD (-)”.
Figura 6. Estratégia de análise para quantificação de células viáveis

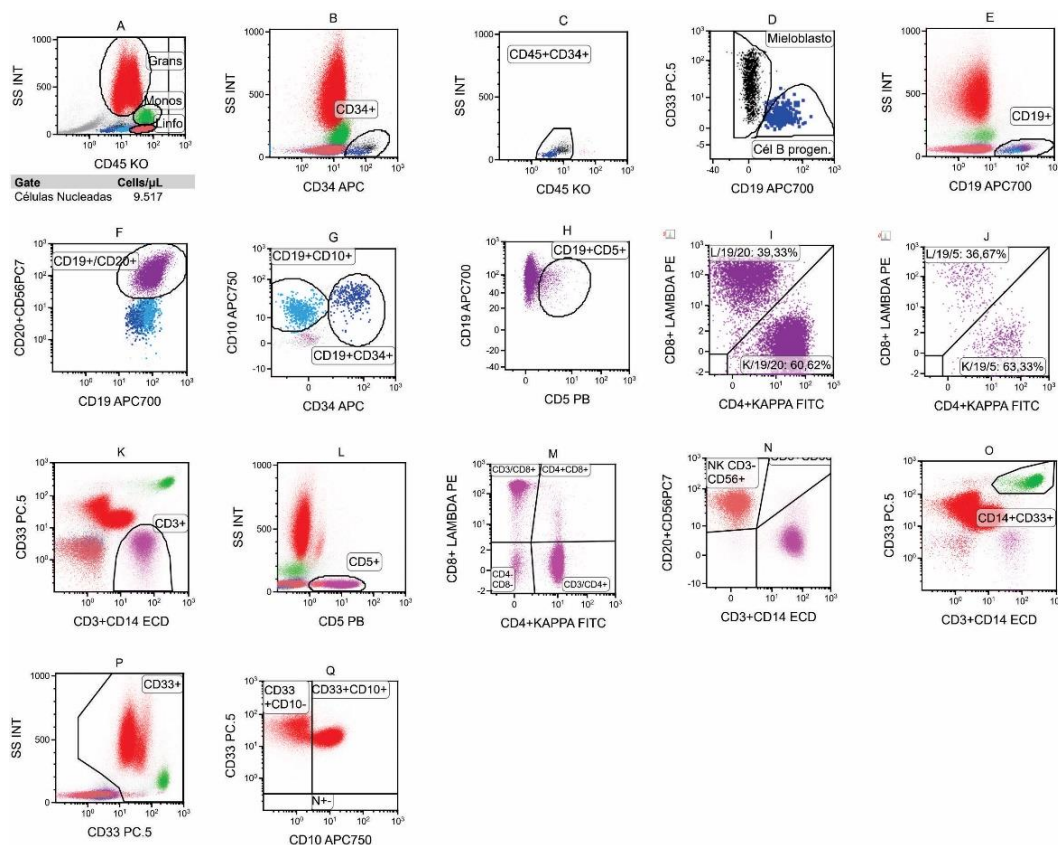
A celularidade da amostra foi determinada por duas metodologias. Através da contagem em um analisador hematológico XN (plataforma dupla) e através da adição de *beads* de quantificação adicionadas no tubo de marcação (plataforma única). Para comparação foi utilizada a quantificação de celularidade obtida através da marcação do tubo 5 (maturação eritroide), onde temos marcadores suficientes para separar as principais populações celulares estudadas, dentre estas populações os eritroblastos que se localizam na região de células CD45 negativas, através da estratégia de análise demonstrada na figura 7.



A: Total de células nucleadas apresentadas em cruzamento de SSC e CD45, foi selecionada a população de células de baixa complexidade e CD45 de forte expressão e denominada “linfócitos”; **B:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população de células de alta complexidade e CD33 de moderada expressão e denominada região de granulócitos; **C:** Na “região de granulócitos”, apresentadas em cruzamento de SSC e FSS, foi selecionada a população de células de alta complexidade e tamanho e denominada granulócitos; **D:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população de células de baixa a média complexidade e CD64 de forte expressão e denominada “região de monócitos”; **E:** Na região de total células (sem *debris*), apresentadas em um cruzamento de SSC e CD33, foi observado se a “região de monócitos” expressam fortemente CD33; **F:** Na “região de monócitos” foi selecionada a população duplo positiva para CD64 e CD33 e denominadas “monócitos”; **G:** Na região “células nucleadas (sem monócitos)”, apresentadas em um cruzamento de CD36 e CD64, foi selecionada a população de CD36 positiva e CD64 negativa e denominada “eritro CD36+”; **H:** Na região “eritro CD36+”, apresentadas em cruzamento de CD64 e CD71, foi selecionada a população de CD71 positiva e CD64 negativa e denominada “eritro CD71+”; **I:** Na região “eritro CD71+”, apresentadas em cruzamento de SSC e CD45, foi selecionada a população de baixa a média complexidade de CD45 de negativa a fraca expressão e denominada “eritro”; **J:** Na região “eritro”, apresentadas em um cruzamento de SSC e FSC, foi selecionada a população de baixa a média complexidade e baixo tamanho relativo e denominada “eritro viáveis”; **K:** Na região “eritro viáveis”, apresentadas em cruzamento de CD36 e CD71, foi selecionada a população duplo positiva para CD36 e CD71 e denominadas de “eritroblastos”.

Figura 7. Estratégia de análise para quantificação de células em valores absolutos por citometria de fluxo

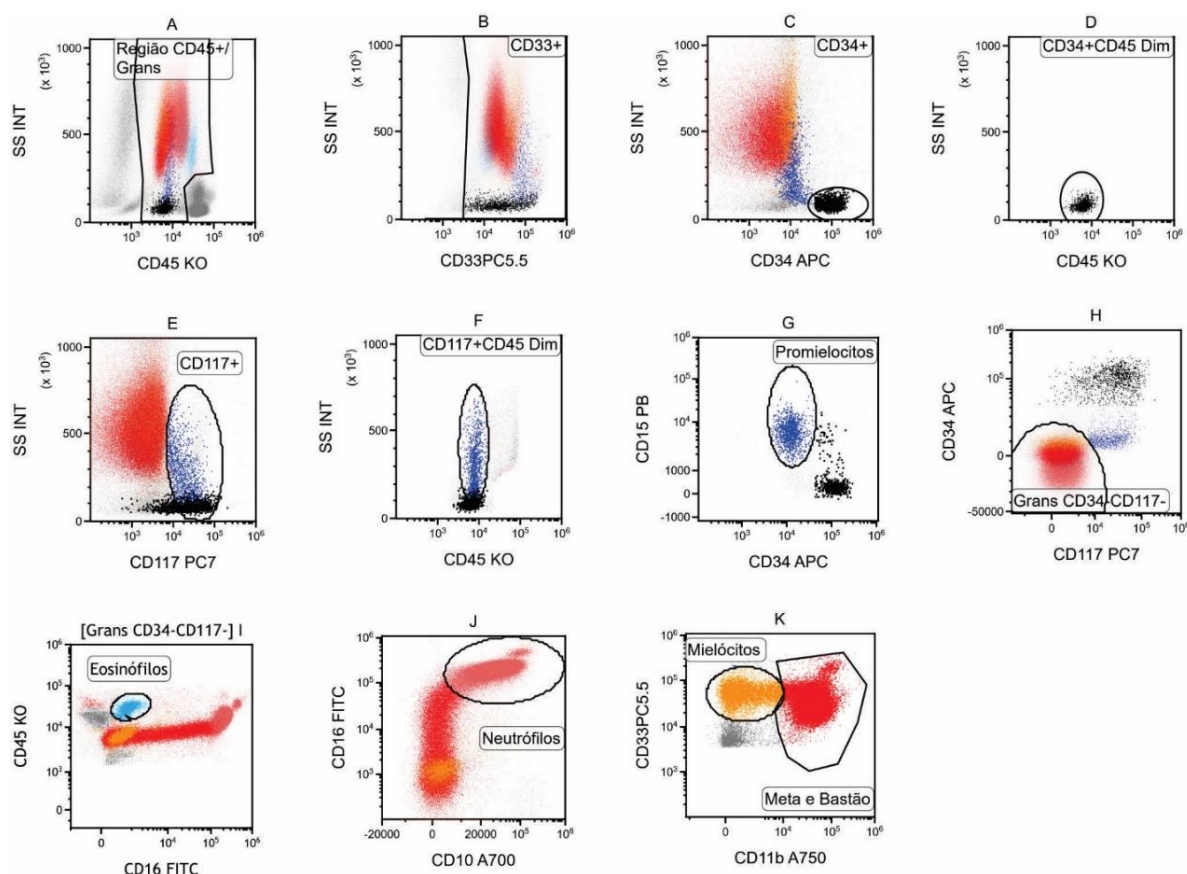
Por meio da combinação de anticorpos utilizadas no tubo 2 foi realizada a quantificação absoluta e relativa de precursores CD34, linfócitos B, linfócitos T, granulócitos e monócitos maduros. Na figura 8, podemos observar a estratégia de análise utilizada.



A: Total de células nucleadas; **B:** Na região “células nucleadas” a população com expressão positiva de CD34 foi classificada como CD34+; **C:** Na região “CD34+”, a população de células com expressão negativa a fraca de CD45 foi classificada como CD45+CD34+; **D:** Na região “CD45+CD34+” foi separada de expressão positiva para CD19 e negativa para CD33, classificada como precursores linfoides B (azul escuro) e positiva para CD33 e negativa para CD19, classificada como precursores mieloides (preto); **E:** Na região “células nucleadas” a população com expressão positiva de CD19 foi classificada como CD19+ (roxo); **F:** Na região “CD19+” a população com expressão positiva de CD20 foi classificada CD19+CD20+; **G:** Na região de células CD19+ a população com expressão positiva de CD10 e negativa para CD34 foi classificada como CD19+CD10+ (azul claro) e a população com expressão positiva de CD10 e CD34 foi classificada como CD19+CD34+ (azul escuro); **H:** Na região de células CD19+ a população com expressão positiva de CD5 foi classificada como CD19+ CD5+; **I:** Na região “CD19+CD20+” foram separadas duas populações de acordo com a expressão positiva para kappa e negativa para lambda, classificada como linfócitos B maduros cadeia leve kappa, ou positiva para lambda e negativa para kappa, classificada como linfócitos B maduros cadeia leve lambda; **J:** Na região “CD19+CD5+” foram separadas duas populações de acordo com a expressão positiva para kappa e negativa para lambda, classificada como linfócitos B CD5+ cadeia leve kappa, ou positiva para lambda e negativa para kappa, classificada como linfócitos B CD5+ cadeia leve lambda; **K:** Na região “células nucleadas” a população com expressão positiva de CD3 e negativa para CD33 foi classificado como CD3+ (rosa); **L:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD5 foi classificada como CD5+; **M:** A região “CD3+” foi separada em quatro populações de acordo com a expressão de positiva para CD4 e negativa para CD8 classificada como CD3/CD4+, positiva para CD8 e negativa para CD4 classificada como CD3/CD8+, positiva para CD4 e CD8 classificada como CD4+CD8+ e negativa para CD4 e CD8 classificada com CD4-CD8-; **N:** Na região “linfo” através do *gate* inicial do histograma A e com uma estratégia booleana para excluir a população de linfócitos B, a população com expressão positiva de CD56 e negativa para CD3 foi classificado como NK CD3-CD56+ (marrom); **O:** Na região “células nucleadas” a população com expressão positiva de CD14 e negativa para CD3 foi classificada como CD14+CD33+; **P:** Na região “células nucleadas” a população com aumento no SSC e expressão intermediária de CD33 foi classificado como CD33+; **Q:** A região “grans” foi separada em duas populações de acordo com a expressão positiva para CD10, classificada como CD33+CD10+, e expressão negativa de CD10, classificada como CD33+CD10-.

Figura 8. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 2

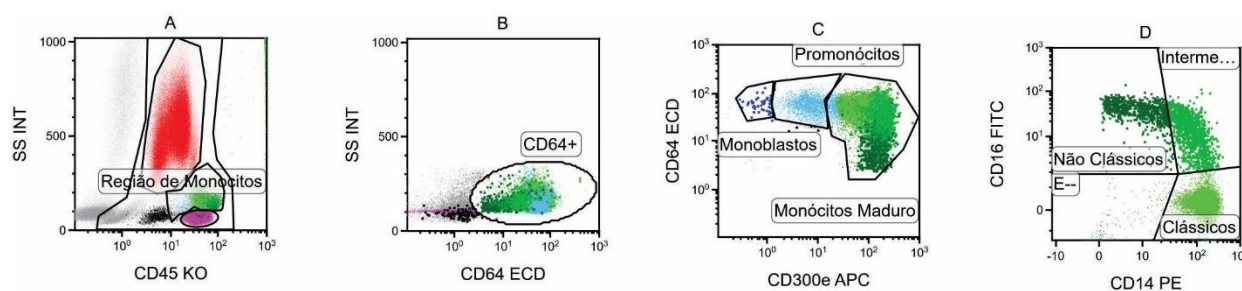
Por meio da combinação de anticorpos utilizada no tubo 3 foi realizada a quantificação absoluta e relativa de mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos/bastonetes, neutrófilos e eosinófilos. Na figura 9, podemos observar a estratégia de análise utilizada.



A: Total de células nucleadas apresentadas em cruzamento de SSC e CD45, foi selecionada a população de células de baixa a alta complexidade e CD45 de fraca a moderada expressão e denominada “região CD45+/grans”; **B:** Na região “CD45+/grans” foi selecionada a população de células que expressa CD33 e denominada região CD33+; **C:** Na região “CD33+” foi selecionada a população de células de que expressa CD34 e denominada CD34+; **D:** Na região “CD34+” foi selecionada a população de células de baixa complexidade e CD45 de fraca a moderada expressão e denominada CD34+CD45 dim; **E:** Na região “CD33+” foi selecionada a população de células expressa CD117 e denominada CD117+; **F:** Na região “CD117+” foi selecionada a população de células de baixa a média complexidade e CD45 de fraca a moderada expressão e denominada CD117+ CD45 dim; **G:** Na região “CD117+ CD45 dim” foi selecionada a população com expressão positiva para CD15 e negativa para CD34 e classificada como promielócito; **H:** Na região “CD33+” foi selecionada a população com expressão negativa para CD34 e CD117 e classificada como grans CD34-CD117-; **I:** Na região “grans CD34-CD117-” foi selecionada a população com forte expressão de CD45 e negativa expressão de CD16 e classificada como eosinófilos; **J:** Na região “grans CD34-CD117-” com estratégia booleana para exclusão de eosinófilos foi selecionada a população de células com expressão positiva de CD16 e CD10 e classificada como neutrófilos; **K:** Na região “grans CD34-CD117-” com estratégia booleana para exclusão de eosinófilos e neutrófilos foi selecionada a população de células com expressão positiva para CD33 e negativa para CD11b e classificada como mielócitos e a população positiva para CD33 e CD11b classificada como meta e bastão.

Figura 9. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 3

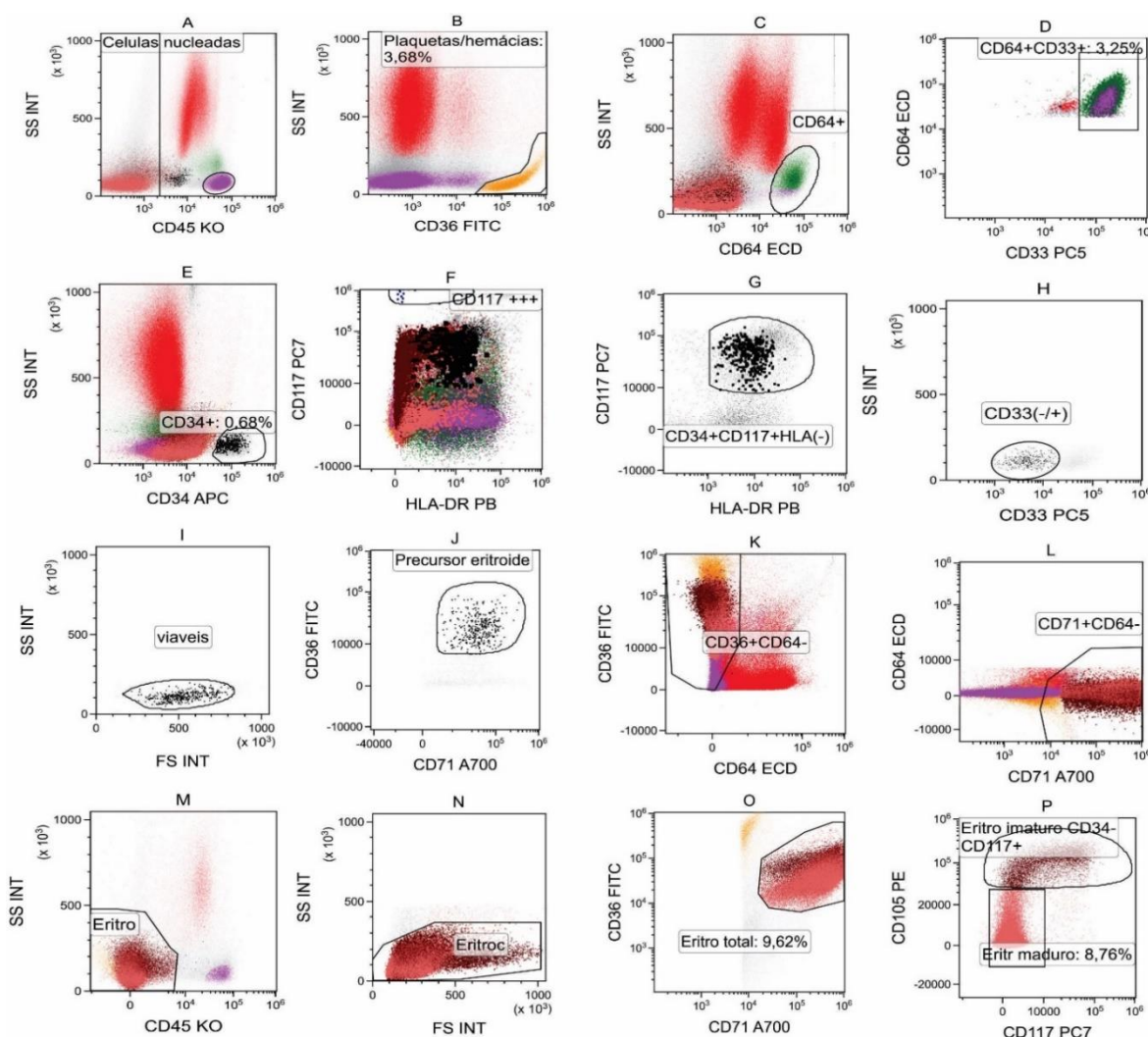
Por meio da combinação de anticorpos utilizadas no tubo 4 foi realizada a quantificação absoluta e relativa de monoblastos, promonócitos, monócitos maduros (clássico, intermediário e não clássico). Na figura 10, podemos observar a estratégia de análise utilizada.



A: Total de células nucleadas apresentadas em cruzamento de SSC e CD45, foi selecionada a população de células de moderada complexidade e CD45 moderada a forte expressão e denominada “região de monócitos”; **B:** Na “região de monócitos” foi selecionada a população de células que expressam CD64 e denominada “CD64+”; **C:** Na região “CD64+” foi selecionada a população de células com expressão positiva de CD64 e ausência de CD300e foi classificada como monoblastos e promonócitos e a população com expressão positiva para CD64 e CD300e foi classificada como monócitos maduros; **D:** Na região “monócitos maduros” a população com expressão fraca de CD14 e positiva para CD16 foi classificada como “não clássico”, a população positiva para CD14 e CD16 foi classificada como “intermediário” e a população com expressão positiva para CD14 e negativa para CD16 foi classificada como “clássicos”.

Figura 10. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 4

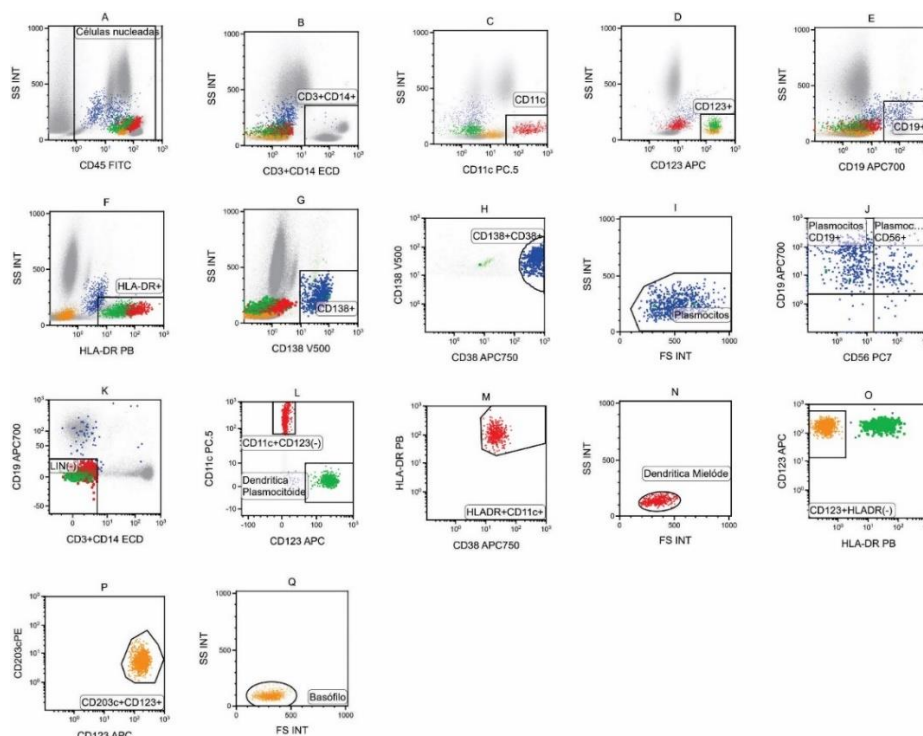
Por meio da combinação de anticorpos utilizadas no tubo 5 foi realizada a quantificação absoluta e relativa de precursores eritroides, eritroblastos imaturos e eritroblastos maduros. Na figura 11, podemos observar a estratégia de análise utilizada.



A: Total de células nucleadas apresentadas em cruzamento de SSC e CD45; **B:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população de células que expressa CD36 de moderada a forte expressão e denominada plaquetas/hemácias; **C:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população de células com forte expressão de CD64 e denominada CD64+; **D:** Na região “CD64+” foi selecionada a população de células com forte expressão de CD33 e denominada CD64+CD33+; **E:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população de células com forte expressão de CD117 e denominada CD34+; **F:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população de células com forte expressão de CD117 e denominada CD117+++; **G:** Na região “CD34+” foi selecionada a população de células com expressão positiva de CD117 e negativa para HLA-DR e denominada CD34+CD117+HLA(-); **H:** Na região “CD34+CD117+HLA(-)” foi selecionada a população de baixa complexidade com expressão negativa a fraca de CD33 e denominada CD33(-/+); **I:** Na região “CD33(-/+)” apresentada em cruzamento de SSC e FSC, foi selecionada a população de baixa a média complexidade e baixo tamanho relativo e denominada viáveis; **J:** Na região “viáveis” foi selecionada a população com expressão positiva para CD36 e CD71 e denominada precursor eritroide; **K:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população CD36 positiva e CD64 negativa e denominada de CD36+CD64-; **L:** Na região “CD36+CD64-” foi selecionada a população CD71 positiva e CD64 negativa e denominada “CD71+CD64-”; **M:** Na região “CD71+CD64-”, apresentada em cruzamento de SSC e CD45, foi selecionada a população de baixa a média complexidade de CD45 de negativa a fraca expressão e denominada “eritro”; **N:** Na região “eritro”, apresentada em cruzamento de SSC e FSC, foi selecionada a população de baixa a média complexidade e baixo tamanho relativo e denominada eritro viáveis; **O:** Na região “eritro viáveis”, apresentadas em cruzamento de CD36 e CD71, foi selecionada a população duplo positiva para CD36 e CD71 e denominada de eritro total; **P:** Na região “eritro total” foi selecionada a população com expressão positiva para CD117 e CD105 e denominada como eritro imaturo e a população de células com expressão negativa para CD117 e fraca a negativa para CD105 denominada de eritro maduro.

Figura 11. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 5

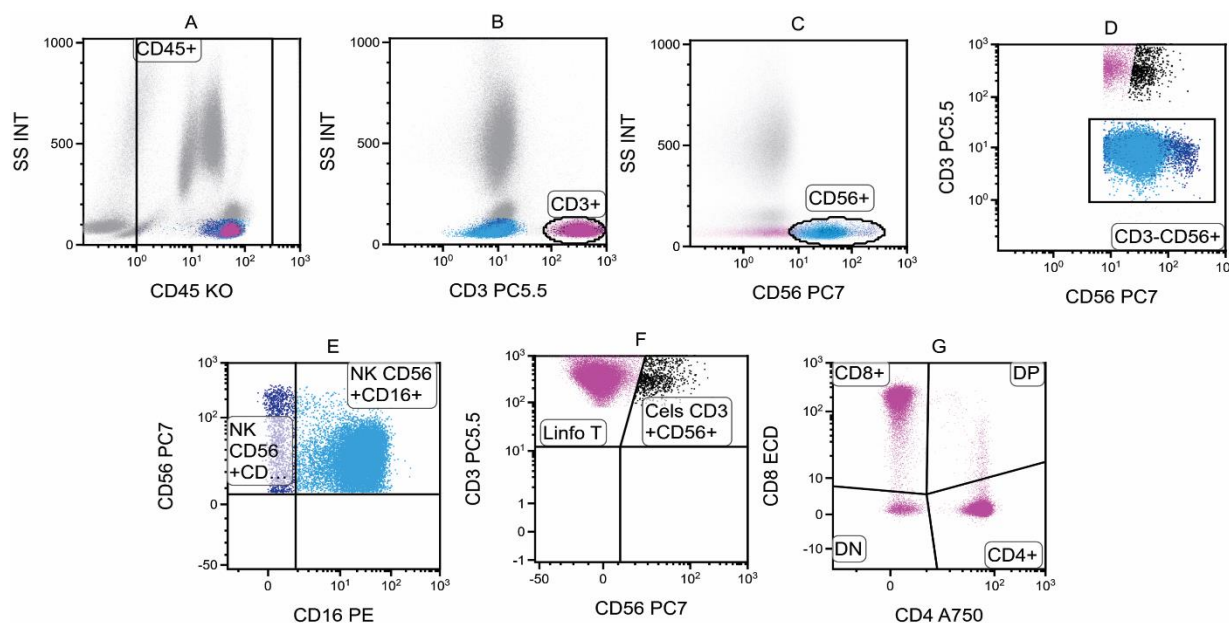
Por meio da combinação de anticorpos utilizadas no tubo 6 foi realizada a quantificação absoluta e relativa de basófilos, plasmócitos, DC mieloides e plasmocitoides. Na figura 12, podemos observar a estratégia de análise utilizada.



A: Total de células nucleadas apresentadas em cruzamento de SSC e CD45; **B:** Na região “células nucleadas” a população com expressão positiva forte de CD3/CD14 foi classificada como CD3+CD14+; **C:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD11c foi classificada como CD11c+; **D:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD123 foi classificada como CD123+; **E:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD19 foi classificada como CD19+; **F:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de HLA-DR foi classificada como HLA-DR+; **G:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD138 foi classificada como CD138+; **H:** Na região “CD138+” a população de células com expressão positiva de CD38 e CD138 foi classificada como CD138+CD38+; **I:** Na região “CD138+CD38+” apresentadas em cruzamento de SSC e FSC, foi selecionada a população de baixa a média complexidade e tamanho relativo e denominada “plasmócitos”; **J:** Na região “plasmócitos” a população de células com expressão positiva de CD19 foi classificada como CD138+CD19+ e a população com expressão positiva de CD56 foi classificada como CD138+CD56+; **K:** Na região “células nucleadas” foi selecionada a população com expressão negativa para CD3, CD14 e CD19, e classificada como LIN(-); **L:** Na região de “LIN(-) e HLA-DR+” a população com expressão positiva para CD11c e negativa para CD123 foi classificada como CD11c+CD123- e a população com expressão positiva para CD123 e negativa para CD11c foi classificada como dendrítica plasmocitoides; **M:** Na região “CD11c+CD123-” a população com expressão positiva para HLA-DR e CD38 foi classificada como HLA-DR+CD11c+; **N:** Na região “HLA-DR+CD11c+” apresentadas em um cruzamento de SSC e FSC, foi selecionada a população de baixa complexidade e tamanho e denominada dendrítica mielóide; **O:** Na região “CD123” foi selecionada a população com expressão positiva para CD123 e negativa para HLA-DR e classificada como CD123+HLA-DR(-); **P:** Na região “CD123+HLA-DR(-)” foi selecionada a população com expressão positiva para CD123 e CD203c e classificada como “CD203c+CD123+”; **Q:** Na região “CD203c+CD123+” apresentada em cruzamento de SSC e FSC, foi selecionada a população de baixa complexidade e tamanho e denominada basófilos.

Figura 12. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 6.

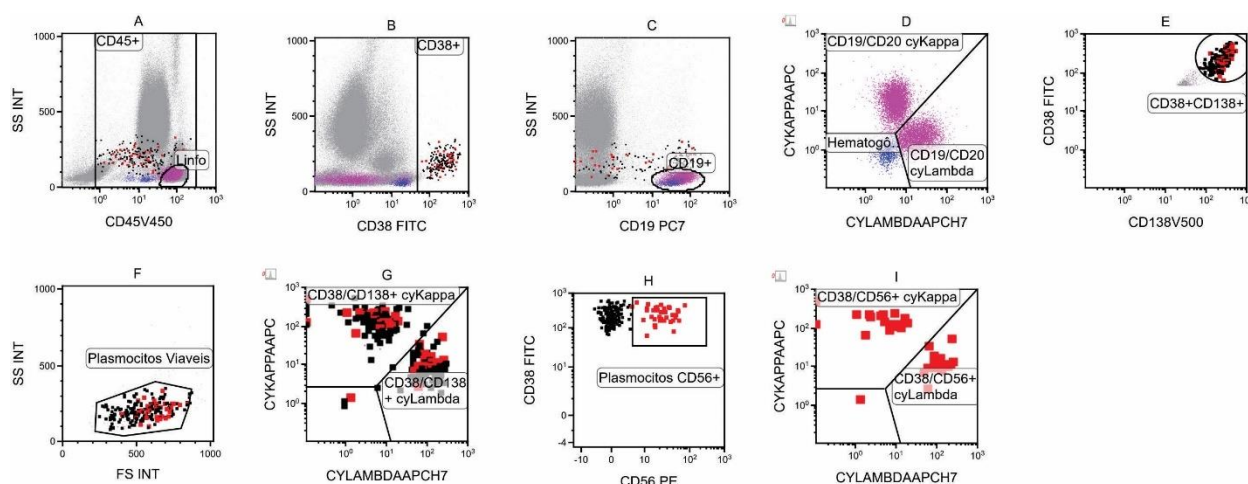
Por meio da combinação de anticorpos utilizadas no tubo 8 foi realizada a quantificação absoluta e relativa de linfócitos T e células NK. Na figura 13, podemos observar a estratégia de análise utilizada.



A: Total de células nucleadas apresentadas em cruzamento de SSC e CD45; **B:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD3 foi classificada como CD3+ (rosa); **C:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD56 foi classificada como CD56+; **D:** Na região “CD56+” a população com expressão positiva de CD56 e negativa de CD3 foi classificada como CD3-CD56+; **E:** Na região “CD3-CD56-” as populações foram separadas de acordo com a expressão positiva para CD16, classificadas como NK CD56+CD16+ (azul claro), ou negativa para CD16 classificadas como NK CD56+CD16- (azul escuro); **F:** Na região de “CD3+” a população com expressão positiva de CD3 e negativa de CD56 foi classificada como linfo T e a população com expressão positiva de CD3 e positiva para CD56 foi classificada como céls CD3+CD56+ (preto); **G:** A região “linfo T” foi separada em quatro populações de acordo com a expressão de positiva para CD4 e negativa para CD8 classificadas como linfócitos T auxiliares, positiva para CD8 e negativa para CD4 classificadas como linfócitos T citotóxicos, positiva para CD4 e CD8 classificadas com linfócitos T duplo positivo e negativa para CD4 e CD8 classificadas com linfócitos T duplo negativo.

Figura 13. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 8

Por meio da combinação de anticorpos utilizadas no tubo 7 foi realizada a quantificação relativa de plasmócitos. Na figura 14, podemos observar a estratégia de análise utilizada.



A: Total de células nucleadas apresentadas em cruzamento de SSC e CD45; **B:** Na região “células nucleadas” a população com expressão positiva forte de CD38 foi classificada como CD38+; **C:** Na região “células nucleadas” a população de células com expressão positiva de CD19 foi classificada como CD19+(rosa); **D:** Na região “CD19+” as populações foram separadas de acordo com a expressão positiva para kappa e negativa para lambda, classificada como CD19/CD20 cyKappa, ou positiva para lambda e negativa para kappa, classificada como CD19/CD20 cylambda e para a população duplo negativa (azul) foi classificada como hematogônia; **E:** Na região “CD38+” a população com expressão positiva de CD38 e CD138 foi classificada como CD38+CD138+ (preto); **F:** Na região “CD38+CD138+” a população de células de médio porte e média complexidade foram classificadas como plasmócitos viáveis; **G:** Na região “plasmócitos viáveis” as populações foram separadas de acordo com a expressão positiva para kappa e negativa para lambda, classificada como CD38/CD138+ cykappa, ou positiva para lambda e negativa para kappa, classificada como CD38/CD138+ cylambda; **H:** Na região “plasmócitos viáveis” a população de células com expressão positiva de CD56 foi classificada como plasmócitos CD56+ (vermelho); **I:** Na região “plasmócitos CD56+” as populações foram separadas de acordo com a expressão positiva para kappa e negativa para lambda, classificada como CD38/CD56+ cykappa, ou positiva para lambda e negativa para kappa, classificada como CD38/CD56+ cylambda.

Figura 14. Estratégia de análise utilizada para identificação das populações celulares identificadas no tubo 7

2.5 Análise estatística

As variáveis quantitativas tiveram sua distribuição estudada por *boxplots*, gráficos de comparação de quartis e teste de Shapiro-Wilk para a normalidade. Foram avaliadas as medianas, 1º e 3º quartis, mínimos e máximos, por serem mais adequados ao comportamento observado na distribuição amostral. As variáveis qualitativas foram descritas por frequência absoluta e relativa ao total de indivíduos na amostra.

Para avaliar a relação das variáveis quantitativas com sexo utilizamos testes não paramétricos de Mann-Whitney e a comparação entre categorias de idade foi realizada por testes não paramétricos de Kruskal-Wallis. Os testes foram escolhidos pelas características das variáveis quantitativas.⁽⁵⁴⁾

Os testes estatísticos foram realizados no *software* SPSS e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas de acordo com nível de significância de 5% para os testes de hipótese.

3 RESULTADOS

3.1 Pacientes

Foram coletadas 46 amostras de MO de indivíduos sem doença hematológica, sendo 16 mulheres e 30 homens, com mediana de 37 (18;87) anos de idade (Tabela 8). Os indivíduos apresentaram resultado dentro dos valores de referência de normalidade para o exame hemograma (Tabela 9), com mediana de 13,75g/dL (12,23;14,70) de hemoglobina; 40,20% (35,30;43,05) de hematócrito; 85,90fL (83,75;88,60) volume corpuscular médio (VCM) e 236.500mm³ (200.750;283.500) de plaquetas.

Tabela 8. Número de doadores por faixa etária

Nº Doares saudáveis	%	Faixa etária (anos)
28	58,3	≤40
7	16,7	41 á 60
11	25,0	>60

Tabela 9. Características clínicas

Doadores saudáveis	Mediana (1º e 3º quartil)	Mínimo - Máximo
Idade, anos	37 (26-60)	18-87
Hemoglobina, g/dL	13,75 (12,40-14-70)	8-90 – 17,30
Hematócrito, %	40,20 (35,60-42,80)	25-50 – 47,90
Volume corpuscular médio, fL	85,90 (83,83-88,48)	79,20 – 95,90
Plaquetas, mm ³	236.500 (201.250-2282.250)	152.000 - 530.000

n=46.

3.2 Celularidade

A celularidade da amostra foi determinada através da estratégia de análise demonstrada na figura 7, os resultados desta análise foram correlacionados com a quantificação de células realizada no contador hematológico XN10 (Sysmex®) e estão descritos na tabela 10. O resultado da correlação entre as plataformas foi de R=0.9966 para o total de células nucleadas, R=0.9576 para de eritroblastos, R=0.9928 para

granulócitos, $R=0.8947$ para linfócitos e $R=0.8558$ para monócitos. Na figura 15 podemos observar os gráficos de correlação entre as plataformas.

Tabela 10. Total de células (plataforma única x plataforma dupla)

População mm ³	Plataforma única		Plataforma dupla		R
	Mediana (1º e 3º quartil)	Mínimo Máximo	Mediana (1º e 3º quartil)	Mínimo Máximo	
Células nucleadas	29743 (19044, 41221)	6212 101237	29.985 (20.103, 42.303)	6.980 101.930	0.9966
Eritroblastos	3327 (1311, 5174)	93 17583	3520 (1800, 6960)	30 18120	0.9576
Linfócitos	3104 (2643, 5150)	875 11086	4960 (3640, 6970)	840 13780	0.8947
Monócitos	1478 (872, 1960)	423 4653	1630 (1000, 3040)	350 6720	0.8558
Granulócitos	17154 (11243, 27738)	3034 69561	18600 (13090, 27670)	3310 69190	0.9928

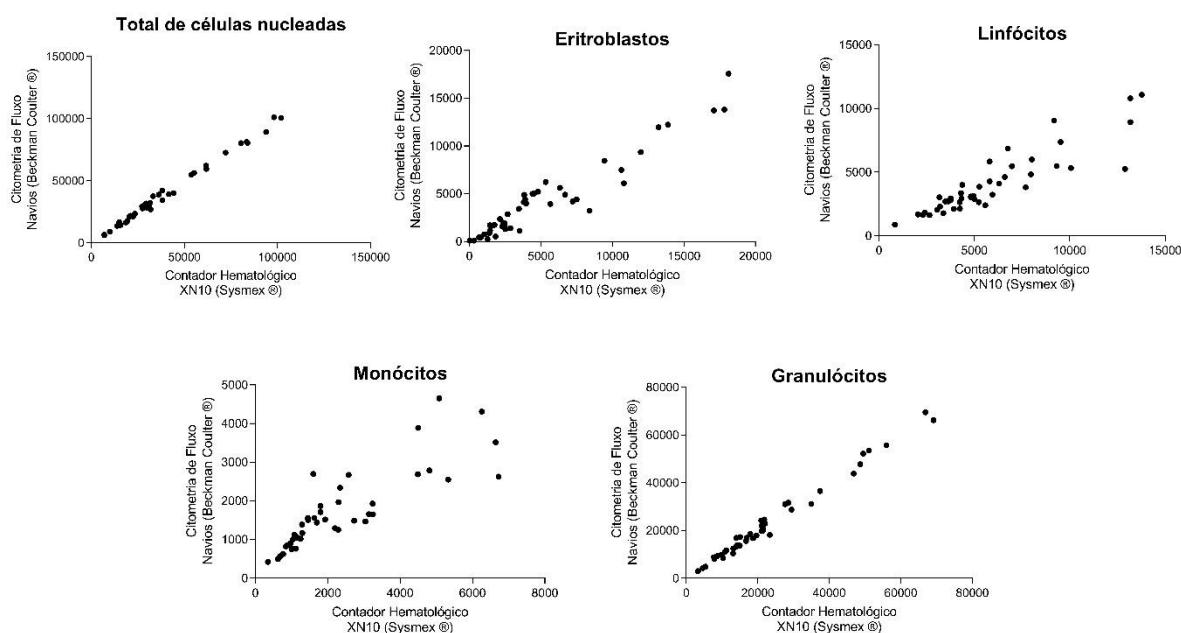


Figura 15. Análise de correlação entre as plataformas

3.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada de acordo com a estratégia de análise demonstrada na figura 6. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 11. A viabilidade celular foi $>90\%$ em todas as amostras e apresentou mediana de $96,22\%$ ($93,44-97,47$). A figura 16 apresenta um gráfico que relaciona o tempo desde a coleta até o processamento das amostras e o total de células viáveis.

Tabela 11. Resultados de viabilidade celular e tempo entre a coleta e o processamento da amostra

Doadores saudáveis	Total de células viáveis (%)	Tempo coleta/processamento (horas/minutos)
1	96,59	23:17:00
2	98,50	21:59:00
3	92,78	24:46:00
4	96,67	21:00:00
5	98,25	4:09:00
6	97,55	23:54:00
7	98,74	6:49:00
8	96,40	24:06:00
9	96,07	30:13:00
10	93,42	27:24:00
11	95,65	28:01:00
12	96,84	28:20:00
13	96,03	30:01:00
14	98,68	24:00:00
15	99,33	19:57:00
16	93,02	22:29:00
17	96,09	20:54:00
18	96,07	27:50:00
19	97,78	27:52:00
20	99,96	29:13:00
21	93,08	24:16:00
22	94,08	24:01:00
23	91,09	27:12:00
24	95,94	23:26:00
25	96,68	23:09:00
26	92,26	23:12:00
27	95,02	19:16:00
28	93,05	25:52:00
29	97,48	20:00:00
30	97,02	30:17:00
31	98,56	27:22:00
32	97,44	25:32:00
33	95,27	13:42:00
34	93,30	22:21:00
35	96,34	30:21:00
36	96,53	3:57:00
37	91,26	24:34:00
38	91,08	24:16:00
39	91,34	27:40:00
40	97,58	28:27:00
41	93,51	23:51:00
42	96,76	20:42:00
43	93,35	20:29:00
44	97,34	5:22:00
45	95,35	48:32:00
46	97,96	7:00:00

n=46.

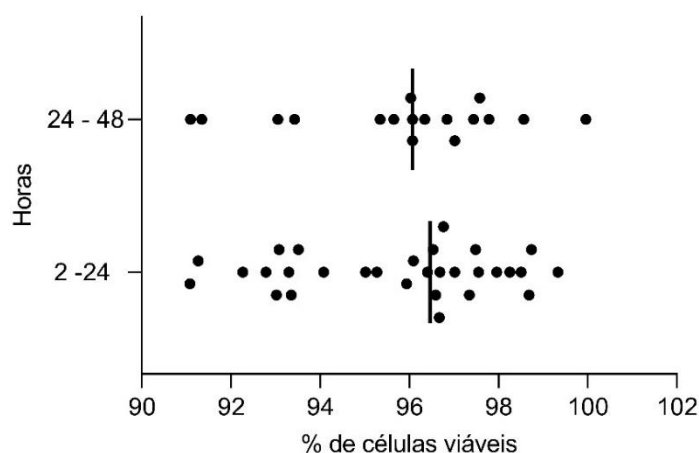


Figura 16. Período entre a coleta e o processamento com a porcentagem de células viáveis

3.4 Pureza da amostra

De acordo com Pont et al.,⁽⁹⁾ para avaliação de pureza de amostras da MO, utiliza-se a relação do percentual de granulócitos imaturos (promielócitos, mielócitos, metamielócitos e bastonetes) dividido pelo percentual de neutrófilos. Desta forma definimos como baixa pureza (relação $<0,5$), moderada pureza (relação $0,5$ a $1,2$) e alta pureza (relação $\geq 1,2$). O resultado desta avaliação está descrito na tabela 12. No total de amostras utilizadas, 3 (6,5%) apresentaram baixa pureza, 13 (28,3%) apresentaram pureza moderada e 29 (63,0%) apresentaram alta pureza.

Tabela 12. Pureza celular de amostras de medula óssea normais por faixa etária

Granulócitos imaturos/neutrófilos	Idade			Total
	<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
$\geq 1,20$	20	4	5	29
$0,5$ a $1,20$	5	2	6	13
$<0,5$	2	1	0	3
Total	28	7	11	46

3.5 Quantificação de linfócitos (B, T) e células *natural killer*

Através da combinação de anticorpos utilizada nos tubos 2 e 8 (Tabela 7), foi possível realizar a quantificação de linfócitos T, B e células NK. A estratégia de

análise utilizada pode ser observada nas figuras 8, 12, 13 e 14. As quantificações foram realizadas de acordo com a faixa etária (Tabela 8).

Os resultados obtidos para linfócitos B estão descritos na tabela 13. A mediana da quantidade de linfócitos B imaturos CD34+ foi 0,12% (0,04; 0,17) e 27/mm³ (7; 61). A mediana da quantidade de linfócitos B imaturos CD34-CD10+ foi 0,45% (0,22; 0,96) e 131/mm³ (40; 303). A mediana para linfócitos B maduros foi 1,86% (1,27; 2,51) e 463/mm³ (285; 749). Os linfócitos B maduros apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,45 (1,34; 1,70). A mediana da quantidade de linfócitos B CD5 foi 0,12% (0,06; 0,22) e 32/mm³ (21; 51). Os linfócitos B CD5 apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,70 (1,46; 1,96). A mediana da quantidade de células plasmocitárias foi 0,16% (0,11; 0,27) e 46/mm³ (29; 93), sendo 0,13% (0,09; 0,19) e 38/mm³ (21; 67) de plasmócitos que expressam CD19 e 0,01% (0,00; 0,03) e 4/mm³ (1; 8) de plasmócitos que expressam CD56. As células plasmocitárias apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,51 (1,24; 1,95) e as células plasmocitárias que expressam CD56 apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,56 (1,11; 3,29).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as faixas etárias avaliadas na população de linfócitos B. Em plasmócitos, observamos diferenças significativas para a população que expressa CD56 ($p=0,031$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentam os valores inferiores quando comparados aos indivíduos mais velhos (>60 anos).

Tabela 13. Resultados de linfócitos B por idade

Tabela 13: Resultados de linfócitos B por idade					
População (fenótipo)		Idade			Valor-p
		<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
Linfócitos B imaturos CD34+ (CD19+CD34+)					
Mediana	mm ³	37 (14; 107)	25 (6; 47)	9 (6; 32)	0,099
	%	0,14 (0,07; 0,20)	0,15 (0,03; 0,28)	0,04 (0,02; 0,16)	0,210
Mínimo	mm ³	1; 364	3; 172	0; 58	
Máximo	%	0,00; 0,95	0,03; 0,73	0,00; 0,27	
Linfócitos B imaturos CD34-CD10+ (CD19+CD10+CD34-)					
Mediana	mm ³	182 (72; 523)	60 (16; 180)	88 (28; 222)	0,124
	%	0,50 (0,24; 1,04)	0,35 (0,14; 1,13)	0,34 (0,11; 0,72)	0,390
Mínimo	mm ³	2; 2120	10; 265	3; 339	
Máximo	%	0,01; 5,51	0,06; 1,13	0,05; 1,55	
Linfócitos B que expressam CD5 (CD19+CD5+)					
Mediana	mm ³	41 (23; 71)	26 (16; 51)	29 (11; 33)	0,172
	%	0,12 (0,06; 0,25)	0,22 (0,06; 0,23)	0,12 (0,05; 0,18)	0,692

continua...

...continuação

Mínimo					
Máximo	mm ³	8; 206	5; 51	3; 47	
	%	0,03; 0,48	0,03; 0,26	0,02; 0,55	
Linfócitos B que expressam CD5 relação kappa/lambda					
Mediana		1,73 (1,42; 1,90)	1,66 (1,49; 2,12)	1,70 (1,44; 2,47)	0,949
Mínimo	%				
Máximo		1,35; 2,42	1,16; 2,39	1,10; 2,92	
Linfócitos B maduro (CD19+CD20+)					
Mediana	mm ³	552 (368; 787)	285 (176; 492)	639 (248; 749)	0,090
	%	1,81 (1,26; 2,35)	1,65 (1,03; 3,08)	2,51 (1,27; 3,09)	0,516
Mínimo	mm ³	199; 1844	138; 734	58; 1021	
Máximo	%	0,69; 6,68	0,51; 3,12	0,24; 5,59	
Linfócitos B maduro relação CLK/CLL					
Mediana		1,43 (1,34; 1,75)	1,55 (1,36; 1,70)	1,46 (1,24; 1,68)	0,838
Mínimo -	%				
Máximo		1,12; 1,99	1,25; 1,87	1,14; 2,25	
Plasmócitos (CD38+CD138+)					
Mediana	mm ³	46 (30; 83)	41 (29; 67)	49 (15; 135)	0,948
	%	0,359	0,359	0,359	0,168
Mínimo	mm ³	3; 355	2; 203	1; 571	
Máximo	%	0,02; 0,82	0,01; 0,69	0,01; 0,74	
Plasmócitos relação cykappa/cylambda (i)					
Mediana		1,54 (1,24; 1,95)	1,28 (1,00; 1,95)	1,43 (1,31; 1,82)	0,434
Mínimo	%				
Máximo		1,11; 3,92	0,99; 2,01	1,00; 2,79	
Plasmócitos que expressam CD19+ (CD38+CD138+CD19+)					
Mediana	mm ³	39 (23; 63)	37 (20; 60)	30 (13; 101)	0,307
	%	0,13 (0,06; 0,16)	0,17 (0,10; 0,31)	0,15 (0,12; 0,37)	
Mínimo	mm ³	3; 306	2; 186	1; 456	
Máximo	%	0,02; 0,74	0,01; 0,63	0,01; 0,59	
Plasmócitos que expressam CD56+ (CD38+CD138+CD56+)					
Mediana	mm ³	3 (1; 6)	4 (1; 5)	8 (1; 12)	0,359
	%	0,01 (0,00; 0,02)	0,02 (0,00; 0,03)	0,04 (0,01; 0,05)	0,031
Mínimo	mm ³	0; 34	0; 9	0; 93	
Máximo	%	0,00; 0,05	0,00; 0,03	0,00; 0,12	
Plasmócitos que expressam CD56+ cykappa/cylambda (i)					
Mediana		1,56 (1,11; 3,40)	1,43 (0,67; 2,90)	1,75 (1,36; 2,45)	0,793+
Mínimo	%				
Máximo		0,00; 8,00	0,00; 3,67	0,00; 3,48	

As quantificações também foram separadas de acordo com o sexo (feminino ou masculino). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 14.

No sexo feminino a mediana para linfócitos B imaturos CD34+ foi 0,09% (0,04; 0,16) e 2/mm³ (7; 48). A mediana para linfócitos B imaturos CD34-CD10+ foi 0,67% (0,39; 1,10) e 210/mm³ (94; 455). A mediana para linfócitos B maduros foi 1,94% (1,47; 2,51) e 718/mm³ (435; 827). Os linfócitos B maduros apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,38 (1,23; 1,63). A mediana para linfócitos B CD5 foi 0,19%

(0,09; 0,25) e 47/mm³ (31; 75). Os linfócitos B CD5 apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,57 (1,43; 1,87). A mediana da quantidade de células plasmocitárias foi 0,16% (0,13; 0,29) e 48/mm³ (36; 95), sendo 0,13% (0,10; 0,23) e 39/mm³ (23; 82) de plasmócitos que expressam CD19 e 0,02% (0,01; 0,05) e 5/mm³ (2; 11) de plasmócitos que expressam CD56. As células plasmocitárias apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,67 (1,34; 1,95) e as células plasmocitárias que expressam CD56 apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,50 (1,33; 2,45).

No sexo masculino a mediana para linfócitos B imaturos CD34+ foi 0,13% (0,04; 0,20) e 29/mm³ (8; 93). A mediana para linfócitos B imaturos CD34-CD10+ foi 0,37% (0,14; 0,77) e 81/mm³ (27; 265). A mediana para linfócitos B maduros foi 1,73% (1,03; 2,50) e 413/mm³ (241; 650). Os linfócitos B maduros apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,52 (1,36; 1,75). A mediana da quantidade de linfócitos B CD5 foi 0,12% (0,05; 0,21) e 25/mm³ (18; 49). Os linfócitos B CD5 apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,74 (1,51; 1,98). A mediana da quantidade de células plasmocitárias foi 0,16% (0,06; 0,27) e 39/mm³ (26; 93), sendo 0,14% (0,06; 0,19) e 35/mm³ (21; 67) de plasmócitos que expressam CD19 e 0,01% (0,00; 0,03) e 4/mm³ (1; 6) de plasmócitos que expressam CD56. As células plasmocitárias apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,48 (1,16; 1,75) e as células plasmocitárias que expressam CD56 apresentaram mediana da relação kappa/lambda de 1,56 (1,11; 3,33).

Entre os sexos houve diferença significativa em números absolutos para as populações linfócitos B CD5+ (p=0,014) e linfócitos B maduros (p=0,013), sendo que no sexo feminino os valores são mais elevados.

Tabela 14. Resultados de linfócitos B por sexo

População (fenótipo)		Sexo		Valor-p
		Feminino	Masculino	
Linfócitos B imaturos CD34+ (CD19+CD34+)				
Mediana	mm ³	27 (7; 48)	29 (8; 93)	0,982
	%	0,09 (0,04; 0,16)	0,13 (0,04; 0,20)	0,488
Mínimo	mm ³	0; 231	1; 364	
Máximo	%	0,00; 0,68	0,00; 0,95	
Linfócitos B imaturos CD34-CD10+ (CD19+CD10+CD34-)				
Mediana	mm ³	210 (94; 455)	81 (27; 265)	0,051
	%	0,67 (0,39; 1,10)	0,37 (0,14; 0,77)	0,056
Mínimo	mm ³	27; 1144	2; 2120	
Máximo	%	0,09; 2,10	0,01; 5,51	
Linfócitos B com expressão de CD5 (CD19+CD5+)				

continua...

...continuação

Mediana	mm ³	47 (31; 75)	25 (18; 49)	0,014
	%	0,19 (0,09; 0,25)	0,12 (0,05; 0,21)	0,162
Mínimo	mm ³	7; 206	3; 112	
Máximo	%	0,03; 0,55	0,02; 0,48	
Linfócitos B com expressão de CD5 relação CLK/CLL				
Mediana		1,57 (1,43; 1,87)	1,74 (1,51; 1,98)	0,245
Mínimo	%	1,10; 2,77	1,16; 2,92	
Máximo				
Linfócitos B maduros (CD19+CD20+)				
Mediana	mm ³	718 (435; 827)	413 (241; 650)	0,013
	%	1,94 (1,47; 2,51)	1,73 (1,03; 2,50)	0,333
Mínimo	mm ³	248; 1844	58; 1222	
Máximo	%	1,18; 5,59	0,24; 6,68	
Linfócitos B maduros relação CLK/CLL				
Mediana		1,38 (1,23; 1,63)	1,52 (1,36; 1,75)	0,177
Mínimo	%	1,14; 2,0	1,12; 2,25	
Máximo				
Plasmócitos (CD38+CD138+)				
Mediana	mm ³	48 (36; 95)	39 (26; 93)	0,350
	%	0,16 (0,13; 0,29)	0,16 (0,06; 0,27)	0,612
Mínimo	mm ³	13; 571	1; 302	
Máximo	%	0,03; 0,74	0,01; 0,82	
Plasmócitos relação cyCLK/cyCLL				
Mediana		1,67 (1,34; 1,95)	1,48 (1,16; 1,75)	0,294
Mínimo	%	1,19; 2,43	0,99; 3,92	
Máximo				
Plasmócitos com expressão de CD19 (CD38+CD138+CD19+)				
Mediana	mm ³	39 (23; 82)	35 (21; 67)	0,596
	%	0,13 (0,10; 0,23)	0,14 (0,06; 0,19)	0,872
Mínimo	mm ³	11; 456	1; 240	
Máximo	%	0,02; 0,59	0,01; 0,74	
Plasmócitos com expressão de CD56 (CD38+CD138+CD56+)				
Mediana	mm ³	5 (2; 11)	4 (1; 6)	0,224
	%	0,02 (0,01; 0,05)	0,01 (0,00; 0,03)	0,242
Mínimo	mm ³	0; 93	0; 27	
Máximo	%	0,00; 0,12	0,00; 0,05	
Plasmócitos com expressão de CD56 relação cyCLK/cyCLL				
Mediana		1,50 (1,33; 2,45)	1,56 (1,11; 3,33)	0,941
Mínimo	%	0,33; 3,80	0,00; 8,00	
Máximo				

Os resultados obtidos para linfócitos T estão descritos na tabela 15. A mediana para linfócitos T foi 7,96% (6,50; 10,43) e 1943/mm³ (1596; 3564), sendo 4,01% (2,94; 5,69) e 968/mm³ (748; 1631) de linfócitos T auxiliares, 3,34% (2,78; 4,25) e 951/mm³ (603; 1643) de linfócitos T citotóxicos, 0,16% (0,09; 0,27) e 47/mm³ (28; 80) de

linfócitos T duplo-positivos e 0,40% (0,22; 0,51) e 95/mm³ (51; 155) de duplo negativos. Os linfócitos T apresentaram a mediana da relação CD4/CD8 de 1,16 (0,84; 1,55).

Entre as faixas etárias houve diferença significativa em números absolutos para as populações linfócitos T citotóxicos ($p=0,031$) e linfócitos T duplo negativo ($p=0,018$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentam valores superiores quando comparados aos indivíduos mais velhos (>60 anos). Para as porcentagens houve diferença estatística na relação CD4/CD8 ($p=0,002$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentam valores inferiores quando comparados aos indivíduos mais velhos (>60 anos).

Tabela 15. Resultados de linfócitos T por idade

População (fenótipo)		Idade			Valor-p
		<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
Linfócitos T (CD3+)					
Mediana	mm ³	2043 (1782; 4002)	1499 (1284; 1941)	2047 (1171; 3181)	0,117
	%	7,64 (6,35; 9,63)	8,48 (7,50; 13,42)	9,37 (5,80; 11,28)	0,454
Mínimo	mm ³	1034; 9251	1277; 3160	211; 6708	
Máximo	%	3,64; 18,01	5,09; 14,10	3,32; 21,38	
Linfócitos T auxiliares (CD3+CD4+CD8-)					
Mediana	mm ³	954 (719; 1711)	826 (789; 999)	1145 (748; 1773)	0,444
	%	3,50 (2,36; 4,82)	5,18 (3,24; 6,61)	5,27 (3,40; 6,75)	0,070
Mínimo	mm ³	525; 5240	742; 1340	172; 2849	
Máximo	%	1,52; 9,29	2,94; 7,00	2,70; 11,92	
Linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+CD4-)					
Mediana	mm ³	1040 (820; 1827)	494 (410; 1047)	798 (339; 1171)	0,031
	%	3,41 (2,99; 4,10)	2,77 (1,93; 6,47)	2,71 (2,10; 4,21)	0,275
Mínimo	mm ³	406; 3405	330; 1643	30; 3381	
Máximo	%	1,74; 7,48	1,58; 6,98	0,47; 7,87	
Linfócitos T duplo positivos (CD3+CD4+CD8+)					
Mediana	mm ³	39 (29; 79)	41 (8; 59)	62 (34; 103)	0,452
	%	0,13 (0,09; 0,24)	0,24 (0,05; 0,27)	0,21 (0,07; 0,49)	0,473
Mínimo	mm ³	10; 532	2; 137	3; 130	
Máximo	%	0,03; 1,48	0,01; 0,80	0,04; 0,59	
Linfócitos T duplo negativo (CD3+CD4-CD8-)					
Mediana	mm ³	103 (77; 186)	51 (34; 97)	55 (25; 154)	0,018
	%	0,44 (0,28; 0,55)	0,27 (0,17; 0,46)	0,24 (0,16; 0,47)	0,136
Mínimo	mm ³	39; 513	29; 118	5; 375	
Máximo	%	0,11; 1,00	0,16; 0,50	0,07; 1,24	
Relação CD4/CD8					
Mediana		0,94 (0,76; 1,33)	1,86 (0,82; 2,39)	1,73 (1,11; 2,51)	0,002
Mínimo		0,57; 1,55	0,71; 2,39	0,84; 5,74	
Máximo					

As quantificações também foram separadas de acordo com o sexo (feminino e masculino). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 16.

No sexo feminino a mediana para linfócitos T foi 7,92% (6,91; 9,46) e 2353/mm³ (1687; 4534), sendo 3,80% (3,27; 5,69) e 1212/mm³ (787; 1813) de linfócitos T auxiliares, 3,22% (2,75; 3,71) e 1021/mm³ (691; 1935) de linfócitos T citotóxicos, 0,10% (0,06; 0,16) e 56/mm³ (32; 75) de linfócitos T duplo-positivos e 0,40% (0,22; 0,52) e 122/mm³ (49; 272) de duplo-negativos. Os linfócitos T apresentaram uma mediana na relação CD4/CD8 de 1,35 (0,87; 1,68).

No sexo masculino a mediana para linfócitos T foi 8,06% (6,19; 11,40) e 1882/mm³ (1499; 3160), sendo 4,37% (2,72; 5,69) e 898/mm³ (718; 1513) de linfócitos T auxiliares, 3,34% (2,86; 4,76) e 893/mm³ (603; 1529) de linfócitos T citotóxicos, 0,17% (0,10; 0,27) e 41/mm³ (27; 80) de linfócitos T duplo-positivos e 0,39% (0,22; 0,51) e 83/mm³ (53; 118) de duplo-negativos. Os linfócitos T apresentaram uma mediana na relação CD4/CD8 de 1,09 (0,82; 1,42).

Entre os sexos não foram observadas diferenças estatísticas.

Tabela 16. Resultados linfócitos T por sexo

População (fenótipo)		Sexo		Valor-p
		Feminino	Masculino	
Linfócitos T (CD3+)				
Mediana	mm³	2353 (1687; 4534)	1882 (1499; 3160)	0,333
	%	7,92 (6,91; 9,46)	8,06 (6,19; 11,40)	0,945
Mínimo	mm³	1088; 9251	211; 6085	
Máximo	%	5,25; 21,38	3,32; 18,01	
Linfócitos T auxiliares (CD3+CD4+CD8-)				
Mediana	mm³	1212 (787; 1813)	898 (718; 1513)	0,140
	%	3,80 (3,27; 5,69)	4,37 (2,72; 5,69)	0,782
Mínimo	mm³	720; 5240	172; 2530	
Máximo	%	1,97; 11,92	1,52; 9,29	
Linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+CD4-)				
Mediana	mm³	1021 (691; 1935)	893 (603; 1529)	0,393
	%	3,22 (2,75; 3,71)	3,34 (2,86; 4,76)	0,518
Mínimo	mm³	231; 3405	30; 3028	
Máximo	%	2,10; 7,87	0,47; 7,48	
Linfócitos T duplo positivo (CD3+CD4+CD8+)				
Mediana	mm³	56 (32; 75)	41 (27; 80)	0,686
	%	0,10 (0,06; 0,26)	0,17 (0,10; 0,27)	0,234
Mínimo	mm³	3; 104	2; 532	
Máximo	%	0,03; 0,56	0,01; 1,48	
Linfócitos T duplo negativo (CD3+CD4-CD8-)				
Mediana	mm³	122 (49; 278)	83 (51; 118)	0,226
	%	0,40 (0,22; 0,52)	0,39 (0,22; 0,51)	0,695

continua...

...continuação

Mínimo	mm ³	24; 513	5; 390	
Máximo	%	0,09; 1,24	0,07; 1,00	
Relação CD4/CD8				
Mediana		1,35 (0,87; 1,68)	1,09 (0,82; 1,42)	0,400
Mínimo	%	0,57; 3,24	0,65; 5,74	
Máximo				

Os resultados obtidos de células NK estão descritos na tabela 17. A mediana para células NK foi de 1,12% (0,74; 1,59) e 383/mm³ (179; 598) sendo 0,11% (0,09; 0,19) e 30/mm³ (19; 68) de células NK que expressam CD56, 0,98% (0,48; 1,41) e 268/mm³ (153; 483) de células NK que expressam CD56 e CD16.

Entre as faixas etárias houve diferença significativa em números absolutos para o total de células NK ($p=0,026$), células NK que expressam CD56 ($p=0,002$) e células NK que expressam CD56 e CD16 ($p=0,024$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentam valores superiores quando comparados aos indivíduos mais velhos (>60 anos). Para as porcentagens houve diferença significativa para células NK que expressam CD56 ($p=0,012$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentam valores superiores quando comparados aos indivíduos mais velhos (>60 anos).

Tabela 17. Resultados de células *natural killer* por idade

População (fenótipo)		Idade			Valor-p
		<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
Células NK (CD56+CD3-)					
Mediana	mm ³	451 (268; 629)	226 (133; 409)	216 (139; 366)	0,026
	%	1,23 (0,82; 1,99)	1,12 (0,86; 1,31)	0,80 (0,35; 1,55)	0,472
Mínimo	mm ³	77; 1210	111; 631	39; 781	
Máximo	%	0,24; 5,40	0,52; 2,37	0,27; 3,83	
Células NK que expressam CD56 (CD56+CD3-CD16-)					
Mediana	mm ³	49 (28; 99)	19 (12; 30)	20 (13; 38)	0,002
	%	0,14 (0,09; 0,25)	0,08 (0,06; 0,19)	0,09 (0,08; 0,11)	0,012
Mínimo	mm ³	19; 392	9; 77	4; 45	
Máximo	%	0,08; 0,67	0,06; 0,25	0,03; 0,14	
Células NK que expressam CD56 e CD16 (CD56+CD16+CD3-)					
Mediana	mm ³	357 (231; 510)	203 (100; 289)	170 (106; 216)	0,024
	%	1,00 (0,59; 1,62)	0,99 (0,65; 1,16)	0,63 (0,27; 1,41)	0,576
Mínimo	mm ³	48; 992	96; 565	28; 570	
Máximo	%	0,15; 4,97	0,45; 2,12	0,21; 2,80	

As quantificações também foram separadas de acordo com o sexo (feminino e masculino). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 18.

No sexo feminino a mediana para células NK foi de 0,52% (0,35; 1,18) e 233/mm³ (111; 429), sendo 0,09% (0,08; 0,14) e 29/mm³ (17; 40) de células NK que expressam CD56 e 0,43% (0,23; 1,03) e 179/mm³ (96; 319) de células NK que expressam CD56 e CD16.

No sexo masculino a mediana para células NK foi de 1,23% (0,90; 2,00) e 419/mm³ (226; 622), sendo 0,11% (0,09; 0,23) e 34/mm³ (20; 71) de células NK que expressam CD56 e 1,00% (0,76; 1,62) e 343/mm³ (188; 504) de células NK que expressam CD56 e CD16.

Entre os sexos houve diferença significativa nas porcentagens do total de células NK ($p=0,007$) e nas células NK que expressam CD56 e CD16 ($p=0,013$), sendo que no sexo masculino os valores são maiores.

Tabela 18. Resultados células *natural killer* por sexo

Tabela 16. Resultados células naturais killer por sexo				
População (fenótipo)		Sexo		Valor-p
		Feminino	Masculino	
Células NK (CD56+CD3-)				
Mediana	mm ³	233 (111; 429)	419 (226; 622)	0,106
	%	0,52 (0,35; 1,18)	1,23 (0,90; 2,00)	0,007
Mínimo	mm ³	39; 1077	42; 1210	
Máximo	%	0,24; 3,83	0,35; 5,40	
Células NK que expressam CD56 (CD56+CD16-CD3-)				
Mediana	mm ³	29 (17; 40)	34 (20; 71)	0,512
	%	0,09 (0,08; 0,14)	0,11 (0,09; 0,23)	0,127
Mínimo	mm ³	12; 232	4; 392	
Máximo	%	0,03; 0,27	0,06; 0,67	
Células NK que expressam CD56 e CD16 (CD56+CD16+CD3-)				
Mediana	mm ³	179 (96; 319)	343 (188; 504)	0,064
	%	0,43 (0,23; 1,03)	1,00 (0,76; 1,62)	0,013
Mínimo	mm ³	28; 850	38; 992	
Máximo	%	0,15; 2,80	0,21; 4,97	

3.6 Avaliação da linhagem granulocítica

Através da combinação de anticorpos utilizada nos tubos 2, 3, 5 e 6 (Tabela 7), foi possível realizar a quantificação de células da linhagem granulocítica,

através das estratégias de análise demonstradas nas figuras 9, 11 e 12. As quantificações foram realizadas de acordo com a faixa etária (Tabela 8).

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 19. A mediana para mieloblastos foi de 0,21% (0,14; 0,30) e 57/mm³ (25; 112). A mediana para promielócitos foi de 0,54% (0,38; 0,75) e 161/mm³ (69; 270). A mediana para mielócitos foi de 4,88% (3,54; 6,86) e 1577/mm³ (657; 2568). A mediana para metamielócitos/ bastonetes foi de 22,94% (17,54; 31,48) e 6655/mm³ (3247; 11724). A mediana para neutrófilos segmentados foi de 21,44% (16,53; 27,14) e 5914/mm³ (4619; 8786). A mediana para eosinófilos foi de 2,08% (1,50; 3,27) e 578/mm³ (326; 901). A mediana para basófilos foi de 0,22% (0,15; 0,37) e 59/mm³ (50; 111). A mediana para mastócitos foi de 0,01% (0,00; 0,02) e 3/mm³ (1; 7).

Entre as faixas etárias houve diferença significativa em números absolutos para os mieloblastos ($p=0,048$), metamielócitos/bastonetes ($p=0,038$) e neutrófilos segmentados ($p=0,006$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentaram valores superiores quando comparados aos indivíduos mais velhos (>60 anos). Para as porcentagens houve diferença significativa para mastócitos ($p=0,004$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentam valores inferiores quando comparado aos indivíduos mais velhos (>60 anos).

Tabela 19. Resultados de linhagem granulocítica por idade

População (fenótipo)		Idade			Valor-p
		<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
Mieloblastos (CD34+CD33+CD45+)					
Mediana	mm ³	77 (47; 122)	23 (15; 27)	48 (21; 99)	0,048
	%	0,21 (0,17; 0,31)	0,13 (0,10; 0,14)	0,25 (0,16; 0,37)	0,070
Mínimo	mm ³	11; 363	9; 28	2; 363	
Máximo	%	0,06; 0,44	0,06; 0,14	0,04; 0,48	
Promielócitos (CD33+CD117+CD15+)					
Mediana	mm ³	220 (105; 331)	69 (58; 153)	102 (57; 248)	0,054
	%	0,58 (0,41; 0,74)	0,39 (0,34; 0,58)	0,54 (0,38; 0,81)	0,259
Mínimo	mm ³	6; 747	38; 164	3; 1215	
Máximo	%	0,09; 1,32	0,25; 0,59	0,06; 1,61	
Mielócitos (CD33+CD16-CD10-)					
Mediana	mm ³	2073 (1056; 3867)	835 (510; 1559)	850 (441; 2195)	0,135
	%	5,34 (3,82; 6,87)	4,08 (2,99; 5,89)	4,19 (3,08; 7,18)	0,745
Mínimo	mm ³	1; 7127	206; 2957	79; 11114	
Máximo	%	0,01; 12,15	1,36; 10,60	1,41; 14,77	
Metamielócitos/bastonetes (CD33+CD11b+CD10-CD16+)					
Mediana	mm ³	8557 (6148; 14083)	4460 (3389; 6247)	3247 (2136; 11724)	0,038
	%	25,21 (20,86; 32,36)	22,25 (17,87; 30,53)	17,54 (12,29; 25,35)	0,114
Mínimo	mm ³	651; 42968	1356; 8539	690; 21284	
Máximo	%	11,83; 41,36	8,94; 30,59	11,16; 44,47	
Neutrófilos Segmentados (CD33+CD16+CD10+)					
Mediana	mm ³	7469 (5048; 9886)	5554 (4699; 6467)	4315 (2932; 5950)	0,006
	%	21,24 (16,81; 26,60)	27,14 (21,02; 29,76)	17,51 (12,35; 22,12)	0,074
Mínimo	mm ³	2026; 24203	4097; 7058	1181; 9588	
Máximo	%	8,85; 43,09	20,44; 42,62	9,49; 34,16	
Eosinófilos (CD33+SSC++CD45++CD34-CD117-CD16-)					
Mediana	mm ³	593 (496; 933)	261 (194; 780)	565 (245; 1176)	0,193
	%	2,03 (1,55; 2,70)	1,72 (1,14; 3,79)	2,65 (1,21; 3,84)	0,598

continua...

...continuação

Mínimo	mm ³	274; 3575	174; 1402	66; 2694	
Máximo	%	1,12; 5,02	0,87; 5,02	1,18; 4,46	
Basófilos (CD123+CD203c+HLADR-)					
Mediana	mm ³	66 (55; 121)	53 (47; 60)	55 (39; 96)	0,173
	%	0,20 (0,14; 0,39)	0,25 (0,20; 0,42)	0,30 (0,21; 0,36)	0,288
Mínimo	mm ³	17; 319	24; 179	26; 163	
Máximo	%	0,07; 1,80	0,12; 0,61	0,15; 0,59	
Mastócitos (CD117+++)					
Mediana	mm ³	3 (1; 6)	3 (1; 4)	6 (3; 26)	0,105
	%	0,01 (0,00; 0,02)	0,01 (0,01; 0,02)	0,03 (0,02; 0,10)	0,004
Mínimo	mm ³	0; 32	0; 10	0; 82	
Máximo	%	0,00; 0,06	0,00; 0,03	0,00; 0,11	

As quantificações também foram separadas de acordo com o sexo (feminino e masculino). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 20.

No sexo feminino a mediana para mieloblastos foi 0,21 (0,19; 0,25) e 77 (31; 106). A mediana para promielócitos foi de 0,47% (0,35; 0,64) e 149/mm³ (80; 308). A mediana para mielócitos foi de 4,88% (3,80; 7,17) e 1645/mm³ (816; 4864). A mediana para metamielócitos/bastonetes foi de 26,29% (20,19; 34,68) e 9554/mm³ (3578; 19947). A mediana para neutrófilos segmentados foi de 18,40% (12,31; 26,60) e 6547/mm³ (4199; 9452). A mediana para eosinófilos foi de 2,10% (1,53; 3,51) e 744/mm³ (341; 1599). A mediana para basófilos foi de 0,22% (0,13; 0,31) e 56/mm³ (51; 87). A mediana para mastócitos foi de 0,01% (0,00; 0,05) e 3 (1; 12).

No sexo masculino a mediana para mieloblastos foi 0,20% (0,13; 0,32) e 47/mm³ (21; 117). A mediana para promielócitos foi de 0,59% (0,40; 0,75) e 161/mm³ (64; 254). A mediana para mielócitos foi de 4,90% (3,08; 6,60) e 1547/mm³ (530; 2362). A mediana para metamielócitos/bastonetes foi de 22,55% (17,04; 30,59) e 6497/mm³ (2481; 11400). A mediana para neutrófilos segmentados foi de 21,65% (17,70; 29,76) e 5729/mm³ (4705; 8685). A mediana para eosinófilos foi de 2,03% (1,50; 2,95) e 566/mm³ (326; 780). A mediana para basófilos foi de 0,24% (0,15; 0,41) e 60/mm³ (50; 116). A mediana para mastócitos foi de 0,01% (0,01; 0,02) e 3/mm³ (2; 7).

Entre os sexos não foram observadas diferenças estatísticas.

Tabela 20. Resultados de linhagem granulocítica por sexo

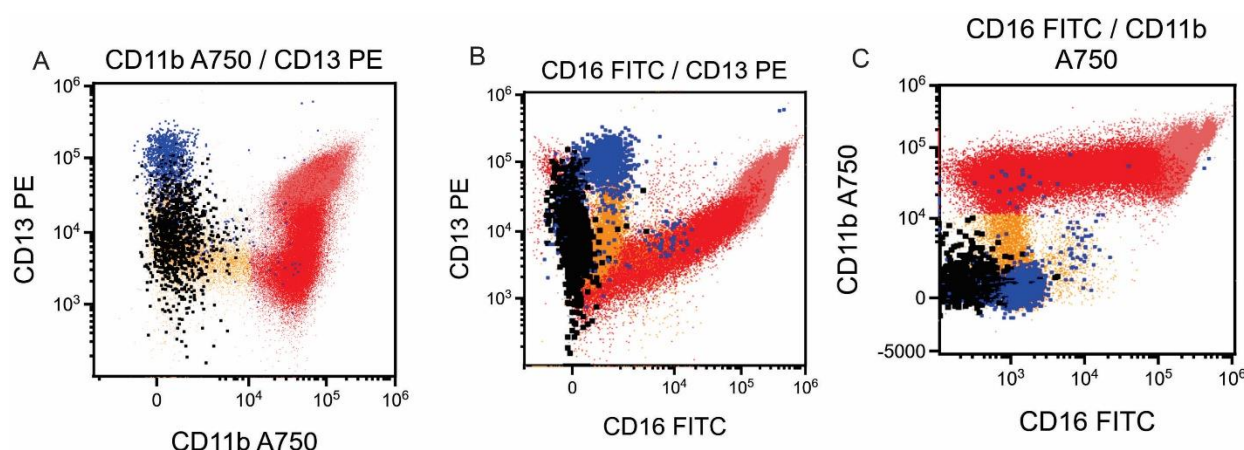
Tabela 20: Resultados de imunofenotipagem granulocítica por sexo				
População (fenótipo)		Sexo		Valor-p
		Feminino	Masculino	
Mieloblastos (CD34+CD33+CD45+)				
Mediana	mm ³	77 (31; 106)	47 (21; 117)	0,306
	%	0,21 (0,19; 0,25)	0,20 (0,13; 0,32)	0,616
Mínimo	mm ³	11; 363	2; 266	
Máximo	%	0,12; 0,48	0,04; 0,44	
Promielócitos (CD33+CD117+CD15+)				
Mediana	mm ³	149 (80; 308)	161 (64; 254)	0,580
	%	0,47 (0,35; 0,64)	0,59 (0,40; 0,75)	0,374
Mínimo	mm ³	27; 1215	3; 690	
Máximo	%	0,28; 1,61	0,06; 1,32	
Mielócitos (CD33+CD16-CD10-)				
Mediana	mm ³	1645 (816; 4864)	1547 (530; 2362)	0,249
	%	4,88 (3,80; 7,17)	4,90 (3,08; 6,60)	0,504
Mínimo	mm ³	139; 11114	1; 5143	
Máximo	%	1,45; 14,77	0,01; 10,60	

continua...

...continuação

Metamielócitos/bastonetes (CD33+CD11b+CD10-CD16+)				
Mediana	mm ³	9554 (3578; 19947)	6497 (2481; 11400)	0,213
	%	26,29 (20,19; 34,68)	22,55 (17,04; 30,59)	0,185
Mínimo	mm ³	1075; 42968	651; 31858	
Máximo	%	11,16; 41,36	8,94; 44,47	
Neutrófilos Segmentados (CD33+CD16+CD10+)				
Mediana	mm ³	6547 (4199; 9452)	5729 (4705; 8685)	0,818
	%	18,40 (12,31; 26,60)	21,65 (17,70; 29,76)	0,112
Mínimo	mm ³	1181; 23986	1217; 24203	
Máximo	%	8,85; 34,16	15,19; 43,09	
Eosinófilos (CD33+SSC++CD45++CD34-CD117-CD16-)				
Mediana	mm ³	744 (341; 1599)	566 (326; 780)	0,321
	%	2,10 (1,53; 3,51)	2,03 (1,50; 2,95)	0,738
Mínimo	mm ³	194; 357	66; 2240	
Máximo	%	1,14; 4,4	0,87; 5,02	
Basófilos (CD123+CD203c+HLADR-)				
Mediana	mm ³	56 (51; 87)	60 (50; 116)	0,747
	%	0,22 (0,13; 0,31)	0,24 (0,15; 0,41)	0,188
Mínimo	mm ³	24; 319	17; 251	
Máximo	%	0,10; 0,43	0,07; 1,80	
Mastócitos (CD117+++)				
Mediana	mm ³	3 (1; 12)	3 (2; 7)	0,889
	%	0,01 (0,00; 0,05)	0,01 (0,01; 0,02)	0,859
Mínimo	mm ³	0; 82	0; 32	
Máximo	%	0,00; 0,11	0,00; 0,11	

Além disso, podemos observar características de normalidade nas curvas de maturação da linhagem neutrofílica (Figura 17). Embora tenha sido encontrado diferença em valores absolutos e relativos dentre as faixas etárias, não houve diferença na curva de maturação.



A: Curva de maturação granulocítica apresentadas em um cruzamento de CD13 *versus* CD11b (azul: mieloblastos; preto: promielócitos; laranja: mielócitos; vermelho: metamielócitos e bastonetes; salmão: neutrófilos segmentados); **B:** Curva de maturação granulocítica apresentadas em um cruzamento de CD13 *versus* CD16; **C:** Curva de maturação granulocítica apresentadas em um cruzamento de CD11b *versus* CD16.

Figura 17. Curva de maturação da linhagem granulocítica

3.7 Avaliação da linhagem monocítica e células dendríticas (mieloides e plasmocitoides)

Através da combinação de anticorpos utilizada nos tubos 2, 4 e 6 (Tabela 7), foi possível realizar a quantificação de células da linhagem monocítica. A estratégia de análise está demonstrada nas figuras 10 e 12. As quantificações foram realizadas de acordo com a faixa etária (Tabela 8).

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 21. A mediana para monoblastos foi de 0,08% (0,04; 0,13) e 18/mm³ (11; 42). A mediana para promonócitos foi de 1,56% (1,05; 1,95) e 451/mm³ (194; 736). A mediana para monócitos maduros foi de 2,65% (1,59; 3,54) e 690/mm³ (503; 995). Na população de monócitos maduros a mediana para monócitos clássicos foi de 2,16% (1,36; 2,88) e 547/mm³ (393; 801). A mediana para monócitos intermediários foi de 0,20% (0,08; 0,28) e 53/mm³ (31; 64). A mediana para monócitos não clássicos foi de 0,10% (0,06; 0,27) e 32/mm³ (19; 45). A mediana para DC mieloides foi de 0,10% (0,07; 0,12) e 30/mm³ (13; 50). A mediana para DC plasmocitoides foi de 0,18% (0,14; 0,24) e 54/mm³ (29; 109).

Entre as faixas etárias houve diferença significativa em números absolutos para os monoblastos ($p=0,030$), monócitos maduros ($p=0,024$), monócitos clássicos ($p=0,017$) e DC plasmocitoides ($p=0,027$), sendo que indivíduos mais jovens (<40 e 40 a 60 anos) apresentaram os valores superiores quando comparados aos indivíduos mais velhos (>60 anos). Para as porcentagens houve diferença significativa

para monócitos não clássicos ($p=0,016$), sendo que indivíduos <40 e >60 apresentaram valores inferiores quando comparados aos indivíduos de 41 a 60 anos.

Tabela 21. Resultados de linhagem monocítica por idade

População (fenótipo)		Idade			Valor-p
		<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
Monoblastos (CD34+CD64+)					
Mediana	mm ³	31 (14; 74)	14 (9; 16)	11 (4; 35)	0,030
	%	0,09 (0,04; 0,16)	0,08 (0,03; 0,09)	0,05 (0,02; 0,12)	0,270
Mínimo	mm ³	3; 245	3; 50	0; 127	
Máximo	%	0,02; 0,62	0,02; 0,25	0,00; 0,44	
Promonócitos (CD64+CD300e-)					
Mediana	mm ³	582 (322; 930)	222 (184; 485)	242 (175; 808)	0,080
	%	1,64 (1,11; 2,06)	1,10 (0,99; 1,79)	1,24 (1,02; 1,70)	0,429
Mínimo	mm ³	41; 2420	143; 602	16; 1095	
Máximo	%	0,29; 2,78	0,90; 2,09	0,22; 2,86	
Monócitos maduros (CD64+CD300e+)					
Mediana	mm ³	932 (580; 1042)	600 (523; 882)	503 (432; 807)	0,024
	%	2,46 (1,57; 3,50)	2,81 (2,63; 3,69)	2,71 (1,76; 3,60)	0,630
Mínimo	mm ³	346; 1528	163; 908	325; 1044	
Máximo	%	0,99; 7,57	0,89; 5,73	1,42; 8,16	
Monócitos clássicos (CD14+CD16-)					
Mediana	mm ³	727 (491; 878)	509 (452; 626)	384 (315; 415)	0,017
	%	2,08 (1,22; 3,08)	2,43 (1,94; 3,13)	1,91 (1,39; 2,68)	0,652
Mínimo	mm ³	308; 1328	131; 807	243; 876	
Máximo	%	0,87; 5,46	0,72; 5,09	1,31; 5,51	
Monócitos intermediários (CD14+CD16+)					
Mediana	mm ³	53 (30; 65)	36 (25; 93)	48 (33; 62)	0,895
	%	0,13 (0,07; 0,27)	0,22 (0,12; 0,33)	0,22 (0,12; 0,38)	0,390
Mínimo	mm ³	14; 275	13; 95	22; 79	
Máximo	%	0,01; 1,17	0,07; 0,34	0,06; 1,07	
Monócitos não clássicos (CD14(frac)/CD16+)					
Mediana	mm ³	32 (18; 38)	48 (19; 82)	32 (16; 47)	0,374
	%	0,07 (0,05; 0,12)	0,28 (0,10; 0,31)	0,13 (0,10; 0,25)	0,016
Mínimo	mm ³	0; 66	15; 134	9; 97	
Máximo	%	0,00; 0,81	0,08; 0,50	0,01; 1,32	
Células dendríticas mieloides					
Mediana	mm ³	33 (13; 54)	16 (13; 35)	30 (11; 49)	0,616
	%	0,10 (0,06; 0,12)	0,09 (0,07; 0,12)	0,11 (0,07; 0,13)	0,774
Mínimo	mm ³	7; 96	12; 48	3; 75	
Máximo	%	0,02; 0,18	0,07; 0,24	0,04; 0,51	
Células dendríticas plasmocitoides					
Mediana	mm ³	70 (41; 120)	32 (21; 40)	36 (15; 91)	0,027
	%	0,20 (0,15; 0,27)	0,15 (0,11; 0,18)	0,16 (0,14; 0,25)	0,171
Mínimo	mm ³	13; 314	9; 71	13; 206	
Máximo	%	0,08; 0,40	0,06; 0,24	0,07; 0,35	

As quantificações também foram separadas de acordo com o sexo (feminino e masculino). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 22.

No sexo feminino a mediana para monoblastos foi de 0,09% (0,04; 0,19) e 28 (12; 79). A mediana para promonócitos foi de 1,30% (1,05; 2,12) e 419/mm³ (218; 827). A mediana para monócitos maduros foi de 1,83% (1,57; 2,91) e 546/mm³ (394; 1090). Na população de monócitos maduros a mediana para monócitos clássicos foi de 1,41% (1,32; 2,49) e 415/mm³ (308; 727). A mediana para monócitos intermediários foi de 0,12% (0,07; 0,20) e 33/mm³ (22; 62). A mediana para monócitos não clássicos foi de 0,12% (0,06; 0,13) e 25/mm³ (15; 38). A mediana para DC mieloides foi de 0,08% (0,07; 0,10) e 40/mm³ (14; 50). A mediana para DC plasmocitoides foi de 0,18% (0,12; 0,24) e 60/mm³ (23; 110).

No sexo masculino a mediana para monoblastos foi de 0,08% (0,04; 0,13) e 18/mm³ (10; 41). A mediana para promonócitos foi de 1,62% (1,09; 1,95) e 473 (177; 729). A mediana para monócitos maduros foi de 2,97% (1,78; 3,69) e 728/mm³ (568; 975). Na população de monócitos maduros a mediana para monócitos clássicos foi de 2,31% (1,40; 3,13) e 558/mm³ (424; 807). A mediana para monócitos intermediários foi de 0,22% (0,09; 0,34) e 55/mm³ (35; 65). A mediana para monócitos não clássicos foi de 0,10% (0,06; 0,28) e 33/mm³ (19; 48). A mediana para DC mieloides foi de 0,11% (0,07; 0,12) e 29/mm³ (13; 48). A mediana para DC plasmocitoides foi de 0,19% (0,15; 0,24) e 44/mm³ (32; 102).

Entre os sexos não foram observadas diferenças estatísticas.

Tabela 22. Resultados linhagem monocítica por sexo

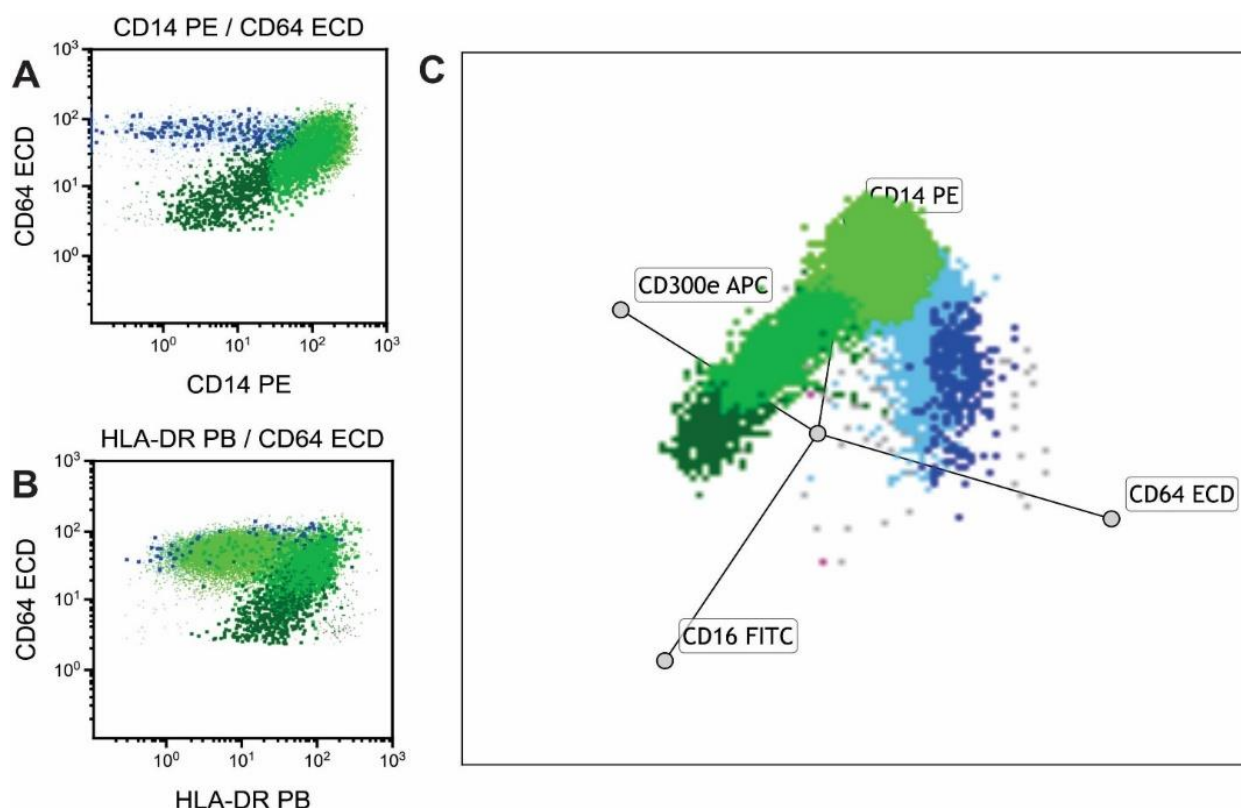
Tabela 22: Resultados imagem monoclonal por sexo				
População (fenótipo)		Sexo		Valor-p
		Feminino	Masculino	
Monoblastos (CD34+CD64+)				
Mediana	mm ³	28 (12; 79)	18 (10; 41)	0,460
	%	0,09 (0,04; 0,19)	0,08 (0,04; 0,13)	0,668
Mínimo	mm ³	1; 234	0; 245	
Máximo	%	0,01; 0,61	0,00; 0,62	
Promonócitos (CD64+CD300e-)				
Mediana	mm ³	419 (218; 827)	473 (177; 729)	0,791
	%	1,30 (1,05; 2,12)	1,62 (1,09; 1,95)	0,704
Mínimo	mm ³	73; 2420	16; 1390	
Máximo	%	0,73; 2,86	0,22; 2,78	
Monócitos maduros (CD64+CD300e+)				
Mediana	mm ³	546 (394; 1090)	728 (568; 975)	0,420

continua...

...continuação

	%	1,83 (1,57; 2,91)	2,97 (1,78; 3,69)	0,062
Mínimo	mm ³	163; 1528	391; 1324	
Máximo	%	0,89; 6,07	0,99; 8,16	
Monócitos clássicos (CD14+CD16-)				
Mediana	mm ³	415 (308; 727)	558 (424; 807)	0,207
	%	1,41 (1,32; 2,49)	2,31 (1,40; 3,13)	0,142
Mínimo	mm ³	131; 1328	338; 1183	
Máximo	%	0,72; 4,43	0,87; 5,51	
Monócitos intermediários (CD14+CD16+)				
Mediana	mm ³	33 (22; 62)	55 (35; 65)	0,089
	%	0,12 (0,07; 0,20)	0,22 (0,09; 0,34)	0,142
Mínimo	mm ³	13; 123	14; 275	
Máximo	%	0,01; 0,87	0,05; 1,17	
Monócitos não clássicos (CD14(frac)/CD16+)				
Mediana	mm ³	25 (15; 38)	33 (19; 48)	0,207
	%	0,12 (0,06; 0,13)	0,10 (0,06; 0,28)	0,690
Mínimo	mm ³	8; 51	0; 134	
Máximo	%	0,01; 0,66	0,00; 1,32	
Células dendríticas mieloides				
Mediana	mm ³	40 (14; 50)	29 (13; 48)	0,493
	%	0,08 (0,07; 0,10)	0,11 (0,07; 0,12)	0,376
Mínimo	mm ³	7; 96	3; 95	
Máximo	%	0,02; 0,51	0,02; 0,24	
Células dendríticas plasmocitoides				
Mediana	mm ³	60 (23; 110)	44 (32; 102)	0,678
	%	0,18 (0,12; 0,24)	0,19 (0,15; 0,24)	0,419
Mínimo	mm ³	14; 293	9; 314	
Máximo	%	0,07; 0,39	0,06; 0,40	

Além disso, podemos observar características de normalidade nas curvas de maturação da linhagem monocítica (Figura 18). Embora tenha sido observada diferença em valores absolutos dentre as faixas etárias, não houve diferença visual na curva de maturação.



A: Curva de maturação monocítica apresentada em cruzamento de CD64 *versus* CD14 (azul escuro: monoblastos; azul claro: promonócitos; verde claro (monócitos maduros clássicos); verde intermediário: monócitos intermediários; verde escuro: monócitos não clássicos); **B:** Curva de maturação monocítica apresentada em cruzamento de CD64 *versus* HLA-DR; **C:** visualização de gráfico radar da linhagem monocítica obtido através da adição dos marcadores CD16, CD300e, CD14 e CD64.

Figura 18. Curva de maturação da linhagem monocítica

3.8 Avaliação da linhagem eritroide

Através da combinação de anticorpos utilizada no tubo 5 (Tabela 7), foi possível realizar a quantificação de células da linhagem eritroide. Na figura 11 podemos observar a estratégia de análise utilizada. As quantificações foram realizadas de acordo com a faixa etária (Tabela 8).

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 23. A mediana para precursor eritroide foi de 0,05% (0,03; 0,08) e 13/mm³ (6; 36). A mediana para eritroblastos imaturos foi de 1,12% (0,51; 1,58) e 387/mm³ (104; 752). A mediana para eritroblastos maduros foi de 8,96% (4,19; 12,95) e 2885/mm³ (1102; 4703).

Entre as faixas etárias houve diferença significativa em números absolutos para eritroblastos maduros ($p=0,004$), sendo que indivíduos com idade <40 anos apresentaram os valores superiores quando comparados aos indivíduos de >40 anos. Para as porcentagens não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 23. Resultados da linhagem eritroide por idade

População (fenótipo)		Idade			Valor-p
		<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
Precursor eritroide (CD34+CD117+CD36+CD71+)					
Mediana	mm ³	20 (10; 36)	6 (3; 10)	16 (3; 36)	0,114
	%	0,06 (0,03; 0,08)	0,03 (0,01; 0,05)	0,08 (0,02; 0,08)	0,367
Mínimo	mm ³	2; 74	1; 64	0; 65 (11)	
Máximo	%	0,00; 0,13	0,01; 0,20	0,00; 0,12 (11)	
Eritroblastos imaturos (CD36+CD71+CD117+CD105+)					
Mediana	mm ³	488 (149; 1115)	128 (100; 199)	262 (90; 788)	0,114
	%	1,20 (0,61; 1,62)	0,73 (0,36; 0,94)	1,12 (0,44; 1,64)	0,257
Mínimo	mm ³	15; 1898 (28)	44; 538 (7)	1; 1189 (11)	
Máximo	%	0,17; 3,37 (28)	0,29; 1,71 (7)	0,02; 2,45 (11)	
Eritroblastos maduros (CD36+CD71+)					
Mediana	mm ³	4044 (1559; 6102)	1400 (735; 2160)	1812 (797; 3608)	0,028
	%	9,76 (4,23; 14,42)	4,61 (4,19; 10,31)	8,25 (4,10; 11,19)	0,369
Mínimo	mm ³	78; 16153	205; 2656	93; 10947	
Máximo	%	1,17; 22,05	1,32; 12,55	1,50; 16,87	

As quantificações também foram separadas de acordo com o sexo (feminino e masculino). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 24.

No sexo feminino a mediana para precursor eritroide foi de 0,05% (0,03; 0,08) e 16/mm³ (6; 36). A mediana para eritroblastos imaturos foi de 1,03% (0,81; 1,32) e 467/mm³ (181; 1036). A mediana para eritroblastos maduros foi de 9,76% (7,42; 11,87) e 3561/mm³ (1986; 6189).

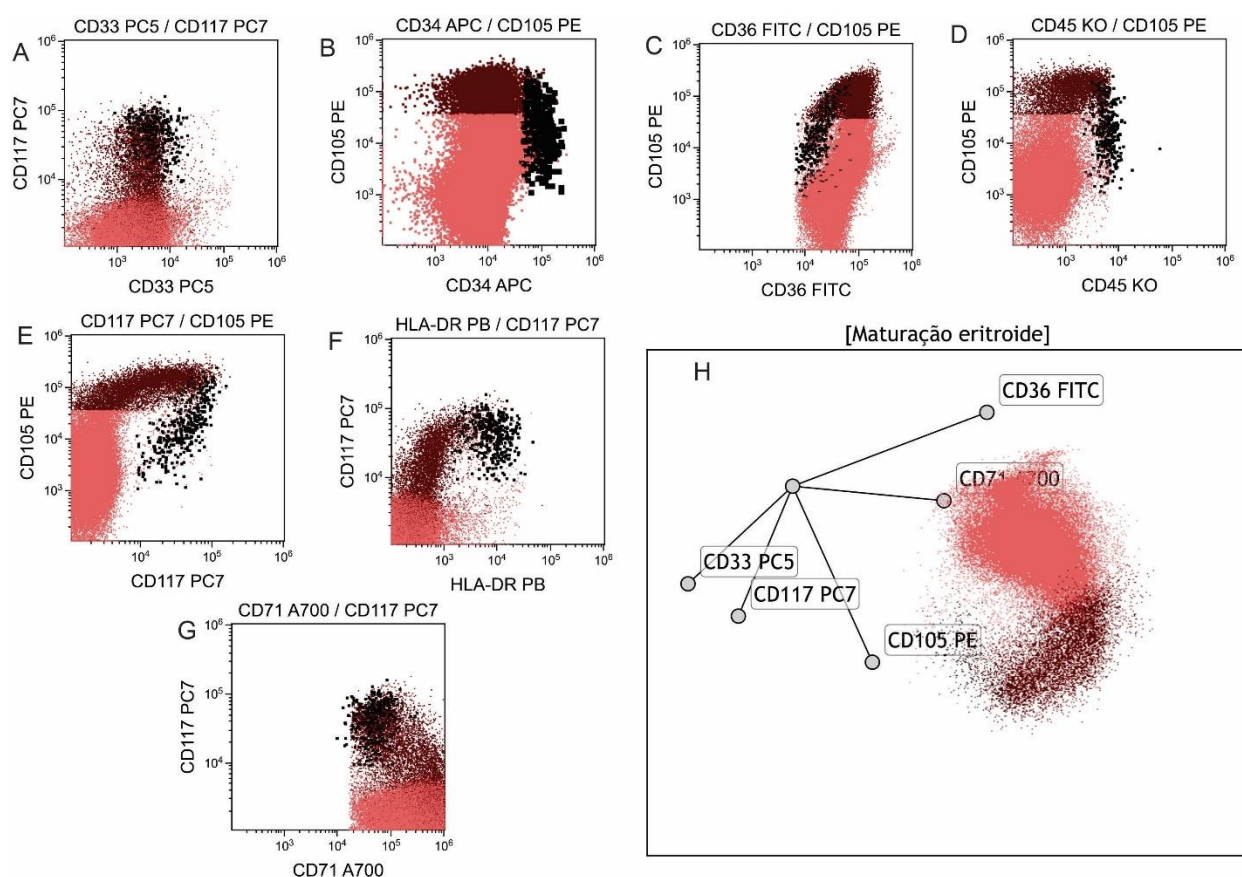
No sexo masculino a mediana para precursor eritroide foi de 0,05% (0,03; 0,08) e 12/mm³ (6; 31). A mediana para eritroblastos imaturos foi de 1,14% (0,36; 1,65) e 335/mm³ (100; 538). A mediana para eritroblastos maduros foi de 6,19% (3,13; 13,64) e 1636/mm³ (797; 4639).

Entre os sexos não foram observadas diferenças estatísticas.

Tabela 24. Resultados da linhagem eritroide por sexo

População (fenótipo)		Sexo		Valor-p
		Feminino	Masculino	
Precursor eritroide (CD34+CD117+CD36+CD71+)				
Mediana	mm³	16 (6; 36)	12 (6; 31)	0,782
	%	0,05 (0,03; 0,08)	0,05 (0,03; 0,08)	0,676
Mínimo	mm³	1; 69	0; 74	
Máximo	%	0,00; 0,12	0,00; 0,20	
Eritroblastos imaturos (CD36+CD71+CD117+CD105+)				
Mediana	mm³	467 (181; 1036)	335 (100; 538)	0,278
	%	1,03 (0,81; 1,32)	1,14 (0,36; 1,65)	0,827
Mínimo	mm³	41; 1353	1; 1898	
Máximo	%	0,41; 3,37	0,02; 3,05	
Eritroblastos maduros (CD36+CD71+)				
Mediana	mm³	3561 (1986; 6189)	1636 (797; 4639)	0,159
	%	9,76 (7,42; 11,87)	6,19 (3,13; 13,64)	0,321
Mínimo	mm³	402; 16153	78; 12437	
Máximo	%	3,87; 16,05	1,17; 22,05	

Além disso, podemos observar características de normalidade nas curvas de maturação da linhagem eritroide (Figura 19). Embora tenha sido observada diferença em valores absolutos dentre as faixas etárias, não houve diferença visual na curva de maturação.



A: Curva de maturação eritroide apresentada em cruzamento de CD117 *versus* CD33 (preto: precursor eritroide; marrom: eritroblastos imaturos; salmão: eritroblastos maduros); **B:** Curva de maturação eritroide apresentada em cruzamento de CD105 *versus* CD34; **C:** Curva de maturação eritroide apresentada em cruzamento de CD105 *versus* CD36; **D:** Curva de maturação eritroide apresentada em cruzamento de CD105 *versus* CD45; **E:** Curva de maturação eritroide apresentada em cruzamento de CD105 *versus* CD117; **F:** Curva de maturação eritroide apresentada em cruzamento de CD117 *versus* HLA-DR; **G:** Curva de maturação eritroide apresentada em cruzamento de CD117 *versus* CD71; **H:** visualização de gráfico radar da linhagem eritroide obtido através da adição dos marcadores CD33, CD117, CD105, CD71 e CD36.

Figura 19. Curva de maturação linhagem eritroide

3.9 Avaliação de score de Ogata

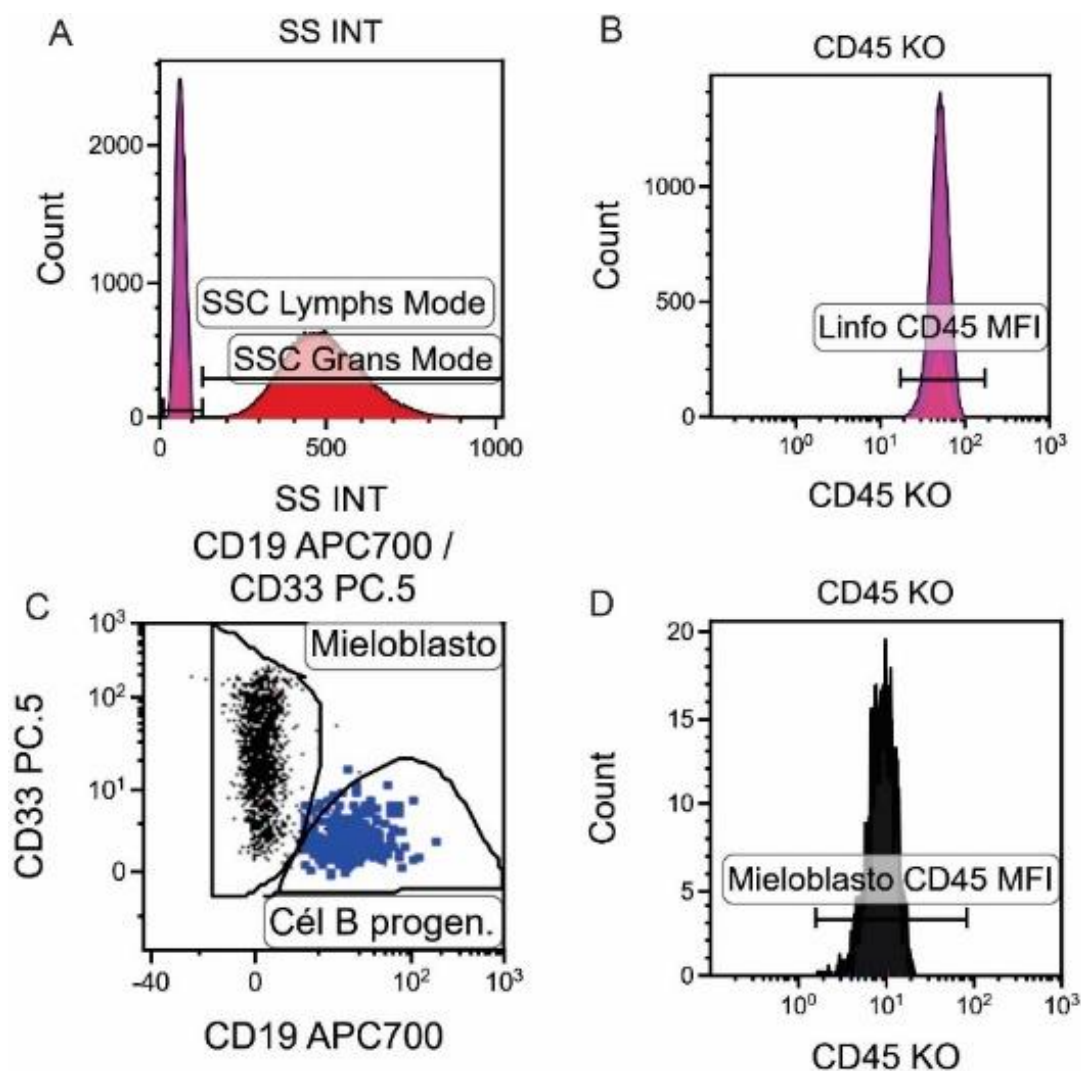
Através da combinação de anticorpos utilizada no tubo 2 (Tabela 7), foi possível realizar a avaliação de displasia através da pontuação do score de Ogata.⁽⁵⁵⁾ As quantificações também foram avaliadas de acordo com a faixa etária (Tabela 8). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 25. A mediana do valor de complexidade de granulócitos (SSC, *mode ratio*) foi de 7,74 (7,19; 8,20). A mediana intensidade de fluorescência de mieloblastos *versus* linfócitos foi de 5,88 (5,34; 6,18). A mediana de mieloblastos foi de 0,69% (0,53; 0,93). A mediana de progenitor B foi de 13,78% (7,08; 19,79).

Entre as faixas etárias houve diferença significativa na intensidade de fluorescência de mieloblastos *versus* linfócitos ($p=0,001$).

Tabela 25. Resultados de avaliação de displasia (*score* de Ogata)

Score de Ogata (pontuação)		Idade			Valor-p
		<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
SSC (<6 = 1 ponto)					
Mediana		7,81 (7,18; 8,24)	7,52 (6,90; 8,31)	7,50 (7,19; 8,15)	0,806
Mínimo	%	5,94; 9,30	6,48; 8,41	5,95; 8,63	
Máximo					
CD45 (<4 ou >7,5 = 1 ponto)					
Mediana		5,96 (5,52; 6,43)	6,03 (5,77; 6,18)	5,17 (5,06; 5,49)	0,001
Mínimo	%	4,94; 8,13	5,38; 6,55	4,79; 6,09	
Máximo					
Mieloblastos (>2 = 1 ponto)					
Mediana		0,78 (0,57; 0,96)	0,57 (0,33; 0,65)	0,63 (0,36; 0,95)	0,146
Mínimo	%	0,35; 1,40	0,18; 1,16	0,12; 1,88	
Máximo					
Progenitor B (<5 = 1 ponto)					
Mediana		14,53 (9,65; 20,34)	14,12 (7,68; 45,95)	9,50 (1,71; 19,66)	0,305
Mínimo	%	0,41; 41,45	6,66; 52,26	0,15; 31,27	
Máximo					

Além disso, podemos observar os parâmetros avaliados para a pontuação do *score* de Ogata e colaboradores (Figura 20).



A: histograma avaliando o SSC de linfócitos e granulócitos; **B:** A intensidade de fluorescência média (MFI) de CD45 de mieloblastos; **C:** Na região "CD45+CD34+" foi separada de expressão positiva para CD19 e negativa para CD33, classificada como precursores linfoides B (azul escuro) e positiva para CD33 e negativa para CD19, classificada como precursores mieloides (preto); **D:** A intensidade de fluorescência média (MFI) de CD45 de linfócitos.

Figura 20. Estratégia de gate para avaliar a pontuação de displasia (score de Ogata)

3.10 Avaliação de red score

Através da combinação de anticorpos utilizada no tubo 5 (Tabela 7), foi possível realizar a avaliação de displasia da linhagem eritroide através da pontuação do red score.⁽⁵⁶⁾ Na figura 21 podemos observar a estratégia de análise utilizada. As quantificações também foram avaliadas de acordo com a faixa etária (Tabela 8). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 26. A mediana de coeficiente de variação da expressão do CD36 foi de 56,09% (51,49; 61,27). A mediana de coeficiente de variação da expressão do CD71 foi de 60,96% (53,63; 72,43).

Entre as faixas etárias não foram observadas diferenças estatísticas.

Tabela 26. Resultados de avaliação de displasia eritroide (*red score*)

Tabela 23: Resultados de avaliação de displasia endocervical (red score)				
Red score (pontuação)	Idade			Valor-p
	<40 anos	41 a 60 anos	>60 anos	
CV CD36 (>65 = 2 pontos)				
Mediana	56,09 (51,93; 62,43)	58,50 (50,03; 61,51)	53,59 (50,52; 61,15)	0,845
Mínimo	48,48; 70,89	48,41; 72,38	46,05; 69,05	
Máximo				
CV CD71 (>80 = 3 pontos)				
Mediana	68,76 (56,87; 74,07)	56,62 (53,63; 72,43)	57,55 (48,16; 60,93)	0,127
Mínimo	31,80; 84,18	43,97; 82,29	31,04; 95,85	
Máximo				

Além disso, podemos observar os parâmetros avaliados para a pontuação do *red score* (Figura 21).

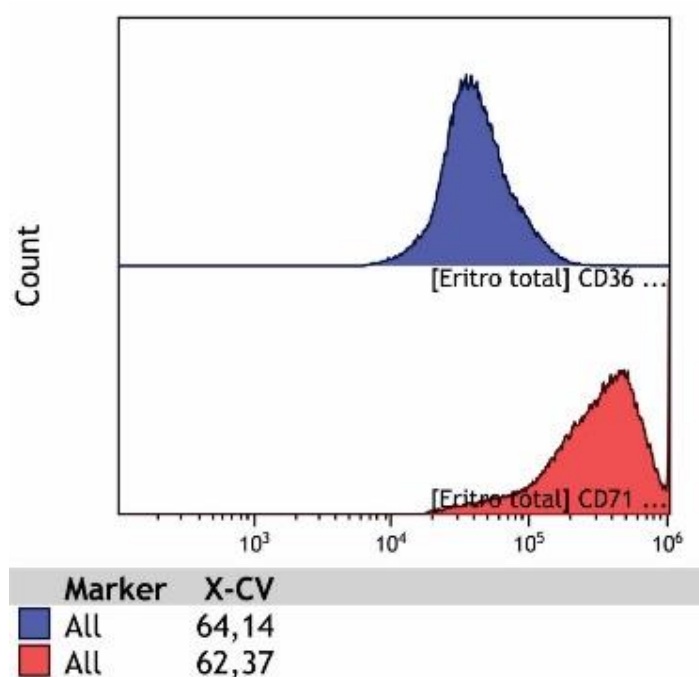


Figura 21. Estratégia de *gate* para avaliar o CV do CD36 e CD71 (*red score*)

4 DISCUSSÃO

Na literatura, é possível encontrar estudos relevantes que discutem valores de referência e estágios maturacionais por CFM. Estes estudos foram iniciados há mais de três décadas e são utilizadas como referência até hoje. Estas publicações demonstraram que mesmo avaliando poucos parâmetros (<5) foi possível mapear valores de normalidade e estágios maturativos das principais linhagens hematopoiéticas.^(3,25,57)

Com os avanços dos equipamentos de CFM, em relação a tecnologia e *softwares* de análise, tornou-se possível identificar e quantificar precisamente milhares de células e suas subpopulações, em diversos materiais biológicos, em um tempo relativamente curto, quando comparadas a outras metodologias (biologia molecular e citogenética).^(1,6,8) Os equipamentos de citometria de fluxo com capacidade de análise de parâmetros superior a 8 cores vêm garantindo maior acurácia ao método e reduzindo o nível de imprecisões.^(14,53) Desde a caracterização imunofenotípica na separação de populações celulares normais e anormais, estágios maturacionais, compreensão dos padrões imunofenotípicos e determinação dos níveis de expressão das proteínas de acordo com o estágio maturacional.⁽¹⁵⁾

O intuito deste estudo foi avaliar valores de normalidade em amostras de MO provenientes de indivíduos brasileiros sem doenças hematológicas de acordo com a faixa etária (<40, 40 a 60, >60 anos) e o sexo (feminino, masculino). Através da utilização de equipamentos com configuração de 10 cores. Em uma análise semiautomatizada, foi possível avaliar e quantificar, em valores absolutos (mm³) e em percentual (%), diversas linhagens celulares, entre elas os linfócitos B (imaturos e maduros), linfócitos T, células NK, monócitos (imaturos e maduros), neutrófilos (maduros e imaturos), basófilos, mastócitos, eritroblastos e DC (plasmocitoides e mieloides).

A quantificação de células em valores absolutos foi realizada através da adição de “*beads*” de quantificação. Os resultados observados por CFM foram comparados aos resultados obtidos em contador hematológico. Os resultados avaliados apresentaram uma boa correlação entre as plataformas para o número total células nucleadas (R=0.9966), eritroblastos (R=0.9576) e granulócitos (R=0.9928). Na quantificação de linfócitos (R=0.8947) e monócitos (R=0.8558) houve uma baixa correlação, provavelmente isso se deve ao fato de que na CFM, além dos parâmetros

de tamanho e complexidade, são adicionados anticorpos monoclonais para distinguir as populações celulares enquanto o contador hematológico baseia-se apenas na dispersão frontal e lateral de luz.

Entretanto, a maioria dos laboratórios opta por utilizar a quantificação do hemograma por analisadores hematológicos, devido a facilidade de operação quando comparado à CFM, que além exigir equipamentos mais sofisticados, as técnicas requerem a presença de um especialista e “*beads*” de quantificação, elevando assim seu custo.^(58–60) O método de plataforma única é recomendando quando existe dificuldade em avaliar a celularidade por um analisador hematológico, como por exemplo na quantificação de células CD34+ em amostras de aférese. Os resultados deste estudo demonstraram que a quantificação das células pode ser avaliada por ambas as plataformas. Entretanto, quando for utilizado o analisador hematológico é recomendado que a quantificação de linfócitos e monócitos seja confirmada por análise morfológica.

A viabilidade celular da amostra é um parâmetro importante a ser avaliado, pois as células não viáveis podem ter seu tamanho alterado e gerar ligações inespecíficas, interferindo na análise e interpretação dos dados obtidos. As diretrizes em CFM recomendam que amostras com viabilidade celular inferior a 75% devem ser rejeitadas, por gerar resultados não confiáveis. Neste estudo as amostras de MO utilizadas para mapear valores de normalidade apresentaram resultados de viabilidade celular superior ao recomendado (>90%).

Outro parâmetro importante a ser avaliado em amostras de MO é o nível de hemodiluição. Na coleta para obtenção do aspirado de MO, a amostra pode estar contaminada com células maduras do sangue periférico. Essa contaminação pode ocorrer, pois a primeira aspiração normalmente é utilizada inteiramente para avaliação morfológica (mielograma), e uma segunda aspiração é a destinada a análises imunofenotípicas. Por esta razão, as porcentagens de populações de células da MO obtida a partir de análises morfológicas são muitas vezes diferentes daquelas analisadas por CFM.⁽⁹⁾

Entretanto, nosso estudo não contemplou a confecção da lâmina a partir da primeira punção. Optamos por não realizar esta análise, pois as coletas eram realizadas quando os pacientes estavam passando por procedimento cirúrgico ortopédico de urgência e a equipe de médicos responsáveis pela coleta não tinham treinamento técnico para confecção da lâmina de biópsia de MO.

Para determinar se a amostra está adequada ou não para análise, são utilizadas algumas estratégias, uma vez que a contaminação por sangue periférico na coleta do aspirado de MO é inevitável. Nosso estudo utilizou como estratégia um cálculo baseado no estudo de Pont et al.,⁽⁹⁾ para medir e quantificar o nível de hemodiluição.⁽⁹⁾

Quando buscamos por valores de referência em MO normal na literatura, podemos observar algumas limitações, quanto as amostras não serem provenientes de doadores sem doenças hematológicas, pequena coorte (<10), equipamentos com tecnologia inferior a 10 cores, poucos marcadores, restrição nas populações estudadas, diferença entre os sexos (feminino e masculino) e avaliações realizadas somente em valores percentuais.

Os pontos fortes do nosso estudo quando comparado aos demais, são referentes ao número de participantes do estudo (46 doadores), utilização de amostras de doadores sem doença hematológica, número de populações celulares estudadas em uma combinação de 10 anticorpos monoclonais por tubo e as avaliações realizadas em valores relativos (%) e absolutos (mm³) de acordo com a faixa etária e o sexo, primeiro estudo brasileiro com estas características.

Nossa comparação na distribuição das populações celulares de acordo com a faixa etária forneceu novas informações sobre a variação da quantidade de células ao longo da vida. Em indivíduos mais velhos, observa-se aumento de células plasmocitárias que expressam CD56 (p=0,031 em valores absolutos), na relação CD4/CD8 (p=0,002), em mastócitos (p=0,004 em percentuais) e monócitos não clássicos (p=0,016 em percentuais).

Em contrapartida, ainda em indivíduos mais velhos observa-se diminuição das populações de linfócitos T citotóxicos (p=0,031 em valores absolutos), linfócitos T duplo negativos (p=0,018 em valores absolutos), células NK que expressam CD56 (p=0,002 em valores absolutos e p=0,012 em percentuais), células NK que expressam CD56 e CD16 (p=0,024 em valores absolutos), mieloblastos (p=0,048 em valores absolutos), metamielócitos/bastonetes (p=0,038 em valores absolutos), neutrófilos (p=0,006 em valores absolutos), monoblastos (p=0,030 em valores absolutos), monócitos maduros (p=0,024 em valores absolutos), monócitos clássicos (p=0,017) e DC plasmocitoides (p=0,027 em valores absolutos), eritroblastos maduros (p=0,004 em valores absolutos).

Entre as faixas etárias houve diferença significativa na intensidade de fluorescência de mieloblastos *versus* linfócitos (p=0,001).

Em geral, o envelhecimento está associado a alterações disfuncionais no sistema imunológico, processo denominado imunossenescência. Indivíduos mais velhos normalmente apresentam inflamação crônica de baixo nível, provavelmente como consequência da exposição contínua a antígenos, com função imunológica deficiente, aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias pela memória efetora, células T senescentes e macrófagos. A inflamação crônica não apenas resulta na imunossenescência, mas também a impulsiona. O envelhecimento afeta todos os componentes celulares do sistema imunológico, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células NK.⁽⁶¹⁾

Na avaliação dos linfócitos B, identificamos na literatura que o número de células desta linhagem está relacionado à idade e que, de acordo com o avanço da idade, o número de células imaturas é reduzido em contrapartida ao aumento de células maduras, o que está de acordo com as funções dos linfócitos B, associados ao desenvolvimento normal do sistema imunológico.^(7,15) Dentre as células maduras desta linhagem destacam-se as células plasmocitárias que se diferenciam após respostas imunológicas exercidas por algum antígeno.⁽⁶²⁾

As principais características imunofenotípicas para reconhecer células plasmocitárias anômalas é a baixa expressão de CD38, CD19 e CD45, com a expressão anômala de CD56 e monoclonalidade de cadeia leve intracitoplasmática. Entretanto, há estudos que descrevem a presença de CD56 em plasmócitos normais. O estudo de Peceliunas et al., identificou aproximadamente 9,6% (0-35,7%) do total de células plasmocitárias que podem expressar CD56, corroborando com nossos achados.⁽⁶²⁾

Na avaliação dos linfócitos T, não houve a intenção de verificar o estágio maturacional destas células, uma vez que o precursor linfoide migra para o timo, onde ocorre sua maturação. Os valores de referência de linfócitos T são bem definidos em amostras de sangue periférico, entretanto, até o momento não existem estudos que avaliem essa população na MO.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

A maioria dos linfócitos T vistos na MO a expressam CD4 ou CD8. A ausência de CD4 e CD8 pode ser observada em linfócitos T TCR gama/delta que frequentemente não expressam ambos os antígenos e a presença de ambos os antígenos podem representar escape tímico, que são também presentes durante a recuperação imunológica em pacientes submetidos a transplante de MO. Entretanto deve-se ter cautela ao avaliar os linfócitos T duplo positivo e duplo negativo, pois apesar

de ser menos comum o aumento dessas populações, muitas vezes suscitam preocupação quando vistas, pois além de ser um fenótipo clássico de linfoma, podem ser recorrentes de condições reativas, como doenças autoimunes, miastenia gravis, artrite reumatoide e esclerose múltipla.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

No estudo de Weyand et al.,⁽⁶⁷⁾ foi descrito que o envelhecimento imunológico é um fator de risco que amplia as chances da ocorrência de patologias associadas ao processo do envelhecimento. Com a deterioração progressiva da imunidade protetora, indivíduos mais velhos tornam-se mais suscetíveis a infecções e respondem com menor intensidade aos desafios imunes como as vacinas. Embora esses mecanismos não estejam totalmente compreendidos, nota-se que os linfócitos T parecem envelhecer mais rápido, principalmente no compartimento de linfócitos T citotóxicos (CD8+), corroborando nossos achados.⁽⁶¹⁾

Na avaliação das células NK, são descritos dois subtipos, a população que expressa somente CD56 e a população que expressa CD56 e CD16. A população que expressa somente CD56 representa um estágio de desenvolvimento mais imaturo e tem um papel distinto como fonte primária de citocinas imunorreguladoras, enquanto a população que expressa CD16 é considerada de células efetoras altamente citotóxicas.

Idosos normalmente apresentam diminuição de células NK CD56+CD16-. Essas células são mais imaturas e apresentam telômeros mais longos que a população de células NK que expressa CD16, corroborando com nossos achados.^(61,68,69)

A redução de células diferenciadas na linhagem linfóide B, combinada com uma redução geral na produção de células T e NK pode explicar a linfopenia associada ao envelhecimento e contribuir para o comprometimento da imunidade em idosos.⁽⁷⁰⁾

Na avaliação de células da linhagem monocítica concluímos que o seu papel no processo inflamatório e na apresentação de antígenos já está muito bem descrito e definido em literatura. Ao contrário do que ocorre com os linfócitos, os monócitos tendem a aumentar ao decorrer da idade, principalmente no subgrupo de monócitos maduros não clássicos que são caracterizados pela expressão de CD16 e diminuição de expressão de CD14 e sua função está relacionada a secreção de citocinas pró-inflamatórias, corroborando nossos achados.⁽⁷⁰⁾

Na avaliação de células precursoras mielóides e linfóides B, neste estudo, é possível identificar diminuição destes precursores, tanto linfóide B, quanto

mieloide, entretanto observamos que o número de precursores mieloides é superior quando comparado ao precursor linfóide B em idosos. Apesar de nossos resultados não apresentarem significância estatística, identificamos concordância com os dados da literatura. O estudo de Groarke et al.⁽⁷⁰⁾ descreveu que há preservação do número de células mieloides e diminuição das células linfóides B, distorcendo a relação mieloide-linfóide e resultando no predomínio de precursores mieloides. Tal fato pode explicar que a maioria das malignidades em idosos é de origem mieloide.⁽⁷⁰⁾

Na avaliação de células da linhagem eritroide, de acordo com a literatura, durante o envelhecimento ocorre redução dos níveis de eritropoetina (EPO), que é o hormônio responsável por estimular a eritropoiese, consequentemente sua redução em idosos justifica os quadros de anemias nesta faixa etária, demonstrando forte relação com os resultados obtidos neste estudo.⁽⁷⁰⁾

Em geral, o envelhecimento causa muitas alterações na MO, dentre elas o número total de células, senescência, diferenciação de linhagens, composição celular e a função das células-tronco hematopoiéticas, que podem levar a consequências clínicas, contribuindo para uma maior taxa de citopenias (anemia e linfopenia) e risco de malignidade hematológica.^(70,71)

Neste estudo, além da avaliação em relação à idade, realizamos também uma avaliação em relação ao sexo, que é uma variável biológica que afeta as respostas imunes a antígenos próprios e estranhos (por exemplo, de fungos, vírus, bactérias, parasitas e alérgenos). É cada vez mais importante reconhecer as diferenças em relação ao sexo nas respostas imunes quando consideramos as diferenças marcantes observadas entre homens e mulheres em várias doenças.⁽⁶⁹⁾

Em nosso estudo, observamos que a população de linfócitos B maduros ($p=0,013$) e linfócitos B que expressam CD5 ($p=0,014$) são elevadas em indivíduos do sexo feminino quando comparadas aos indivíduos do sexo masculino.

Na literatura é descrito que em mulheres, independentemente da idade, a maioria dos genes expressos são significativamente supra regulados em linfócitos B, consequentemente levando a maior produção de anticorpos, quando comparado aos homens. Os níveis basais de imunoglobulina são mais elevados, consequentemente o número de linfócitos B também, corroborando nossos achados.^(69,72,73)

Em nosso estudo, apesar de não apresentar significância estatística, podemos observar um leve aumento em valores absolutos de linfócitos T auxiliares e

citotóxicos em mulheres. Na literatura também é descrito que em mulheres, além do aumento da proporção de linfócitos B, observa-se níveis mais elevados de linfócitos T ($p=0,333$) auxiliares ($p=0,140$) e citotóxicos ($p=0,393$) em relação aos homens, corroborando nossos achados.^(69,72,73)

Em nosso estudo observamos que o percentual de células NK é relativamente maior em indivíduos do sexo masculino ($p=0,007$), principalmente na população de células que expressa CD56 e CD16 ($p=0,013$). Na literatura é descrito que os níveis hormonais de progesterona e estrogênio reduzem a atividade das células NK. Demonstra-se, assim, que mulheres em uso de métodos contraceptivos orais apresentam menor atividade das células NK. Isso explica a diminuição de células NK observadas nas mulheres, corroborando com nossos achados.^(61,68,69)

Neste estudo incluímos a avaliação da expressão antigênica de CD5 em linfócitos B e concomitantemente as expressões das cadeias leves kappa e lambda. O CD5 é um marcador expresso por linfócitos T, entretanto sua expressão em linfócitos B maduros está associada a restrições para uma das cadeias leves (kappa ou lambda) e pode ocorrer em neoplasias linfoides B crônicas.^(6,8) As neoplasias B mais clássicas são o linfoma de células do manto e a leucemia linfocítica crônica.^(6,8) Na literatura é descrita a existência de uma subpopulação de linfócitos B que expressam CD5, sendo descrita como uma população de linfócitos B transicionais.⁽⁷⁴⁾ A determinação de um valor de referência para estas células na MO normal é de extrema importância, uma vez que até o momento não há relatos de valores de referência que possam diferenciar a expressão normal da expressão patológica deste marcador. Apesar da expressão antigênica de CD5 sugerir população anômala, na ausência de doenças hematológicas, essas células devem expressar imunoglobulinas de cadeia leve kappa e lambda em proporções entre 1:2 e 1:3.

Em nosso estudo observamos que os linfócitos B que expressam CD5 apresentaram imunoglobulinas de cadeias leves kappa e lambda em proporções normais, com uma relação de 1,70 (1,46; 1,96) e, portanto, atendem os critérios de normalidade.

Com o intuito de validar os achados deste estudo, comparamos nossos resultados com o que já está disponível na literatura e compilamos em formato de tabela (Tabela 27) para melhor visualização dos dados.

Dentre as comparações realizadas observamos que o estudo realizado por Roa-Higuera et al.,⁽⁴⁾ foi o que apresentou maior semelhança de

metodologia proposta. O estudo de Jafari et al.,⁽²²⁾ embora limitado por uma pequena coorte e amostras de MO de suspeita de patologias clínicas, mas sem alterações imunofenotípicas identificadas, utilizaram equipamento com capacidade de 10 cores e estudaram principalmente curvas de maturação. O estudo de Pont et al.,⁽⁹⁾ apresentou uma grande coorte de amostras, porém as amostras foram selecionadas de amostras com suspeita de patologias clínicas, mas sem alterações imunofenotípicas ou morfológicas identificadas. O estudo de Matarraz et al.,⁽¹¹⁾ utilizou amostras de medula normal e comparou com amostras de MO reativas, porém o estudo em questão não utilizou marcadores suficientes para diferenciação de linfócitos B e linfócitos T. Os estudos de Nies et al.⁽¹³⁾ e Brooimans et al.⁽⁵⁾ também apresentaram uma grande coorte, entretanto também não utilizaram marcadores suficientes para diferenciação de linfócitos B e linfócitos T. Apenas o estudo de Lorand-Metze et al.⁽¹²⁾ é brasileiro, o em questão avaliou somente a população de células imaturas linfóide B, sem a intenção de estabelecer valores de referência.

Observando essas comparações, percebemos semelhanças entre os resultados. Entretanto, nossa metodologia contemplou mais parâmetros avaliados, na capacidade do citômetro, nos anticorpos monoclonais utilizados, nas populações estudadas e nos resultados obtidos (sexo e faixa etária). Assim, nossos achados não são comparáveis com outros estudos.

Apesar deste estudo não ter realizado a comparação em relação a etnia, este é o primeiro estudo brasileiro em que foi realizado o estabelecimento de valores de normalidade em medula óssea de indivíduos sem doenças hematológicas. Sendo que o Brasil é considerado um dos países de maior diversidade étnica do mundo, pois sua população apresenta características dos colonizadores europeus (brancos), negros (africanos), e indígenas (população nativa), além de elementos dos imigrantes asiáticos.

Tabela 27. Comparação dos resultados deste estudo com resultados de publicações relevantes

1º Autor – Ano da publicação – número de doadores – idade – resultados – configuração do citômetro		Resultados obtidos neste estudo: Mediana (1º e 3º Q)
Brooimans et al. ⁽⁵⁾ – 2008 – 78 – 48 (15 - 79 anos) – mediana – 4 cores (%)		
Células CD34+	1,8	0,81 (0,57 - 1,1)
Linfócitos	13,4	10,81 (8,33 - 14,57)
Monócitos	3,5	2,65 (1,59 - 3,54)
Granulócitos	73,7	59,72 (45,84 - 78,33)
Pont et al. ⁽⁹⁾ – 2018 – 180 – 45 (0,3-70 anos) – mediana, % – 10 cores – faixa etária avaliada: 18-70 anos n=51		
Monócitos	4,4	2,65 (1,59 - 3,54)
Mieloblastos	0,7	0,69 (0,53 - 0,93)
Grans imaturo	44,2	37,98 (27,14 - 47,21)
Neutrófilos	22,8	21,74 (18,70 - 31,12)
Eosinófilos	2,3	2,08 (1,50 - 3,27)
Basófilos	0,3	0,22 (0,15 - 0,37)
Eritroblastos	12,5	10,17 (4,82 - 14,88)
Linfócitos B imaturo	0,9	0,57 (0,26 - 1,13)
Linfócitos B	1,8	1,86 (1,27 - 2,51)
Linfócitos T	8,1	7,96 (6,50 - 10,43)
Células NK	1,3	0,99 (0,56 - 1,63)
Plasmócitos	0,4	0,16 (0,11 - 0,27)
Matarráz et al. ⁽¹¹⁾ – 2011 – 47 – 67 (47-49 anos), média, % e DP – 4 cores		
Células CD34+	0,9 (0,8)	0,81 (0,57 - 1,1)
Linfócitos B imaturo CD34+	0,07 (0,1)	0,12 (0,04 - 0,17)
Linfócitos	13 (5,4)	10,81 (8,33 - 14,57)
Monócitos	4 (2)	2,65 (1,59 - 3,54)
Mieloblastos	1 (0,5)	0,69 (0,53 - 0,93)
Mielócitos e metamielócitos	19,8 (8)	27,82 (21,08 - 38,34)
Neutrófilos	33 (14)	21,44 (16,53 - 27,14)
Eosinófilos	3,5 (4,5)	2,08 (1,50 - 3,27)
Eritroblastos	15 (9)	10,17 (4,82 - 14,88)

continua...

...continuação

Jafari et al.⁽²²⁾ – 2017 – 12 – 49 (21-74 anos) – média, % e DP – 10 cores

Células CD34+	0,96 (0,57)	0,81 (0,57 - 1,1)
Monócitos	3,75 (2,16)	2,65 (1,59 - 3,54)
Grans	63,47 (10,14)	59,72 (45,84 - 78,33)
Mieloblastos	0,41 (0,24)	0,69 (0,53 - 0,93)
Monoblastos	0,06 (0,05)	0,08 (0,04 - 0,13)
Promielócitos	1,04 (1,5)	0,54 (0,38 - 0,75)
Basófilos	0,24 (0,19)	0,22 (0,15 - 0,37)
Precursor eritroide	0,15 (0,10)	0,05 (0,03 - 0,08)
Eritroblastos maduro	3,6 (3,25)	10,17 (4,82 - 14,88)
Eritroblastos imaturos	0,21 (0,12)	1,12 (0,51 - 1,58)

Roa-Higuera et al.⁽⁴⁾ – 2010 – 5 – (61 - 79 anos) – média % - mm³ e DP – 5 cores

Células CD34+	1,5 (0,7) 117 (92)	0,81% (0,57 - 1,1) 112 (44 - 231)
Monócitos	4 (1) 323 (225)	2,65% (1,59 - 3,54) 690 (503 - 995)
Promonócitos	0,7 (0,2) 49 (27)	1,56% (1,05 - 1,95) 451 (194 - 736)
Mieloblastos	1,4 (0,5) 102 (91)	0,69% (0,53 - 0,93) 57 (25 - 112)
Promielócitos	1,3 (1,1) 108 (77)	0,54% (0,38 - 0,75) 161 (69 - 270)
Mielócitos	9 (2) 800 (622)	4,88% (3,54 - 6,86) 1577 (657 - 2568)
Metamielócitos	22 (11) 1589 (1102)	22,94% (17,54 - 31,48) 6655 (3247 - 11724)
Neutrófilos	30 (9) 2272 (1533)	21,44% (16,53 - 27,14) 5914 (4619 - 8786)
Eosinófilos	3,6 (1) 150 (109)	2,08% (1,50 - 3,27) 578 (326 - 901)
Basófilos	0,2 (0,2) 13 (7)	0,22% (0,15 - 0,37) 59 (50 - 111)
Linfócitos B imaturos CD34+	0,2 (0,2) 12 (14)	0,12% (0,04 - 0,17) 27 (7 0- 61)
Dendríticas mieloides	0,3 (0,007) 3(1,7)	0,10% (0,07 - 0,12) 30 (13 - 50)
Dendríticas plasmocitóides	0,3 (0,080) 37 (23)	0,18% (0,14 - 0,24) 54 (29 - 109)
Mastócitos	0,01 (0,006) 8,5 (11)	0,01% (0,00 - 0,02) 3 (1 - 7)

Lorand-Metze et al.⁽¹²⁾ – 2017 – 4 – 134 – 43 (0,10 - 89 anos) – mediana, % – faixa etária avaliada: 19-55 anos n=40

Células CD34+	0,77 (0,35 -1,34)	0,81 (0,57 - 1,1)
Linfócito B imaturo CD34+	0,14 (0,08 - 0,41)	0,12 (0,04 - 0,17)

continua...

...continuação

Nies et al. ⁽¹³⁾ – 2018 – 10 – (50 - 66 anos) – média (variação), %		
Eritroblastos	21,6 (14,0 - 27,2)	10,17 (4,82 - 14,88)
Neutrófilos	60,4 (39,6 - 71,5)	58,26 (52,51 - 67,19)
Monócitos	4,1 (3,7 - 4,8)	2,65 (1,59 - 3,54)
Linfócitos	8,8 (5,4 - 11,4)	10,81 (8,3 - 14,57)
Plasmócitos	0,1 (0,3 - 1,9)	0,16 (0,11 - 0,27)
Violidaki et al. ⁽³⁹⁾ – 2020 – 10 – 55 (19 - 85 anos) – média (DP) – 10 cores, %		
Eritroblastos	17,1 (7,0)	10,17 (4,82 - 14,88)
Eritroblasto imaturo	3,1 (1,0)	1,12 (0,51 - 1,58)
Eritroblasto maduro	4,9 (1,8)	8,96 (4,19 - 12,95)
CV CD36	67,4 (9,7)	56,09 (51,49 - 61,27)
CV CD71	94 (21,4)	60,96 (53,63 - 72,43)

5 CONCLUSÃO

1. Este estudo estabeleceu valores de referência (absolutos e relativos) para as populações de células da linhagem linfóide B (imatura e madura), linfóide T, *natural killer*, granulocítica (imaturos e maduros), monocítica (imaturos e maduros), eritroide (imaturos e maduros) e também demonstrou variações nestas populações de acordo com sexo e idade. Além do estabelecimento da avaliação dos estágios de maturação para as populações estudadas. Os padrões imunofenotípicos identificados, bem como os valores de referência absolutos e relativos para as diferentes populações em medula óssea normal, poderão ser usados por outros laboratórios de citometria de fluxo como base para o estabelecimento de parâmetros de normalidade e referência para análises fenotípicas em neoplasias hematológicas.

6 REFERÊNCIAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375–90.
2. Carbone A. Classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues. discovering diseases—defining their features. *Hemato*. 2020;1(1):7-9.
3. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, et al. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(1):4–10.
4. Roa-Higuera DC, Fiorentino S, Rodríguez-Pardo VM, Campos-Arenas AM, Infante-Acosta EA, Cardozo-Romero CC, et al. Immunophenotypic analysis of normal cell samples from bone marrow: applications in quality control of cytometry laboratories. *Univ Sci (Bogota)*. 2010;15(3):206-23.
5. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: influence of peripheral blood contamination. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76(1):18–26.
6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2008.
7. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;60(1):1–13.
8. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019–32.
9. Pont J, Souvignet A, Campos L, Plesa A, Bulabois B, Pernollet M, et al. Accurate quantification of fourteen normal bone marrow cell subsets in infants to the elderly by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(5):627–36.
10. Bento LC, Correia RP, Pitangueiras Manguiera CL, De Souza Barroso R, Rocha FA, Bacal NS, et al. The use of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a review. *Front Oncol*. 2017;7:270. Figure 5, Evaluation of neutrophil maturation in a regular versus dysplastic sample; p. 7.
11. Matarraz S, Fernandez C, Albors M, Teodosio C, López A, Jara-Acevedo M, et al. Cell-cycle distribution of different cell compartments in normal versus reactive bone marrow: a frame of reference for the study of dysplastic hematopoiesis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(6):354-61.
12. Lorand-Metze I, Longhini AL, Oliveira-Duarte G, Correia RP, Santos-Silva MC, Yamamoto M, et al.; Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX). Normal variation of bone marrow B-cell precursors according to age - reference ranges for studies in myelodysplastic syndromes in Brazil. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(5):644–50.
13. Nies KP, Kraaijvanger R, Lindelauf KH, Drent RJ, Rutten RM, Ramaekers FC, et al. Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. *Cytometry A*. 2018;93(11):1097–105.

14. Rajab A, Porwit A. Screening bone marrow samples for abnormal lymphoid populations and myelodysplasia-related features with one 10-color 14-antibody screening tube. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015;88(4):253–60.
15. Orfao A, Matarraz S, Pérez-Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. *J Immunol Methods.* 2019;475:112684.
16. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res.* 2003;34(6):476–88.
17. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol.* 2000;53(3):111–7.
18. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S5-13.
19. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood.* 1987;70(5):1316–24.
20. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al.; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012;26(9):1986–2010.
21. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica.* 2012;97(8):1209–17.
22. Jafari K, Tierens A, Rajab A, Musani R, Schuh A, Porwit A. Visualization of cell composition and maturation in the bone marrow using 10-color flow cytometry and radar plots. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(2):219–29.
23. Chattopadhyay PK, Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods.* 2012;57(3):251–8.
24. McKinnon KM. Flow cytometry: an overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1-5.1.11.
25. Wood B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol.* 2004;75(75):559–76.
26. Wangen JR, Eidenschink Brodersen L, Stolk TT, Wells DA, Loken MR. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(2):184–96.
27. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development.* 2011;138(6):1017–31.
28. Julien E, el Omar R, Tavian M. Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Lett.* 2016;590(22):3987–4001.
29. Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol.* 2016;173(2):206–18.
30. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.* 2003;34(6):461–75.
31. Bain BJ. Normal bone marrow. In: Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L. *Hematopathology.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 179–94 .e1.

32. Ramaiah L, Bounous DI, Elmore SA. Hematopoietic system. In: Haschek W, Bolon B, Ochoa R, Rousseaux C, Wallig M, editors. *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. Vol. 2. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 1863–933.
33. Marti LC, Bacal NS, Bento LC, Correia RP, Rocha FA. Lymphoid hematopoiesis and lymphocytes differentiation and maturation. In: Isvoranu G, editor. *Lymphocyte updates - cancer, autoimmunity and infection*. London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Aug 19]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/55460>
34. Lorenzi TF. *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. 4a ed. Guanabara Koogan; 2006.
35. Carr JH, Rodak BF. *Atlas de hematologia clínica*. São Paulo: Santos; 2000. Figura 2-1, Gráfico da hematopoiese. p. 11.
36. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother*. 1993;2(2):137–44.
37. von Laer D, Corovic A, Vogt B, Fehse B, Roscher S, Rimek A, et al. Loss of CD38 antigen on CD34+CD38+ cells during short-term culture. *Leukemia*. 2000;14(5):947–8.
38. McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, Dick JE. Reversible cell surface expression of CD38 on CD34-positive human hematopoietic repopulating cells. *Exp Hematol*. 2007;35(9):1429–36.
39. Violidaki D, Axler O, Jafari K, Bild F, Nilsson L, Mazur J, et al. Analysis of erythroid maturation in the nonlysed bone marrow with help of radar plots facilitates detection of flow cytometric aberrations in myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;98(5):399–411.
40. Han X, Jorgensen JL, Brahmandam A, Schlette E, Huh YO, Shi Y, et al. Immunophenotypic study of basophils by multiparameter flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(5):813–9.
41. Marti LC, Bacal NS, Bento LC, Rocha FA. Phenotypic markers and functional regulators of myelomonocytic cells. In: *Biology of myelomonocytic cells*. London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/53922>
42. Lambert C, Preijers FW, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017;92(3):180–8.
43. Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, Pildain AJ, Kroft SH. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(5):799–806.
44. Yang DT, Greenwood JH, Hartung L, Hill S, Perkins SL, Bahler DW. Flow cytometric analysis of different CD14 epitopes can help identify immature monocytic populations. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(6):930–6.
45. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al.; Francophone Myelodysplasia Group. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015;125(23):3618–26.
46. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2015;5(1):13886.
47. Brckalo T, Calzetti F, Pérez-Cabezas B, Borràs FE, Cassatella MA, López-Botet M. Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(3):722–32.

48. Helmink BA, Sleckman BP. The response to and repair of RAG-mediated DNA double-strand breaks. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):175–202.
49. Takaba H, Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* 2017;38(11):805–16.
50. Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, Kincade PW. Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol.* 2006;18(1):2–11.
51. Carrion C, Guérin E, Gachard N, le Guyader A, Giraut S, Feuillard J. Adult bone marrow three-dimensional phenotypic landscape of B-cell differentiation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019;96(1):30–8.
52. Jegalian AG, Facchetti F, Jaffe ES. Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(6):392–404.
53. Correia RP, Rajab A, Bento LC, Alexandre AM, Vaz AC, Schimidell D, et al. A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(2):136–43.
54. Ludbrook J. Practical statistics for medical research. *ANZ J Surg.* 1991;61(12):963–4.
55. Ogata K. Diagnostic flow cytometry for low-grade myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol.* 2008;26(4):193–8.
56. Westers TM, Cremers EM, Oelschlaegel U, Johansson U, Bettelheim P, Matarraz S, et al.; IMDSFlow Working Group. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. *Haematologica.* 2017;102(2):308–19.
57. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leukoc Biol.* 1990;48(2):138–48.
58. Connelly MC, Knight M, Giorgi JV, Kagan J, Landay AL, Parker JW, et al. Standardization of absolute CD4+ lymphocyte counts across laboratories: an evaluation of the Ortho CytronAbsolute flow cytometry system on normal donors. *Cytometry.* 1995;22(3):200–10.
59. Hultin LE, Chow M, Jamieson BD, O’Gorman MR, Menendez FA, Borowski L, et al. Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(3):194–200.
60. Glencross D, Scott L, Aggett H, Sonday S, Scott CS. Microvolume fluorimetry for the determination of absolute CD4 and CD8 lymphocyte counts in patients with HIV: a comparative evaluation. *Clin Lab Haematol.* 1999;21(6):391–5.
61. Campos C, Pera A, Lopez-Fernandez I, Alonso C, Tarazona R, Solana R. Proinflammatory status influences NK cells subsets in the elderly. *Immunol Lett.* 2014;162(1 Pt B):298–302.
62. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80(5):318–23.
63. Sabattini E, Bacci F, Sagrarnoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica.* 2010;102(3):83–7.
64. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):31–8.
65. Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev.* 2004;3(3):215–20.

66. Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hasserjian RP. A double-positive CD4+CD8+ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(5):805–14.
67. Weyand CM, Goronzy JJ. Aging of the immune system. Mechanisms and therapeutic targets. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13 Suppl 5:S422-8.
68. Abdullah M, Chai PS, Chong MY, Tohit ER, Ramasamy R, Pei CP, et al. Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. *Cell Immunol*. 2012;272(2):214–9.
69. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626–38.
70. Groarke EM, Young NS. Aging and hematopoiesis. *Clin Geriatr Med*. 2019;35(3):285–93.
71. Hamilton JA, Henry CJ. Aging and immunotherapies: new horizons for the golden ages. *Aging Cancer*. 2020;1(1-4):30–44.
72. Furman D, Hejblum BP, Simon N, Jojic V, Dekker CL, Thiébaud R, et al. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(2):869–74.
73. Fan H, Dong G, Zhao G, Liu F, Yao G, Zhu Y, et al. Gender differences of B cell signature in healthy subjects underlie disparities in incidence and course of SLE related to estrogen. *J Immunol Res*. 2014;2014:814598.
74. Qorbani A, Gao G, Dwyre DM. Polyclonal CD5+/CD19+ B1a lymphocytes after allogeneic stem cell transplantation: a potential diagnostic pitfall. *Autops Case Rep*. 2020;10(2):e2020147.

Abstract

Introduction: The analysis of hematopoietic cells by flow cytometry represents an important tool in clinical practice for the diagnosis and monitoring of hematological diseases. Technological advances in equipment and analysis software are opening doors to explore specific patterns to help to differentiate between normal and abnormal cells patterns. **Purpose:** To determine relative and absolute reference values of normality in individuals with no hematologic disease bone marrow, as well as normal patterns of maturation for the different hematopoietic lineages. **Methods:** Bone marrow samples were collected from 46 healthy patients (16 women and 30 men) undergoing orthopedic surgery and how were aged between 18 and 87 years (median 36 years). The analysis of 8 tubes performed in an equipment with 10 colors configuration enabled to evaluate and quantify (% and mm^3) B lymphocytes (immature and mature), T lymphocytes (helper, cytotoxic, double negative, double positive), natural killer cells, granulocytes (myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes, rods and neutrophils), monocytes (monoblasts, promonocytes, mature monocytes, classical, intermediate and non-classical), erythroblasts (immature and mature), plasma cells, basophils, mast cells, myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. The results were evaluated according to sex (female and male), age group (<40, 40 to 60, >60 years), and described as median percentage and absolute values. **Results:** In evaluating the results according to age group, we identified that older individuals presented an increase in plasma cells that expressed CD56 ($p=0.031$ in absolute values). In addition, they also had improved relation of CD4/CD8 ratio ($p=0.002$), mast cells ($p=0.004$ in percentages), non-classical monocytes ($p=0.016$ in percentages), as well as a decrease in cytotoxic T lymphocytes ($p=0.031$ in absolute values), double negative T lymphocytes ($p=0.018$ in absolute values), and natural killer cells that express CD56 ($p=0.002$ in absolute values and $p=0.012$ in percentages). Moreover, individuals also presented higher natural killer cells that expressed CD56 and CD16 ($p=0.024$ in absolute values), myeloblasts ($p=0.048$ in absolute values), metamyelocytes/Rods ($p=0.038$ in absolute values), neutrophils ($p=0.006$ in absolute values), monoblasts ($p=0.030$ in absolute values), mature monocytes ($p=0.024$ in absolute values), classical monocytes ($p=0.017$), plasmacytoid dendritic cells ($p=0.027$ in absolute values), and mature erythroblasts ($p=0.004$ in absolute values). In the evaluation of the results according to sex, we identified that the

population of mature B lymphocytes ($p=0.013$) and B lymphocytes that expressed CD5 ($p=0.014$) was higher in women, while the percentage of natural killer cells is relatively was higher in men ($p=0.007$), particularly in the population of cells that expressed CD56 and CD16 ($p=0.013$). **Conclusion:** This study established reference values (absolute and relative) for populations according to sex and age group in bone marrow samples from individuals with no hematologic disease for B lymphocytes (immature and mature), T lymphocytes (helper, cytotoxic, double negative, double positive), natural killer cells, granulocytes (myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes, rods and neutrophils), monocytes (monoblasts, promonocytes, mature monocytes, classical, intermediate and non-classical), erythroblasts (immature and mature), plasma cells, basophils, mast cells, myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. Maturational stages of B lymphocytes, granulocytes, monocytes and erythroblasts were showed and they remained stable despite individuals' sex and age group.

Keywords: Flow cytometry; Hematopoietic stem cells; Bone marrow; Reference standards; Reference values