



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Instituto de Ciências da Saúde

**ESTUDO FENOTÍPICO DA MATURAÇÃO DA LINHA  
ERITRÓIDE NA MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública

por

**LILIANA CHAVES CEREJO FERREIRA**

Porto, Fevereiro de 2012



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Instituto de Ciências da Saúde

## **ESTUDO FENOTÍPICO DA MATURAÇÃO DA LINHA ERITRÓIDE NA MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde  
da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em  
Análises Clínicas e Saúde Pública, especialidade - Hematologia e Imunohemoterapia.

Trabalho realizado no Laboratório de Citometria do Serviço de  
Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto, sob a  
orientação de Professora Doutora Margarida Lima e da Mestre Maria Luís Queirós.



por

**LILIANA CHAVES CEREJO FERREIRA**

Porto, Fevereiro de 2012



## Resumo

A eritropoiese é um processo complexo de diferenciação de progenitores eritróides em glóbulos vermelhos que se dá, na medula óssea dos humanos, durante a infância e a vida adulta. Este processo, regulado por diversos factores, permite a diferenciação de progenitores eritróides, não identificáveis morfológicamente, em precursores eritróides (proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos), estes em reticulócitos e, por fim, em glóbulos vermelhos, células pequenas, anucleadas e bicôncavas, altamente especializadas no transporte de oxigénio. Nos laboratórios clínicos, o estudo da diferenciação da linha eritróide é tradicionalmente efectuado através da análise da morfologia, e contagem diferencial das células nos diferentes estádios de diferenciação reconhecíveis pelas suas características morfológicas. Neste estudo avaliamos a maturação da linha eritróide por citometria de fluxo, através da marcação de amostras de medula óssea com uma combinação de oito anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos (anti-CD36 FITC, anti-CD105 PE, anti-CD34 PerCP-Cy5.5, anti-CD117 PE-Cy7, anti-CD33 APC, anti-CD71 APC-H7 / APC-Alexa Fluor 750, anti-HLA-DR PB e anti-CD45 PO) e comparamos os resultados com os obtidos no estudo morfológico. O estudo por citometria de fluxo permitiu identificar quatro estádios de maturação com perfil fenotípico distinto. No estádio 1, mais imaturo, as células expressam todos os antígenos analisados, no estádio 2 perdem a expressão de CD45, CD34, HLA-DR e CD33, no estádio 3 perdem a expressão de CD117 e no estádio 4, mais maduro, a expressão de CD105. A expressão de CD71 e de CD36 mantém-se ao longo de todo o processo maturativo, atingindo o máximo nos estádios 3 e 4, respectivamente. Os estádios fenotípicos 1, 2, 3 e 4 parecem corresponder, grosso modo, aos estádios morfológicos de proeritroblasto (podendo incluir pré-proeritroblastos), eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático e eritroblasto ortocromático, respectivamente. Em resumo, utilizando um painel de imunofenotipagem com 8 cores, caracterizamos a maturação da linha eritróide na medula óssea por citometria, identificamos diferentes estádios maturativos com base no perfil fenotípico e estabelecemos a sua correlação com os estádios identificáveis por critérios morfológicos.

## Abstract

Erythropoiesis is a complex process of differentiation of erythroid progenitors into red blood cells that occurs in the bone marrow of humans during childhood and adulthood. This process, regulated by several factors, allows the differentiation of erythroid progenitors, not morphologically identifiable, into erythroid precursors (proerythroblasts, basophilic erythroblasts, polychromatic erythroblasts, orthochromatic erythroblasts), these into reticulocytes and finally, into red blood cells, that are small, anucleated, uniform and biconcave cells highly specialized in oxygen transport. In clinical laboratories, the morphology analysis and differential counts are of great importance for the study of the erythroid differentiation. In this study we have studied the maturation of the erythroid lineage by flow cytometry, by staining bone marrow samples with a combination of eight monoclonal antibodies with different specificities, conjugated with different fluorochromes (anti-CD36 FITC, anti-CD105 PE, anti-CD34 PerCP-Cy5.5, anti-CD117 PE-Cy7, anti-CD33 APC, anti-CD71 APC-H7 / APC-Alexa Fluor 750, anti-HLA-DR PB and anti-CD45 PO) and compared the results with those obtained by morphology. Flow cytometry allowed the identification of four stages of red cell maturation with different phenotypic profiles. In stage 1, more immature, erythroid cells expressed all the antigens analyzed, in stage 2 they lose CD45, CD34, HLA-DR and CD33, followed by CD117 in stage 3 and CD105 in stage 4. CD71 and CD36 expression persist till the end of the erythroid maturation, reaching the maximum in stages 3 and 4, respectively. The stage 1 probably correspond to proerythroblasts (although some preproerythroblasts may also be included), stage 2 to basophilic erythroblasts, stage 3 to polychromatic erythroblasts and stage 4 to orthochromatic erythroblast. In summary, using an eight-color staining, we characterized the red cell maturation by flow cytometry and established a relationship with the phenotypically identifiable stages with those traditionally identified by morphology.

## **Agradecimentos**

A elaboração desta tese contou com a colaboração de diversas pessoas às quais não podia deixar de agradecer.

À Professora Doutora Margarida Lima agradeço o facto de ter aceitado orientar-me e todo o apoio prestado.

À Mestre Maria Luís Queirós agradeço todo o acompanhamento, cooperação e empenho demonstrados.

À Doutora Magdalena Leander agradeço toda a colaboração, prestabilidade e simpatia manifestadas ao longo de todo o período experimental da tese.

À Dr.<sup>a</sup> Inês Freitas agradeço o contributo prestado na contagem diferencial de células da medula óssea por estudo citológico.

Ao Professor Doutor Paulo Costa agradeço a colaboração na análise estatística dos dados obtidos no estudo.

Ao Dr. Symon Riedstra agradeço o facto de me ter facultado muitos dos artigos científicos necessários para a elaboração da dissertação, por todos os bons conselhos e por toda a compreensão que sempre manifestou.

Ao Sr. Rui Silva e à D.<sup>a</sup> Fernanda Costa agradeço a prontidão no envio de grande parte dos artigos científicos.

A todos os meus amigos e familiares agradeço o carinho, apoio e coragem que sempre me transmitiram.

A todos que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **Lista de Quadros**

Quadro 1. Anticorpos monoclonais respectivas especificidades, clones, fluorocromos e casas comerciais. ....	22
Quadro 2. Anticorpos monoclonais e respectivos volumes.....	23
Quadro 3. Comprimentos de onda dos lasers do citómetro de fluxo e de emissão dos fluorocromos.....	24
Quadro 4. Resumo dos perfis fenotípicos que caracterizam os estádios maturativos da linha eritróide.....	48

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Representação relativa dos diferentes estadios maturativos da linha eritróide, identificados por estudo imunofenotípico. ....	33
Tabela 2. Representação relativa dos diferentes estadios maturativos da linha eritróide, identificados por estudo morfológico. ....	35

## Lista de Figuras

Figura 1. Biópsia de medula óssea (Ko <i>et.al.</i> , 2001).....	5
Figura 2. Estádios de maturação da linha eritróide na medula óssea: proeritroblastos e eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos. (Burkitt <i>et.al.</i> , 1993) .....	8
Figura 3. Estádios de diferenciação da linha eritróide no sangue periférico: reticulócitos (R) e eritrócitos. (Burkitt <i>et.al.</i> , 1993).....	9
Figura 4. Representação esquemática da maturação da linha eritróide. ....	10
Figura 5. Esfregaços de medula óssea, sem e com coloração de Romanovsky. ....	12
Figura 6. Representação esquemática do sistema óptico de um citómetro de fluxo com um laser e três detectores de fluorescência. (Díaz <i>et.al.</i> , 2010) .....	15
Figura 7. Citómetro de fluxo Navios <sup>TM</sup> (Beckman Coulter). ....	23
Figura 8. Selecção inicial da população de células eritróides nucleadas da medula óssea, “contaminada” com plaquetas. ....	25
Figura 9. Selecção secundária da população de células eritróides nucleadas da medula óssea, com exclusão das plaquetas “contaminantes” .....	25
Figura 10. Identificação e selecção dos diferentes estádios de maturação da linha eritróide, com base em critérios fenotípicos. ....	26
Figura 11. Microscópio óptico BX40 (Olympus).....	27
Figura 12. Percentagem de células eritróides nas amostras de medula óssea hipocelulares, normocelulares e hiperceulares, avaliada por citometria de fluxo.....	30
Figura 13. Percentagem de células da linha eritróide nas amostras hipocelulares, normocelulares e hiperceulares, avaliada por estudo morfológico. ....	31
Figura 14. Comparação entre as contagens de células da linha eritróide obtidas no estudo morfológico e no estudo imunofenotípico. ....	32
Figura 15. Comparação entre as contagens de células da linha eritróide obtidas no estudo morfológico e no estudo imunofenotípico, excluindo os <i>outliers</i> .....	32
Figura 16. Percentagem de células eritróides nos estádios 1, 2, 3 e 4 nas amostras hipocelulares, normocelulares e hiperceulares. ....	34
Figura 17. Percentagem de células em cada estadio maturativo, nas diferentes amostras, avaliada por critérios imunofenotípicos. ....	34
Figura 18. Percentagem de células em cada estadio maturativo, nas diferentes amostras, avaliada por critérios morfológicos. ....	36
Figura 19. APS obtidos após selecção da linha eritróide. ....	37
Figura 20. <i>Dot-plots</i> biparamétricos ilustrativos da maturação fenotípica da linha eritróide na medula óssea. ....	38
Figura 21. Evolução do tamanho celular (FSC) durante a maturação da linha eritróide.	39
Figura 22. Evolução da complexidade celular (SSC) durante a maturação da linha eritróide.....	40

---

Figura 23. Comparação entre dois anticorpos anti-CD71 conjugados com fluorocromos diferentes. ....	41
Figura 24. Evolução da expressão de CD71 durante a maturação da linha eritróide. ....	41
Figura 25. Evolução da expressão de CD36 durante a maturação da linha eritróide. ....	42
Figura 26. Evolução da expressão de CD34 durante a maturação da linha eritróide. ....	43
Figura 27. Evolução da expressão de CD45 durante a maturação da linha eritróide. ....	43
Figura 28. Evolução da expressão de HLA-DR durante a maturação da linha eritróide. ....	44
Figura 29. Evolução da expressão de CD33 durante a maturação da linha eritróide. ....	45
Figura 30. Evolução da expressão de CD117 durante a maturação da linha eritróide. ....	45
Figura 31. Evolução da expressão de CD105 durante a maturação da linha eritróide. ....	46
Figura 32. Representação gráfica do perfil fenotípico maturativo da linha eritróide: evolução da intensidade média de expressão dos diferentes antigénios ao longo da maturação. ....	47
Figura 33. Representação gráfica do perfil fenotípico maturativo da linha eritróide: intensidade média de expressão dos vários antigénios nos diferentes estádios maturativos. ....	47

---

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

- AcMo - Anticorpos monoclonais
- ADN - Ácido Desoxirribonucleico
- AGM - Aorta-Gonadal-Mesonefros
- APC - *Allophycocyanin*
- APC-H7 - *Allophycocyanin-Hilite7*
- APS - *Automatic Population Separator*
- ARN - Ácido Ribonucleico
- BFU-E - *Burst Forming Units - Erythroid*
- CD - *Cluster of Differentiation*
- CF - Citometria de fluxo
- CFU-E - *Colony Forming Units - Erythroid*
- CFU-GEMM - *Colony Forming Unit - Granulocyte Erythroid Macrophage*

### *Mixed*

- EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético
- EPO - Eritropoietina
- EPO-R - Receptor da eritropoietina
- FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*
- FS ou FSC - *Forward Scatter*
- GV - Glóbulos vermelhos
- Hb - Hemoglobina
- HLA-DR - *Human Leucocyte Antigen DR*
- MHC - *Major Histocompatibility Complex*
- MO - Medula óssea
- PB - *Pacific Blue*
- PE - *Phycoerythrin*
- PE-Cy7 - *Phycoerythrin-Cyanine 7*

- PerCP-Cy5.5 - *Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5*
- PO - *Pacific Orange*
- SCF - *Stem Cell Factor*
- SCH - *Stem Cell Hematopoiética*
- Siglec - *Sialic acid binding immunoglobulin related lectins*
- SS ou SSC - *Side Scatter*
- TGF- $\beta$  - *Transforming Growth Factor - Beta*

## Índice

<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
Factores que influenciam a eritropoiese .....	2
Eritropoiese .....	4
Estudo laboratorial da medula óssea.....	10
Colheita de medula óssea.....	11
Estudo morfológico das células (mielograma) .....	12
Estudo imunofenotípico das células (citometria de fluxo) .....	12
Anticorpos Monoclonais.....	17
<b>Objectivos.....</b>	<b>20</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>21</b>
Amostras .....	21
Metodologia.....	21
Contagem de células .....	21
Estudo imunofenotípico .....	21
Imunomarcção das amostras.....	21
Leitura no Citómetro de Fluxo.....	23
Análise dos Resultados.....	24
Estudo morfológico.....	27
Análise estatística.....	27
<b>Resultados .....</b>	<b>29</b>
Celularidade .....	29
Representação das células da linha eritróide .....	29
Estudo imunofenotípico .....	29
Estudo morfológico.....	30

Comparação entre os estudos imunofenotípico e morfológico.....	31
Identificação e quantificação de estádios maturativos eritróides .....	33
Estudo imunofenotípico .....	33
Estudo morfológico.....	35
Comparação entre os estudos imunofenotípico e morfológico.....	36
Caracterização fenotípica da maturação da linha eritróide.....	37
Análise do tamanho e complexidade celular .....	39
FSC.....	39
SSC.....	39
Análise da expressão de marcadores celulares .....	40
CD71.....	40
CD36.....	42
CD34.....	42
CD45.....	43
HLA-DR .....	44
CD33.....	44
CD117.....	45
CD105.....	46
Caracterização dos perfis fenotípicos maturativos .....	46
<b>Discussão .....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras .....</b>	<b>54</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>55</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>I</b>



## Introdução

A eritropoiese é considerada o processo de produção de células mais produtivo do nosso organismo (Boehm *et.al.*, 2009), estimando-se que, nos humanos, sejam produzidos, diariamente, cerca de  $200 \times 10^{12}$  glóbulos vermelhos (GV) nos indivíduos adultos, sendo o seu tempo médio de vida de, aproximadamente, 120 dias após a sua saída da medula óssea (MO) (Rogers *et.al.*, 2008; Bratosin *et.al.*, 2001; Franco, 2009). Os mecanismos que intervêm no envelhecimento fisiológico dos eritrócitos não são claramente entendidos, contudo, pensa-se que tenham um carácter multifactorial, contribuindo, no seu conjunto, para a perda da capacidade de deformação (membrana rígida e inflexível) e de volume celular. Como consequência, os GV senescentes não conseguem atravessar a microcirculação com facilidade, sendo por isso reconhecidos e fagocitados pelas células do sistema histiocítico-macrofágico do baço e da MO (Khandelwal e Saxena, 2006; Klinken, 2002; Waugh *et.al.*, 1992; Bratosin *et.al.*, 2001; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001). Este balanço entre a actividade proliferativa e a apoptose faz com que a massa de GV se mantenha constante (Aïnseba e Benosman, 2010).

Os GV são células anucleadas com cor rosada, com  $2 \mu\text{m}$  de espessura,  $7-8 \mu\text{m}$  de diâmetro e volume médio de  $90 \text{ fl}$ ; têm forma de disco bicôncavo, apresentam uma depressão central e têm capacidade de deformação, sem que a sua membrana perca a integridade estrutural, o que permite a sua passagem pelos vasos capilares (Waugh *et.al.*, 1992; Klinken, 2002; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001). São altamente especializados e não apresentam organelos citoplasmáticos (núcleo, mitocôndrias ou ribossomas), sendo incapazes de sintetizar novas proteínas (Lee *et.al.*, 1993). Estruturalmente apresentam uma membrana, e, no citoplasma, as enzimas imprescindíveis para manter o reduzido metabolismo celular, electrólitos e, o seu maior constituinte, a hemoglobina (Hb) (Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Lee *et.al.*, 1993; Klinken, 2002). A Hb tem como função efectuar as trocas gasosas (transporta o  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  em todos os tecidos do organismo), sendo o eritrócito o responsável pela sua protecção e transporte (Douay, 2010; Klinken, 2002; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001). Ocupa cerca de 90% do peso seco do eritrócito e é constituída por quatro cadeias globínicas com um grupo heme associado a cada uma delas, no qual se encontra um átomo de ferro que é essencial no transporte de gases. A síntese do grupo heme ocorre nas mitocôndrias dos precursores eritróides, sendo

dependente da inserção do ferro (Hoffbrand *et.al.*, 2004; Lee *et.al.*, 1993; Klinken, 2002; Fried, 2009).

Existem várias moléculas de Hb que se formam ao longo do desenvolvimento humano para responderem às distintas necessidades de adaptação ao O<sub>2</sub>. As principais são a Hb A (normal no adulto), constituída por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ , e a Hb F (existente no feto, mas também em pequenas quantidades no adulto), na qual estão presentes duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\gamma$ . Esta troca observada entre as cadeias  $\gamma$  e  $\beta$  ocorre entre os três e os seis meses após o nascimento (Hoffbrand *et.al.*, 2004; Ma *et.al.*, 2008; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001).

### **Factores que influenciam a eritropoiese**

A tensão de oxigénio regula dinamicamente a eritropoiese, sendo responsável pela melhoria da manutenção do desenvolvimento dos progenitores eritróides e, inversamente, pela inibição da expansão terminal e maturação dos eritrócitos (Vlaski *et.al.*, 2009). O baixo teor em oxigénio (hipóxia) é o estímulo fisiológico primário para a produção de eritropoietina (EPO), havendo alteração da progressão do processo eritropoiético por modulação dos factores de transcrição eritróides e da expressão do receptor da EPO (EPO-R) (Haase, 2010; Tsiftoglou *et.al.*, 2009). A EPO, com 35 kDa, é uma glicoproteína que exerce um papel crítico na linha eritróide, fundamental para o equilíbrio adequado entre a proliferação, a morte celular programada e a maturação das células. É produzida, principalmente, no fígado (feto) e no rim (adulto) com um nível basal de, aproximadamente, 10-20mU/mL, sendo libertada para a corrente sanguínea e interagindo com os progenitores e precursores eritróides na MO (Rogers *et.al.*, 2008; Goldberg, 1995; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Amoyal *et.al.*, 2007; Tsiftoglou *et.al.*, 2009; Price, 2008). A actividade da EPO é mediada pela ligação ao seu receptor. Para além de activar proteínas anti-apoptóticas, protegendo as células progenitoras eritróides da apoptose, a EPO estimula também a síntese de Hb, sendo um factor de crescimento indispensável na diferenciação terminal (Amoyal *et.al.*, 2007; Dorn *et.al.*, 2008). É de notar que a EPO, ao actuar sinergeticamente com numerosos factores de crescimento, estimula a eritropoiese, através da promoção da proliferação, diferenciação e sobrevivência dos precursores eritróides, inibe a apoptose e é essencial na síntese e funcionamento das proteínas de membrana dos eritrócitos (Tsiftoglou *et.al.*, 2009;

Amoyal *et.al.*, 2007; Borrione *et.al.*, 2007). Desta forma, quando há um decréscimo de GV, a EPO aumenta a sua produção (Franco, 2009).

O processo de formação de eritrócitos é controlado por múltiplos factores de crescimento, contudo os dois principais são a EPO (mencionada anteriormente) e o “*stem cell factor*” (SCF), que actua sinergeticamente com a EPO, promovendo a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) e, por consequência, a proliferação dos progenitores (Dorn *et.al.*, 2008).

Para além dos factores de crescimento, os nutrientes são também indispensáveis na eritropoiese (Fried, 2009). O ferro é imprescindível para a oxigenação e desoxigenação da Hb e para a síntese do grupo heme, sendo adquirido através da dieta. Desta forma, um homem adulto absorve, diariamente, cerca de 0,5 a 1 mg de ferro e, nas mulheres, a sua absorção pode duplicar (durante o ciclo menstrual) ou até mesmo quadruplicar (durante a gravidez) (Hoffman *et.al.*, 2009; Fried, 2009). O ferro procedente da degradação da Hb vai ser transportado pela proteína transferrina e é reutilizado para a eritropoiese, estando também envolvidas neste processo duas outras proteínas: a ferritina (armazena o excedente em ferro) e receptor de transferrina.

A vitamina B<sub>12</sub> e o ácido fólico são dois outros nutrientes necessários para a síntese de ADN. A primeira é adquirida somente através de produtos animais, sendo a sua ingestão diária de 7 a 30µg. A segunda encontra-se na maioria dos alimentos e a sua ingestão diária é de 200 a 250 µg (Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Hoffbrand *et.al.*, 2004; Cavill, 2002).

Adicionalmente, os aminoácidos desempenham também um importante papel na formação e sobrevivência dos GV (Crafts, 1955; Layrisse *et.al.*, 1988).

Assim, se não houver um suplemento adequado de nutrientes, a produção de GV fica comprometida, mesmo quando a EPO se encontra em quantidades excessivas, e, apesar da maior parte dos indivíduos ter um armazenamento abundante em vitamina B<sub>12</sub>, o mesmo não acontece em relação ao ferro e ao ácido fólico, podendo limitar a taxa de eritropoiese (Goldberg, 1995).

## **Eritropoiese**

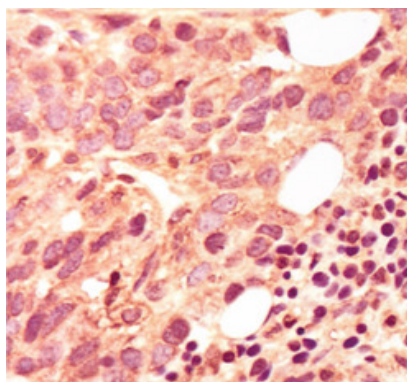
A eritropoiese é um processo complexo de várias etapas que conduzem à diferenciação de progenitores eritróides em GV (Kalfa *et.al.*, 2010; Tsiftoglou *et.al.*, 2009).

A formação de células eritropoiéticas emerge, durante o processo de gastrulação, com a formação do hemangioblasto (progenitor mesodérmico) (Baron, 2003). O processo eritropoiético efectua-se, até aos dois meses de gestação, no saco vitelino (eritropoiese primitiva) onde há produção de eritroblastos grandes e nucleados e expressão de proteínas globínicas embrionárias (Baron, 2003; Hoffbrand *et.al.*, 2004; Ma *et.al.*, 2008; Orkin e Zon, 2008). Pensa-se que as células, produzidas no saco vitelino e na região aorta-gonadal-mesonefros (AGM), colonizam o fígado fetal, tornando-se este, a partir dos dois até aos sete meses, em conjunto com o baço, o principal local de formação de células sanguíneas, assim como o local onde se começa a efectuar a eritropoiese definitiva (Lécuyer e Hoang, 2004; Hoffbrand *et.al.*, 2004; Lu *et.al.*, 2008). Estes dois últimos órgãos continuam a sua função, mas em menor quantidade, até às duas semanas após o nascimento (Hoffbrand *et.al.*, 2004).

Tanto as células eritróides primitivas como as definitivas sofrem condensação e enucleação, diferindo no local embrionário de formação, tamanho (as primitivas são, aproximadamente, seis vezes maiores), morfologia e expressão de globinas e outros genes (Baron, 2003; Mcgrath e Palis, 2005). Assim, com o avançar da gestação, a natureza dos GV muda, tornando-se mais pequenos e com um conteúdo menor em Hb (Pahal *et.al.*, 2000).

A partir dos sete meses de gestação, a MO torna-se o local mais importante de produção de células sanguíneas, passando a ser a única fonte durante a infância e a vida adulta (Hoffbrand *et.al.*, 2004). É formada por uma rede complexa de seios vasculares, células do estroma, fibroblastos e células hematopoiéticas, com gordura nos espaços entre os seios venosos (Molineux *et.al.*, 2006; Burkitt *et.al.*, 1993). As células eritropoiéticas medulares são sequestradas por nichos específicos, aos quais se dá o nome de “ilhas eritroblásticas” (eritroblastos em desenvolvimento que rodeiam um macrófago central), sendo “alimentadas” pelas células do estroma que produzem

citocinas necessárias para o seu desenvolvimento (Dorn *et.al.*, 2008; Chen *et.al.*, 2009; Molineux *et.al.*, 2006).



**Figura 1. Biópsia de medula óssea (Ko *et.al.*, 2001).**

No recém-nascido, a eritropoiese dá-se em toda a MO, havendo, na infância, substituição progressiva de medula por gordura nos ossos longos, ficando o processo eritropoiético, no adulto, restringido às vértebras, costelas, crânio, esterno, sacro, pelve e extremidade proximal do fêmur (Hoffbrand *et.al.*, 2004).

Para além dos locais acima mencionados, a placenta tem sido reconhecida como um local adicional de hematopoiese aquando da formação de novas células hematopoiéticas na AGM e no fígado (Orkin e Zon, 2008; Huber, 2010).

O processo hematopoiético é acompanhado por mudanças a nível físico, bioquímico e antigénico (Loken *et.al.*, 1987). Tem início com a formação das *stem cell* hematopoiéticas (SCH), que são células raras (1/10000 células), auto-renováveis e pluripotenciais, sendo necessária para a diferenciação e geração de células maduras (Aïnseba e Benosman, 2010; Rogers *et.al.*, 2008; Boehm *et.al.*, 2009). Estas, como têm uma esperança média de vida relativamente curta, tornam essencial a existência de SCH, para restabelecimento das mesmas, assim como a existência do processo de auto-renovação para sustentação das SCH, que se caracterizam por ter uma depleção baixa ou mesmo nula (Orkin e Zon, 2008; Tsiftoglou *et.al.*, 2009; Molineux *et.al.*, 2006).

As SCH residentes na MO, através de interações com o estímulo apropriado de hormonas ou citoquinas que interagem com os receptores de superfície, dão origem, por divisões assimétricas, a progenitores hematopoiéticos comprometidos que vão perdendo, progressivamente, o potencial de auto-renovação, tornando-se cada vez mais

restritos na sua capacidade de diferenciação (Ichii *et.al.*, 2010; Murre, 2007; Tsiftoglou *et.al.*, 2009; Molineux *et.al.*, 2006; Eckfeldt *et.al.*, 2005; Klinken, 2002). Assim, as SCH de semi-vida longa (*long term* SCH), com capacidade de auto-renovação durante toda a vida do organismo, diferenciam-se em SCH de semi-vida curta (*short-term* SCH), com actividade limitada de auto-renovação, e estas, por sua vez, em progenitores multipotentes sem capacidade de auto-renovação. De seguida, há diferenciação destas últimas em *Colony Forming Unit - Granulocyte Erythroid Macrophage Mixed* (CFU-GEMM), que, na presença dos estímulos apropriados, dão origem a progenitores eritróides (Murre, 2007; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Zermati *et.al.*, 2000).

Os progenitores eritróides não são identificáveis morfológicamente, sendo os primeiros a formar-se designados por *Burst Forming Units - Erythroid* (BFU-E). Estes caracterizam-se por expressarem receptores do SCF, por terem um potencial proliferativo elevado e um baixo número de EPO-R, não respondendo por isso à EPO. Os segundos a formar-se, a partir da proliferação e diferenciação de BFU-E, são designados por *Colony Forming Units - Erythroid* (CFU-E) e caracterizam-se por uma menor expressão de receptores do SCF, pela perda gradual da capacidade proliferativa e pelo aumento do número de EPO-R, passando a responder à mesma (Vlaski *et.al.*, 2009; Klinken, 2002; Borrione *et.al.*, 2007; Amoyal *et.al.*, 2007).

Se a interacção da EPO com o seu receptor nos progenitores eritróides e a sincronia entre a síntese de Hb e de ADN forem adequadas, há continuidade da maturação, havendo variação da taxa de eritropoiese de acordo com o nível sérico de EPO e do tamanho e integridade da população de eritrócitos (Menon *et.al.*, 2006; Fried, 2009).

Após formação do progenitor eritróide CFU-E vai haver diferenciação deste em precursores eritróides (que são já reconhecíveis morfológicamente e que respondem, tal como a CFU-E, à EPO por terem um elevado número de EPO-R) aos quais se atribui o nome de eritroblastos. Estes, dependendo da morfologia do núcleo e da quantidade de Hb existente no citoplasma, que afecta a cor dos mesmos, vão ser classificados em proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos (Kalfa *et.al.*, 2010; Vlaski *et.al.*, 2009; Borrione *et.al.*, 2007; Klinken, 2002).

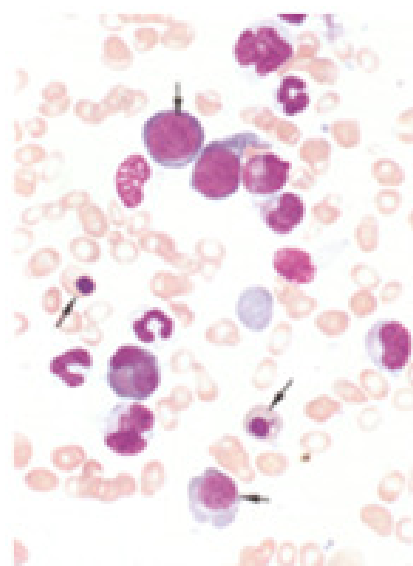
Este processo de diferenciação ordenado do eritrão, por mitoses sucessivas, é normalmente acompanhado pela baixa taxa de proliferação seguida de paragem do ciclo celular, redução do volume celular, condensação gradual da cromatina, hemoglobinizacão progressiva (passagem do estado basofílico ao estado acídófilo), perda de filamentos e, por fim, por enucleacão (Akker *et.al.*, 2010; Hellebostad *et.al.*, 1990; Chen *et.al.*, 2009; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Mcgrath e Palis, 2005).

Os primeiros eritroblastos a serem reconhecidos morfológicamente como células eritróides nucleadas designam-se por proeritroblastos. São caracteristicamente reconhecidos pelo seu grande tamanho (20 a 25  $\mu\text{m}$ ), têm nucléolo visível e uma razão núcleo/citoplasma elevada (80%). A cromatina é fina e está uniformemente distribuída, tornando-se mais distinta e intensivamente corada quando comparada com as células dos estadios seguintes. A síntese de Hb, que se vai acumulando durante o desenvolvimento eritróide, inicia-se no estadio de proeritroblasto, sendo o citoplasma intensamente basófilo devido à existência de um grande número de ribossomas (Bain e Thompson, 2009; Chen *et.al.*, 2009; Tsiftoglou *et.al.*, 2009; Henry, 1991; Klinken, 2002; Burkitt *et.al.*, 1993).

Alguns autores defendem a existência de um estadio anterior ao proeritroblasto ao qual atribuíram o nome de pré-proeritroblasto. É caracterizado por ter um tamanho que varia entre os 25 e os 35  $\mu\text{m}$ , contém núcleo, nucléolos, vacúolos citoplasmáticos e complexo de Golgi; a cromatina encontra-se descondensada e uniformemente dispersa, sendo o citoplasma fortemente basofílico. Para além disto, sugerem também que os genes de globina se comecem a expressar neste estadio (Wojda *et.al.*, 2002).

O estadio posterior ao proeritroblasto, após mitose, é o de eritroblasto basófilo definindo-se como uma célula mais pequena (16 a 18  $\mu\text{m}$ ), com citoplasma extremamente basofílico (devido à presença de ácido ribonucleico (ARN)) e núcleo com a forma característica de “*clock face*” devido às alteracões na cromatina (condensacão). Neste estadio é possível distinguir a paracromatina que cora de rosa e, apesar da presença de nucléolos, não é possível fazer a distincão dos mesmos. Após mitose, forma-se o eritroblasto policromático, ligeiramente mais pequeno do que a célula formada anteriormente, que vai desenvolvendo uma coloracão rosada à medida que os níveis de Hb aumentam (a sua síntese intensifica-se a partir do estadio em questão),

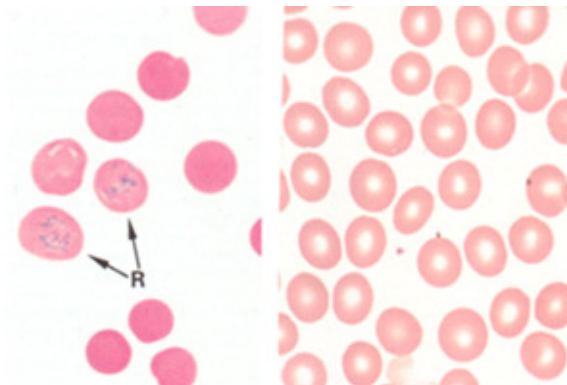
levando à diluição dos ribossomas. Neste estadio, o núcleo, que cora intensivamente, ocupa cerca de metade da área da célula, o conteúdo em ARN começa a decrescer e a cromatina, moderadamente condensada, é nitidamente distinta da paracromatina. Seguem-se mais uma ou duas mitoses, o núcleo torna-se pequeno e altamente condensado (picnótico), ocupando cerca de 25% da célula, atingindo-se o estadio de eritroblasto ortocromático. Este tem um tamanho entre 10 a 15  $\mu\text{m}$ , possui menos ribossomas e um citoplasma cada vez mais rosado, devido à produção de grandes quantidades de Hb.



**Figura 2. Estádios de maturação da linha eritróide na medula óssea: proeritroblastos e eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos (Burkitt *et.al.*, 1993).**

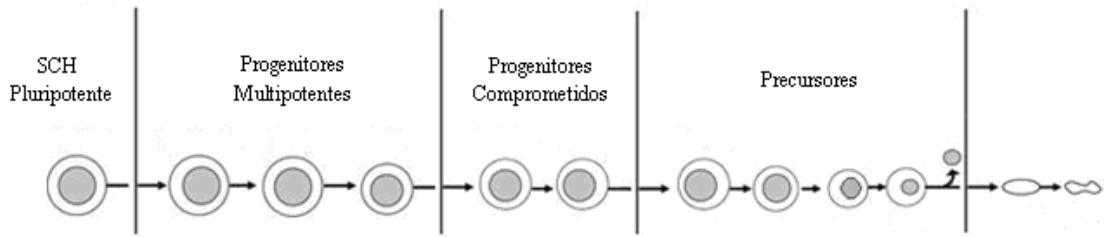
Posteriormente, através de contracções e ondulações citoplasmáticas, dá-se a enucleação onde há expulsão do núcleo e de uma pequena porção de citoplasma. Este processo pode ser accionado por diferentes mecanismos, incluindo entidades solúveis e interacções das células eritróides com o microambiente do estroma medular, formando-se o estadio de reticulócito (população bastante heterogénea com diferentes estádios de maturação) (Henry, 1991; Klinken, 2002; Tsiftoglou *et.al.*, 2009; Koury *et.al.*, 2005; Boehm *et.al.*, 2009). Este apresenta-se policromatofílico, devido à retenção de ARN, tem forma irregular, contém organelos citoplasmáticos como ribossomas, mitocôndrias e complexo de Golgi, e apresentam um retículo formado por ARN e proteínas que precipitam após fixação e coloração (Henry, 1991; Sato *et.al.*, 2010; Piva *et.al.*, 2010).

O processo de síntese de Hb, de ARN e de outras proteínas completa-se (devido à persistência de algumas mitocôndrias, ribossomas e restos do retículo endoplasmático), há degradação interna de organelos e proteínas (a acumulação de autofagossomas nos eritroblastos precoces sugere que os organelos deverão ser removidos por autofagia), havendo migração dos reticulócitos da MO para a circulação (o número de reticulócitos no sangue periférico é indicador da taxa de eritropoiese) (Koury *et.al.*, 2005; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Mortensen *et.al.*, 2009). Crê-se que este processo de migração seja mediado pela EPO e dependente do aumento da deformabilidade celular (Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Corberand, 1996). À medida que o reticulócito matura, a forma irregular vai-se perdendo, assim como o retículo, tornando-se bioquimicamente menos activo (perda gradual de enzimas e da capacidade de sintetizar o grupo heme e as cadeias de globina) (Bertles e Beck, 1962; Piva *et.al.*, 2010). Assim, após perda completa do retículo, começa-se a desenvolver a forma bicôncava, característica da célula madura, formando-se, deste modo, o eritrócito.



**Figura 3. Estádios de diferenciação da linha eritróide no sangue periférico: reticulócitos (R) e eritrócitos. (Burkitt *et.al.*, 1993)**

A alteração de células grandes, móveis e com forma irregular para células pequenas, uniformes e bicôncavas demonstram a formação de eritrócitos, sendo esta a célula mais madura da eritropoiese (Koury *et.al.*, 2005; Piva *et.al.*, 2010; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001).



**Figura 4. Representação esquemática da maturação da linha eritróide.**

Assim, através da activação de uma única SCH há um aumento massivo de eritrócitos (por cada proeritroblasto produzido, formam-se 16 eritrócitos) (Klinken, 2002; Henry, 1991). É de salientar que, mesmo em condições normais, há cerca de 5 a 10% de eritroblastos que não chegam a completar o processo de maturação, desaparecendo na própria MO antes de se transformarem em eritrócitos. Este processo, conhecido como eritropoiese fisiológica ineficaz, desempenha um importante papel na homeostasia do nosso organismo (Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001).

Desta forma percebe-se que, o eritrócito, que poderia parecer uma célula pouco útil, devido à perda de elementos vitais tal como o núcleo, é na realidade a célula que se especializou de tal forma no transporte de oxigénio ao ponto de eliminar todos os componentes que não necessita para a sua missão, tornando-se numa célula de flexibilidade facilitada e envolvendo um menor esforço cardíaco para o seu bombeamento (Klinken, 2002; Douay, 2010).

### **Estudo laboratorial da medula óssea**

A MO normal é mole e semi-fluída, podendo ser removido algum do seu fluído para análise através da técnica de aspiração, com uma agulha apropriada e conectada a uma seringa. A punção pode ser efectuada em vários locais, sendo frequentemente efectuada no esterno e na crista ilíaca (Lee *et.al.*, 1993; Kelly *et.al.*, 2010; Corrons e Bascompte, 2006).

Para análise do aspirado medular podem ser usadas técnicas manuais e automáticas (Lewis *et.al.*, 2008). Tradicionalmente, a colheita do aspirado medular tem como principal objectivo a realização do esfregaço para estudo morfológico e contagem diferencial das células, também designado mielograma (Lee *et.al.*, 1993; Kelly *et.al.*,

2010; Corrons e Bascompte, 2006). No entanto, o estudo das células do aspirado medular com recurso a outros métodos mais sofisticados é cada vez mais frequente. Entre estes, salientam-se a caracterização imunofenotípica, por citometria de fluxo, e o seu estudo molecular, por técnicas de genética molecular, ou citogenético, por cariótipo ou por técnicas de fluorescência por hibridização *in situ* (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*).

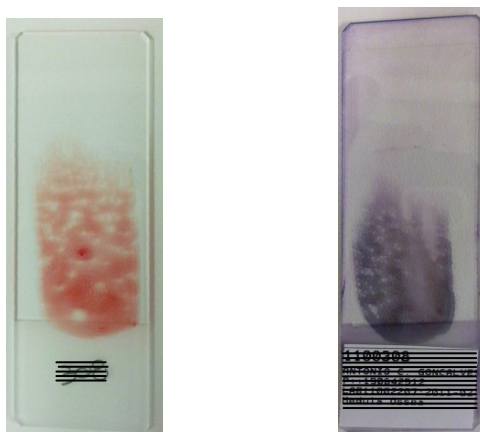
### ***Colheita de medula óssea***

A análise da morfologia e contagem diferencial da linha eritróide, por microscopia, é efectuada no mielograma. Para que este seja representativo da MO e para que não haja coagulação, deve ser efectuada imediatamente após obtenção de um pequeno volume (100 a 200 µl, para evitar a hemodiluição) de aspirado medular, sendo aconselhável preparar o máximo de esfregaços possível. O uso de anticoagulantes não é desejável, pois introduz artefactos na morfologia celular. Contudo, dos presentemente disponíveis, o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) é o que introduz menos artefactos, daí ser o anticoagulante de escolha.

Após realização do esfregaço, pode proceder-se à colheita de um pequeno volume adicional de aspirado medular (cerca de 1 a 2 ml) para efectuar outros estudos. Esta amostra deve ser rapidamente introduzida em tubo com o anticoagulante apropriado e este deve ser agitado suavemente, para evitar a coagulação. O EDTA é o anticoagulante mais frequentemente usado quando a amostra se destina a estudo imunofenotípico das células por citometria de fluxo ou a estudo molecular por técnicas de genética molecular, enquanto a heparina é o anticoagulante mais usado quando a amostra se destina a estudos citogenéticos.

### ***Estudo morfológico das células (mielograma)***

A coloração mais frequentemente escolhida é a de Romanovsky. Numa primeira fase, o esfregaço deve ser examinado com uma objectiva de menor ampliação (10X) para que se consiga apreciar a celularidade (diminuída, normal ou aumentada) e a presença ou ausência de células gordas. Numa segunda fase, dever-se-á proceder à observação do esfregaço com uma objectiva de maior ampliação (100X) para que se consiga observar as características morfológicas das diferentes células, podendo também efectuar-se a contagem diferencial das mesmas (Corrons e Bascompte, 2006; Lee *et.al.*, 1993).



**Figura 5. Esfregaços de medula óssea, sem e com coloração de Romanovsky.**

### ***Estudo imunofenotípico das células (citometria de fluxo)***

O diagnóstico clínico tem sofrido, nos últimos anos, profundas modificações devido ao desenvolvimento de novos métodos que contribuem para o melhor conhecimento de muitas patologias.

Uma das tecnologias, relativamente recente, que tem vindo a revelar-se como um método de grande relevância tanto a nível da investigação, como a nível do diagnóstico clínico é a citometria de fluxo (CF). Esta é uma tecnologia de análise quantitativa e qualitativa automatizada, que tem a capacidade de analisar, simultaneamente, diversas características celulares ou de partículas em suspensão com grande objectividade, sensibilidade e rapidez (Orfao e Buitrago, 1995; Landuyt *et.al.*,

2010; Porta *et.al.*, 2006). Por tudo isto, a CF tem-se tornado uma excelente ferramenta de imunofenotipagem, sendo usada para analisar uma grande variedade de amostras, incluindo MO. Assim, através da sua aplicação é possível medir diversas características na célula como tamanho celular, complexidade citoplasmática, conteúdo em ácidos nucleicos e uma grande variedade de proteínas intracelulares e de membrana (Brown e Wittwer, 2000).

O princípio em que se baseia esta tecnologia consiste em fazer passar células ou outras partículas alinhadas, uma a uma e em suspensão, em frente a um ou mais feixes luminosos monocromáticos (lasers), gerando sinais que vão ser, posteriormente, captados por detectores adequados, transformando-se em impulsos eléctricos que se amplificam e se convertem em sinais digitais, sendo, por último, processados por um computador (Orfao e Buitrago, 1995).

Este desenrolar de acontecimentos dá-se nos diversos componentes do citómetro de fluxo. O sistema de injeção da amostra transporta partículas em suspensão na amostra de forma confinada para poder efectuar uma análise individual das células, evitando obstruções e permitindo uma análise precisa. Para isso usa um fluído portador electricamente condutor (fluído hidrodinâmico) e uma pressão de ar reguladora para estabilizar o processo.

A câmara de fluxo é o local onde a amostra e o fluído envolvente se vão encontrar, havendo geração de um fluxo laminar, onde não há mistura dos dois líquidos devido às diferenças de pressão. A fonte de luz produz um feixe de luz que incide na amostra. A maior parte dos sistemas usa um ou mais lasers como fonte de luz, devendo-se, a sua preferência, à geração de luz monocromática e ao diâmetro relativamente mais pequeno que o das lâmpadas em arco. A selecção do laser depende do tipo de células a analisar e dos comprimentos de onda necessários para a excitação dos fluorocromos seleccionados. Os sinais são produzidos quando as células em suspensão passam, alinhadas, uma a uma, à frente do feixe de luz, que incide sobre elas na perpendicular.

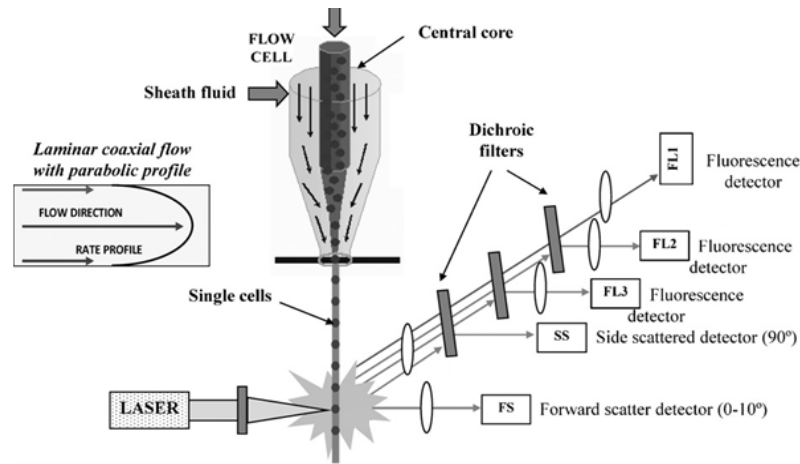
O sistema óptico é formado por vários espelhos dicróicos e filtros que absorvem e transmitem determinados comprimentos de onda, possuindo dois detectores de dispersão de luz e alguns de fluorescência (o número varia com o citómetro). As características celulares que contribuem para a dispersão da luz são o tamanho e as

características das membranas celulares, do conteúdo citoplasmático (ex. grânulos) e do núcleo. A dispersão de luz é, portanto, um processo físico em que uma célula ou partícula interacciona com a luz incidente, alterando a sua direcção sem modificação do seu comprimento de onda. Esta pode dispersar-se para a frente, sendo uma medida do tamanho celular e à qual se atribui o nome de *Forward Scatter* (FS ou FSC) ou pode-se dispersar em ângulo recto, sendo uma medida da densidade celular e da granularidade, conhecida por *Side Scatter* (SS ou SSC).

A informação gerada com a emissão de luz pelos fluorocromos presentes na célula ou partícula está relacionada com a absorção de energia luminosa com comprimento de onda característico para cada composto. Esta absorção vai fazer com que os electrões subam a um nível energético superior, havendo uma rápida passagem destes electrões excitados para o seu estado energético normal, havendo, por consequência, emissão de fotões e de energia. A luz emitida pelos fluorocromos tem menor energia e maior comprimento de onda, atribuindo-se, a este processo, o nome de fluorescência.

De seguida, os detectores, que podem ser fotodíodos, fotomultiplicadores ou detectores monocromáticos, recebem os pulsos de luz carregados de fotões, gerando um sinal electrónico, que é proporcional à quantidade de luz dispersa ou à intensidade de fluorescência. Este sinal vai ser amplificado e, posteriormente, convertido em sinal digital, através de um conversor analógico/digital.

Por fim, a informação é transmitida para o sistema informático, tornando-se possível efectuar a análise da amostra em estudo (Díaz *et.al.*, 2010; Orfao e Buitrago, 1995).



**Figura 6. Representação esquemática do sistema óptico de um citómetro de fluxo com um laser e três detectores de fluorescência. (Díaz *et.al.*, 2010)**

Em CF, a análise é efectuada a partir dos dados obtidos que são apresentados sob a forma de gráficos mono ou biparamétricos. Nos gráficos monoparamétricos, também designados histogramas, visualiza-se apenas um parâmetro (por exemplo, uma fluorescência). Nos gráficos biparamétricos, conhecidos como *dot plots*, ou “gráficos de pontos”, visualizam-se dois parâmetros simultaneamente (por exemplo, FSC *versus* SSC).

Para efectuar a análise fenotípica das células é necessário utilizar anticorpos monoclonais (AcMo) específicos para antígenos presentes em moléculas expressas à superfície ou no interior da célula, conjugados com fluorocromos (moléculas fluorescentes) (Martin *et.al.*, 2006). Desta forma, conseguem-se identificar as células que expressam as moléculas em estudo e caracterizar a sua expressão (Marrone, 2009).

Os fluorocromos de excelência são biologicamente inertes (não afectam as células, nem se ligam directamente aos elementos celulares), emitem fluorescência com grande intensidade quando estimulados pela luz com o comprimento de onda adequado e, para imunofenotipagem, devem ser facilmente conjugados com AcMo (Baumgarth e Roederer, 2000). Contudo, é necessário ter atenção ao uso de combinações de fluorocromos pois, apesar das vantagens em caracterizar, simultaneamente, diversas propriedades na mesma célula, se os fluorocromos usados em combinação tiverem espectros de emissão próximos pode haver sobreposição de fluorescências, sendo necessário fazer a compensação espectral, onde os sinais de um detector vão ser

subtraídos aos dos outros; assim, os fluorocromos usados em combinação devem ter uma baixa sobreposição espectral entre si (Díaz *et.al.*, 2010). A compensação é, por isso, uma questão essencial na CF da qual depende a fiabilidade dos resultados obtidos. Por este motivo, o utilizador deve estar ciente dos efeitos da compensação, tem que saber utilizá-la convenientemente e deve ser capaz de reconhecer dados não ou mal compensados (Hézar *et.al.*, 2007; Baumgarth e Roederer, 2000).

Desde a primeira aplicação da CF no estudo da célula, o número de parâmetros a serem medidos (número de fluorocromos a serem combinados numa única leitura) tem aumentado. Esta evolução, que se deveu ao desenvolvimento de novos *hardware*, *software* e fluorocromos, levou ao aumento significativo da quantidade e da qualidade das medições. Percebe-se, portanto, que os benefícios da CF multiparamétrica fazem com que esta técnica se tenha tornado uma ferramenta particularmente útil e insubstituível no estudo da biologia e da imunologia da célula. Contudo, a medição de múltiplos parâmetros, em cada célula, está limitada pelo número de fluorocromos que podem ser usados em simultâneo, dificultando o processo da compensação (Baumgarth e Roederer, 2000).

O maior inconveniente da CF encontra-se na necessidade em obter células, núcleos ou cromossomas em suspensão e individualizados, perdendo-se, desta forma, informação sobre a arquitectura tecidual ou celular e sobre as relações que cada célula, núcleo ou cromossoma estabelece com o meio que os rodeia (Orfao e Buitrago, 1995).

O elemento chave dos citómetros de fluxo consiste na sua capacidade de medir um elevado número de partículas e, simultaneamente, múltiplos parâmetros em cada célula. Deste modo, é possível identificar e caracterizar populações e subpopulações de células ou até detectar células raras, como é o caso das SCH (Díaz *et.al.*, 2010; Martin *et.al.*, 2006).

Os resultados apresentados são o número de eventos contados, a percentagem de eventos e a intensidade média de fluorescência, podendo esta última ser convertida em número equivalente de fluorescência ou de moléculas de anticorpo (Hézar *et.al.*, 2007).

Assim, com o uso da CF, torna-se possível fazer o estudo da diferenciação das células hematopoiéticas (Huber, 2010).

### **Anticorpos monoclonais**

Para a identificação de moléculas expressas na superfície das células, assim como intracelulares, é necessário utilizar AcMo específicos (Landuyt *et.al.*, 2010; Martin *et.al.*, 2006). Actualmente está disponível uma grande variedade de AcMo específicos para determinantes antigénicos de numerosas moléculas, (Orfao e Buitrago, 1995), sendo a sua classificação efectuada de acordo com os respectivos *clusters of differentiation* (CD); serão referidos os de interesse para o estudo em questão.

#### CD71

Um dos AcMo mais usados na imunofenotipagem da linha eritróide é o anti-CD71, que se liga ao receptor de transferrina (CD71), uma glicoproteína transmembranar com 95 KD de peso molecular envolvida no metabolismo do ferro. Apesar da expressão de CD71 não ser específica da linha eritróide, a combinação de um alto nível de expressão desta proteína com as características de dispersão da luz das células, permite identificar com alguma precisão a linha eritróide (Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001; Borrione *et.al.*, 2007; Wojda *et.al.*, 2002). A expressão de CD71 é regulada por inúmeros factores, incluindo o armazenamento em ferro e o estímulo por parte da EPO. Começa a expressar-se no progenitor eritróide BFU-E, tendo uma expressão baixa a intermédia no estadio de CFU-E (Sato *et.al.*, 2010; Borrione *et.al.*, 2007; Loken *et.al.*, 1987). Nos estadios de pré-proeritroblasto, proeritroblasto e de eritroblasto basófilo a sua expressão é elevada, por comparação com a observada no estadio de eritroblasto policromático. Em relação ao estadio de eritroblasto ortocromático, alguns autores defendem a negatividade para CD71, no entanto outros referem a sua retenção nos reticulócitos (Wojda *et.al.*, 2002; Mortensen *et.al.*, 2009). Nestes, o CD71 expressa-se em maior quantidade nos mais imaturos, havendo um decréscimo à medida que maturam até ao seu desaparecimento (Borrione *et.al.*, 2007). Esta diferença de expressão demonstra a regulação da expressão dos receptores de transferrina ao longo da maturação, em função das necessidades determinadas pela síntese de hemoglobina (Serke e Huhn, 1992; Marsee *et.al.*, 2010). Na célula madura, o CD71 está igualmente ausente (Allan *et.al.*, 2008).

### CD36

O CD36, glicoproteína de 88 KDa, está presente nas plaquetas, na linha monocítica e na linha eritróide (Cho e Kim, 2009; Filippone *et.al.*, 2010). É usado na identificação de células eritróides progenitoras e nucleadas, sendo sabido que os eritroblastos basófilos e policromáticos têm uma forte expressão deste receptor. Alguns autores afirmam também que o CD36 marca eritrócitos maduros (Allan *et.al.*, 2008; Dorn *et.al.*, 2008).

### CD34

O CD34, com um peso molecular de 116 KD, é um marcador de SCH e de progenitores mais diferenciados das diversas linhas, incluindo a eritróide, que se liga à proteína de adesão CD62L (Selectina L), perdendo gradualmente a sua expressão com a maturação (Tsiftoglou *et.al.*, 2009; Wognum *et.al.*, 1996; Liu *et.al.*, 2007; Sackstein, 1997; Abbas *et.al.*, 2000; Wojda *et.al.*, 2002; Pahal *et.al.*, 2000). Desta forma, à medida que as células se tornam comprometidas para com a linha eritróide, a expressão de CD34 decresce substancialmente até desaparecer (Boehm *et.al.*, 2009).

### CD45

O CD45, com um peso molecular compreendido entre 180 e 220 KD, é um receptor pan-leucocitário com actividade de fosfatase da tirosina. No que respeita ao estudo da linha eritróide por citometria de fluxo, este marcador é útil para excluir os leucócitos contaminantes (Sato *et.al.*, 2010). Está presente em todas as células hematopoiéticas, havendo uma diminuição da sua expressão a partir do estadio de proeritroblasto até à sua perda (Pahal *et.al.*, 2000; Cho *et.al.*, 2001; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001).

### HLA-DR

O HLA-DR (*Human Leucocyte Antigen-DR*) é um receptor de superfície heterodimérico que é composto por uma cadeia  $\alpha$  (30-34 KDa) e outra  $\beta$  (26-29 KDa) e pertence ao *Major Histocompatibility Complex* (MHC) de classe II (Handy *et.al.*, 2010; Roitt *et.al.*, 1996; Kanakoudi-Tsakalidou *et.al.*, 2001). É uma molécula que se expressa nas células apresentadoras de antígeno (células dendríticas, monócitos, linfócitos B) e nos linfócitos T activados, sendo também utilizado para a imunofenotipagem da linha

eritróide. Expressa-se nas células CD34+ (progenitores hematopoiéticos), deixando de se expressar na fase de proeritroblasto (Terstappen *et.al.*, 1990; Levacher *et.al.*, 1990; Genel *et.al.*, 2010; Wognum *et.al.*, 1996; Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001).

#### CD117

O CD117, também designado proteína KIT, é uma proteína com 145 KD que funciona como receptor para o SCF (Novelli *et.al.*, 2010; Tsiftoglou *et.al.*, 2009). É detectável na maioria das células imaturas CD34 negativas, sendo expresso pela pluripotente SCH e pelos progenitores mielóides. Após os estádios de CFU-E e de proeritroblasto há um declínio da sua expressão, mas o CD117 continua a ser detectável até ao estádio de eritroblasto (Bain e Thompson, 2009; Wognum *et.al.*, 1996).

#### CD105

O CD105 (endoglina), com um peso molecular de 90 KD, liga-se a vários membros da superfamília *transforming growth factor* - beta (TGF- $\beta$ ), sendo expresso nos proeritroblastos e co-expresso nos precursores hematopoiéticos mais imaturos. Sabe-se também que a expressão de CD105 se mantém nas células comprometidas com a linha hematopoiética, tendo um importante papel no que respeita aos progenitores precoces mielo-eritróides (Porta *et.al.*, 2006; Abbas *et.al.*, 2000; Cho *et.al.*, 2001).

#### CD33

O CD33 é uma glicoproteína de 67 KD que se liga ao ácido siálico e é membro da família *Sialic acid binding immunoglobulin related lectins* (Siglec), sendo também designado por Siglec-3 (Abdool *et.al.*, 2010). Expressa-se à superfície dos precursores hematopoiéticos mielóides, eritróides e megacariocíticos, sendo mais fortemente expresso nas células da linha mielomonocítica (Marin *et.al.*, 2010; Wognum *et.al.*, 1996). Apesar disto, é usualmente conhecido como sendo um marcador de células mielóides, sabendo-se também que não se expressa nas SCH pluripotentes (Ueda *et.al.*, 2000; Abdool *et.al.*, 2010).

Do que atrás foi dito pode inferir-se que usando AcMo com especificidade adequada é possível fazer o estudo dos diferentes estádios de desenvolvimento eritropoiético (Mortensen *et.al.*, 2009; Martin *et.al.*, 2006).

## **Objectivos**

O objectivo geral deste trabalho consistiu no estudo fenotípico da maturação da linha eritróide na MO, por CF, recorrendo à utilização de AcMo específicos para diversos antigénios, conjugados com diferentes fluorocromos,

Os objectivos específicos consistiram na identificação e caracterização de diferentes estadios de diferenciação da linha eritróide por critérios fenotípicos, estabelecendo a sua eventual relação com os estadios de maturação identificáveis por critérios morfológicos.

## **Material e Métodos**

O trabalho laboratorial foi realizado no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

### **Amostras**

Foram estudadas 26 amostras de MO de doentes do Serviço de Hematologia Clínica enviadas ao Laboratório de Citometria para estudo imunofenotípico e ao Serviço de Hematologia Laboratorial para estudo citológico (mielograma) e que não apresentaram evidência de envolvimento medular por doença hematológica.

As amostras foram colhidas em tubos com anticoagulante EDTA-K3.

### **Metodologia**

Após exclusão de envolvimento medular por doença hematológica, foi efectuada a contagem das células, o estudo imunofenotípico e estudo morfológico da linha eritróide.

#### ***Contagem de células***

A contagem de células foi feita no contador hematológico automático CoulterGen-S, da Beckman Coulter.

As amostras foram classificadas de hipocelulares, normocelulares ou hipercelulares conforme a concentração celular era  $<30.000/\text{mm}^3$ ,  $\geq 30.000/\text{mm}^3$  e  $\leq 90.000/\text{mm}^3$  ou  $>90.000/\text{mm}^3$ , respectivamente.

#### ***Estudo imunofenotípico***

O estudo imunofenotípico da linha eritróide foi efectuado através de imunomarcção, seguida de aquisição em citómetro de fluxo e análise dos resultados.

### **Imunomarcção das amostras**

Para a imunomarcção foi usada uma técnica de imunofluorescência directa, usando uma combinação de oito AcMo conjugados com fluorocromos com especificidade para antigénios expressos em moléculas consideradas relevantes para a

identificação da linha eritróide e estudo da sua diferenciação (Quadro 1). A escolha desta combinação de anticorpos baseou-se no painel de imunomarcção sugerido pelo grupo EuroFlow para diagnóstico e subclassificação de leucemias mielóides agudas e síndromes mielodisplásicas (Dongen *et.al.*, 2009) para utilização no citómetro FACScanto (Becton-Dickinson), tendo sido posteriormente adaptada para utilização no citómetro de fluxo Navios<sup>TM</sup> da Beckman Coulter, com substituição do AcMo anti-CD71 conjugado com APC-H7 pelo mesmo anticorpo conjugado com APC-AF750.

**Quadro 1. Anticorpos monoclonais respectivas especificidades, clones, fluorocromos e casas comerciais.**

<b>Especificidade</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorocromo (a)</b>	<b>Casa Comercial (b)</b>
<b>CD36</b>	FA6.152	FITC	IOT
<b>CD105</b>	1G2	PE	IOT
<b>CD34</b>	8G12	PerCP-Cy5.5	BD
<b>CD117</b>	104D2D1	PE-Cy7	IOT
<b>CD33</b>	P67.6	APC	BD
<b>CD71</b>	M-A712 / YDJ1.2.2	APC-H7/ APC-AF750	BD / IOT
<b>HLA-DR</b>	L243	PB	Biologend
<b>CD45</b>	HI30	PO	Invitrogen

(a) APC, *Allophycocyanin*; APC-AF750, *Allophycocyanin-Alexa Fluor 750*; APC-H7, *Allophycocyanin-Hilite7*; FITC, *Fluorescein Isothiocyanate*; PB, *Pacific Blue*; PE, *Phycoerythrin*; PE-Cy7, *Phycoerythrin-Cyanine 7*, PerCP-Cy5.5, *Peridinin Chlorophyll protein-Cyanine 5.5*, PO, *Pacific Orange*.

(b) BD, Becton Dickinson Bioscience; IOT, Immunotech;

Para a imunomarcção, procedeu-se da seguinte forma:

- a) Adição do volume apropriados de cada anticorpo (Quadro 2), a um tubo de polipropileno;
- b) Adição de 100 µL de suspensão celular, contendo  $\approx 1 \times 10^6$  células;
- c) Agitação;
- d) Incubação durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (18-25°C).

**Quadro 2. Anticorpos monoclonais e respectivos volumes.**

<b>Anticorpos Monoclonais</b>	<b>CD36</b>	<b>CD105</b>	<b>CD34</b>	<b>CD117</b>	<b>CD33</b>	<b>CD71</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>CD45</b>
<b>Volume (µL)</b> *	10	20	20	10	5	5	5	5

\* Volume de anticorpo para 100 µL de suspensão celular ( $1 \times 10^6$  células).

De seguida, efectuou-se a lise dos eritrócitos presentes na amostra, seguida de lavagem das células.

Para o efeito, adicionou-se 500 µL do reagente de lise OptiLyse<sup>®</sup> C Lysing Solution da Beckman Coulter, agitou-se no vórtex e incubou-se durante 10 minutos no escuro à temperatura ambiente (18-25°C).

No final do período de incubação, adicionaram-se 2 mL de solução tampão de fosfatos em meio salino (BD FACSSlow<sup>™</sup>), agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 minutos, retirando-se o sobrenadante.

Repetiu-se mais uma vez o passo anterior e, finalmente, adicionaram-se 500 µL de BD FACSSlow<sup>™</sup>, ficando as amostras preparadas para a leitura no citómetro de fluxo.

### **Leitura no citómetro de fluxo**

As amostras foram lidas no citómetro de fluxo Navios<sup>™</sup> da Beckman Coulter (Figura 7), com as características mencionadas no Quadro 3.

Para a leitura foi usado o *Software* Navios versão 1.0., da Beckman Coulter.

Em cada amostra, foram adquiridos 200.000 eventos.



**Figura 7. Citómetro de fluxo Navios<sup>™</sup> (Beckman Coulter).**

**Quadro 3. Comprimentos de onda dos lasers do citómetro de fluxo e de emissão dos fluorocromos.**

Laser	Comprimento de onda de emissão do laser (nm)	Canal	Fluorocromo	Comprimento de onda de emissão máxima do fluorocromo (nm)
Azul	488	FS	-	-
		SS	-	-
		FL1	FITC	541
		FL2	PE	575
		FL4	PerCP-CY5.5	695
		FL5	PE-Cy7	810
Vermelho	638	FL6	APC	660
		FL8	APC-H7 APC-Alexa Fluor 750	785 775
Violeta	405	FL9	PB	455
		FL10	PO	551

### Análise dos resultados

A análise dos resultados foi efectuada com o *Software* Infinicyt™ (Cytognos), usando a última versão disponibilizada para o grupo Euroflow (V1.5) e consistiu fundamentalmente nas seguintes etapas:

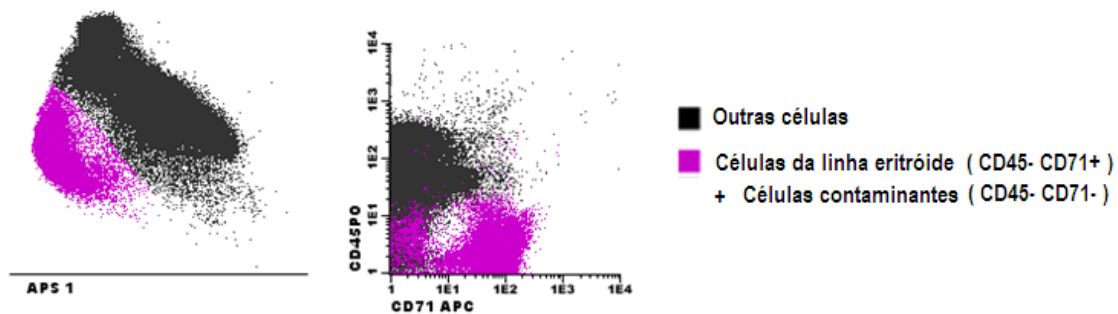
- a) Selecção da linha eritróide
- b) Quantificação da linha eritróide
- c) Identificação fenotípica dos estadios maturativos da linha eritróide
- d) Caracterização fenotípica dos estadios maturativos da linha eritróide

### Identificação e selecção da linha eritróide

A identificação e selecção da linha eritróide foram feitas usando o *Automatic Population Separator* (APS), que faz uma separação n-dimensional das populações de células através da verificação das diferentes escolhas de combinações de parâmetros (FSC, SSC e fluorescências), e tendo como apoio *dot plots* em que se representam as fluorescências emitidas pelas células marcadas com os anticorpos específicos para diferentes antígenos.

Este processo decorreu a dois tempos, usando os APS 1 e 2 e tendo como apoio os *dot plots* anti-CD45/anti-CD71 e anti-CD36/anti-CD71, respectivamente (Figuras 8 e 9), consistindo nos seguintes passos sequenciais:

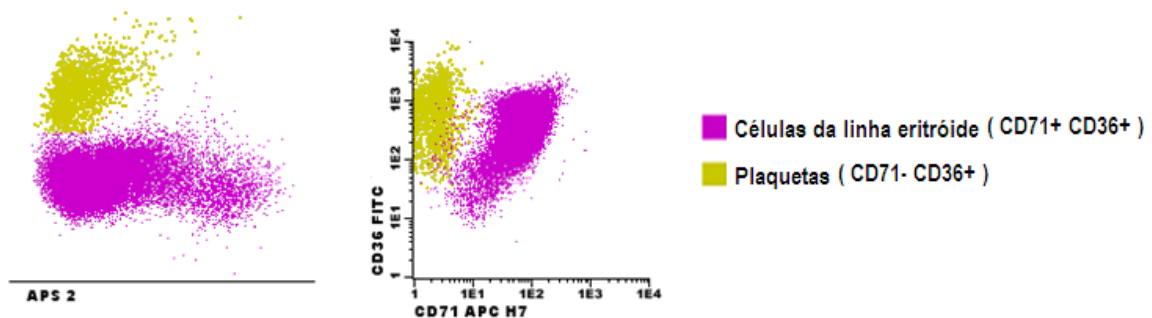
Passo 1. Seleccionamos inicialmente a “população de células eritróides nucleadas da medula óssea” no APS1, tendo como apoio o histograma biparamétrico anti-CD45/anti-CD71 (Figura 8).



**Figura 8. Selecção inicial da população de células eritróides nucleadas da medula óssea, “contaminada” com plaquetas.**

Analisando este último histograma, verificamos que a “população de células eritróides nucleadas” seleccionada no APS1, embora fosse constituída fundamentalmente por células da linha eritróide (CD45-/CD71+), apresentava sempre uma “contaminação” variável com células não eritróides (CD45-/CD71-).

Passo 2: Seleccionamos secundariamente a “população de células eritróides nucleadas da medula óssea” no APS2, tendo como apoio o histograma biparamétrico anti-CD36/anti-CD71 (Figura 9).



**Figura 9. Selecção secundária da população de células eritróides nucleadas da medula óssea, com exclusão das plaquetas “contaminantes”.**

Analisando este último histograma, verificamos que a “população de células eritróides nucleadas da medula óssea” seleccionada no passo 1 era constituída por células eritróides (CD71+CD36+) e por plaquetas (CD71-CD36+) e que esta estratégia de selecção nos permitia excluir as plaquetas “contaminantes”.

### Quantificação da linha eritróide

Uma vez identificadas as células eritróides nucleadas da medula óssea (e excluídas as plaquetas contaminantes), procedemos à sua quantificação, expressando o resultado em % de células eritróides no total das células nucleadas presentes na amostra.

### Identificação fenotípica dos estadios de maturação da linha eritróide

Após identificação e selecção da população das células eritróides, procedemos à análise dos *dot plots* anti-CD36/anti-CD105, anti-CD36/anti-CD117 e anti-CD117/anti-CD34 (Figura 10). Nestes *dot plots* identificamos as populações que nos pareciam poder corresponder a estadios de maturação distintos e que designamos arbitrariamente como estadios 1, 2, 3 e 4, com base na expressão de CD105, CD117 e CD34. O estadio 3 foi seleccionado com base na expressão exclusiva de CD105 (Figura 10, histograma A), o estadio 2 com base na expressão de CD105 e CD117 (Figura 10, histograma B) e o estadio 1 com base na expressão de CD105, CD117 e CD34 (histograma C). As células com ausência de expressão destes três marcadores foram consideradas como pertencentes ao estadio 4.

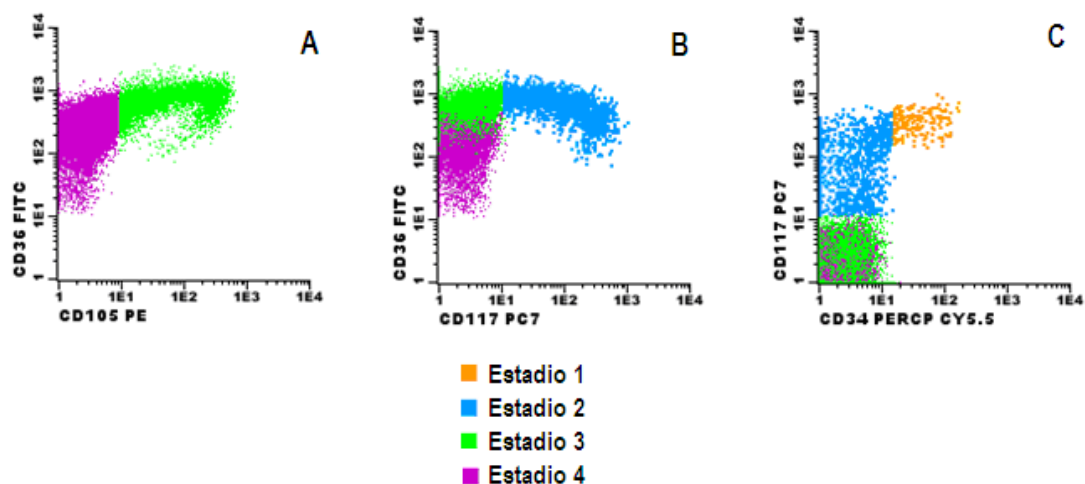


Figura 10. Identificação e selecção dos diferentes estadios de maturação da linha eritróide, com base em critérios fenotípicos.

### Caracterização fenotípica dos estádios maturativos da linha eritróide

Os estádios maturativos acima mencionados foram caracterizados quanto ao FSC, SSC e quanto à expressão dos vários antígenos estudados, tendo esta última sido avaliada pela intensidade média de fluorescência.

### ***Estudo morfológico***

A partir das mesmas amostras de MO usadas para estudo imunofenotípico, foram efectuados esfregaços, que, após coloração e após secagem, foram preservados através de montagem com lamela, em Entellan<sup>®</sup> (Merck).

Nestes esfregaços foi posteriormente realizado, em duplicado, o estudo morfológico da linha eritróide, executado por um médico patologista experiente, em microscópio óptico BX40 da Olympus (ampliação de 1000x). Este estudo consistiu na quantificação da percentagem de células eritróides totais na MO e na sua contagem diferencial, tendo em conta as características morfológicas nucleares e citoplasmáticas que identificam os diferentes estádios maturativos da linha eritróide: proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos.



**Figura 11. Microscópio óptico BX40 (Olympus).**

### ***Análise estatística***

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o *Software* SPSS versão 18.0. Para as variáveis quantitativas contínuas foi calculada a média e o desvio padrão e para as variáveis qualitativas, foi calculada a frequência. Para a comparação de variáveis foram usados o teste t-student (comparação de dois grupos), e ANOVA (para comparação de mais de dois grupos), seguido pelo teste de Tukey para comparação

múltipla a posteriori, nos casos adequados. A homogeneidade da variância foi avaliada pelo teste Levene e o nível de significância considerado foi de 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ).

## **Resultados**

Os resultados apresentados são relativos a 26 amostras de MO sem evidência de envolvimento medular por doença hematológica, das quais 54% pertenciam a doentes do sexo feminino e 46% a doentes do sexo masculino, tendo idades compreendidas entre os 40 e os 82 anos.

### **Celularidade**

No que diz respeito à celularidade, 50% das amostras eram hipocelulares, 23% das amostras eram normocelulares e 27% hipercelulares.

Nestas amostras, a concentração celular média foi de  $20,3 \pm 7,3 \times 10^9/L$ ,  $61,3 \pm 17,7 \times 10^9/L$  e  $142,3 \pm 29,0 \times 10^9/L$ , respectivamente.

### **Representação das células da linha eritróide**

#### ***Estudo imunofenotípico***

A percentagem de células de linha eritróide identificadas por CF foi de  $12,2 \pm 6,8\%$ .

Na análise global pelo teste ANOVA, em que se compararam os grupos de amostras hipocelulares, normocelulares e hipercelulares quanto à percentagem de células da linha eritróide, verificou-se que existia pelo menos um grupo diferente dos outros ( $p = 0,003$ ), no que respeita à % de células eritróides totais, avaliada por CF (Figura 12 e a Tabela I dos anexos).

Quando se analisaram as diferenças entre grupos constatou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,002$ ) entre a % de células eritróides totais observada nas amostras hipocelulares e hipercelulares (Tabelas II e III dos anexos).

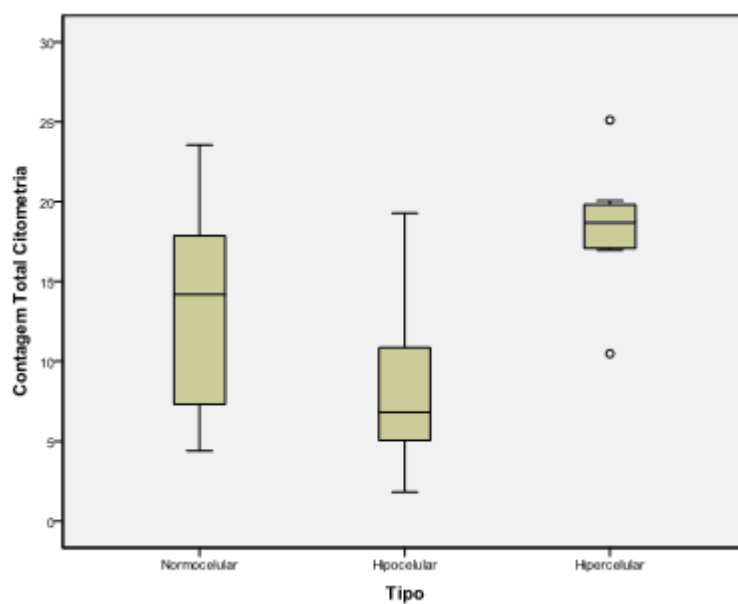
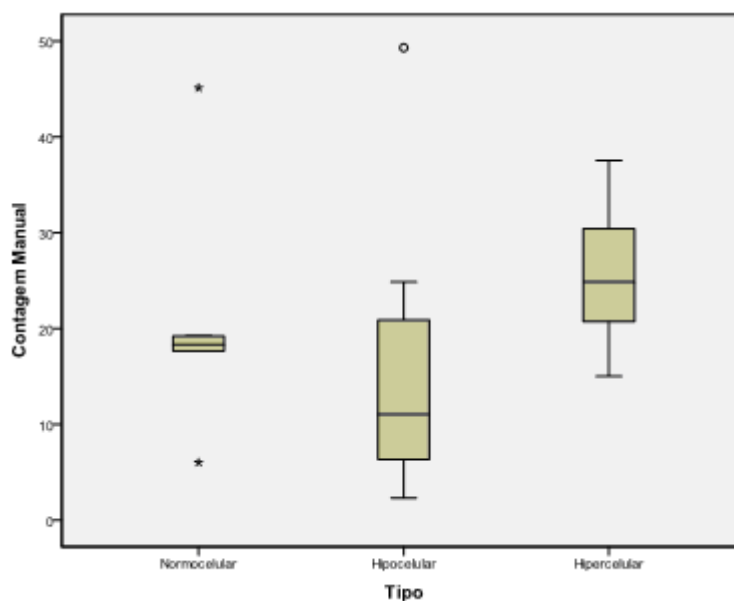


Figura 12. Percentagem de células eritróides nas amostras de medula óssea hipocelulares, normocelulares e hiperocelulares, avaliada por citometria de fluxo.

### *Estudo morfológico*

No que respeita ao estudo morfológico, a percentagem de células de linha eritróide foi de  $19,3 \pm 12,4\%$ .

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre amostras hipocelulares, normocelulares e hiperocelulares, no que respeita à percentagem de células da linha eritróide ( $p = 0,173$ ) (Figura 13 e Tabela IV dos anexos).

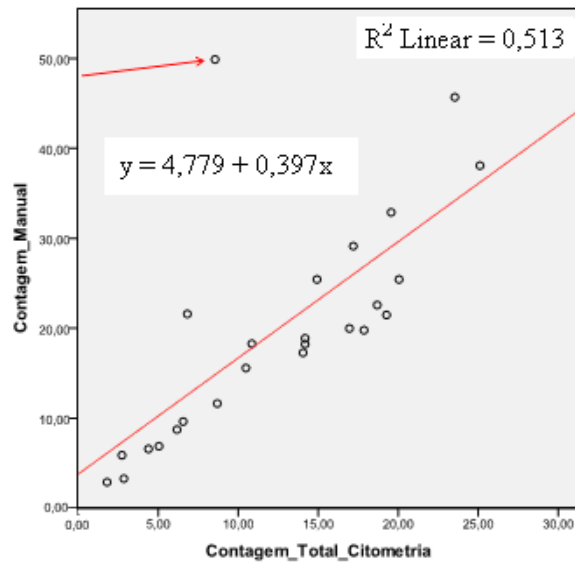


**Figura 13. Percentagem de células da linha eritróide nas amostras hipocelulares, normocelulares e hiperelulares, avaliada por estudo morfológico.**

### ***Comparação entre os estudos imunofenotípico e morfológico***

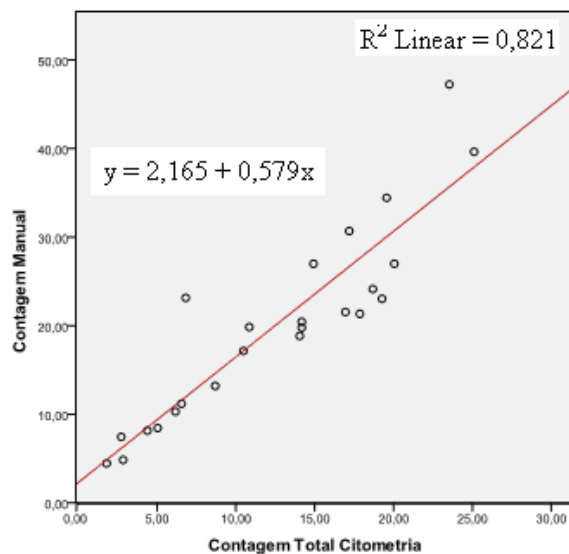
A percentagem de células da linha eritróide obtida por CF correlacionava-se com a percentagem de células da linha eritróide obtida por morfologia, sendo o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,513 (Figura 14 e Tabela V dos anexos). No entanto, verificou-se que a contagem por morfologia era superior à obtida por CF (ordenada na origem igual a 4,779).

Este valor da ordenada na origem tem uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,016$ ) relativamente à origem o que se deverá, provavelmente, à presença da amostra que se encontra mais afastada da recta [assinalada com seta a vermelho (Figura 14 e Tabela VI dos anexos)].



**Figura 14. Comparação entre as contagens de células da linha eritróide obtidas no estudo morfológico e no estudo imunofenotípico.**

Com o intuito de averiguar se realmente a amostra assinalada seria a responsável pela diferença estatisticamente significativa acima referida, foi efectuada nova comparação dos dois métodos, mas agora sem essa mesma amostra (Figura 15). Como se pode observar, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) aumentou consideravelmente (0,821), o que significa que os dois métodos têm uma maior correlação (Tabela VII dos anexos). O valor da ordenada na origem deixa de ter uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,086$ ) contudo, a contagem por morfologia continua a ter valores superiores aos da citometria ( $B = 2,165$ ) (Figura 15 e Tabela VIII dos anexos).



**Figura 15. Comparação entre as contagens de células da linha eritróide obtidas no estudo morfológico e no estudo imunofenotípico, excluindo os *outliers*.**

## **Identificação e quantificação de estadios maturativos eritróides**

### ***Estudo imunofenotípico***

A combinação dos oito anticorpos permitiu distinguir quatro estadios de maturação, designados por estadios 1, 2, 3 e 4, sendo que o estadio 1 representa células mais imaturas e o estadio 4 células mais maduras.

Avaliando a percentagem de células presentes em cada um dos estadios de maturação identificados por critérios fenotípicos verificou-se que à medida que a maturação avançava, do estadio 1 para o estadio 4, a quantidade de células da linha eritróide ia aumentando (Tabela 1).

**Tabela 1. Representação relativa dos diferentes estadios maturativos da linha eritróide, identificados por estudo imunofenotípico.**

<b>Estadios fenotípicos</b>	<b>% das células eritróides nucleadas da medula óssea</b>			
	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Estadio 1</b>	0,8%	0,4%	0,1%	1,4%
<b>Estadio 2</b>	6,2%	1,4%	3,5%	10,1%
<b>Estadio 3</b>	32,9%	13,5%	11,5%	59,0%
<b>Estadio 4</b>	60,2%	13,8%	35,2%	83,3%

Desta forma, as células nos estadios mais indiferenciados (estadios 1 e 2) eram relativamente raras, representando só  $7,0 \pm 1,5\%$  das células da linha eritróide, e havia um franco predomínio de células nos estadios mais avançados de diferenciação (estadios 3 e 4), que representavam, em conjunto,  $93,1 \pm 1,5\%$  das células eritróides nucleadas da MO.

As amostras hipocelulares, normocelulares e hipercelulares não apresentavam diferenças significativas na percentagem de células nos estadios maturativos 1, 2, 3 e 4 (Figura 16).

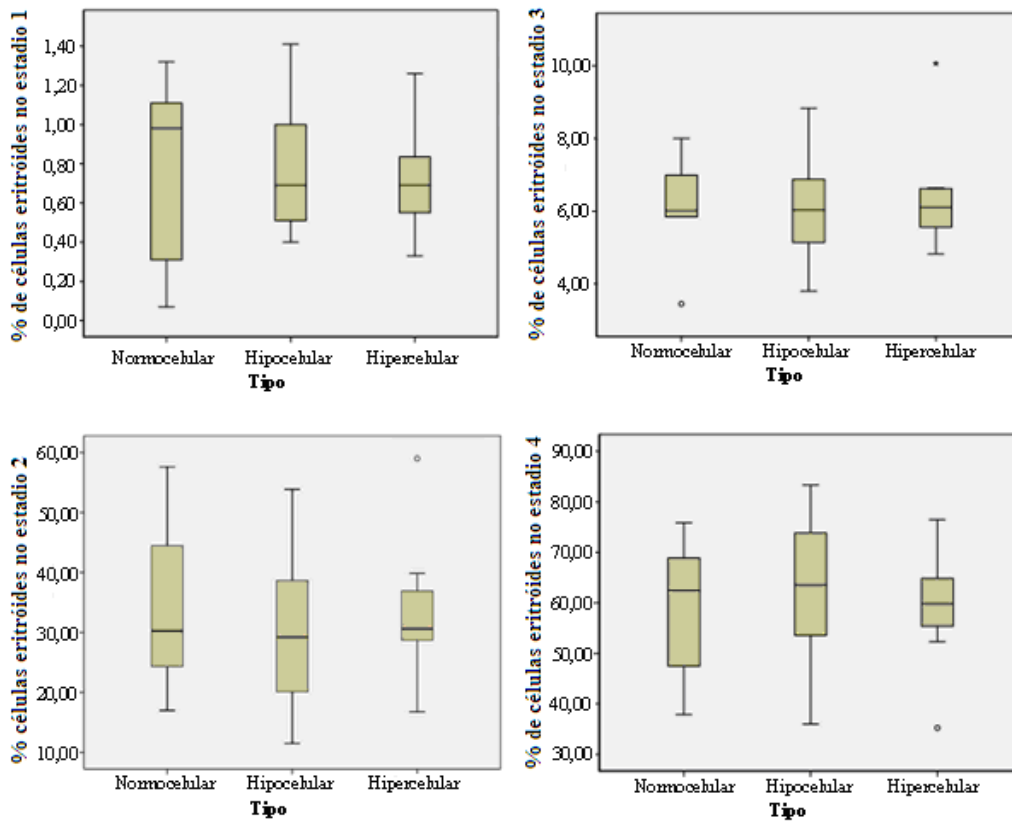


Figura 16. Percentagem de células eritróides nos estadios 1, 2, 3 e 4 nas amostras hipocelulares, normocelulares e hiperceulares.

A Figura 17 representa a distribuição relativa de cada um dos estadios fenotípicos em cada uma das amostras estudadas e aí pode observar-se que a distribuição das células entre os estadios 3 e 4 era variável de amostra para amostra.

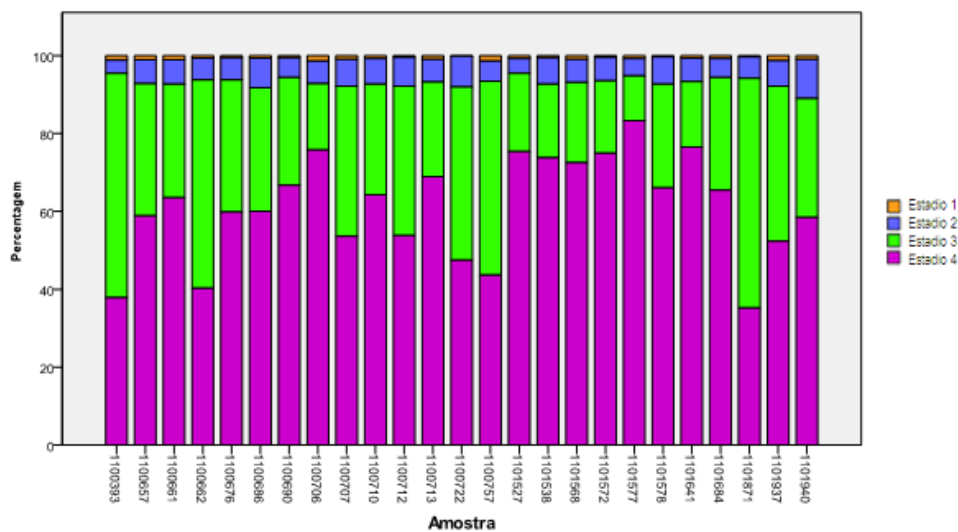


Figura 17. Percentagem de células em cada estadio maturativo, nas diferentes amostras, avaliada por critérios imunofenotípicos.

### *Estudo morfológico*

Igualmente, avaliando a percentagem de células presentes em cada um dos estádios de maturação identificados por critérios morfológicos verificou-se que à medida que a maturação ocorria, desde o proeritroblasto até ao eritroblasto ortocromático, a quantidade de células da linha eritróide ia aumentando (Tabela 2).

**Tabela 2. Representação relativa dos diferentes estádios maturativos da linha eritróide, identificados por estudo morfológico.**

Estádios morfológicos	% das células eritróides nucleadas da medula óssea			
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
<b>Proeritroblastos</b>	0,8%	0,9%	0,0%	3,0%
<b>Eritroblastos basófilos</b>	5,6%	3,1%	0,0%	11,2%
<b>Eritroblastos policromáticos</b>	34,9%	13,5%	0,0%	56,6%
<b>Eritroblastos ortocromáticos</b>	58,7%	15,0%	39,3%	100,0%

Tal como no estudo imunofenotípico, verificou-se que a percentagem de células nos estádios mais precoces de diferenciação, constituídas por proeritroblastos e eritroblastos basófilos, era relativamente pequena ( $6,4 \pm 3,8\%$  das células da linha eritróide), havendo um franco predomínio de células em estádios mais avançados de diferenciação ( $93,6 \pm 3,8\%$ ), representadas por eritroblastos ortocromáticos e eritroblastos policromáticos (Figura 18).

A Figura 18 representa a distribuição relativa de cada um dos estádios maturativos identificados por critérios morfológicos em cada uma das amostras estudadas e aí pode verificar-se que era muito variável a distribuição entre eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos.

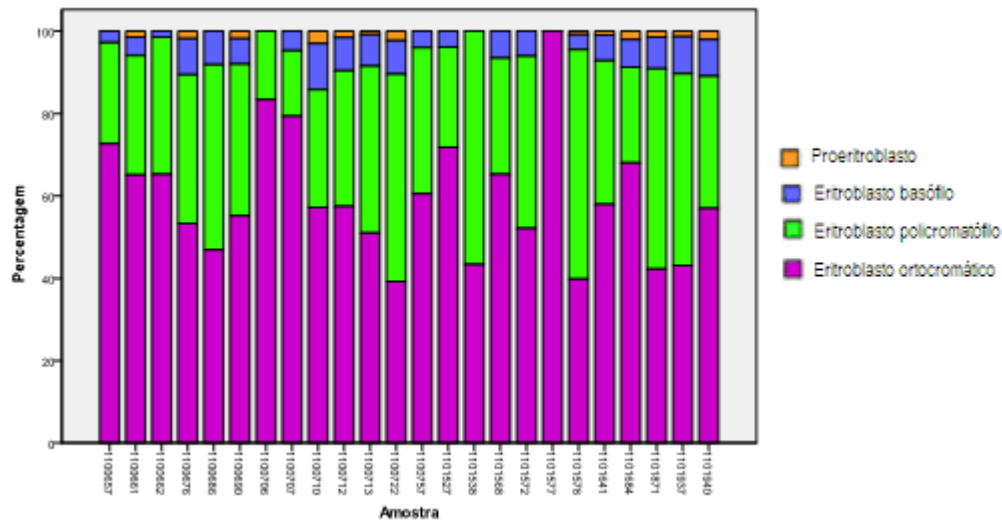


Figura 18. Percentagem de células em cada estágio maturativo, nas diferentes amostras, avaliada por critérios morfológicos.

### *Comparação entre os estudos imunofenotípico e morfológico*

Comparando a percentagem de células da linha eritróide obtida por CF com a percentagem de células da linha eritróide obtida por morfologia em cada estágio maturativo verificou-se que a correlação entre o estágio 1 e o estágio de proeritroblasto foi muito fraca ( $R^2 = 0,071$ ) (Tabela IX dos anexos).

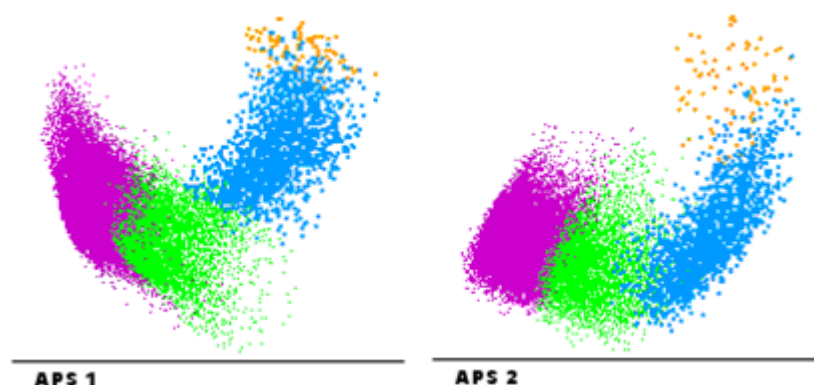
No entanto, no que respeita à correlação dos restantes estádios fenotípicos e morfológicos, foram observadas correlações estatisticamente significativas:

- A percentagem de células no estágio 2 apresentou uma forte correlação com a percentagem de eritroblastos basófilos ( $R^2 = 0,736$ ) (Tabelas X e XI dos anexos).
- Da mesma forma, a percentagem de células no estágio 3 exibiu correlação com a percentagem de eritroblastos policromáticos ( $R^2 = 0,685$ ) (Tabelas XII e XIII dos anexos).
- No que se refere à percentagem de células no estágio 4, também houve correlação com a percentagem de eritroblastos ortocromáticos ( $R^2 = 0,611$ ) (Tabelas XIV e XV dos anexos).

## **Caracterização fenotípica da maturação da linha eritróide**

O estudo imunofenotípico permitiu fazer a análise da expressão dos diferentes marcadores nesses mesmos estádios de maturação identificados por citometria de fluxo.

Os APS 1 e 2, que conjugam a informação obtida nos diferentes parâmetros avaliados (FSC, SSC e fluorescências) permitiram-nos visualizar os vários estádios fenotípico de maturação da linha eritróide na medula (Figura 19).



**Figura 19. APS obtidos após selecção da linha eritróide.**

Nos *dot plots* representativos da maturação da linha eritróide (Figura 20) pudemos verificar que o tamanho e a complexidade vão diminuindo à medida que as células vão maturando (*dot plot A*).

Quanto à expressão das diferentes moléculas estudadas, verificamos que o CD71 e o CD36 se expressam em todos os estádios (*dot plots B, C e D*), sendo variável a expressão das restantes moléculas. Assim, a expressão de CD45, HLA-DR, CD34 e CD117 (*dot plots B, I, H e G, respectivamente*) caracteriza os estádios mais imaturos (estádios 1 e 2), sendo a expressão das três primeiras moléculas restrita ao estadio 1, enquanto a expressão de CD117 se observa nos estádios 1 e 2. Já o CD105 se expressa até ao estadio 3 (*dot plots C, E, G e J*), desaparecendo no estadio 4. Relativamente ao CD33, a sua expressão é muito reduzida, observando-se apenas em algumas células do estadio 1 (*dot plot J*).

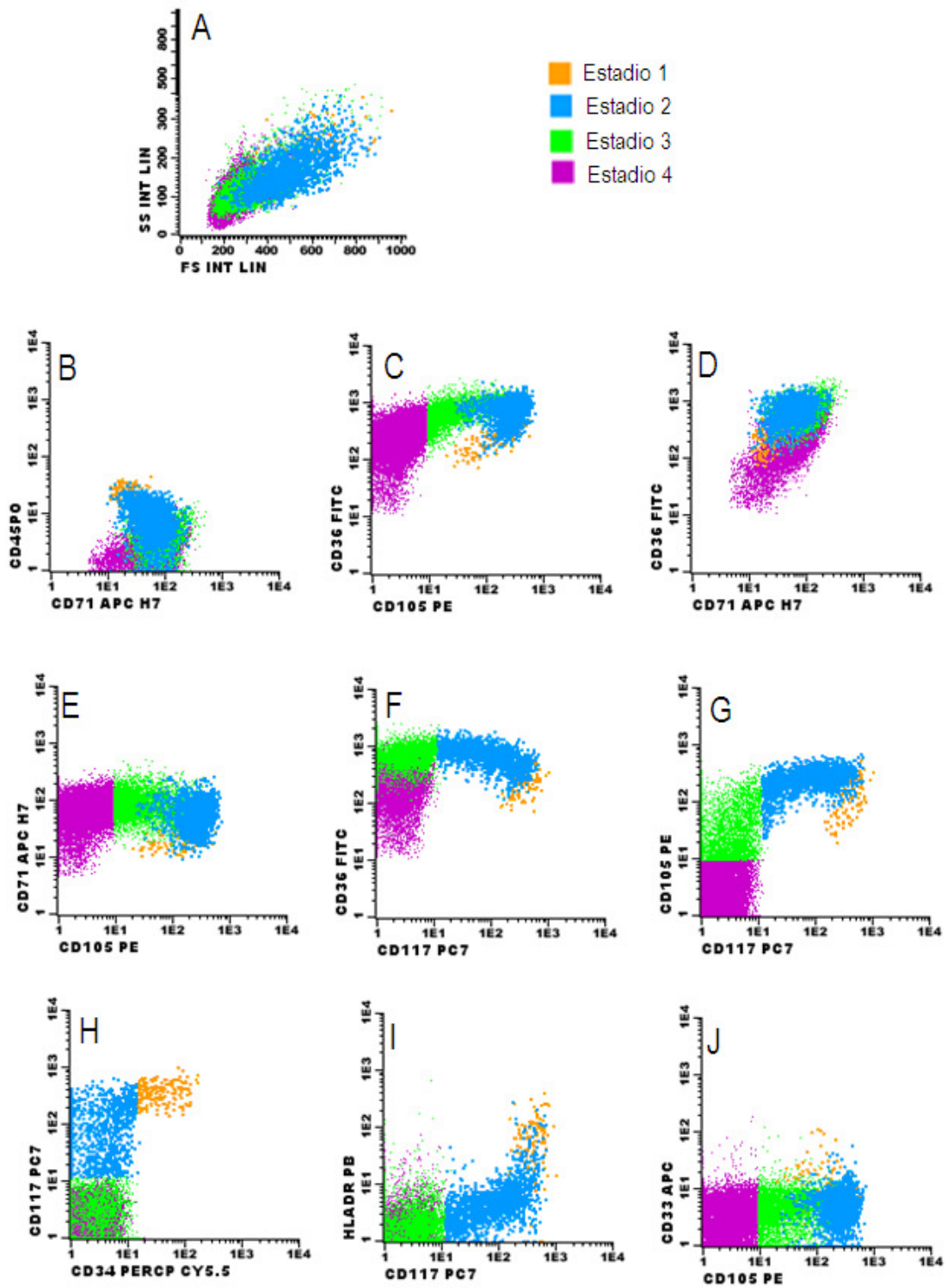


Figura 20. *Dot-plots* biparamétricos ilustrativos da maturação fenotípica da linha eritróide na medula óssea.

## *Análise do tamanho e complexidade celular*

### FSC

Relativamente ao tamanho celular, avaliado pelo FSC, observa-se, como já referido anteriormente, uma diminuição gradual ao longo dos quatro estadios de diferenciação, sendo esta diminuição mais acentuada quando as células passam do estadio 2 para o estadio 3 (Figura 21 e Tabela XVI dos anexos).

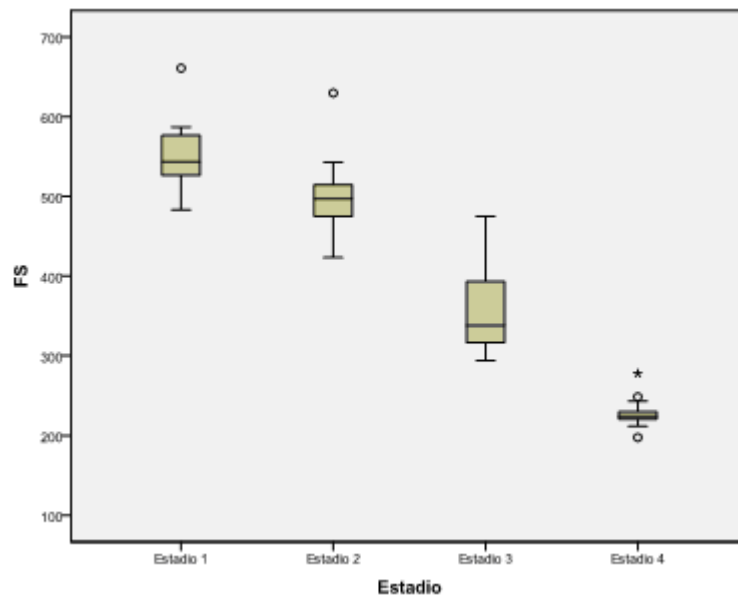


Figura 21. Evolução do tamanho celular (FSC) durante a maturação da linha eritróide.

### SSC

Quanto à complexidade celular, avaliada pelo SSC, observa-se, também, uma diminuição gradual ao longo dos quatro estadios de diferenciação, sendo esta diminuição mais acentuada na passagem do estadio 1 para o estadio 2 e do estadio 3 para o estadio 4 (Figura 22 e Tabela XVII dos anexos).

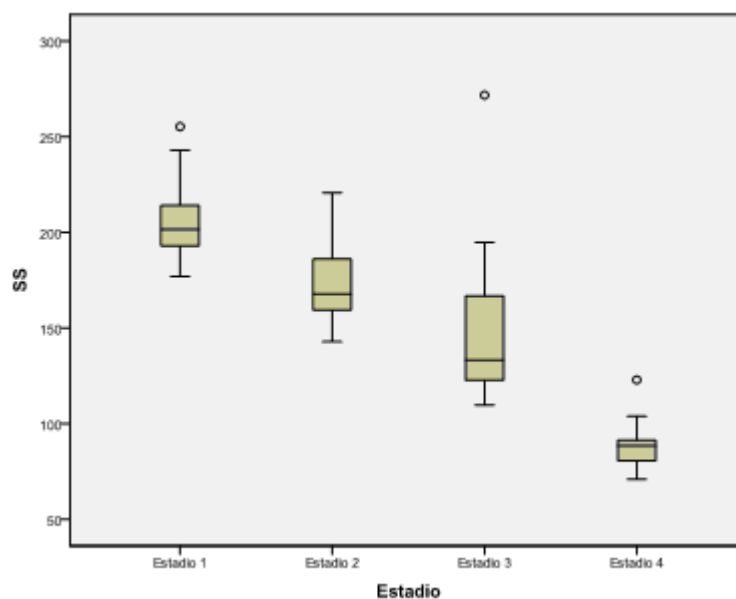


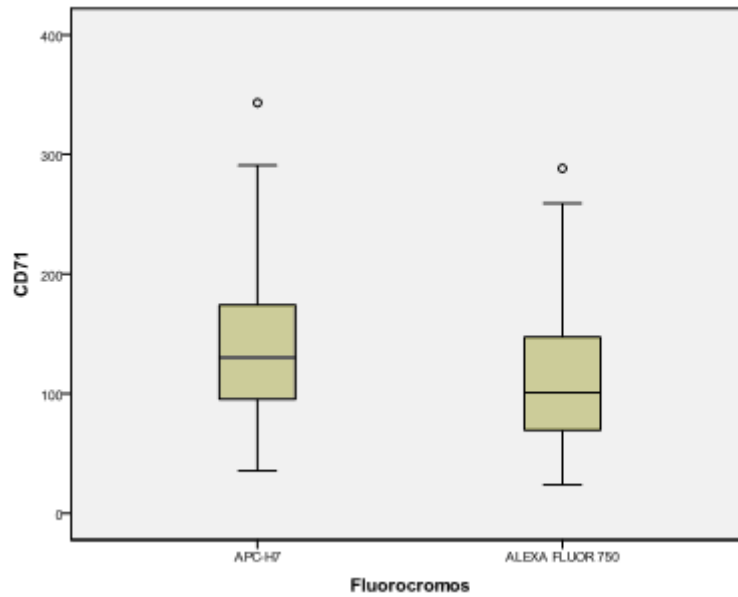
Figura 22. Evolução da complexidade celular (SSC) durante a maturação da linha eritróide.

### *Análise da expressão de marcadores celulares*

Descreve-se de seguida a variação da expressão de cada uma das moléculas estudadas ao longo do processo de maturação da linha eritróide, identificada pelos estadios maturativos sequenciais, 1 a 4, e avaliada pela intensidade média de fluorescência emitida pelas células marcadas com os respectivos anticorpos, conjugados com fluorocromos.

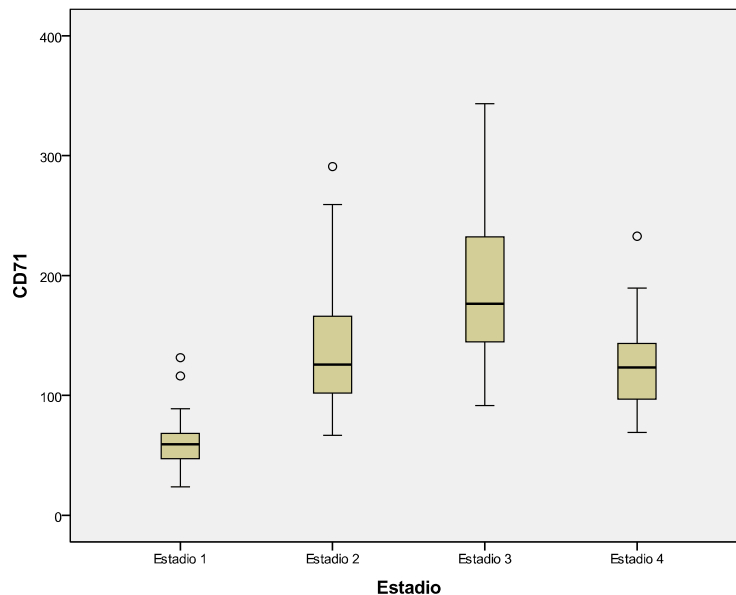
#### **CD71**

No estudo da maturação da linha eritróide por citometria foram usados dois anticorpos anti-CD71 marcados com fluorocromos diferentes (APC-H7 e APC-Alexa Fluor 750). Foi, portanto, imprescindível verificar se havia diferenças entre estes dois fluorocromos, nomeadamente no que respeita à intensidade de fluorescência. Como se pode observar na Figura 23 e na Tabela XVIII dos anexos, a análise estatística comprovou que não havia diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,054$ ).



**Figura 23. Comparação entre dois anticorpos anti-CD71 conjugados com fluorocromos diferentes.**

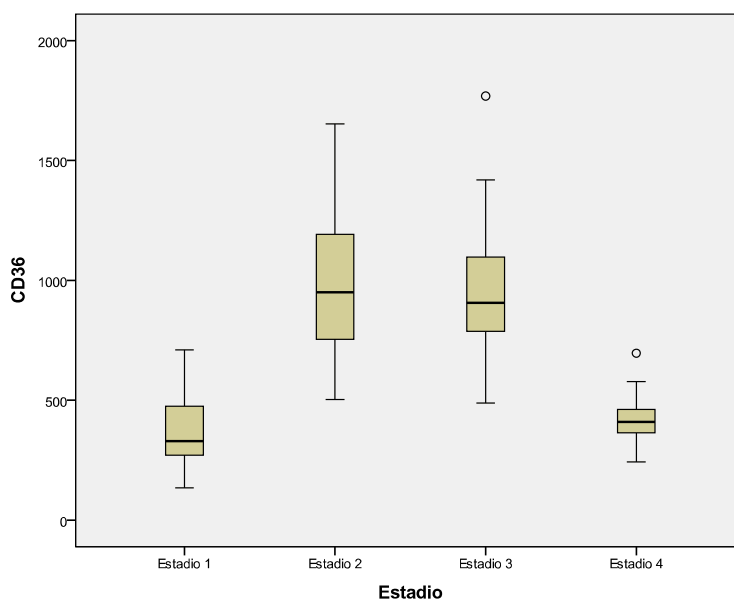
Desta forma, ao analisar a expressão de CD71 verifica-se que há um aumento na intensidade média de expressão até ao estadio 3 e que na fase terminal de maturação na medula, correspondente à passagem do estadio 3 para o estadio 4, há uma diminuição na expressão deste receptor à superfície das células (Figura 24 e Tabela XIX dos anexos).



**Figura 24. Evolução da expressão de CD71 durante a maturação da linha eritróide.**

### **CD36**

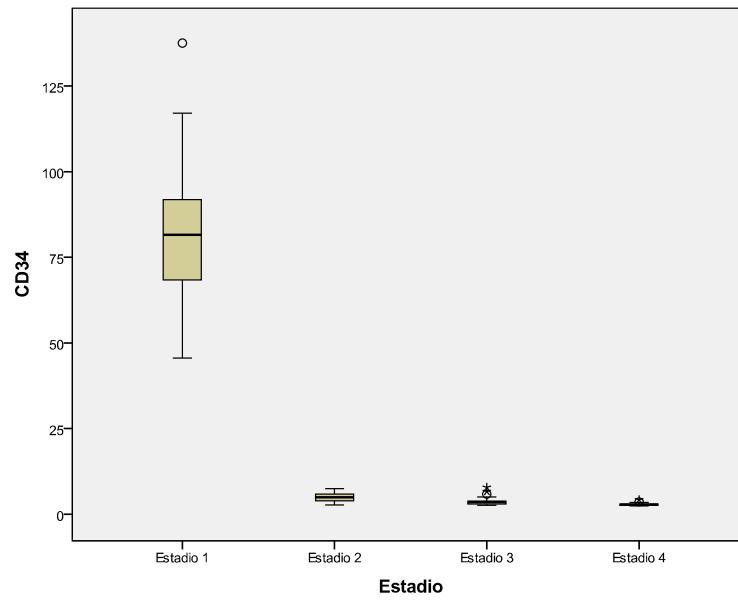
No que diz respeito à intensidade média de expressão de CD36 nota-se um aumento acentuado na passagem do estadio 1 para o estadio 2; no estadio 2 a expressão desta molécula atinge o máximo, mantendo-se ainda elevada no estadio 3 e diminuindo posteriormente (Figura 25 e Tabela XX dos anexos).



**Figura 25. Evolução da expressão de CD36 durante a maturação da linha eritróide.**

### **CD34**

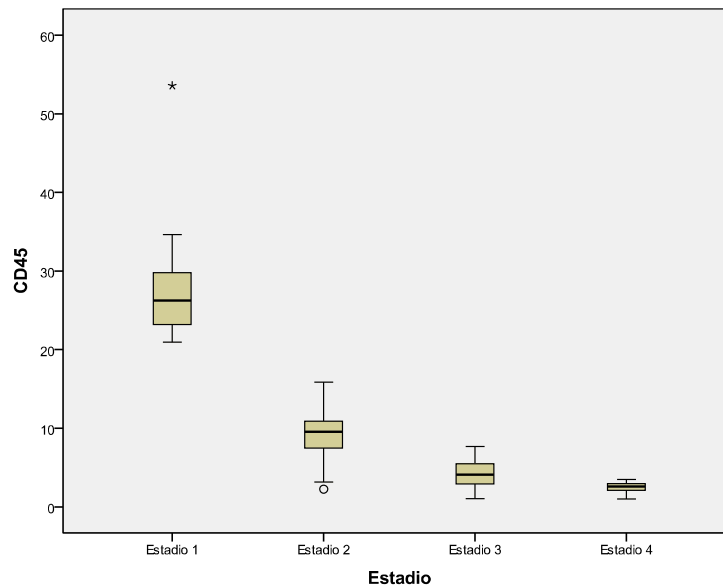
A intensidade média de expressão de CD34 apresenta um decréscimo desde o estadio 1 até ao estadio 4, observando-se expressão fraca desta molécula no estadio 1, e ausência de expressão nos estadios subsequentes (Figura 26 e Tabela XXI dos anexos).



**Figura 26. Evolução da expressão de CD34 durante a maturação da linha eritróide.**

### **CD45**

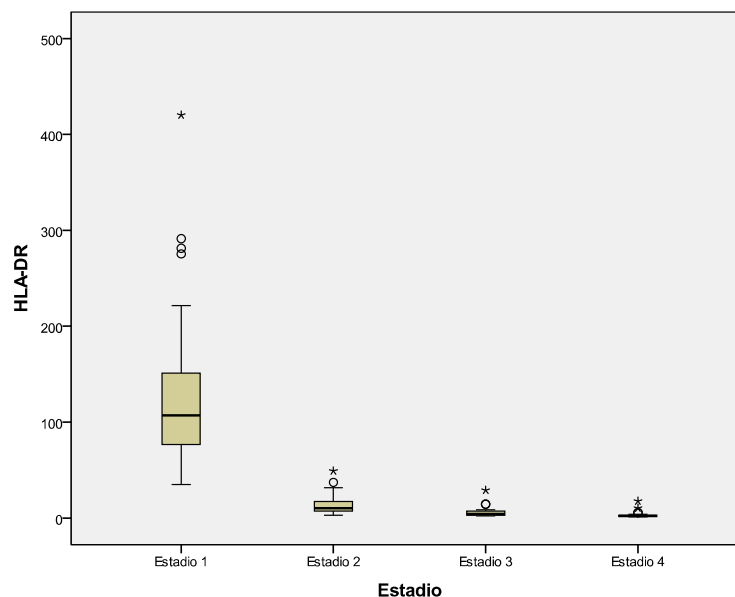
Relativamente ao CD45 a intensidade média de expressão diminui desde o estadio 1 ao estadio 4, observando-se expressão extremamente fraca desta molécula no estadio 1, diminuição no estadio 2 e ausência de expressão nos estadios 3 e 4 (Figura 27 e Tabela XXII dos anexos).



**Figura 27. Evolução da expressão de CD45 durante a maturação da linha eritróide.**

### HLA-DR

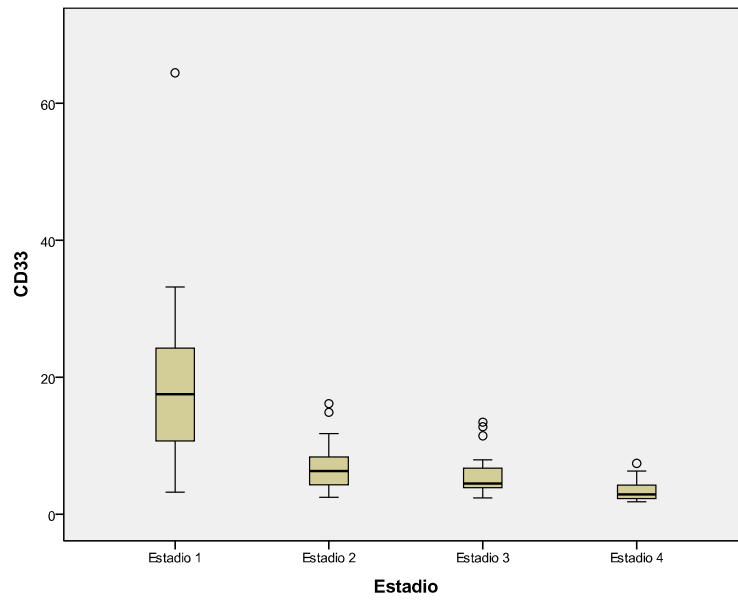
A expressão de HLA-DR ocorre no estadio 1, diminuindo posteriormente e não tendo sido observada expressão desta molécula nos estadios subsequentes (Figura 28 e Tabela XXIII dos anexos).



**Figura 28. Evolução da expressão de HLA-DR durante a maturação da linha eritróide.**

### CD33

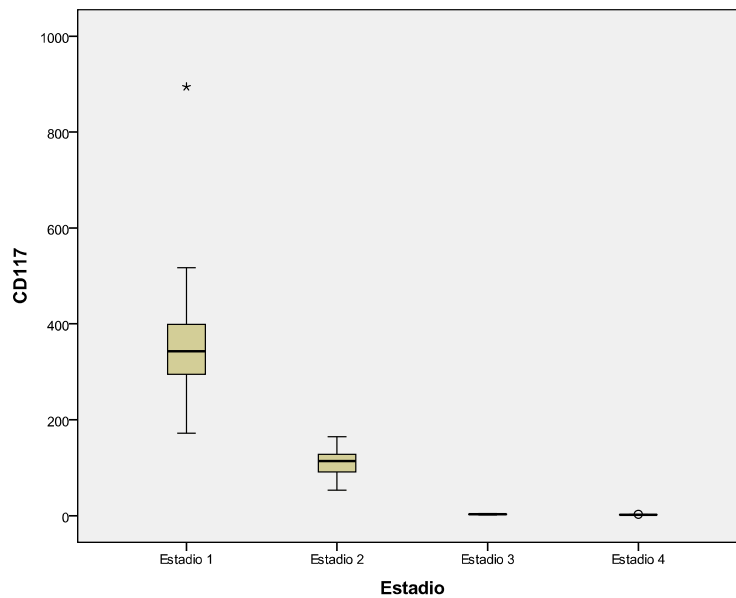
Quanto ao CD33 verifica-se uma diminuição da intensidade média de expressão desde o estadio 1 até ao estadio 4, sendo o seu comportamento idêntico ao do CD45 e do HLA-DR (Figura 29, Tabela XXIV dos anexos).



**Figura 29. Evolução da expressão de CD33 durante a maturação da linha eritróide.**

### **CD117**

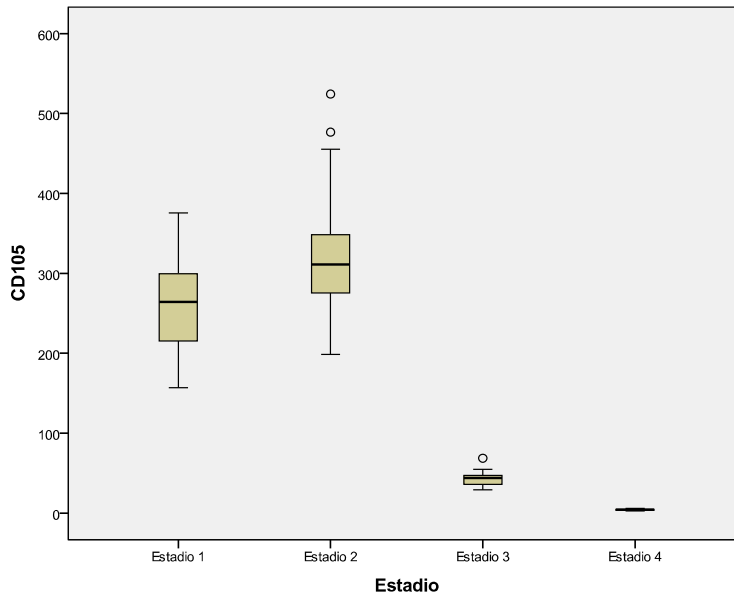
No que se refere ao CD117 verifica-se uma diminuição da intensidade média de expressão desde o estadio 1 ao estadio 4, havendo uma maior descida entre os estadios 1 e 2, deixando de se expressar nos estadios 3 e 4 (Figura 30 e Tabela XXV dos anexos).



**Figura 30. Evolução da expressão de CD117 durante a maturação da linha eritróide.**

## **CD105**

O CD105 tem um ligeiro aumento da intensidade média de expressão na passagem do estadio 1 para o estadio 2, diminuindo significativamente na passagem do estadio 2 para o estadio 3, continuando a diminuir até ao estadio 4, onde já não se expressa (Figura 31 e Tabela XXVI dos anexos).



**Figura 31. Evolução da expressão de CD105 durante a maturação da linha eritróide.**

### ***Caracterização dos perfis fenotípicos maturativos***

Após análise individual de cada uma das moléculas foi efectuado o estudo combinado dos oito marcadores nos quatro estadios de maturação, para que fosse possível avaliar o perfil fenotípico de cada um dos estadios.

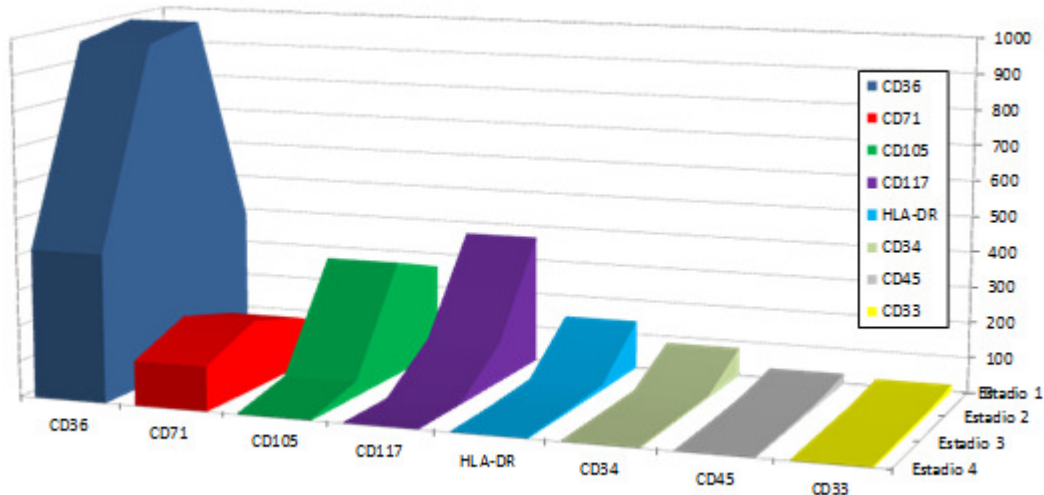
Assim, pela observação das Figuras 32 e 33 verifica-se que ao longo da diferenciação da linha rubra algumas moléculas deixam de se expressar e outras passam a ter uma maior ou menor expressão em determinados estadios.

No estadio 1, todas as moléculas se expressam, apesar de no caso do CD33 e do CD45 as intensidades de expressão serem muito reduzidas.

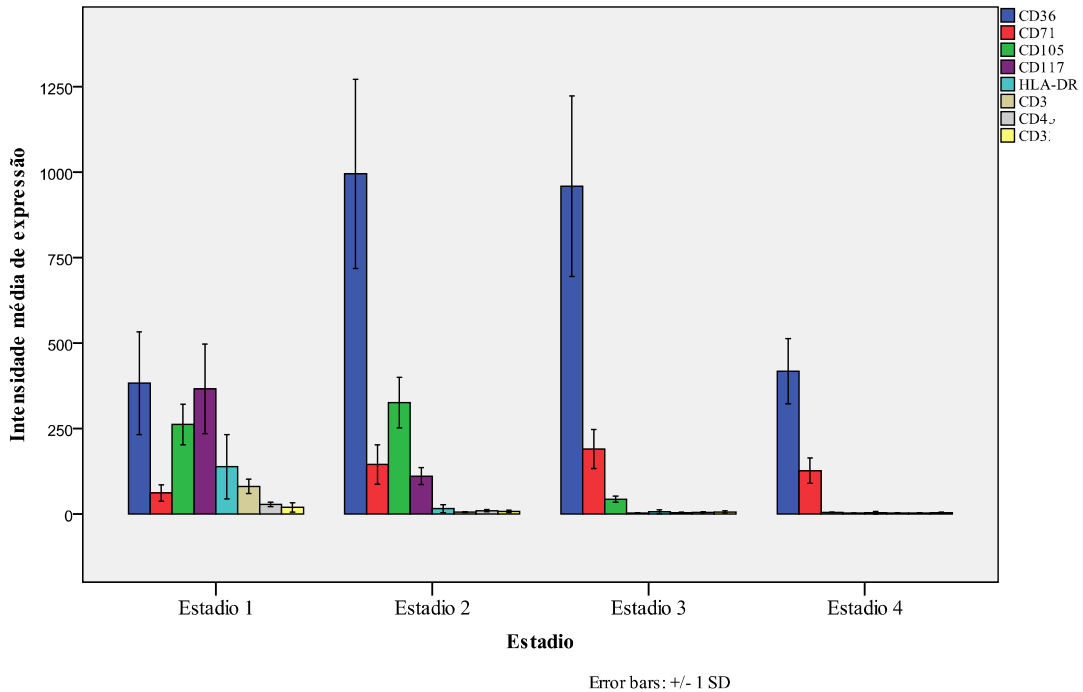
No estadio 2, o CD33, o CD45, o CD34 e o HLA-DR deixam de ser expressar, o CD117 tem uma diminuição de expressão, a expressão de CD105 mantém-se e os CD71 e CD36 apresentam uma intensidade de expressão mais elevada.

No estadio 3, o CD117 deixa de se expressar, a expressão de CD105 diminui e a expressão de CD71 aumenta, enquanto a de CD36 praticamente não varia.

Por fim, no estadio 4 o CD105 deixa de se expressar, diminuindo a expressão de CD71 e de CD36.



**Figura 32. Representação gráfica do perfil fenotípico maturativo da linha eritróide: evolução da intensidade média de expressão dos diferentes antígenos ao longo da maturação.**



**Figura 33. Representação gráfica do perfil fenotípico maturativo da linha eritróide: intensidade média de expressão dos vários antígenos nos diferentes estádios maturativos.**

Para melhor clarificação da análise da maturação da linha eritróide ao longo dos quatro estadios de diferenciação identificados por CF, representam-se de forma resumida no Quadro 4, os perfis fenotípicos correspondentes.

**Quadro 4. Resumo dos perfis fenotípicos que caracterizam os estadios maturativos da linha eritróide.**

<b>Estadio fenotípico</b>	<b>CD71</b>	<b>CD36</b>	<b>CD34</b>	<b>CD45</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>CD33</b>	<b>CD117</b>	<b>CD105</b>
<b>Estadio 1</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-/+)	(++)	(++)
<b>Estadio 2</b>	(++)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+++)
<b>Estadio 3</b>	(+++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
<b>Estadio 4</b>	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+, ++, +++) Positivo, i.e., expressão nas células desse estadio maturativo (com a designação +, ++ e +++ pretende-se apenas sistematizar a variação da intensidade de expressão ao longo do processo maturativo; (-) Negativo, i.e., ausência de expressão nas células desse estadio maturativo; (-/+) Expressão variável nas células desse estadio maturativo.

## Discussão

Os nossos resultados indicam que os **critérios fenotípicos para identificar e quantificar a linha eritróide** neste estudo (características de dispersão da luz associadas ao fenótipo CD45-CD71+CD36+) permitem obter resultados comparáveis aos critérios morfológicos convencionais, uma vez que a percentagem de células da linha eritróide por CF se correlaciona com a percentagem de células da linha eritróide por morfologia.

O facto da contagem por critérios morfológicos ser ligeiramente superior à contagem obtida por critérios fenotípicos, sobretudo no que respeita à contagem de células nos estadios mais avançados, pode dever-se ao facto das células da linha eritróide perderem a expressão de CD71 e de CD36 na fase final da maturação, sendo admissível que alguns eritroblastos tardios já não apresentem expressão significativa destas moléculas e possam, por isso, ter sido excluídos da análise citométrica. Outra hipótese plausível é que o método usado para a lise dos eritrócitos (OptiLyse® C, uma solução tamponada contendo 1.5% de formaldeído) possa ter conduzido à lise de alguns eritroblastos tardios, em particular de eritroblastos ortocromáticos. Para ultrapassar esta dificuldade, foram descritos métodos de imunomarcção sem lise dos eritrócitos e sem lavagem das células, que usaram o DRAQ5 (corante fluorescente com afinidade para o ADN) para a selecção das células nucleadas e a marcação com anti-CD45 e anti-CD71 para identificar as células da linha eritróide (Allan *et.al.*, 2008).

Quer o estudo imunofenotípico quer o estudo morfológico permitiram identificar quatro estadios maturativos da linha eritróide e em ambos os casos se verificou o aumento da quantidade de células desde o estadio mais imaturo até ao mais maduro. O facto das populações eritróides serem produzidas por mitoses sucessivas, justifica o aumento atrás citado (Chen *et.al.*, 2009).

Os **estadios maturativos da linha eritróide identificados na medula óssea por CF** caracterizam-se por perfis fenotípicos distintos que traduzem a evolução da expressão de diferentes moléculas ao longo da diferenciação: estadio 1 (CD45+, CD34+, CD117++, CD105++, CD71+, CD36+), estadios 2 (CD45-, CD34-, CD117+,

CD105+++), CD71++, CD36+++), 3 (CD45-, CD34-, CD117-, CD105+, CD71+++), CD36++) e 4 (CD45-, CD34-, CD117-, CD105-, CD71+, CD36+).

Durante a maturação da linha eritróide, avaliada por CF, verificou-se uma diminuição tanto em tamanho (avaliado pelo **FSC**) como em complexidade (avaliada pelo **SSC**), o que está de acordo com o citado por Koury *et.al* (2005) e com o observado no estudo morfológico.

Relativamente à **correspondência entre os estadios maturativos identificados por critérios fenotípicos e os identificados por critérios morfológicos**, convém antes de mais lembrar que a maturação das células é um processo contínuo, traduzido por mudanças morfológicas, fenotípicas e funcionais sequenciais e que qualquer tentativa de identificação de estadios, embora potencialmente útil para a sistematização do conhecimento, pode ser artefactual. De qualquer forma, os estadios fenotípicos 2, 3 e 4, parecem corresponder às células classificadas morfológicamente como eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos. Já não é claro que as células classificadas do ponto de vista fenotípico como pertencentes ao estadio 1 correspondam aos proeritroblastos, uma vez que não foi encontrada correlação entre a contagem morfológica e a contagem fenotípica. Este facto pode dever-se à pouca representação deste estadio precoce e à maior dificuldade em identificar estas células por critérios morfológicos. No entanto, também podemos admitir que no estadio 1 estejam incluídas algumas células mais imaturas (pré-proeritroblastos), uma vez que as células deste estadio partilham muitas características usualmente atribuíveis às células mais indiferenciadas, como a expressão de CD45, CD34 e HLA-DR.

A compreensão da correlação entre estadios fenotípicos e morfológicos exige uma análise detalhada das **moléculas cuja expressão se perde em fases mais ou menos precoces da diferenciação da linha eritróide**, ainda na medula óssea: CD45, CD34, HLA-DR, CD33, CD117 e CD105.

Relativamente à expressão de **CD45**, um receptor com actividade de fosfatase da tirosina, envolvido na regulação da proliferação celular, da diferenciação e da migração (Hertog, 1999), de acordo com Cho *et.al.*, 2001 e Sans-Sabrafan *et.al.*, 2001, esta molécula tem uma diminuição de expressão a partir do proeritroblasto até a sua perda no eritrócito, o que está em consonância com o que se verificou no trabalho efectuado.

Por outro lado, quando as células progenitoras hematopoiéticas se tornam comprometidas para com a linha eritróide, o **CD34**, diminui rapidamente, desaparecendo precocemente (Abbas *et.al.*, 2000 e Boehm *et.al.*, 2009). Embora as células identificáveis neste estudo como pertencentes ao estadio 1 ainda expressem CD34 com intensidade fraca, de acordo com estudos publicados previamente, baseados em estudos imunohistoquímicos da medula óssea os proeritroblastos já não expressam CD34 (Oertel *et.al.*, 1996).

Da mesma forma, Wognum *et.al.* (1996) e Sans-Sabrafan *et.al.* (2001) reportaram que o **HLA-DR** se expressa nas células CD34+, deixando de se expressar nos proeritroblastos. No estudo aqui efectuado verifica-se, no entanto, que as células eritróides classificadas como pertencentes ao estadio 1 ainda expressam HLA-DR, ainda que a intensidade de expressão desta molécula seja reduzida, deixando de se expressar nos estadios posteriores. Sendo o HLA-DR uma molécula crucial na apresentação de antígenos aos linfócitos T (Handy *et.al.*, 2010) e tendo os GV uma função altamente especializada no transporte de oxigénio e nas trocas gasosas, torna-se óbvio que esta molécula não é necessária para estas células (Klinken, 2002).

Quanto à expressão de **CD33**, segundo Marin *et.al.* (2010) e Abbas *et.al.* (2000), esta molécula expressa-se à superfície dos precursores hematopoiéticos eritróides, tendo a função de regular a sinalização nas células mielóides, justificando-se assim a baixa expressão da molécula no estadio 1 e a ausência de expressão nos estadios subsequentes.

No que respeita à expressão de **CD117**, verificamos que esta molécula se expressa exclusivamente nos estadios 1 e 2, muito embora a sua expressão no estadio 2, correspondente aos eritroblastos basófilos, seja já fraca e heterogénea. Estes resultados estão de acordo com o estudo publicado por Wognum *et.al.* (1996), onde se refere que a expressão da molécula decresce após os estadios de CFU-E e de proeritroblasto, continuando a ser detectável nos eritroblastos. O facto de o CD117 ser o receptor do SCF e este, por sua vez, ser um factor de crescimento que promove a síntese de ADN e, por consequência, a proliferação celular, explica a ausência de expressão nos estadios mais tardios de diferenciação da linha eritróide (Tsiftoglou *et.al.* 2009, Dorn *et.al.*, 2008).

Finalmente, no que respeita ao **CD105** (endoglina), observamos a expressão desta molécula até ao estadio 3, correspondente aos eritroblastos basófilos. Segundo Porta *et.al.* (2006), o CD105 actua como receptor acessório para o TGF- $\beta$  (Barbara *et.al.*, 1999), tem um papel importante na mielopoiese e na eritropoiese, expressando-se nas células precursoras hematopoiéticas CD45+ (Cho *et.al.*, 2001) e nos proeritroblastos. Os resultados obtidos demonstraram que este factor de crescimento é importante para a diferenciação eritróide até ao estadio de eritroblasto basófilo.

Não menos importante é a regulação da expressão de outras **moléculas que, apesar de estarem presentes em todos os estadios de diferenciação da linha eritróide na medula óssea, sofrem variações de expressão ao longo do processo maturativo: CD71 e CD36.**

A cinética de expressão de **CD71**, que corresponde ao receptor de transferrina e que medeia a incorporação dos complexos transferrina-ferro pelas células pode estar relacionada com as necessidades das células eritróides, de forma a assegurar a síntese da Hb. De facto, o estudo fenotípico demonstrou que a expressão de CD71, aumenta desde o estadio 1 (proeritroblastos?) até ao estadio 3 (eritroblastos policromáticos), havendo um decréscimo no estadio 4 (eritroblastos ortocromáticos), onde esta molécula se continua, contudo, a expressar. Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos por Wojda *et.al.*, 2002 que, usando um modelo de diferenciação da linha eritróide *in vitro*, a partir de células CD34+ cultivadas em meio com eritropoietina, documentou um aumento da expressão de CD71 até dia +6 de cultura, atingindo esta um *plateau* entre os dias +6 e +10 e diminuindo posteriormente, quando as células atingiam a sua maturação terminal. Também estão de acordo com os resultados obtidos por Marsee *et.al.*, 2010, que usando estudos imunohistoquímicos em biopsias de medula óssea, reportou que a expressão de CD71 diminuía na fase terminal de maturação da linha eritróide (eritroblastos tardios), sendo a expressão desta molécula praticamente ausente nos eritrócitos maduros. Estas variações da expressão de CD71 ao longo do processo maturativo podem traduzir as necessidades de incorporação de ferro pelas células de forma a completar a síntese de Hb, uma vez que a policromatofilia do citoplasma dos eritroblastos decorre do processo de hemoglobinição.

Os motivos que justificam a cinética de expressão de **CD36** ao longo da maturação da linha eritróide não são tão óbvios, uma vez que esta molécula tem aparentemente múltiplos ligandos, incluindo o colagénio, a trombospondina, assim como lipoproteína de baixa densidade oxidadas, fosfolípidos oxidados e ácidos gordos de cadeia longa, e múltiplas funções imunológicas e metabólicas em diferentes células (Silverstein e Febbraio, 2002). Nas células fagocíticas, o CD36 integra, juntamente com o receptor da vitronectina ( $\alpha V\beta 3$ ), um receptor *scavenger* envolvido na fagocitose independente da opsonização, estando também envolvido na fagocitose das células apoptóticas através do reconhecimento da fosfatidilserina exposta na membrana externa (Fadok *et.al.*, 1998). O facto de esta molécula atingir o máximo de expressão em estádios relativamente precoces da diferenciação (estadio 2 / eritroblastos basófilos) pode estar relacionado com o facto de esta molécula estar envolvida no efeito anti-apoptótico mediado pela EPO, prolongando assim a sobrevivência das células da linha eritróide (Nishiuchi *et.al.*, 2010). De qualquer forma, os nossos resultados são concordantes com os de outros publicados, onde se refere que o CD36 permite identificar células eritróides progenitoras e nucleadas, tendo uma forte expressão nos eritroblastos basófilos e policromáticos (Dorn *et.al.*, 2008).

## Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

A análise de células da MO por CF tem sido introduzida como um importante critério para a investigação e diagnóstico de numerosas patologias, principalmente nos casos em que a análise por morfologia e/ou citogenética é inconclusiva. Contudo, requer uma compreensão detalhada da expressão antigénica em cada linha celular durante a sua maturação desde a SCH até à célula madura (Westers *et.al*, 2011).

Neste trabalho caracterizámos, por CF, o perfil fenotípico da maturação da linha eritróide usando a combinação de oito anticorpos com especificidades distintas, conjugados com diferentes fluorocromos sugerida pelo consórcio Euroflow para o estudo das Síndromes Mielodisplásicas. Esta abordagem permitiu-nos analisar, em simultâneo, a expressão de diferentes moléculas à superfície das células eritróides ao longo do processo maturativo e identificar quatro estádios de maturação (estádios 1 a 4) que, grosso modo, parecem corresponder à sequência maturativa das células da linha eritróide na medula óssea descrita por critérios morfológicos (proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo e eritroblasto ortocromático).

Embora a expressão individual de cada uma das moléculas nas células da linha eritróide possa ter sido alvo de análise em estudos previamente publicados, este é, tanto quanto é do nosso conhecimento, o primeiro estudo em que a sua expressão é avaliada simultaneamente, utilizando um protocolo de imunofenotipagem a 8 cores e em que os estádios de maturação identificados por critérios fenotípicos são comparados com os identificados por critérios morfológicos. Esta abordagem só foi possível graças à utilização de um novo citómetro de fluxo que permite uma abordagem multiparamétrica e de uma nova aplicação informática que permite extrair o máximo de informação dos dados obtidos.

Pretendemos, em estudos posteriores, alargar o estudo a outras moléculas com reconhecida importância na maturação da linha eritróide, como o EPO-R e o CD235a (Glicoforina A), entre outras. Tencionamos ainda identificar alterações do perfil fenotípico de maturação associadas a diversas patologias que se acompanham de alterações primárias (síndromas mielodisplásicas, leucemias agudas, etc.) ou secundárias (anemia ferripriva, anemias megaloblásticas, etc.) da maturação eritróide.

## Referências Bibliográficas

- ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. e POBER, Jordan S. – **Cellular and Molecular Immunology**. 4ª ed. San Francisco: Saunders, 2000. 504 e 510 p. ISBN 0721682332.
- ABDOOL, Adam [*et.al.*] - Circulating CD33 and its clinical value in acute leukemia. Experimental Hematology. ISSN 0301-472X. 38 (2010) 462-471.
- AÏNSEBA, Bedr Eddine. e BENOSMAN, Chahrazed - Global dynamics of hematopoietic stem cells and differentiated cells in a chronic myeloid leukemia model. Journal of Mathematical Biology. ISSN 1432-1416. 62 (2010) 975-997.
- AKKER, Emile [*et.al.*] - The majority of the in vitro erythroid expansion potential resides in CD34- cells, outweighing the contribution of CD34+ cells and significantly increasing the erythroblast yield from peripheral blood samples. Haematologica. ISSN 1592-8721. 95 (2010) 1594-1598.
- ALLAN, Robert W., ANSARI-LARI, Mohammad Ali e JORDAN, Sandra - DRAQ5-Based, No-Lyse, No-Wash Bone Marrow Aspirate Evaluation by Flow Cytometry. American Journal of Clinical Pathology. ISSN 0002-9173. 129 (2008) 706-713.
- AMOYAL, Ilana, PRUS, Eugenia e FIBACH, Eitan - Vanadate. Elevates Fetal Hemoglobin in Human Erythroid Precursors by Inhibiting Cell Maturation. Experimental Biology and Medicine. ISSN 1535-3702. 232 (2007) 654-661.
- BAIN, Barbara J. e THOMPSON, E. Mary - Expression of CD117 by proerythroblasts. American Journal of Hematology. ISSN 1096-8652. 85 (2009) 123.
- BARBARA, Nadia Pece [*et.al.*] - Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor - beta superfamily. Journal of Biological Chemistry. ISSN 0021-9258. 274 (1999) 584-594.
- BARON, Margaret H. - Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. Experimental Hematology. ISSN 0301-472X. 31 (2003) 1160–1169.

- 
- BAUMGARTH, Nicole e ROEDERER, Mario - A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. Journal of Immunological Methods. ISSN 0022-1759. 243 (2000) 77-97.
  - BERTLES, John F. e BECK, William S. - Biochemical Aspects of Reticulocyte Maturation. The Journal of Biological Chemistry. ISSN 0021-9258. 237 (1962) 3770-3777.
  - BOEHM, Daniela, MURPHY, William G. e AL-RUBEAI, Mohamed - The potential of human peripheral blood derived CD34+ cells for ex vivo red blood cell production. Journal of Biotechnology. ISSN 0168-1656. 144 (2009) 127–134.
  - BORRIONE, Paolo [*et.al.*] - A peculiar pattern of expression of the transferrin receptor (CD71) by reticulocytes in patients given recombinant human erythropoietin (rHuEPO): a novel marker for abuse in sport? Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. ISSN 1724-6083. 21 (2007) 79-88.
  - BRATOSIN, Daniela [*et.al.*] - Improved Storage of Erythrocytes by Prior Leukodepletion: Flow Cytometric Evaluation of Stored Erythrocytes. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry). ISSN 0196-4763. 46 (2001) 351–356.
  - BROWN, Michael e WITTEWER, Carl - Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. Clinical Chemistry. ISSN 1530-8561. 46 (2000) 1221–1229.
  - BURKITT, H.G., YOUNG, B. e HEATH, J.W. - **Wheater's – Functional Histology: A Text and Colour Atlas**. 3ª ed. New York: Churchill Livingstone, 1993. 43, 44, 54, 57, 58 p. ISBN 0443046913.
  - CAVILL, Ivor - Erythropoiesis and iron. Best Practice & Research Clinical Haematology. ISSN 1521-6926. 15 (2002) 399-409.
  - CHEN, Ke [*et.al.*] - Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. ISSN 0027-8424. 106 (2009) 17413–17418.
  - CHO, Sarah K. [*et.al.*] - Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk11 precursors. Blood. ISSN 1528-0020. 98 (2001) 3635-3642.

- CHO, Sunghye e KIM, Eunhee - CD36: A multi-model target for acute stroke therapy. Journal of Neurochemistry. ISSN 1471-4159. 109 (2009) 126-132.
- CORBERAND, Joël X. - Reticulocyte analysis using flow cytometry. Hematology and Cell Therapy. ISSN 1279-8509. 38 (1996) 487-494.
- CORRONS, Joan Luís e BASCOMPTE, Jesepe Luís A. - **Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología**. 3ª ed. Barcelona: Masson, S.A., 2006. 219, 220 p. ISBN 8445815814.
- CRAFTS, Roger C. - Relationships of Hormones to the Utilization of Essential Nutrients in Erythropoiesis. The American Journal of Clinical Nutrition. ISSN 1938-3207. 3 (1955) 52-55.
- DÍAZ, Mario [*et.al.*] - Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical Engineering Journal. ISSN 1369-703X. 48 (2010) 385–407.
- DONGEN, J.J.M. [*et.al.*] - **EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes**. 14ª ed. Berlin: European Hematology Association Congress, 2009. 11p.
- DORN, Isabel [*et.al.*] - In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. Transfusion. ISSN 1537-2995. 48 (2008) 1122-1132.
- DOUAY, Luc - From Stem Cell to Red Blood Cells In Vitro: “The 12 Labors of Hercules”. Clinics in Laboratory Medicine. ISSN 0272-2712. 30 (2010) 391–403.
- ECKFELDT, Craig E. [*et.al.*] - Functional Analysis of Human Hematopoietic Stem Cell Gene Expression Using Zebrafish. Plos Biology. ISSN 1545-7885. 3 (2005) 1449-1458.
- FADOK, Valerie A. [*et.al.*] - CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). Journal of Immunology. ISSN 1550-6606. 161 (1998) 6250-6257.

- 
- FILIPPONE, Claudia [*et.al.*] - Erythroid Progenitor Cells Expanded from Peripheral Blood without Mobilization or Preselection: Molecular Characteristics and Functional Competence. Plos One. ISSN 1932-6203. 5 (2010) 1-8.
  - FRANCO, Robert S. - The measurement and importance of red cell survival. American Journal of Hematology. ISSN 1096-8652. 84 (2009) 109–114.
  - FRIED, Walter - Erythropoietin and erythropoiesis. Experimental Hematology. ISSN 0301-472X. 37 (2009) 1007–1015.
  - GENEL, Ferah [*et.al.*] - Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. Journal of Infection. ISSN 0163-4453. 60 (2010) 224-228.
  - GOLDBERG, Mark Alan - Erythropoiesis, Erythropoietin, and Iron Metabolism in Elective Surgery: Preoperative Strategies for Avoiding Allogeneic Blood Exposure. The American Journal of Surgery. ISSN 0002-9610. 170 (1995) 37- 43.
  - HAASE, Volker H. - Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. American Journal of Physiology - Renal Physiology. ISSN 1522-1466. 299 (2010) 1-13.
  - HANDY, Jonathan M. [*et.al.*] - HLA-DR expression and differential trafficking of monocyte subsets following low to intermediate risk surgery. Anaesthesia. ISSN 1365-2044. 65 (2010) 27-35.
  - HELLEBOSTAD, Marit, SANENGEN, T. e HALVORSEN, Sverre - Variations in erythropoiesis throughout a lifetime. Blut. ISSN 0006-5242. 61 (1990) 358-363.
  - HENRY, John Bernard - **Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods**, 18<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1991. 606-608 p. ISBN 0721622127.
  - HERTOOG, Jeroen - Protein-tyrosine phosphatases in development. Mechanisms of Development. ISSN 0925-4773. 85 (1999) 3-14.
  - HÉZARD, Nathalie [*et.al.*] - La Cytométrie en Flux dans un Laboratoire D'Hémostase. Revue Francophone des Laboratoires. ISSN 1773-035X. 37 (2007) 63-71.
  - HOFFBRAND, A.V., PETTIT, J.E. e MOSS, P.A.H. - **Hematologia**, 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 9, 22, 51, 52, 80 p. ISBN 8536301627.

- HOFFMAN, Ronald [*et.al.*] - **Hematology: Basic Principles and Practice**, 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2009. 5, 18, 19, 29 p. ISBN 9780443067136.
- HUBER, Tara L. - Dissecting hematopoietic differentiation using the embryonic stem cell differentiation model. The International Journal of Developmental Biology. ISSN 1696-3547. 54 (2010) 991-1002.
- ICHII, Michiko [*et.al.*] - Functional diversity of stem and progenitor cells with B-lymphopoietic potential. Immunological Reviews. ISSN 0105-2896. 237 (2010) 10-21.
- KALFA, Theodosia A. [*et.al.*] - Rac1 and Rac2 GTPases are necessary for early erythropoietic expansion in the bone marrow but not in the spleen. Haematologica. ISSN 1592-8721. 95 (2010) 27-35.
- KANAKOUDI-TSAKALIDOU, F. [*et.al.*] - Flow cytometric measurement of HLA-DR expression on circulating monocytes in healthy and sick neonates using monocyte negative selection. Clinical and Experimental Immunology. ISSN 1365-2249. 123 (2001) 402-407.
- KELLY, Mary [*et.al.*] - Evaluation of bone marrow examinations performed by an advanced nurse practitioner: An extended role within a haematology service. European Journal of Oncology Nursing. ISSN 1462-3889. 15 (2010) 335-338.
- KHANDELWAL, Sanjay e SAXENA, Rajiv Krishna - Assessment of survival of aging erythrocyte in circulation and attendant changes in size and CD147 expression by a novel two step biotinylation method. Experimental Gerontology. ISSN 0531-5565. 41 (2006) 855-861.
- KLINKEN, S. Peter - Red blood cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. ISSN 1357-2725. 34 (2002) 1513-1518.
- KO, Yoo-Joung [*et.al.*] - A Multi-Institutional Phase II Study of SU101, a Platelet-derived Growth Factor Receptor Inhibitor, for Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer. Clinical Cancer Research. ISSN 1557-3265. 7 (2001) 800-805.
- KOURY, Mark J. [*et.al.*] - In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. Blood. ISSN 1528-0020. 105 (2005) 2168-2174.

- 
- LANDUYT, Kristel B. [et.al.] - Flow cytometric characterization of freshly isolated and culture expanded human synovial cell populations in patients with chronic arthritis. Arthritis Research & Therapy. ISSN 1478-6362. 12 (2010) 1-14.
  - LAYRISSE, Miguel [et.al.] - Requirements of nutrients which participate in erythropoiesis. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. ISSN 0004-0622. 38 (1988) 622-646.
  - LÉCUYER, Eric e HOANG, Trang - SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. Experimental Hematology. ISSN 0301-472X 32 (2004) 11-24.
  - LEE, G. Richard [et.al.] - **Wintrobe's – Clinical Hematology**, 9ª ed. Philadelphia: Lea&Febiger, 1993. 62, 63, 66, 101, 102, 142 p. ISBN 0812111885.
  - LEVACHER, Maryse [et.al.] - T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT. Comparison with CD4+ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. Clinical & Experimental Immunology. ISSN 0009-9104. 81 (1990) 177-182.
  - LEWIS, S. Mitchell, BAIN, Barbara J. e BATES, Imelda - **Dacie y Lewis - Hematología práctica**, 10ª ed. Madrid: Elsevier España S.A., 2008. 53 p. ISBN 9788480862295.
  - LIU, Xiao-Ling [et.al.] - Differential gene expression in human hematopoietic stem cells specified toward erythroid, megakaryocytic, and granulocytic lineage. Journal of Leukocyte Biology. ISSN 0741-5400. 82 (2007) 986-1002.
  - LOKEN, Michael R. [et.al.] - Flow cytometric analysis of human bone marrow: Normal erythroid development. Blood. ISSN 1528-0020. 69 (1987) 255-263.
  - LU, Shi-Jiang [et.al.] - Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. Blood. ISSN 1528-0020. 112 (2008) 4475- 4484.
  - MA, Feng [et.al.] - Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. ISSN 1091-6490. 105 (2008) 13087–13092.
  - MARIN, Virna [et.al.] - Cytokine induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. Haematologica. ISSN 1592-8721. 95 (2010) 2144-2152.

- MARRONE, Babetta L. - Flow Cytometry: A Multipurpose Technology for a Wide Spectrum of Global Biosecurity Applications. Journal of the Association for Laboratory Automation. ISSN 1535-5535. 14 (2009) 148-156.
- MARSEE, Derek K., PINKUS, Geraldine S. e YU, Hongbo - An Effective Marker for Erythroid Precursors in Bone Marrow Biopsy Specimens. American Journal of Clinical Pathology. ISSN 0002-9173. 134 (2010) 429-435.
- MARTIN, Kathleen [et.al.] - **Flow Citometry – Educational Guide**, 2<sup>a</sup> ed. California: DAKO, 2006. 1, 19 p.
- MCGRATH, Kathleen E. e PALIS, James - Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. Experimental Hematology. ISSN 0301-472X. 33 (2005) 1021–1028.
- MENON, Madhu P. [et.al.] - Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. The Journal of Clinical Investigation. ISSN 1558-8238. 116 (2006) 683-694.
- MOLINEUX, Graham, FOOTE MaryAnn e ELLIOTT, Steven G. - **Erythropoietins and Erythropoiesis - Molecular, Cellular, Preclinical, and Clinical Biology**. Switzerland: Birkhäuser Verlag A.G, 2006. 3 p. ISBN 3764375434.
- MORTENSEN, Monika [et.al.] - Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences. ISSN 1091-6490 107 (2009) 832–837.
- MURRE, Comelis - Defining the Pathways of Early Adult Hematopoiesis. Cell Stem Cell. ISSN 1934-5909. 1 (2007) 357-358.
- NISHIUCHI, Takamasa [et.al.] - Scavenger receptor class BI mediates the anti-apoptotic effect of erythropoietin. Annals of Medicine. ISSN 1365-2060. 42 (2010) 151-60.
- NOVELLI, Marco [et.al.] - DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. Histopathology. ISSN 1365-2559. 57 (2010) 259–270.
- OERTEL, Joachim [et.al.] - Immunotyping of blasts in human bone marrow. Annals of Hematology. ISSN 0939-5555. 72 (1996) 125-129.

- ORFAO, Alberto e BUITRAGO, José Manuel González - **La Citometría de Flujo en el Laboratorio Clínico**. Barcelona: Talleres Gráficos Vigor, S.A., 1995. 11, 13-16 p. ISBN 8492096713.
- ORKIN, Stuart H. e ZON, Leonard I. - Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell. ISSN 0092-8674. 132 (2008) 631–644.
- PAHAL, Gurmit S. [*et.al.*] - Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks' gestation. American Journal of Obstetrics and Gynecology. ISSN 0002-9378. 183 (2000) 1029-1034.
- PIVA, Elisa [*et.al.*] - Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. ISSN 1437-4331. 48 (2010) 1-12.
- PORTA, Matteo Giovanni Della [*et.al.*] - Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. Leukemia. ISSN 0887-6924. 20 (2006) 549-555.
- PRICE, Elizabeth A. - Aging and erythropoiesis: Current state of knowledge. Blood Cells, Molecules, and Diseases. ISSN 1079-9796. 41 (2008) 158-165.
- ROGERS, Heather M. [*et.al.*] - Hypoxia Alters Progression of the Erythroid Program. Experimental Hematology. ISSN 1825-151X. 36 (2008) 17-27.
- ROITT, Ivan, BROSTOFF, Jonathan e MALE, David - **Immunology**, 4<sup>a</sup> ed. Barcelona: Mosby, 1996. 5.5. cap. ISBN 0723421781.
- SACKSTEIN, R. - Expression of an L-selectin ligand on hematopoietic progenitor cells. Acta Haematologica. ISSN 1421-9662. 97 (1997) 22-28.
- SANS-SABRAFAN, J. [*et.al.*] - **Hematología Clínica**, 4<sup>a</sup> ed. Barcelona: Harcourt, 2001. 10, 11, 66, 79-81, 87, 88 p. ISBN 9788481744859.
- SATO, Shinji [*et.al.*] - Enhanced expression of CD71, transferrin receptor, on immature reticulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. International Journal of Laboratory Hematology. ISSN 1751-553X. 32 (2010) 137-143.
- SERKE, Stefan e HUHN, Dieter - Identification of CD71 (transferrin receptor) expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cytometry (MP-FCM): correlation to the quantitation of reticulocytes as determined by conventional

microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. British Journal of Haematology. ISSN 1365-2141. 81 (1992) 432-439.

• SILVERSTEIN, Roy L. e FEBBRAIO, Maria - CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. Science Signaling. ISSN 1525-8882. 2 (2002) re3.

• TERSTAPPEN, Leon W.M.M. [*et.al.*] - Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. Journal of Leukocyte Biology. ISSN 1938-3673. 48 (1990) 138-148.

• TSIFTSOGLU, Asterios S., VIZIRIANAKIS, Ioannis S. e STROUBOULIS, John - Erythropoiesis: Model Systems, Molecular Regulators, and Developmental Programs. IUBMB Life. ISSN 1521-6551. 61 (2009) 800-830.

• UEDA, Takahiro [*et.al.*] - Hematopoietic Repopulating Ability of Cord Blood CD34+ Cells in NOD/Shi-*scid* Mice. Stem Cells. ISSN 1066-5099. 18 (2000) 204-213.

• VLASKI, Marija [*et.al.*] - Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. Experimental Hematology. ISSN 0301-472X. 37 (2009) 573-584.

• WAUGH, Richard E. [*et.al.*] - Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. Blood. ISSN 1528-0020. 79 (1992) 1351-1358.

• WESTERS, Theresia M. [*et.al.*] - Implementation of flow cytometry in the diagnostic work-up of myelodysplastic syndromes in a multicenter approach: Report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. Leukemia Research. ISSN 0145-2126. 36 (2011) 422-430.

• WOGNUM, A.W., DE JONG, M.O. e WAGEMAKER, G. - Differential Expression of Receptors for Hemopoietic Growth Factors on Subsets of CD34+ Hemopoietic Cells. Leukemia and Lymphoma. ISSN 1029-2403. 24 (1996) 11-25.

• WOJDA, Urszula, NOEL, Pierre e MILLER, Jeffery Lynn - Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. Blood. ISSN 1528-0020. 99 (2002) 3005-3013.

- ZERMATI, Yael [*et.al.*] - Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. Experimental Hematology. ISSN 0301-472X. 28 (2000) 885-894.

## Anexos

**Tabela I: Teste ANOVA.**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	465,597	2	232,798	7,820	,003
Within Groups	684,686	23	29,769		
Total	1150,283	25			

**Tabela II: Teste Tukey HSD.**

(I) Tipo	(J) Tipo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normocelular	Hipocelular	5,24590	2,69284	,148	-1,4979	11,9897
	Hipercelular	-4,71333	3,03549	,286	-12,3152	2,8886
Hipocelular	Normocelular	-5,24590	2,69284	,148	-11,9897	1,4979
	Hipercelular	-9,95923	2,55786	,002	-16,3650	-3,5535
Hipercelular	Normocelular	4,71333	3,03549	,286	-2,8886	12,3152
	Hipocelular	9,95923	2,55786	,002	3,5535	16,3650

**Tabela III: Teste Tukey HSD.**

Tipo	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Hipocelular	13	8,3308	
Normocelular	6	13,5767	13,5767
Hipercelular	7		18,2900
Sig.		,163	,226

**Tabela IV: Teste ANOVA.**

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	539,629	2	269,815	1,902	,173
Within Groups	3121,535	22	141,888		
Total	3661,165	24			

**Tabela V:** Análise da correlação.

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,716	,513	,492	4,88190

**Tabela VI:** Modelo da regressão linear.

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	4,779	1,834		2,605	,016
Contagem_Manual	,397	,081	,716	4,920	,000

**Tabela VII:** Análise da correlação sem valor aberrante (*outlier*).

M Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,906	,821	,813	3,00113

**Tabela VIII:** Modelo da regressão linear sem valor aberrante (*outlier*).

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	2,165	1,203		1,800	,086
Contagem Manual	,579	,058	,906	10,060	,000

**Tabela IX:** Análise da correlação.

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,266	,071	,028	,27267

**Tabela X:** Análise da correlação.

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,858	,736	,724	,57695

**Tabela XI:** Modelo da regressão linear.

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	-,190	,213		-,890	,383
Total_Soma_est2_total	1,687	,216	,858	7,826	,000

**Tabela XII:** Análise da correlação.

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,827	,685	,670	3,10237

**Tabela XIII:** Modelo da regressão linear.

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	,766	1,081		,709	,486
Total_Soma_est3_total	1,440	,208	,827	6,912	,000

**Tabela XIV:** Análise da correlação.

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,782	,611	,593	3,13253

**Tabela XV:** Modelo da regressão linear.

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	2,625	1,372		1,913	,069
Total_Soma_est4_total	,956	,163	,782	5,877	,000

**Tabela XVI: Teste Tukey HSD (FSC).**

Estadio	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4	26	226,937308	358,324615	497,701923	547,905769
3	26				
2	26				
1	26				
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

**Tabela XVII: Teste Tukey HSD (SSC).**

Estadio	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4	26	88,476923	146,390385	172,279615	205,651538
3	26				
2	26				
1	26				
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

**Tabela XVIII: Teste Levene (CD71).**

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
CD71	Equal variances assumed	,130	,719	1,948	102	,054	24,809	12,734	-,448	50,066
	Equal variances not assumed			1,974	96,868	,051	24,809	12,568	-,135	49,754

**Tabela XIX: Teste Tukey HSD (CD71).**

Estádio	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	26	61,044231	126,541923	189,653462
4	26			
2	26		144,407692	
3	26			
<b>Sig.</b>		1,000	,506	1,000

**Tabela XX: Teste Tukey HSD (CD36).**

Estádio	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	26	382,460385	959,051154
4	26		
3	26	417,375769	
2	26	995,318846	
<b>Sig.</b>		,933	,926

**Tabela XXI: Teste Tukey HSD (CD34).**

Estádio	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
4	26	2,854615	80,346154	
3	26			
2	26			4,890769
1	26			
<b>Sig.</b>		,897	1,000	

**Tabela XXII: Teste Tukey HSD (CD45).**

Estádio	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	26	2,445769	9,242692	27,542308
3	26			
2	26	4,077692		
1	26			
<b>Sig.</b>		,420	1,000	1,000

**Tabela XXIII:** Teste Tukey HSD (HLA-DR).

Estádio	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	26	3,316923	
3	26	6,260385	
2	26	15,098462	
1	26		137,829231
Sig.		,808	1,000

**Tabela XXIV:** Teste Tukey HSD (CD33).

Estádio	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4	26	3,375385	
3	26	5,571923	
2	26	6,938846	
1	26		18,865385
Sig.		,269	1,000

**Tabela XXV:** Teste Tukey HSD (CD117).

Estadio	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	26	2,034615		
3	26	2,894231		
2	26		110,361538	
1	26			366,245769
Sig.		1,000	1,000	1,000

**Tabela XXVI:** Teste Tukey HSD (CD105).

Estadio	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4	26	4,241154			
3	26		42,980385		
1	26			261,620000	
2	26				325,972308
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000