

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE – UFCSPA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Renata Bartolomeu Staub

**Avaliação da expressão de CD200 e
CD43 em linfoproliferações de células T**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2022

Renata Bartolomeu Staub

Avaliação da expressão de CD200 e CD43 em linfoproliferações de células T

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Ciências da Saúde de
Porto Alegre como requisito para a
obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra Liane Nanci Rotta

Coorientadora: Dra Natália Aydos Marcondes

Porto Alegre

2021

Catálogo na Publicação

Staub, Renata Bartolomeu

Avaliação da expressão de CD200 e CD43 em
linfoproliferações de células T / Renata Bartolomeu
Staub. -- 2022.

45 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Orientador(a): Dra Liane Nanci Rotta ;
coorientador(a): Dra Natália Aydos Marcondes.

1. CD200. 2. CD43. 3. Linfoproliferações T. 4.
Linfoma. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À professora Liane, pela orientação durante o período da graduação que, felizmente, se estendeu para a pós-graduação. Obrigada por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. És mais que uma orientadora, és mestre e amiga.

À Natália, que ensinou e auxiliou em tantos momentos com sua experiência e grande expertise. Ao Dr. Flavo Fernandes e ao Dr. Gustavo Faulhaber por terem confiado a mim o trabalho iniciado em seu laboratório, me dando condições excelentes de desenvolver esse trabalho. À equipe do Laboratório Zanol, por todos os momentos que tivemos e que foram de grande aprendizado.

À minha família e meu companheiro por apoiarem e compreenderem o meu isolamento em inúmeras vezes nesses dois anos que passaram. Mãe e pai, por todas as lições de amor, dedicação e compreensão. Sinto-me privilegiada ter pais tão especiais. Bruno, por todo amor, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigada por permanecer ao meu lado.

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por oferecerem formação de qualidade, científica e gratuita. Em tempos de negacionismo e pandemia, é especial fazer parte de um grupo tão esclarecido que preza levar informações de qualidade para a população.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE

Lista de abreviações	6
Lista de tabelas	8
Lista de figuras	9
Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
1.1 CD200	15
1.2 CD43	20
2. Justificativa	25
3. Referências	26
4. Objetivos	35
4.1. <i>Objetivo principal</i>	35
4.2. <i>Objetivos específicos</i>	35
5. Artigos científicos	36
5.1. <i>Artigo original</i>	36
5.2. <i>Artigo de revisão</i>	54
6. Conclusão	59
Anexos	60
Anexo A: Aprovação do CEP	60

Lista de abreviações

AML – *Acute Myeloid Leukemia*

APC – *Antigen Presenting Cells*

ATL – *Adult T-cell lymphoma*

CD – *Cluster of differentiation*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CLL – *Chronic Lymphocytic Leukemia*

DPC – *Distal Pole Complex*

DRM – Doença residual mínima

EBV – *Epstein Barr virus*

ERM – *Ezrin, Radixin and Moesin*

ETP-ALL – *Early-T precursor cell acute lymphoblastic leukemia*

FSC – *Forward scatter*

Hb – *Hemoglobin*

HSC – *Hematopoietic stem cells*

HTLV-1 – Vírus T linfotrópico humano do tipo 1

ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFN- γ – Interferon gama

IL-2 – Interleucina 2

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LCM – Linfoma de Células do Manto

LLA-B – Leucemia/Linfoma Linfoblástico de Células B

LLA-T – Leucemia/Linfoma Linfoblástico de Células T

LLC – Leucemia Linfocítica Crônica

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LNH – Linfoma não-Hodgkin

LSC – *Leukemic Stem Cells*

MCP – Mieloma de Células Plasmáticas

MF/SS – *Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome*

MFI – *Median fluorescence intensity*

MGUS – *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MoAb – *Monoclonal antibody*

MRD – *Minimal residual disease*
MRC - Mannose Receptor C-Type 1
mRNA – RNA mensageiro
NHL – *Non-Hodgkin Lymphoma*
NK – *Natural Killer*
NK-ALL – *Natural killer cell acute lymphoblastic leukemia*
OMS – Organização Mundial da Saúde
OS – *Overall survival*
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PCM – *Plasma Cell Myeloma*
PKC – *Protein kinase C*
PTCL-NOS – *Peripheral T-cell lymphoma – not otherwise specified*
SG – Sobrevida global
SLE – Sobrevida Livre de Eventos
SLP – Sobrevida Livre de Progressão
SMD – Síndrome Mielodisplásica
SSC – *Side Scatter*
T-ALL – *T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*
TCF – *T-cell factor*
TCR- $\alpha\beta$ – *T cell receptor alpha/beta*
TCR- $\gamma\delta$ – *T cell receptor gamma/delta*
T-LGL – *T-cell large granular lymphoma*
TNF- α – *Tumor necrosis fator alpha*
T-PLL – *T-cell prolymphocytic leukemia*
Treg – Células T reguladoras
WBC – *White Blood Cells*
WHO – *World Health Organization*

Lista de tabelas

Table 1: T-cell disorders demographic and general sample characteristics.....	48
Table 2: General sample characteristics in each disease.....	49

Lista de figuras

Figure 1: CD200 expression related to (A) type of disorder, (B) leucocytes count, (C) blasts (%), (D) hemoglobin level and (E) platelets count.....	50
Figure 2: CD200 MFI in precursor lymphoid neoplasms	51

Resumo

As neoplasias de células T são tumores clonais de células T em vários estágios de maturação. O CD200 (ou OX-2) é uma glicoproteína transmembrana expressa em células B, células mieloides, plaquetas e subtipos de células T em linfonodos, cuja expressão em neoplasias parece estar associada a um pior prognóstico. O CD43 é uma proteína transmembrana expressa na superfície da maior parte das células hematopoiéticas (incluindo linfócitos T), em células neoplásicas de leucemias e neoplasias sólidas, cuja expressão parece estar associada à tumorigênese, particularmente de neoplasias hematológicas. O CD200 não é normalmente expresso em células T presentes no sangue periférico e na medula óssea, de modo que sua expressão caracterizaria um imunofenótipo aberrante nesses casos. O CD43, por outro lado, é expresso normalmente nessas células, porém sua expressão pode caracterizar um pior prognóstico em um processo neoplásico e a ausência de expressão pode ser útil para avaliação de doença residual. Por meio de um estudo transversal, avaliamos a expressão de CD200 e CD43 em células de doenças linfoproliferativas de linhagem T utilizando a técnica de citometria de fluxo. Foram utilizadas 34 amostras de medula óssea e 18 amostras de sangue periférico obtidas por conveniência num laboratório especializado em diagnóstico de doenças hematológicas de Porto Alegre (Brasil) entre 2017 e 2020. Em 52 amostras de neoplasias de células T analisadas, CD200 teve expressão detectada em 20 delas. Destas, 84,2% (n = 16; 20) tiveram diagnóstico de neoplasias linfoides precursoras (P = 0,01). CD43 foi expresso em 31 amostras e 93,1% (n = 27; 31) apresentaram diagnóstico de neoplasias maduras (P = 0,013). Amostras positivas para CD200 também apresentaram dados laboratoriais como leucocitose, anemia e plaquetopenia, enquanto amostras positivas para CD43 apresentaram, principalmente, leucocitose. A expressão de CD200 foi expresso mais comumente em leucemia/linfoma linfoblástico de células T (LLA-T) e leucemia linfóide de células T precursoras, enquanto CD43 mostrou ser um bom marcador para as neoplasias de células T maduras mais comuns, como Linfoma periférico de células T, sem outra especificação, Linfoma de células T grandes e granulares e Linfoma de células T do adulto.

Palavras-chave: CD200, CD43, linfoproliferações T, linfoma.

Abstract

T cell neoplasms are clonal T cell tumors in various stages of maturation. CD200 (or OX-2) is a transmembrane glycoprotein expressed on B cells, myeloid cells, platelets and T cell subtypes in lymph nodes, whose expression in neoplasms seems to be associated with a worse prognosis. CD43 is a transmembrane protein expressed on the surface of most hematopoietic cells (including T lymphocytes), in neoplastic leukemia cells and solid neoplasms, whose expression seems to be associated with tumorigenesis, particularly in hematologic neoplasms. CD200 is not normally expressed on T cells present in peripheral blood and bone marrow, so its expression would characterize an aberrant immunophenotype in these cases. CD43, on the other hand, is normally expressed in these cells, but its expression can characterize a worse prognosis in a neoplastic process and the absence of expression can be useful for the evaluation of residual disease. Through a cross-sectional study, we evaluated the expression of CD200 and CD43 in T-lineage lymphoproliferative disease cells using the flow cytometry technique. We used 34 samples of bone marrow and 18 samples of peripheral blood obtained for convenience in a laboratory specialized in the diagnosis of hematological diseases in Porto Alegre (Brazil) between 2017 and 2020. In 52 samples of T-cell neoplasms analyzed, CD200 was detected in 20 of them. Of these, 84.2% (n = 16; 20) were diagnosed with precursor lymphoid neoplasms (P = 0.01). CD43 was expressed in 31 samples and 93.1% (n = 27; 31) of these were diagnosed with mature neoplasms (P = 0.013). CD200 positive samples also presented laboratory data such as leukocytosis, anemia and thrombocytopenia, while CD43 positive samples presented mainly leukocytosis. CD200 expression was most commonly expressed in T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and precursor T-cell lymphoid leukemia, while CD43 was shown to be a good marker for the most common mature T-cell neoplasms, such as T cells, not otherwise specified, Large and granular T cell lymphoma and Adult T cell lymphoma.

Key terms: CD200, CD43, T-cell lymphoproliferations, lymphoma.

1. Introdução

A classificação das neoplasias hematológicas é baseada na avaliação de parâmetros clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos, definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A correta identificação e classificação das células neoplásicas é necessária para estabelecer o diagnóstico e consequente indicação do tratamento. A maioria das neoplasias hematológicas possui um imunofenótipo característico que pode ser identificado laboratorialmente, o que é muito útil para o diagnóstico, quando associado à história clínica do paciente ¹.

Os linfócitos T, B e NK possuem a mesma célula progenitora, sendo os estímulos que essas células recebem ao longo da sua maturação que definem em qual subtipo serão diferenciadas. Ao contrário dos linfócitos B, os precursores T deixam a medula óssea e entram no timo, onde continuam com o seu programa de diferenciação que inclui o rearranjo dos genes responsáveis pelos receptores de células T (TcR), que ocorre de maneira similar ao das imunoglobulinas, como será descrito. No timo, esses precursores CD7+ sofrem um processo de maturação, que é extremamente complexo e resulta na formação de um repertório de células T funcionais. À semelhança do que ocorre com os linfócitos B, os linfócitos T adquirem, mantêm ou perdem marcadores como o CD2, CD1, CD5, CD4, CD8, CD3, que permitem caracterizar diferentes etapas de maturação.

Neste esquema, o precursor CD34+/CD7+ proveniente da medula óssea ou fígado fetal migra para a camada subcapsular do córtex tímico e rapidamente expressa os marcadores CD2 e CD5. Esse precursor pró-T pode se diferenciar em duas linhagens diferentes. A maioria (95%) se diferencia em células pré-T corticais que expressam CD1 e, simultaneamente, CD4 e CD8, proteínas TcR- $\alpha\beta$ citoplasmáticas e, possivelmente, níveis baixos de CD3/TcR- $\alpha\beta$ na membrana. Esses timócitos, na camada medular do timo, formam duas subpopulações: a mais numerosa CD4+CD8- e a CD4-CD8+, ambas expressando CD3/TcR- $\alpha\beta$. Alternativamente, o precursor pró-T CD34+CD7+, CD2+, CD5+ pode se diferenciar em células pré-T CD4-CD8- (5%) que expressam inicialmente TcR- $\gamma\delta$ citoplasmático e, posteriormente, CD3 e TcR- $\gamma\delta$ na membrana. A seguir, esses três tipos de timócitos maduros (T- $\alpha\beta$ CD4 ou T- $\alpha\beta$ CD8 e T- $\gamma\delta$) migram para o sangue e para os órgãos linfoides secundários.

O TcR- $\alpha\beta$ é expresso em 90 a 95% dos linfócitos circulantes, enquanto o TcR- $\gamma\delta$ aparece em 5 a 10%. O TcR coexiste na membrana em íntima associação com o CD3 e, quando encontra seu antígeno específico, emite um sinal para o interior da célula desencadeando uma sequência de ativação de mecanismos que culmina com a proliferação dos linfócitos. A passagem dos precursores T pelo timo tem duas funções: a produção de células T maduras e a seleção de clones não autorreativos. Ambas dependem da participação de células não linfoides do timo, que são as epiteliais, dendríticas e macrófagos, e constituem o microambiente necessário para a diferenciação dos timócitos.

Nesse processo existe uma seleção positiva de linfócitos T tolerantes, capazes de interagir com produtos do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) das células do próprio indivíduo, e a seleção negativa de clones autorreativos com essas proteínas do MHC, que são eliminados, e constituem a maioria das células. É importante salientar que menos de 1% dos timócitos migram para a periferia, sendo a maioria destruída dentro do próprio órgão. Os linfócitos T que emigram do timo e colonizam os órgãos linfoides secundários são chamados de células virgens. Após o contato com os antígenos, os linfócitos T participam da resposta imunológica como linfócitos T-auxiliares ou T-citóticos e, terminada a resposta, a maioria morre, mas alguns sobrevivem e constituem os linfócitos de memória, que têm vida longa.

O timo atinge o tamanho máximo em relação ao peso corporal no recém-nascido, aumenta em peso até próximo dos vinte anos, quando é constituído por mais de 80% de tecido linfoide. A partir dessa idade, regride progressivamente e, aos quarenta anos, é constituído predominantemente de tecido adiposo, com menos de 5% de tecido linfoide. Os corpúsculos de Hassall diminuem em número, mas aumentam em tamanho, e as células epiteliais também diminuem em número, acompanhando os timócitos. Existem dúvidas sobre até que idade o timo mantém a sua capacidade de liberação de células maduras para a periferia e qual a sua relevância para a imunidade. Estudos realizados em crianças timectomizadas (durante cirurgias torácicas) demonstram uma diminuição de linfócitos T no sangue periférico, porém sem qualquer consequência clínica. Além disso, uma pesquisa recente revelou que o timo é capaz de liberar pequena quantidade de linfócitos T de novo para a periferia, mesmo em indivíduos com mais de 65 anos idade, quando o seu tamanho é estimado em 1/50 do timo do recém-nascido (Zago et al., 2013).

Entre o grupo de doenças linfoproliferativas da linhagem T estão incluídas a leucemia/linfoma linfoblástico T (LLA-T) e linfoproliferações maduras de células T ¹. As neoplasias originadas por esses tipos de células representam apenas 12% de todos os Linfoma não-Hodgkin (LNH) ¹. O número de casos novos de linfoma não Hodgkin esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 6.580 casos em homens e de 5.450 em mulheres ². Esses valores correspondem a um risco estimado de 6,31 casos novos a cada 100 mil homens e de 5,07 para cada 100 mil mulheres ². Com base no Registro Norte-Americano de Câncer, entre 1997 e 2006, as neoplasias de células B tiveram uma incidência de 27,9 / 1.000 habitantes, enquanto as neoplasias de células T tiveram uma incidência de 2,1 / 1.000 habitantes ³. Essas neoplasias têm maior incidência em populações asiáticas, latino-americanas e indígenas, provavelmente devido às ligações genéticas entre essas populações ⁴.

As patologias das células T têm curso clínico variável e podem ser relativamente indolentes ou altamente agressivas ⁵. A classificação dos linfomas periféricos de células T permanece um desafio, sendo 30% a 50% dos casos considerados não classificáveis, portanto, esses pacientes geralmente apresentam um prognóstico ruim com o uso da quimioterapia padrão ⁶. Agentes infecciosos também têm contribuído para o desenvolvimento de vários tipos de neoplasias de células B, T e NK, como o vírus Epstein-Barr (EBV) e o vírus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1) ¹.

Para o diagnóstico de linfoproliferações da linhagem T, a identificação de células aberrantes baseia-se não apenas na distribuição numérica absoluta ou relativa entre o total de células presentes na amostra, mas principalmente na identificação de perfis imunofenotípicos específicos e considerados anormais, que podem ser diferenciados de padrões normais ou reativos, bem como a identificação de clonalidade ^{8,9}. Em 2017, a OMS publicou uma atualização da Classificação de Tumores de Tecidos Hematopoiéticos e Linfóides, na qual são apresentados os melhores métodos pelos quais distúrbios hematológicos e neoplasias podem ser diagnosticados, sendo que a citometria de fluxo apresenta um papel central na classificação e no correto diagnóstico ¹. Essa classificação será usada para definir as neoplasias incluídas neste trabalho.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método de análise citológica que permite a identificação, caracterização, contagem e separação de células em

suspensão. Consiste na marcação de epítomos na superfície (CDs ou diferenciação de cluster), citoplasma e núcleo celular ^{10,11}. A imunofenotipagem é o procedimento padrão para o diagnóstico de neoplasias hematopoiéticas e é útil na detecção e monitoramento de doença residual mínima (DRM) ^{1,12}.

1.1 CD200

CD200 (OX-2) é uma glicoproteína transmembrana tipo I de cerca de 45 kDa codificada pelo gene MRC. É naturalmente expressa em plaquetas, células endoteliais, em células do sistema nervoso central e periférico, em células neoplásicas de uma variedade de tumores sólidos, células B, subconjuntos de células T e células mieloides, onde seu papel é proteger locais imunoprivilegiados e promover tolerância periférica ¹³. O CD200 não tem sinalização intracelular conhecida, mas induz imunossupressão por ligação com CD200R, um receptor de inibição da superfamília de imunoglobulinas. O CD200R é expresso principalmente em células mieloides e subconjuntos de células T, promovendo efeito supressor na resposta imunomediada de células T ¹⁴ e favorecendo o crescimento tumoral ¹⁵.

Memarian et al. (2013) mostrou que atividades funcionais de ligação CD200-CD200R também estão presentes em células saudáveis, mas elas estão exacerbadas nas células tumorais, o que gera um ambiente imunossupressor e, portanto, efeitos negativos nas respostas imunológicas, assim contribuindo para um risco aumentado de recorrência e pior progressão. Eles também mostraram que o CD200, mas não CD200R, teve expressão elevada em células progenitoras mieloides de leucemia mieloides aguda (LMA), em comparação com sujeitos saudáveis ¹⁶.

O CD200 é expresso em várias neoplasias hematopoiéticas, incluindo LMA e algumas doenças derivadas de células B, como a leucemia linfocítica crônica (LLC) e a tricoleucemia. Por estar naturalmente presente nas células B, a expressão do CD200 nessas doenças é considerada significativa quando na sua ausência, como no imunofenótipo característico do linfoma de células do manto (LCM). Sabe-se que o gene que codifica para CD200 está presente no cromossomo 3q13.2. O ganho do cromossomo 3 ou 3q já foi observado em pacientes com LLC e naqueles com linfoma de células B da zona marginal, sugerindo que a supraregulação pode, em alguns casos, ser devido à duplicação de CD200 na célula B ¹⁷.

Estudos sugerem que a expressão de CD200 em doenças plasmocitárias, leucemias agudas, carcinomas (carcinoma de cabeça e pescoço, carcinoma renal e carcinoma de cólon) e melanomas está associada a um pior prognóstico, provavelmente devido ao seu mecanismo imunossupressor ^{18–20}. Em um modelo animal, verificou-se que as neoplasias positivas para CD200 inibiram a capacidade dos linfócitos de erradicar as células tumorais ²¹.

O CD200 é expresso numa minoria de casos de neoplasias de células T e pode ser útil para seu diagnóstico, avaliação e tratamento ¹⁴, não sendo normalmente expresso em células T presentes no sangue periférico e na medula óssea, então sua expressão caracterizaria um imunofenótipo aberrante. Até o momento, nenhum estudo evidenciou a presença de CD200 em linfócitos T do sangue periférico ou da medula óssea e poucos estudos avaliaram a expressão de CD200 em neoplasias de células T. No entanto, parece ser um bom marcador imunofenotípico para linfoma de células T angioimunoblástico ¹⁴.

Alguns estudos propuseram que a expressão de CD200 em pacientes com neoplasias mieloides implicam em uma piora do prognóstico e até mesmo na diminuição da sobrevida global (SG). Tonks et al. (2007) descreveram que a expressão de CD200 pode ter valor prognóstico em pacientes com LMA, uma vez que pode haver uma associação entre a expressão de CD200 e pior desfecho em pacientes com LMA com anormalidades genéticas, tais como t(8; 21) (RUNX1-RUNX1T1) e inv(16) (CBFB-MYH11), ambos ligados à remissão completa e resultado favorável ²². Tonks et al. (2007b), em seu estudo seguinte, mostraram que essa piora ocorre, possivelmente, por causa da imunossupressão e inibição da depuração imunológica da doença residual. Assim, é possível que a expressão de CD200 em doenças de bom curso clínico pode representar um pior desfecho por meio da evasão imune pelas células neoplásicas ¹⁹. Outros estudos também mostraram que pacientes com LMA com alta expressão de CD200 tinham SG inferior, em comparação com aqueles pacientes com baixa expressão de CD200 ^{23,24}.

Chen et al. (2017) e Aref et al. (2020) mostraram que em síndromes mielodisplásicas (SMD), um grupo de doenças com proliferação clonal de células hematopoéticas displásicas da medula óssea, os pacientes com alto nível de expressão de CD200 tiveram um SG mais curta e uma alta transformação leucêmica do que aqueles com baixa expressão ^{24,25}. O grupo de Tiribelli et al. (2017) observou

que os pacientes com alta expressão de CD200 são menos propensos a manter a remissão completa e podem ter um pior desfecho, com sobrevida máxima de 3 anos após o diagnóstico. Eles também identificaram uma maior frequência da expressão de CD200 em pacientes com neoplasias positivas para CD34, e pacientes com forte expressão de CD200 tiveram uma probabilidade significativamente menor da SG em comparação com aqueles com baixa expressão de CD200 ²⁶. Adicionalmente, Oda et al. (2017) mostraram que a expressão de CD200 é aumentada em uma pequena população de células-tronco de leucemia (LSC) com alta capacidade proliferativa; LSC com CD200-positivo iniciam e mantêm a doença e são resistentes à radioterapia e quimioterapia ²⁷.

Em pacientes com LMA que apresenta forte expressão de CD200 observou-se uma redução na atividade citotóxica das células T de memória, quando comparado a pacientes com baixa expressão de CD200. Da mesma forma, as células T de memória CD4-positivas, que produzem TNF- α , IL-2 e IFN- γ , são reduzidas a quase 50% nesses pacientes ²⁸. Indivíduos com a baixa expressão de CD200 nas células leucêmicas tiveram uma resposta maior ao IFN- γ , mesmo quando comparados a pacientes saudáveis, sugerindo que esta citocina pode desempenhar um papel na LMA, que é atenuada por CD200 ²⁸. Também foi demonstrado que não houve influência da expressão de CD200 na frequência de células T CD3-positivas, ou seja, não há diminuição geral de células T, apenas inibição destas em pacientes com forte expressão de CD200 ²⁸. Além disso, se evidenciou que esta glicoproteína está associada com supressão de células T de memória Th1 por um mecanismo específico de antígeno microbiano comum, sugerindo que a expressão de CD200 pode exacerbar a suscetibilidade desses pacientes a coinfeções, o que acaba dificultando a recuperação e causando pior resultado ²⁹.

Gorczynski et al. (2005) mostraram que o CD200 tem o potencial de induzir a formação de células T reguladoras (Treg) (CD4+ CD25+ FoxP3+), um subgrupo de células T imunossupressoras que são associadas a pior prognóstico em pacientes com LMA ³⁰. Coles et al. (2012) corroboram que a expressão de CD200 tem o potencial de induzir a formação de células T reguladoras (CD4+ CD25+ FoxP3+). Em concordância, Zahran et al. (2018) mostraram que pacientes com super-expressão de CD200 em células leucêmicas têm um nível elevado de Tregs.

Coles et al. (2015) mostrou que a ligação CD200-CD200R e PD-L1:PD-1 em células T podem produzir um efeito ainda mais imunossupressor em linfócitos T CD8-positivos quando expresso em células leucêmicas, o que tem um significado importante para LMA que geralmente têm expressão de CD200 e PD-L1 ³¹. Além disso, as células de LMA exercem efeitos imunossupressores diretos em células *natural killer* (NK) mediados por ligantes imunossupressores ou por fatores solúveis e induzem os linfócitos T reguladores (Treg) que enfraquecem as respostas das células NK ³². Uma forte expressão de CD200 em blastos mieloides está associada a uma significativa diminuição na frequência das células NK, o que acaba suprimindo a atividade citolítica e a secreção de citocinas pró-inflamatórias mediada por essas células ³³. No entanto, a atividade imunológica das células NK é restabelecida quando a interação entre CD200 e seu receptor (CD200R) está bloqueada, o que pode ter valor terapêutico em termos da resposta imune ³³.

Estudos mostraram que a maioria dos pacientes que expressam CD200 não respondeu à terapia de indução, o que poderia ser explicado pela supressão de células T de memória e redução da atividade das células NK em pacientes com LMA CD200-positivos, especialmente nas células NK com alta atividade lítica ^{23,34-36}. Assim, um tratamento com base em anticorpos anti-CD200 pode promover resposta imune e tratamento antitumoral mediado por células T na LMA ³³. Também foi inferido que uma terapia anti-CD200 poderia ser eficaz em termos de remissão, quando aplicado no início do repovoamento linfóide e, principalmente, na presença de células tronco com expressão de CD200 ³³. Assim, a inibição de CD200-CD200R foi proposta como uma ferramenta útil para imunoterapia contra o câncer, como já foi estudado em casos de LLC e mieloma de células plasmáticas (MCP) ^{16,37}.

A expressão de CD200 em MCP é um fator prognóstico independente que poderia representar um novo alvo terapêutico para esses pacientes ¹⁸. Alapat et al. (2012) observou que as células plasmáticas normais eram uniformemente negativas para CD200; no entanto, CD200 foi expresso por 70% dos casos de MCP, com intensidades variáveis de fluorescência ³⁸. No estudo de coorte desenvolvido por Douds et al. (2014) o CD200 não foi expresso por células plasmáticas reativas, mas foi expresso por um grande subconjunto de casos de MCP (73%), semelhante a outros estudos de imunohistoquímica e citometria de fluxo ^{39,40}. Dorfmann et al.

(2010), em um ensaio de imunohistoquímica, observou que mais de 70% dos casos de MCP foram positivos para CD200, com intensidades fraca ou moderada ⁴⁰.

Olteanu et al. (2012) comparou células plasmáticas de distúrbios imunoproliferativos não-mieloma e células plasmáticas da MCP, mostrando que a proporção de casos de MCP com células plasmáticas positivas para CD200 foi significativamente maior do que na gamopatia monoclonal de significância incerta (MGUS) (73,0% vs 54,0%, $p = 0,030$). Além disso, pode ser que a diferença na expressão de CD200 entre MCP e MGUS esteja relacionada ao risco de pacientes com MGUS progredirem para PCM ou distúrbios relacionados ⁴¹. É, portanto, concebível que os pacientes com MGUS sem CD200 sejam menos propensos a progredir para MCP.

Em 2006 foi demonstrado que a maioria dos pacientes com MCP e com expressão negativa para CD200 teve maior sobrevida livre de eventos (SLE) após o transplante de células-tronco autólogas, comparado àqueles com expressão positiva para CD200 ¹⁸. Por outro lado, Aberuyi et al. (2012) ao avaliar 52 pacientes com MCP (principalmente casos pós-tratamento) identificaram casos negativos para CD200, como o subtipo proliferativo de MCP significativamente mais prevalente (definido por expressão gênica), e este subtipo foi associado a um desfecho clínico insatisfatório. Em outras palavras, MCP CD200-positivo parece ter um desfecho melhor do que casos CD200-negativos ⁴². Em contraste, a expressão de CD200 não foi associada à uma mudança na SG e sobrevida livre de progressão (SLP), seja quando todos os pacientes foram incluídos ou quando apenas pacientes com diagnóstico recente foram analisados ³⁹. Aref et al. (2017) ilustrou que os pacientes com MCP CD200-negativo tiveram melhores SLP e SG em comparação àqueles positivos para a expressão de CD200 ⁴³.

Shi et al. (2020) confirmaram que a expressão negativa de CD200 previu um melhor resultado em pacientes com MCP recém-diagnosticados. Digno de nota, a expressão positiva de CD200 foi relacionada ao estágio clínico avançado (R-ISS III), em comparação com os anteriores (R-ISS I e II) ⁴⁴. Além disso, o efeito de diferentes estratégias de indução na SLP de pacientes com expressão de CD200, mostrando que não importa o tipo de tratamento que os pacientes recebem, a expressão de CD200 pode ser usada como um marcador de prognóstico ⁴³. Também, os autores compararam a expressão de CD200 juntamente com fatores prognósticos

convencionais de alto risco e, como resultado, a expressão negativa de CD200 foi identificada como um preditor independente de SG, em análise multivariável. Observou-se ainda que a perda de expressão de CD200 previu um resultado superior e uma melhor resposta terapêutica no decurso da doença ⁴³. Olteanu et al. (2011) avaliaram a expressão de CD200 utilizando citometria de fluxo e imunohistoquímica em amostras de 76 pacientes com MCP (44 recém-diagnosticados e 32 indivíduos previamente tratados) e confirmaram o pior SLE em casos CD200-positivos ⁴⁵.

Alguns pesquisadores têm proposto o uso da terapia anti-CD200 em doenças onde há uma hiper-expressão dessa glicoproteína. Um estudo envolvendo crianças com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) investigou o uso de anticorpos anti-CD200, uma vez que eles bloqueiam sua interação com o CD200R, mas não induzem diretamente a morte celular ⁴⁶. Uma vez que a conexão CD200-CD200R é impedida, a evasão do tumor por esta via também é anulada ⁴⁶. O bloqueio do CD200 com um anticorpo que evite as interações CD200-CD200R e que direcione a citotoxicidade contra o tumor através de vias celulares ou por vias mediadas pelo complemento, gerando potencialmente células lisadas como imunógenos, parece ser a melhor maneira de desenvolver um candidato anti-CD200, porém a expressão de CD200 em outros tecidos normais sugere o contrário ¹⁷. Assim, um agente que apenas evite que o CD200, na superfície das células tumorais, interaja com o receptor em macrófagos e células dendríticas pode ser a melhor abordagem terapêutica ¹⁷.

Recentemente, um estudo de fase 1 foi realizado para avaliar a marcação do ponto de verificação imune CD200-CD200R utilizando um anticorpo monoclonal anti-CD200 (samalizumab; ALXN6000) em pacientes com LLC e MCP ⁴⁷. Embora a expressão de CD200 em células-tronco hematopoéticas (HSCs) normais aumenta o potencial para efeitos fora do alvo, os pacientes neste estudo de determinação de dose não experimentaram efeitos adversos hematológicos, sendo que a dose máxima tolerada não foi atingida ⁴⁷.

1.2CD43

O CD43 ou sialoforina, primeiro identificada por Brown em 1981, é uma proteína transmembrana expressa na superfície da maioria das células

hematopoiéticas (incluindo linfócitos T) e células tumorais de leucemias e neoplasias sólidas. A expressão de CD43 por imunohistoquímica é usada para identificar neoplasias hematolinfóides e possui valor diagnóstico na confirmação da origem celular, incluindo aquelas neoplasias pouco diferenciadas ou CD45-negativo ⁴⁸.

CD43 carrega uma região N-terminal extracelular fortemente O-glicosilada ⁴⁹ que se liga à molécula de adesão intercelular-1 (ICAM- 1) ⁵⁰ e aumenta a ativação de células T específicas do antígeno ⁵¹. Esta glicoproteína pertence à família das mucinas associadas a células ⁵² e foi proposto que a estrutura estendida das mucinas e sua carga negativa podem fornecer uma barreira repulsiva ao redor da célula, limitando fenômenos inespecíficos de adesão ⁵³. Vários estudos indicam que, devido à sua estrutura rígida e grande carga negativa da parte extracelular, o CD43 impede a interação dos receptores de superfície com seus ligantes, agindo como uma molécula anti-aderente que regula negativamente a adesão e o *homing* das células T ⁵⁴⁻⁵⁷.

O domínio citoplasmático de CD43 interage com proteínas do citoesqueleto e regula uma variedade de vias de transdução de sinal intracelular envolvidas na ativação celular, proliferação e sobrevivência ⁵². Notavelmente, o *cross-linking* de CD43 induz apoptose das células progenitoras hematopoiéticas humanas, mas não das células-tronco ⁵⁸. Adicionalmente, em células T e monócitos, o *cross-linking* de CD43 estimula a proliferação via proteína quinase C (PKC) ⁵⁹.

O papel fisiológico dessa proteína, apesar de bem estudado, ainda é pouco compreendido. Ela está envolvida na ontogenia das células T e provavelmente na atividade dessas células após a maturação. Estudos recentes têm mostrado a relação entre a expressão do CD43 e a tumorigênese, principalmente de neoplasias hematológicas. Sua coexpressão em células CD5+/CD20+ está associada a um papel preditivo de malignidade e mau prognóstico em linfomas difusos de grandes células B ⁶⁰. No entanto, o CD43 desempenha um papel na ativação de linfócitos T, monócitos, células B e linfócitos citotóxicos, sendo uma das moléculas mais abundantes na superfície das células T, e dados de modelos animais sugerem que ele participa da migração de células T virgens para locais inflamatórios ⁵³. O CD43 é geralmente expresso em células T, mas sua expressão pode caracterizar um pior prognóstico em um processo neoplásico.

Embora as funções de CD43 na resposta imunológica tenham sido bem descritas ⁶¹, o papel desta sialomucina na biologia tumoral começa apenas a ser elucidada. Tem sido sugerido que, semelhante à Notch (via de sinalização celular), em tumor de cólon humano as células CD43-positivo sofrem uma clivagem proteolítica que resulta na translocação de seu domínio intracelular para o núcleo, onde interage com β -catenina e TCF (fator de células T) promovendo a expressão de c-Myc e ciclina D, e levando à proliferação celular ⁶². Além disso, a interação de CD43 com ICAM-1 ou E-selectina nos estágios finais de desenvolvimento do tumor promove metástases ⁶³. No entanto, os mecanismos por meio dos quais o CD43 contribui para o processo de transformação e desenvolvimento do tumor permanecem, em grande parte desconhecidos ⁶⁴.

Outros estudos têm demonstrado a relação entre a expressão de CD43 e a tumorigênese, especialmente de neoplasias hematológicas ^{65,66}. Ao contrário do tecido sólido, onde CD43 é negativo em células B normais ⁶⁷, no sangue periférico, um subconjunto normal (13–23%) de células B é CD43 positivo ⁶⁸. No contexto de neoplasias de células B, sua negatividade suporta o diagnóstico de linfoma folicular, enquanto sua positividade pode ser observada em uma variedade de distúrbios de células B, como a LLC, o linfoma de células do manto, o linfoma de zona marginal, o linfoma linfoplasmocitário e o linfoma difuso de grandes células B, onde também foi correlacionado com um pior prognóstico ^{60,69}.

Alguns estudos demonstraram inequivocamente a expressão de CD43 em linhagens de células de carcinoma do cólon humano (COLO 205) nos níveis de proteína e de mRNA ⁷⁰. Alguns pesquisadores descobriram que o CD43 foi expresso em todos os adenomas do cólon e em cerca de 50% dos adenocarcinomas, sugerindo um papel importante para o CD43 na tumorigênese do cólon ⁷¹. Eles sugeriram que a expressão aberrante de CD43 durante a tumorigênese do cólon pode prejudicar a apoptose e isso pode estar envolvido no desenvolvimento de câncer ^{71,72}.

Apesar de sua abundância em células T, a função precisa do CD43 permanece indefinida. As células T de camundongos CD43-/- exibem proliferação e adesão aumentadas *in vitro* ^{73,74} e respostas imunes aumentadas *in vivo* ⁷⁵. De forma surpreendente, o CD43 é excluído da sinapse imune de células T ativadas ⁷⁶ e frequentemente se localiza em um complexo de proteínas distal ao local de contato da célula apresentadora de antígeno (APC), referido como complexo de pólo distal

(DPC) ^{77,78}. Vários grupos relataram que a falha em excluir CD43 resulta na inibição da produção de IL-2 ^{79,80}. Com base nesses dados, o CD43 foi caracterizado como um regulador negativo da função das células T ⁸¹.

A hipótese prevalente para explicar o mecanismo de regulação negativa mediada por CD43 era que o domínio extracelular de CD43 agia como uma barreira para as interações célula a célula ^{54,55,73}. No entanto, alguns estudos demonstraram que o domínio citoplasmático não é apenas necessário, mas também suficiente para o movimento de CD43 para longe da sinapse imunológica, bem como para a atenuação mediada por CD43 da proliferação de células T e adesão homotípica ^{74,77,80,81}. Estes dados sublinham uma função crítica para a cauda citoplasmática de CD43 na regulação da proliferação e adesão de células T ⁸¹.

Apesar do progresso significativo na elucidação da função da cauda citoplasmática do CD43, não há uma função bem definida para seu domínio extracelular ⁸¹. As regiões transmembrana e citoplasmática de CD43 são altamente conservadas, auxiliando o papel de CD43 na transdução de sinal ^{82,83}. A fosforilação de S ⁷⁶ do domínio citoplasmático de CD43 é necessária para o tráfego de células T, demonstrando ainda que CD43 requer sua cauda citoplasmática altamente conservada para desempenhar suas funções de molécula co-receptora ⁸¹. A região justamembrana tem uma extensão de aminoácidos básicos que se ligam às proteínas ligantes do citoesqueleto ezrina, radixina e moesina (ERM) ⁸⁴. Essa associação é necessária para a exclusão de CD43 da sinapse imunológica de células T ativadas ^{77,79}, bem como sua localização no sulco de clivagem de células T em divisão ⁸⁴. Curiosamente, embora a atenuação da proliferação de células T mediada por CD43 requer uma cauda citoplasmática intacta, ela é independente da associação de CD43 com proteínas ERM ⁸⁰. Isso sugere que estão envolvidos neste processo elementos estruturais adicionais dentro da cauda citoplasmática ⁸¹.

Uma visão topológica das interações célula T-APC foi proposta, sugerindo que o CD43 pode ser uma proteína reguladora da superfície celular, que amortece as respostas das células T por sua presença física ⁷⁶. Essa hipótese poderia ser apoiada pelo fato de que CD43 é excluído da sinapse imunológica durante a ativação de células T ^{76,79}. Além disso, CD43 também demonstrou desempenhar um papel na ativação de células T. Ainda, alguns estudos mostraram que o CD43 transduz múltiplos sinais de ativação que, em última análise, induzem a expressão de alguns

genes durante a ativação das células T ⁸⁵⁻⁸⁷ e desempenha um papel coestimulador *in vitro* e *in vivo* ^{71,88}. Em contraste, outros estudos sugerem que as células T CD43^{-/-} são hiperproliferativas *in vitro* ^{73,75} e a expressão de CD43 foi demonstrada ser um marcador que distingue entre células T de memória e efetoras ⁸⁸.

2. Justificativa

Os marcadores CD200 e CD43, em associação com os outros marcadores do painel imunofenotípico padrão, são úteis na diferenciação de doenças linfoproliferativas B de células maduras ⁸⁹, principalmente em leucemia linfocítica crônica e linfoma de manto. Pouco se sabe sobre sua expressão em outras neoplasias hematológicas, principalmente nas neoplasias das linhagens T e a maioria dos estudos sobre a expressão desses marcadores enfoca sua expressão na população europeia, sem dados brasileiros conhecidos. Considerando a propriedade imunossupressora do CD200 e a provável associação de ambas as proteínas na piora do prognóstico do paciente, a avaliação da expressão de CD200 e CD43 em diferentes neoplasias linfoides da linhagem T pode auxiliar no diagnóstico, além de haver utilidade no monitoramento do tratamento avaliando a presença de doença residual mínima.

3. Referências

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *World Health Organization Classification of Tumours Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2017.
2. INCA IN de C (Brasil). *Estimativa 2020: Incidência de Câncer No Brasil*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2019. doi:10.32635/2176-9745.rbc.2020v66n1.927
3. Siaghani PJ, Wong JT, Chan J, Weisenburger DD, Song JY. *Epidemiology and Pathology of T- and NK-Cell Lymphomas*. Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-319-99716-2
4. Pillai V, Tallarico M, Bishop MR, Lim MS. Mature T- and NK-cell non-Hodgkin lymphoma in children and young adolescents. *Br J Haematol*. 2016;173(4):573-581. doi:10.1111/bjh.14044
5. Jevremovic D, Olteanu H. Flow Cytometry Applications in the Diagnosis of T/NK-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2019;96(2):99-115. doi:10.1002/cyto.b.21768
6. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2010;115(5):1026-1036. doi:10.1182/blood-2009-06-227579
7. Greer JP, Kinney MC, Loughran TP. T cell and NK cell lymphoproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. Published online 2001:259-281. doi:10.1182/asheducation-2001.1.259
8. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975. doi:10.1038/leu.2012.120
9. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-3967. doi:10.1182/blood-2007-11-120535
10. Sales M. *Citometria de Fluxo Aplicações No Laboratório Clínico e de Pesquisa Editora Atheneu 2013*.; 2013. doi:10.13140/2.1.1317.6324
11. de Tute RM. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology*. 2011;58(1):90-105. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03703.x

12. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014073. doi:10.4084/MJHID.2014.073
13. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol*. 2002;23(6):285-290. doi:10.1016/S1471-4906(02)02223-8
14. Dorfman DM, Shahsafaei A. CD200 (OX-2 Membrane Glycoprotein) is Expressed by Follicular T Helper Cells and in Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(1):76-83.
15. Liao KL, Bai XF, Friedman A. The role of CD200-CD200R in tumor immune evasion. *J Theor Biol*. 2013;328:65-76. doi:10.1016/j.jtbi.2013.03.017
16. Memarian A, Nourizadeh M, Masoumi F, et al. Upregulation of CD200 is associated with Foxp3+ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. *Tumor Biol*. 2013;34(1):531-542. doi:10.1007/s13277-012-0578-x
17. Kretz-Rommel A, Bowdish KS. Rationale for anti-CD200 immunotherapy in B-CLL and other hematologic malignancies: New concepts in blocking immune suppression. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(1):5-15. doi:10.1517/14712598.8.1.5
18. Moreaux J, Hose D, Reme T, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(13):4194-4197. doi:10.1182/blood-2006-06-029355
19. Tonks A, Hills R, White P, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia [7]. *Leukemia*. 2007;21(3):566-568. doi:10.1038/sj.leu.2404559
20. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: A putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(1). doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.103
21. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, et al. CD200 Expression on Tumor Cells Suppresses Antitumor Immunity: New Approaches to Cancer Immunotherapy. *J Immunol*. 2007;178(9). doi:10.4049/jimmunol.178.9.5595
22. Tonks A, Pearn L, Musson M, et al. Transcriptional dysregulation mediated by RUNX1-RUNX1T1 in normal human progenitor cells and in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2007;21(12):2495-2505. doi:10.1038/sj.leu.2404961
23. Zahran AM, Mohammed Saleh MF, Sayed MM, Rayan A, Ali AM, Hetta HF. Up-regulation of regulatory T cells, CD200 and TIM3 expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Cancer Biomarkers*. 2018;22(3). doi:10.3233/CBM-181368

24. Aref S, Abousamra N, El-Helaly E, Mabed M. Clinical Significance of CD200 and CD56 Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2020;21(3). doi:10.31557/APJCP.2020.21.3.743
25. Chen J xi, Mei L ping, Chen B guo, et al. Over-expression of CD200 predicts poor prognosis in MDS. *Leuk Res.* 2017;56:1-6. doi:10.1016/j.leukres.2017.01.021
26. Tiribelli M, Raspadori D, Geromin A, et al. High CD200 expression is associated with poor prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, even in FIT3-ITD-/NPM1+ patients. *Leuk Res.* 2017;58(February):31-38. doi:10.1016/j.leukres.2017.04.001
27. Oda SK, Daman AW, Garcia NM, et al. A CD200R-CD28 fusion protein appropriates an inhibitory signal to enhance T-cell function and therapy of murine leukemia. *Blood.* 2017;130(22):2410-2419. doi:10.1182/blood-2017-04-777052
28. Coles SJ, Hills RK, Wang ECY, et al. Expression of CD200 on AML blasts directly suppresses memory T-cell function. *Leukemia.* 2012;26(9):2148-2151. doi:10.1038/leu.2012.77
29. Coles SJ, Hills RK, Wang ECY, et al. Increased CD200 expression in acute myeloid leukemia is linked with an increased frequency of FoxP3 + regulatory T cells. *Leukemia.* 2012;26(9):2146-2148. doi:10.1038/leu.2012.75
30. Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented induction of CD4+CD25+ treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation.* 2005;79(4):488-491. doi:10.1097/01.TP.0000152118.51622.F9
31. Coles SJ, Gilmour MN, Reid R, et al. The immunosuppressive ligands PD-L1 and CD200 are linked in AML T-cell immunosuppression: Identification of a new immunotherapeutic synapse. *Leukemia.* 2015;29(9):1952-1954. doi:10.1038/leu.2015.62
32. Ustun C, Miller JS, Munn DH, Weisdorf DJ, Blazar BR. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: Is it time for immunomodulation? *Blood.* 2011;118(19):5084-5095. doi:10.1182/blood-2011-07-365817
33. Coles SJ, Wang ECY, Man S, et al. CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25(5):792-799. doi:10.1038/leu.2011.1

34. Damiani D, Tiribelli M, Raspadori D, et al. Clinical impact of CD200 expression in patients with acute myeloid leukemia and correlation with other molecular prognostic factors. *Oncotarget*. 2015;6(30):30212-30221. doi:10.18632/oncotarget.4901
35. Muhsin Z, Al-Mudallal S. Evaluation of the expression of CD200 and CD56 in CD34-positive adult acute myeloid leukemia and its effect on the response to induction of chemotherapy. *Iraqi J Hematol*. 2018;7(1). doi:10.4103/ijh.ijh_37_17
36. Rygiel TP, Meyaard L. CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):233-238. doi:10.1016/j.coi.2012.01.002
37. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, et al. Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: Association with disease progression. *Cancer Invest*. 2013;31(2):121-131. doi:10.3109/07357907.2012.756110
38. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, et al. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(1):93-100. doi:10.1309/AJCP59UORCYZEVQO
39. Douds JJ, Long DJ, Kim AS, Li S. Diagnostic and prognostic significance of CD200 expression and its stability in plasma cell myeloma. *J Clin Pathol*. 2014;67(9):792-796. doi:10.1136/jclinpath-2014-202421
40. Dorfman DM, Shahsafaei A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in B cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(5):726-733. doi:10.1309/AJCP38XRRUGSQOVC
41. Olteanu H, Harrington AM, Kroft SH. Immunophenotypic stability of CD200 expression in plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(6):1013-1014. doi:10.1309/AJCP8TF3WUIWLZHU
42. Aberuyi N, Rahgozar S, Ghodousi ES, et al. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Leukemia*. 2012;137(1):665-667. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07644.x
43. Aref S, Azmy E, El-Gilany AH. Upregulation of CD200 is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2017;35(1). doi:10.1002/hon.2206

44. Shi Q, Wu C, Han W, et al. Clinical significance of CD200 expression in newly diagnosed multiple myeloma patients and dynamic changing during treatment. *Leuk Lymphoma*. Published online October 27, 2020. doi:10.1080/10428194.2020.1839653
45. Olteanu H, Harrington AM, Hari P, Kroft SH. CD200 expression in plasma cell myeloma. *Br J Haematol*. 2011;153(3):408-411. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08555.x
46. Diamanti P, Cox C V, Ede BC, Petrova PS, Uger RA, Blair A. Investigating the Effects of Anti-CD200 Therapy for Childhood ALL. *Blood*. 2016;128(22):4021. doi:10.1182/blood.V128.22.4021.4021
47. Mahadevan D, Lanasa MC, Farber C, et al. Phase i study of samalizumab in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: Blockade of the immune checkpoint CD200. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1-13. doi:10.1186/s40425-019-0710-1
48. Batdorf BH, Kroft SH, Hosking PR, Harrington AM, Mackinnon AC, Olteanu H. Evaluation of CD43 expression in non-hematopoietic malignancies. *Ann Diagn Pathol*. 2017;29:23-27. doi:10.1016/j.anndiagpath.2017.04.010
49. Remold-O'Donnell E, Rosen FS. Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodef Rev*. 1990;2(2):151—174.
50. Rosenstein Y, Santana A, Pedraza-Alva G. CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol Res*. 1999;20(2):89-99. doi:10.1007/BF02786465
51. Park JK, Rosenstein YJ, Remold-O'Donnell E, Bierer BE, Rosen FS, Burakoff SJ. Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature*. 1991;350(6320):706-709. doi:10.1038/350706a0
52. Ostberg JR, Barth RK, Frelinger JG. The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol Today*. 1998;19(12):546-550. doi:10.1016/s0167-5699(98)01343-7
53. Nieto M, Rodríguez-Fernández JL, Navarro F, et al. Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood*. 1999;94(8):2767-2777. doi:10.1182/blood.v94.8.2767.420k26_2767_2777

54. Ardman B, Sikorski MA, Staunton DE. CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(11):5001-5005. doi:10.1073/pnas.89.11.5001
55. Manjunath N, Johnson RS, Staunton DE, Pasqualini R, Ardman B. Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *J Immunol*. 1993;151(3):1528-1534.
56. McFarland TA, Ardman B, Manjunath N, Fabry JA, Lieberman J. CD43 diminishes susceptibility to T lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 1995;154(3):1097 LP - 1104.
57. Stockton BM, Cheng G, Manjunath N, Ardman B, von Andrian UH. Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity*. 1998;8(3):373-381. doi:10.1016/s1074-7613(00)80542-7
58. Bazil V, Brandt J, Tsukamoto A, Hoffman R. Apoptosis of human hematopoietic progenitor cells induced by crosslinking of surface CD43, the major sialoglycoprotein of leukocytes. *Blood*. 1995;86(2):502-511.
59. Silverman LB, Wong RC, Remold-O'Donnell E, et al. Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *J Immunol*. 1989;142(12):4194-4200.
60. Ma X-B, Zheng Y, Yuan H-P, Jiang J, Wang Y-P. CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis. *Hum Pathol*. 2015;46(4):593-599. doi:10.1016/j.humpath.2015.01.002
61. Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. CD43 – One molecule, many tales to recount. *Signal Transduct*. 2007;7:372-385. doi:10.1002/sita.200700140
62. Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, et al. CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(1):12-17. doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.011
63. Ziprin P, Alkhamesi NA, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW. Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumour-mesothelial cell adhesion. *Biol Chem*. 2004;385(8):755-761. doi:10.1515/BC.2004.092
64. Camacho-Concha N, Olivos-Ortiz A, Nuñez-Rivera A, et al. CD43 promotes cells transformation by preventing merlin-mediated contact inhibition of growth. *PLoS One*. 2013;8(11):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0080806

65. Park WS, Kim HJ, Lee GK, Son HS, Bae Y. Anti-adhesive functions of CD43 expressed on colon carcinoma cells through the modulation of integrins. *Exp Mol Pathol.* 2012;92(1):82-89. doi:10.1016/j.yexmp.2011.10.009
66. Balikova A, Jääger K, Viil J, Maimets T, Kadaja-Saarepuu L. Leukocyte marker CD43 promotes cell growth in co-operation with β -catenin in non-hematopoietic cancer cells. *Int J Oncol.* 2012;41(1):299-309. doi:10.3892/ijo.2012.1440
67. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma: A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1999;111(4):488-494. doi:10.1093/ajcp/111.4.488
68. Lynch EF, Jones PA, Swerdlow SH. CD43 and CD5 antibodies define four normal and neoplastic B-cell subsets: a three-color flow cytometric study. *Cytometry.* 1995;22(3):223-231. doi:10.1002/cyto.990220310
69. Mitrovic Z, Iqbal J, Fu K, et al. CD43 expression is associated with inferior survival in the non-germinal centre B-cell subgroup of diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2013;162(1):87-92. doi:10.1111/bjh.12356
70. Misawa Y, Nagaoka H, Kimoto H, et al. CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. *Eur J Immunol.* 1996;26(11):2573-2581. doi:10.1002/eji.1830261106
71. Sperling AI, Green JM, Mosley RL, et al. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J Exp Med.* 1995;182(1):139-146. doi:10.1084/jem.182.1.139
72. He YW, Bevan MJ. High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis. *J Exp Med.* 1999;190(12):1903-1908. doi:10.1084/jem.190.12.1903
73. Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature.* 1995;377(6549):535-538. doi:10.1038/377535a0
74. Walker J, Green JM. Structural requirements for CD43 function. *J Immunol.* 1999;162(7):4109-4114.

75. Thurman EC, Walker J, Jayaraman S, Manjunath N, Ardman B, Green JM. Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43. *Int Immunol*. 1998;10(5):691-701. doi:10.1093/intimm/10.5.691
76. Sperling AI, Sedy JR, Manjunath N, Kupfer A, Ardman B, Burkhardt JK. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J Immunol*. 1998;161(12):6459-6462.
77. Allenspach EJ, Cullinan P, Tong J, et al. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity*. 2001;15(5):739-750. doi:10.1016/s1074-7613(01)00224-2
78. Cullinan P, Sperling AI, Burkhardt JK. The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev*. 2002;189:111-122. doi:10.1034/j.1600-065x.2002.18910.x
79. Delon J, Kaibuchi K, Germain RN. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*. 2001;15(5):691-701. doi:10.1016/s1074-7613(01)00231-x
80. Tong J, Allenspach EJ, Takahashi SM, et al. CD43 regulation of T cell activation is not through steric inhibition of T cell-APC interactions but through an intracellular mechanism. *J Exp Med*. 2004;199(9):1277-1283. doi:10.1084/jem.20021602
81. Mody PD, Cannon JL, Bandukwala HS, et al. Signaling through CD43 regulates CD4 T-cell trafficking. *Blood*. 2007;110(8):2974-2982. doi:10.1182/blood-2007-01-065276
82. Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis AE 3rd, et al. Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(8):2819-2823. doi:10.1073/pnas.86.8.2819
83. Cyster J, Somoza C, Killeen N, Williams AF. Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *Eur J Immunol*. 1990;20(4):875-881. doi:10.1002/eji.1830200424
84. Yonemura S, Hirao M, Doi Y, et al. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol*. 1998;140(4):885-895. doi:10.1083/jcb.140.4.885

85. Pedraza-Alva G, Mérida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27564-27568. doi:10.1074/jbc.271.44.27564
86. Santana MA, Pedraza-Alva G, Olivares-Zavaleta N, et al. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(40):31460-31468. doi:10.1074/jbc.M005231200
87. Mattioli I, Dittrich-Breiholz O, Livingstone M, Kracht M, Schmitz ML. Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes. *Blood.* 2004;104(10):3302-3304. doi:10.1182/blood-2004-04-1536
88. Onami TM, Harrington LE, Williams MA, et al. Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol.* 2002;168(12):6022-6031. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6022
89. Arlindo EM, Marcondes NA, Fernandes FB, Faulhaber GAM. Quantitative flow cytometric evaluation of CD200, CD123, CD43 and CD52 as a tool for the differential diagnosis of mature Bcell neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017;39(3):252-8.

4. Objetivos

4.1. Objetivo principal

- Avaliar a expressão de CD200 e CD43 em células de doenças linfoproliferativas da linhagem T.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar revisão bibliográfica sobre o papel de CD200 nas diversas doenças hematológicas nas quais sua expressão não é bem estabelecida;
- Estabelecer uma relação entre a expressão dos marcadores CD200 e CD43 em células de doenças hematológicas;
- Avaliar a expressão de marcadores CD200 e CD43 em células T imaturas e maduras;
- Caracterizar a expressão de CD200 e de CD43 de acordo com a patologia e relacionar com parâmetros celulares periféricos e medulares;
- Avaliar a intensidade média de fluorescência de CD200 em neoplasmas linfoides de células precursoras e de CD43 em neoplasmas de células maduras.

5. Artigos científicos

O estudo desenvolvido durante os dois anos de mestrado gerou resultados que são apresentados em duas publicações, uma revisão sobre o marcador CD200 nas diferentes neoplasias hematológicas (DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103509), publicada na revista *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, cujo fator de impacto é 6.312 e possui qualis A1. O segundo artigo, original com os resultados das análises feitas neste período, foi submetido para o periódico *Leukemia Research*, cujo fator de impacto é 3.715 e possui qualis A3.

5.1. Artigo original

Original article

Diagnostic Hematology

CD200 expression in T-cells neoplasms

Running head: T-cells neoplasms: CD200 expression

.

ABSTRACT

Background: T cell neoplasms are clonal T cell tumors at various maturation stages that are relatively uncommon and account for 12% of non-Hodgkin's lymphomas. CD200 (or OX-2) is a glycoprotein whose expression in neoplasms seems to be associated with a worse prognosis. CD200 expression would characterize an aberrant immunophenotype, as well as a worse prognosis in neoplastic processes and contributes to residual disease evaluation. Our aim was to evaluate the expression of CD200 on precursor lymphoid and mature T cell neoplasms and its diagnostic utility.

Methods: Through a cross-sectional study, we evaluated the expression of CD200 in T-lineage lymphoproliferative disease cells using the flow cytometry technique. We

used 34 samples of bone marrow and 20 samples of peripheral blood obtained for convenience in a laboratory specialized in the diagnosis of hematological diseases in Porto Alegre (Brazil) between 2017 and 2020.

Results: In 54 samples of T-cell neoplasms analyzed, CD200 was detected in 20 of them. Of these, 16 (84.2%) were diagnosed with precursor lymphoid neoplasms ($P=0.01$). CD200 positive samples also presented laboratory data such as leukocytosis, anemia and thrombocytopenia.

Conclusion: CD200 expression proved to be a common finding in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and Early T-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ETP-ALL).

Key words: CD200, T cell neoplasm, lymphoproliferative disease.

Introduction

In humans, B, T and NK lymphocytes have the same progenitor cell, but it is the stimuli they receive throughout their maturation that define which cells they will differentiate into. T cell precursors leave the bone marrow and enter the thymus, where they continue their differentiation program that includes the rearrangement of genes responsible for T cell receptors (TCR). In the thymus, these CD7+ T cell precursors undergo a maturation process that results in the formation of a repertoire of functional T cell. Similar to what happens with B lymphocytes, T lymphocytes acquire, maintain, or lose markers, including CD2, CD1, CD5, CD4, CD8, CD3, which allow the characterization of different stages of maturation¹.

The CD34+/CD7+ T cell precursor from bone marrow or fetal liver migrates to the subcapsular layer of the thymic cortex and rapidly expresses CD2 and CD5.

Thymocytes in the medullary layer of the thymus form two subpopulations: CD4⁺CD8⁻ cells and CD4⁻CD8⁺ cells, both expressing CD3/TCR- $\alpha\beta$. Alternatively, the CD34⁺/CD7⁺ T cell precursor can differentiate into CD4⁻/CD8⁻ cells that express TcR- $\gamma\delta$. Then three types of mature thymocytes (T- $\alpha\beta$ CD4, T- $\alpha\beta$ CD8, and T- $\gamma\delta$) migrate into the blood and secondary lymphoid organs. TCR- $\alpha\beta$ is expressed in 90 to 95% of circulating T lymphocytes, while TCR- $\gamma\delta$ appears in 5 to 10%. The TCR coexists in the membrane in close association with CD3 and, when it encounters its specific antigen, it sends a signal to the interior of the cell, triggering a sequence of mechanisms activation that culminates in the proliferation of T lymphocytes¹.

The group of T-cell neoplasms includes T-lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and mature T-cell neoplasms². For the diagnosis of T-lineage neoplasms, the identification of aberrant cells is based not only on the absolute or relative numerical distribution among the total number of cells present in the sample, but mainly on the identification of specific and considered abnormal immunophenotypic profiles, which can be differentiated from normal or reactive patterns, as well as the identification of clonality^{3,4}.

CD200 (OX-2) is a type I transmembrane glycoprotein of about 45 kDa encoded by the MRC gene (Mannose Receptor C-Type 1). It is naturally expressed in platelets, endothelial cells, central and peripheral nervous system cells, neoplastic cells from a variety of solid tumors, B cells, T cell subsets and myeloid cells where its role is to protect immunoprivileged sites and promote peripheral tolerance⁵. CD200 has no known intracellular signaling, but induces immunosuppression by binding to CD200R, an inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, that is mainly expressed in myeloid cells and T cell subsets and promotes a suppressive effect on the immune-mediated response of T cells and favors tumor growth^{6,7}.

CD200 has a significant role in B cells mature neoplasms, as seen in mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia (CLL). It is known that the gene that codes for CD200 is present on chromosome 3q13.2 and gain of chromosome 3 or 3q has already been observed in patients with and in those with marginal zone B-cell lymphoma, suggesting that the upregulation may, in some cases, be due to CD200 duplication within the B cell⁸.

CD200 has been identified as a poor prognostic marker in acute myeloid leukemia (AML) and plasma cell myeloma (PCM) and has been associated with the progression of several carcinomas (head and neck, renal and colon carcinoma) probably due to its immunosuppressive effect⁹. CD200 is not normally expressed on T cells present in peripheral blood and bone marrow, so its expression would characterize an aberrant immunophenotype. Few studies have evaluated CD200 expression in T cell neoplasms however, it appears to be a good immunophenotypic marker for angioimmunoblastic T-cell lymphoma¹⁰. Staub et al. (2021) performed a bibliography review toward to the expression of CD200 and the many types of hematological malignancies, such as AML and PCM. In this review article, it becomes clear that many authors suggest that CD200 might have an role as a poor prognostic biomarker in both entities¹¹.

The aim of our study was to evaluate the expression of CD200 on precursor lymphoid and mature T cell neoplasms to identify whether this marker would have diagnostic utility for these entities.

Methods

Study population

We conducted a cross-sectional study of people diagnosed with T neoplasms in a reference laboratory in the south of Brazil, from November 2017 to December of 2018

and again in December 2019 to October 2020. The exclusion criteria were diagnosis of any other hematologic disease. The inclusion criteria were diagnosis of any disorder of T cells. Laboratory data were obtained in reports provided by the medical assistants.

Laboratory analysis

The monoclonal antibodies used to evaluate the markers of interest and also to identify the aberrant population were distributed using the following fluorescences: anti-human CD2 PE/APC/PB (clone LT2 or 39C1.5), anti-human CD3 PE/PercP/APC/APC-AF750/PB (clone UCHT1), anti-human CD5 FITC/PC5.5/APC (clone CRIS1 or BLA1a), anti-human CD7 FITC/APC/APC-AF700 (clone MEM-186 or 8H8.1), anti-human CD16 APC/PB (clone 3G8), anti-human CD56 PE/APC-AF700 (clone MEM-188 or N901), anti-human CD200 PE/PC7/APC (clone OX-104) and anti-human CD43 FITC/PE/BV650 (clones MEM-59, DFT1 or HIT2). All monoclonal antibodies were purchased from EXBIO® (Praha, CZ), BD Biosciences (San Diego, USA) or Beckman Coulter (Brea, CA, EUA).

Flow cytometry immunophenotyping procedures were performed according to the following protocol¹²: about 500,000 cells from whole blood or bone marrow samples anticoagulated with EDTA were incubated with the fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (MoAb) for 20 minutes in the dark, at room temperature. Red blood cells were lysed by incubation with Exellyse I (EXBIO®, Praha, CZ), followed by incubation with distilled water. Samples were washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). All reagents were used in accordance with the manufacturer's instructions. All samples were processed within 48h of collection¹³. Immediately after the preparation, samples were acquired on a 4-color BD FACSCalibur flow cytometer using CellQuest™ Pro software (BD Biosciences, San

Diego, CA, USA) or on a 13-color DxFlex flow cytometer using CytExpert software (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). About 100,000 events per sample were obtained. Reproducibility of fluorescence intensities was preserved by calibration and daily quality control procedures.

Assessment of CD200 expression

Kaluza Analysis software version 2.1 (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) was used for data analysis. For the gating strategy, debris were removed and neoplastic cells were initially selected based on their forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) distribution. Neoplastic cells were further identified by expression of the markers for T cells described above. Percentages of expression and, when possible, mean fluorescence intensities (MFI) of CD200 was recorded. Evaluation of CD200 expression was classified as negative and positive. For MFI comparison, a ratio was calculated¹⁴ because CD200 was tested on different fluorochromes over the years due to alterations in the immunophenotyping panel and migration from a 4-color flow cytometer to a 13-color instrument.

Statistical Analysis

Medians and interquartile ranges for each MFI of MoAb were calculated. The chi-squared, Fisher exact, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to calculate the statistical significance of differences between groups. Differences were considered significant when the P-value <0.05. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences v. 18.0 software (SPSS, Chicago, USA).

Ethical Aspects

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Institution (CAAE: 80989617.4.3005.5345) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and current laws in Brazil. Written informed consent was deemed unnecessary after the signature of a commitment term for the use of biological material and associated information by researchers. Only waste samples of blood and bone marrow were used for analysis. No sample collection was performed exclusively for the study.

Results

Analysis was made in 52 samples from patients diagnosed with T cell neoplasms (Table 1). The mean age was 30.5 (± 19.8) years for those patients diagnosed with precursor lymphoid neoplasms ($n = 20$) and 58.2 (± 17.5) years for those with mature neoplasms ($n = 32$). The individuals were predominantly male for both precursor lymphoid and mature neoplasms, with 75.0% ($n=15$) and 59.4% ($n=19$), respectively. Most samples were bone marrow (60.0%, $n=12$) for precursor lymphoid neoplasms and peripheral blood (71.9%, $n=23$) for mature neoplasms.

The most common precursor lymphoid neoplasm was T-ALL (25.9%, $n=14$) followed by early T-cell precursor lymphoblastic leukemia (ETP-ALL) (11.1%, $n=6$), both with a percentage of blasts greater than 65.0. There was no case of NK-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma (NK-ALL). The most prevalent mature neoplasm was Peripheral T-cell Lymphoma, not otherwise specified (PTCL-NOS) (22.2%, $n=12$). Sample characteristics are shown in Table 2.

CD200 was studied in all samples and was expressed in 20 cases (38.5%). In precursor lymphoid neoplasms, 80.0% ($n=16$) of cases were CD200-positive, while in mature neoplasms 93.7% ($n=30$) of cases were CD200-negative ($P=0.001$) (Figure 1A). In CD200-positive cases, 85.0% (17/20) presented leukocytes $> 11,000/\mu\text{L}$

(Figure 1B). Also, 73.7% (14/19) presented > 20% blasts (Figure 1C, $p < 0.001$) and among these, 50.0% (9/18) presented a negative expression for CD34, a well-known immaturity marker. In addition, 77.7% (14/18) presented Hb < 12 g/dL ($P=1.0$) (Figure 1D) and 88.9% (16/18) presented platelet < 150,000/ μ L ($P=1.0$) (Figure 1E). MFI ratio of CD200 was high (>10) in 42.9% of the cases where it was positive and half of them are among the precursor lymphoid neoplasms ($P=0.473$). The CD200 MFI ratio in T-ALL was 12.6 and in ETP-ALL, 27.4 ($P=0.055$) (Figure 2).

Discussion

In our study, there was a prevalence of CD200 expression in T-ALL cases, whereas most of mature T cell neoplasms did not express CD200. In order to specify diagnostic methods, as well as to seek better maturational differentiation of these cells among the various types of hematological tumors, the discovery of new markers is of high importance. In addition to characterizing an aberrant T cell marker, the expression of CD200 may provide relevant information regarding the prognosis for these patients.

According to the 2017 WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, T-ALL and ETP-ALL are more common in male adolescents and young adults while most mature T-cell lymphomas are more common in men over 40 years¹. Zago et al. (2013) argues that precursor lymphoid neoplasms have two peaks of incidence, one between two and five years old and the other around 30 to 40 years old¹. Longo et al. (2015) points out that peripheral T cell diseases usually have a latency period and develop after the age of 50 years, predominantly in male individuals¹⁵. These data corroborate with the mean age and the sex distribution we observed in our sample for both groups of disorders.

The most common T cell mature neoplasm in the adult population is PTCL-NOS, with a global incidence of 25.9%² being the most frequent lymphoma subtype in North

America and Europe¹⁶, while in South America approximately 15% to 20% of lymphomas are diagnosed as PTCL¹⁷. Whereas, T-ALL is a less common precursor lymphoid neoplasm, accounting for approximately 25.0% of adult diagnoses of ALL². These data corroborate with the prevalence observed in our patients. Peripheral blood is usually the sample of choice to perform a diagnostic test for mature proliferative diseases since in most cases these tumors are peripheral and blood collection is safer and simpler for such diagnosis. However, only bone marrow aspiration and biopsy are the definitive diagnostic tests to confirm the diagnosis of acute disorders, as these tumors are usually concentrated in the bone marrow.

Since CD200 expression is not normal or expected in T cells, mature or immature, there are very few studies mentioning its occurrence. We found a significant association between its expression and precursor lymphoid neoplasms as well as its negativity and mature neoplasms. Acute leukemias tend to be more aggressive than chronic leukemias in the adult population and, considering the well-established role of CD200 in tumor evasion in AML and PCM, which has been associated to worse prognosis^{9,18–20}, it is somewhat expected that T-ALL and ETP-ALL had the higher incidence of CD200 expression. According to Zago et al. (2013), adults diagnosed with acute leukemia presents overall survival (OS) of 20-30% over five years¹. Studies involving patients diagnosed with AML showed that those with higher CD200-expression were found to have inferior OS (three months) compared to those patients with lower CD200-expression (eigth months) ($P = 0.049$)^{21,22}.

We observed that half of all T-ALL cases with CD200 expression had negative expression for CD34, a known marker of immature cells. Those CD34-negative cases had stronger CD200 expression when compared to those expressing CD200 and CD34. Damiani et al. (2015) showed that more than 70% of patients with AML

presented positive expression of CD34 with a concomitant expression of CD200²³. Tiribelli et al. (2017) also identified a higher frequency of CD200 expression in patients with CD34 expression in AML²⁰.

It is well known that precursor lymphoid neoplasms, both of B cells and of T cells, lead in most cases to leukocytosis, anemia, and thrombocytopenia due to bone marrow failure¹⁵. Patients diagnosed with T-ALL usually have a very high WBC count in addition to other signs such as a mediastinal mass and pleural effusion. In contrast, most mature neoplasms, both B-cell and T-cell, lead to leukocytosis but do not lead to serious anemia or thrombocytopenia as seen in those precursor lymphoid cases. The occurrence of anemia, leukocytosis and thrombocytopenia is due to the underlying disease and not to the expression of a marker.

Indeed, some studies have evidenced the effect of CD200 on T cells, tangent to the immunosuppressive effect. In the murine model, the bond between CD200-CD200R (i) reduces cytokines production mediated by Th1-type T cell, such as IL-2 and INF- γ , (ii) increases cytokines production mediated by Th2-type T cell, such as IL-10 and IL-4 and (iii) promotes in vitro differentiation of T cells into CD4+CD25+FoxP3+Treg lymphocytes²⁴.

CD200 is thought to induce Tregs that inhibit the immune response of tumor-specific effector T cells²⁴. In contrast, Treg levels were not correlated with CD200-expressing T cells²⁵. In future studies, this incongruity could be solved by studying bone marrow or lymph node samples, which better reflects the tumor microenvironment. A recent study found in an animal model using hepatocellular carcinoma cells that CD200R inhibitor suppressed the growth of tumors and decreased the levels of Th17 and Treg in peripheral blood²⁶. Tregs constitutively express the intracellular transcription factor Foxp3 (that is increased in tumor tissues),

which CD200R inhibitor decreased the level²⁶. Gorczynski also demonstrated that anti-CD200R monoclonal antibodies promote the development of dendritic cells and have the capacity to induce regulatory T cells and directly augment Tregs production in the thymus²⁴.

Th1 cytokines are required for efficient cytotoxic T cell function²⁷ and an increased cell surface expression by tumor cells of the costimulatory molecule CD200 is sufficient to prevent a Th1 response, thereby altering the cytokine milieu surrounding tumor cells, including cytokines such as IL-2 and IFN- γ ²⁸. Interaction of CD200 as a cell-bound ligand with its receptor on macrophages has been shown to perturb immune function and shift immune responses from a Th1 toward a Th2 cytokine profile²⁸. Because the progression of many cancer types (including various lymphomas, renal carcinoma, prostate carcinoma, cervical carcinoma, lung carcinoma and melanoma) has been correlated with this shift from Th1 to Th2 cytokines, strategies to reverse this shift are believed to be therapeutically beneficial^{29,30}. Current data indicate that up-regulation of CD200 may be a mechanism used by CLL tumor cells to evade eradication by the immune system and the monoclonal antibody blockade of CD200 interaction with its receptor restores a Th1 cytokine profile²⁸, perhaps this could also be applied for CD200 expressing T cell neoplasms.

Our study has limitations. The major one is a small sample size and the impossibility of performing the quantitative evaluation of MFI for some cases.

Conclusion

The CD200 expression as assessed by flow cytometry immunophenotyping proved to be a common finding in T-ALL and ETP-ALL, whereas this marker was not expressed in most mature T neoplasms, suggesting that it may be a helpful marker in the differential diagnosis of those distinct entities, Then, its inclusion in pre-established

marker panels from the hematological community could be considered. Deeper and more robust studies are required, but it cannot be ruled out that these markers may help the differential diagnosis in T lymphocyte diseases.

References

1. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. Ed. Atheneu; 2013.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *World Health Organization Classification of Tumours Haematopoietic and Lymphoid Tissues*.; 2017.
3. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975. doi:10.1038/leu.2012.120
4. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-3967. doi:10.1182/blood-2007-11-120535
5. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol*. 2002;23(6):285-290. doi:10.1016/S1471-4906(02)02223-8
6. Dorfman DM, Shahsafaie A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in B cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(5):726-733. doi:10.1309/AJCP38XRRUGSQOVC
7. Liao KL, Bai XF, Friedman A. The role of CD200-CD200R in tumor immune evasion. *J Theor Biol*. 2013;328:65-76. doi:10.1016/j.jtbi.2013.03.017
8. Kretz-Rommel A, Bowdish KS. Rationale for anti-CD200 immunotherapy in B-CLL and other hematologic malignancies: New concepts in blocking immune suppression. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(1):5-15. doi:10.1517/14712598.8.1.5
9. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: A putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(1). doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.103
10. Dorfman DM, Shahsafaie A. CD200 (OX-2 Membrane Glycoprotein) is Expressed by Follicular T Helper Cells and in Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(1):76-83.
11. Staub RB, Marcondes NA, Rotta LN. CD200 expression in hematopoietic neoplasms: Beyond a marker for diagnosis of B-cell neoplasms. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;167(August). doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103509
12. Arlindo EM, Marcondes NA, Fernandes FB, Faulhaber GAM. Quantitative flow cytometric evaluation of CD200, CD123, CD43 and CD52 as a tool for the

differential diagnosis of mature B-cell neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017;39(3):252-258. doi:10.1016/j.bjhh.2017.05.002

13. Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han J-Y, Estrellado A, on behalf of ICSH/ICCS Working Group ; Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS – part II – preanalytical issues. *Cytom Part B Clin Cytom.* 2013;84(5):286-290. doi:https://doi.org/10.1002/cyto.b.21105
14. Bohling SD, Davis E, Thompson K, Kussick SJ, Love J. Flow cytometric analysis of CD200 expression by pulmonary small cell carcinoma. *Cytom Part B Clin Cytom.* 2016;90(6):493-498. doi:https://doi.org/10.1002/cyto.b.21340
15. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Hematologia e Oncologia de Harrison.*; 2015.
16. Siaghani PJ, Wong JT, Chan J, Weisenburger DD, Song JY. *Epidemiology and Pathology of T- and NK-Cell Lymphomas.* Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-319-99716-2
17. Pombo De Oliveira MS, Loureiro P, Bittencourt A, et al. Geographic diversity of adult t-cell leukemia/lymphoma in Brazil. *Int J Cancer.* 1999;83(3):291-298. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19991029)83:3<291::aid-ijc1>3.3.co;2-g
18. Tonks A, Pearn L, Musson M, et al. Transcriptional dysregulation mediated by RUNX1-RUNX1T1 in normal human progenitor cells and in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2007;21(12):2495-2505. doi:10.1038/sj.leu.2404961
19. Memarian A, Nourizadeh M, Masoumi F, et al. Upregulation of CD200 is associated with Foxp3+ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. *Tumor Biol.* 2013;34(1):531-542. doi:10.1007/s13277-012-0578-x
20. Tiribelli M, Raspadori D, Geromin A, et al. High CD200 expression is associated with poor prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, even in FIT3-ITD-/NPM1+ patients. *Leuk Res.* 2017;58(February):31-38. doi:10.1016/j.leukres.2017.04.001
21. Zahran AM, Mohammed Saleh MF, Sayed MM, Rayan A, Ali AM, Hetta HF. Up-regulation of regulatory T cells, CD200 and TIM3 expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Cancer Biomarkers.* 2018;22(3). doi:10.3233/CBM-181368
22. Aref S, Abousamra N, El-Helaly E, Mabed M. Clinical Significance of CD200 and CD56 Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2020;21(3). doi:10.31557/APJCP.2020.21.3.743
23. Damiani D, Tiribelli M, Raspadori D, et al. Clinical impact of CD200 expression in patients with acute myeloid leukemia and correlation with other molecular prognostic factors. *Oncotarget.* 2015;6(30):30212-30221. doi:10.18632/oncotarget.4901
24. Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented induction of CD4+CD25+ treg

using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation*. 2005;79(4):488-491. doi:10.1097/01.TP.0000152118.51622.F9

25. Erçetin AP, Aktaş S, Pişkin Ö, et al. The correlation between T regulatory cells and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Turkish J Hematol*. 2011;28(2):107-114. doi:10.5152/tjh.2011.26
26. Huang S, Pan Y, Zhang Q, Sun W. Role of CD200/CD200R Signaling Pathway in Regulation of CD4+T Cell Subsets During Thermal Ablation of Hepatocellular Carcinoma. *Med Sci Monit*. 2019;25. doi:10.12659/MSM.913094
27. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, et al. CD200 Expression on Tumor Cells Suppresses Antitumor Immunity: New Approaches to Cancer Immunotherapy. *J Immunol*. 2007;178(9). doi:10.4049/jimmunol.178.9.5595
28. McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, et al. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(4):1041-1046. doi:10.1073/pnas.0510081103
29. Filella X, Alcover J, Zarco MA, Beardo P, Molina R, Ballesta AM. Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer. *Prostate*. 2000;44(4). doi:10.1002/1097-0045(20000901)44:4<271::AID-PROS2>3.0.CO;2-G
30. Tabata T, Hazama S, Yoshino S, Oka M. Th2 subset dominance among peripheral blood T lymphocytes in patients with digestive cancers. *Am J Surg*. 1999;177(3). doi:10.1016/S0002-9610(99)00004-5

Table 1: T-cell disorders demographic and general sample characteristics.

	T-cell acute disorders (N=20)	T-cell chronic disorders (N=32)
<i>Characteristic</i>		
Median age, years	30.5 ($\pm$ 19.8)	58.2 ($\pm$ 17.5)
<i>Sex</i>		
Male	15 (75.0)	19 (59.4)
Female	5 (25.0)	13 (40.6)
<i>Sample</i>		
Peripheral blood	8 (40.0)	23 (71.9)
Bone marrow	12 (60.0)	9 (28.1)
Neoplastic cells	80.5 ($\pm$ 13.0)	47.5 ($\pm$ 22.0)
<i>Peripheral blood counts</i>		
White blood cell count ($\times 10^9/L$)	144,4 ($\pm$ 127,8)	41,9 ($\pm$ 53,3)
Hemoglobin (g/dL)	9.7 ($\pm$ 2.6)	12.0 ($\pm$ 3.3)
Platelet count ($\times 10^9/L$)	114,2 ($\pm$ 87,9)	236,2 ($\pm$ 124,6)

Data to sex and sample are expressed as number (%) and to peripheral blood counts are shown as mean $\pm$ SD.

Table 2: General sample characteristics in each disease.

Precursor lymphoid neoplasms (n=20)		Mature neoplasms (n=32)						
		T-ALL (n=14; 25.9%)	ETP-ALL (n=6; 11.1%)	MF/SS (n=3; 5.6%)	ATL (n=6; 11.1%)	T-PLL (n=3; 5.6%)	T-LGL leukemia (n=8; 14.8%)	T-cell lymphoma, NOS (n=12; 22.2%)
Sample counts								
Neoplastic cells (%)		68.4 (±32.2)	71.8 (±23.7)	40.9 (±17.5)	46.5 (±21.4)	77.5 (±22.6)	30.7 (±21.3)	51.3 (±19.9)
White blood cells (x10 ⁹ /L)		117,9 (±112,9)	124,2 (±90,8)	57,6 (± 51,5)	57,2 (±45,8)	144,2 (±104,4)	13,6 (±13,6)	32,9 (±32,7)
Hemoglobin (g/dL)		11.2 (±2.82)	8.1 (±1.2)	14.6 (±1.6)	11.0 (±2.5)	12.9 (±2.0)	11.0 (±4.9)	13.3 (±1.8)
Platelets ,(x10 ⁹ /L)		149,4 (±93,6)	149,2 (±126,9)	275,0 (±114,2)	196,5 (±146,9)	164,0 (±72,7)	154,2 (±79,6)	284,0 (±121,1)

T-ALL: T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma; ETP-ALL: early T-cell precursor lymphoblastic leukemia; MF/SS: mycosis fungoides/Sézary Syndrome; ATL: adult T-cell leukemia/lymphoma; T-PLL: T-cell prolymphocytic leukemia and T-LGL: T-cell Large Granular Lymphocytic Leukemia.

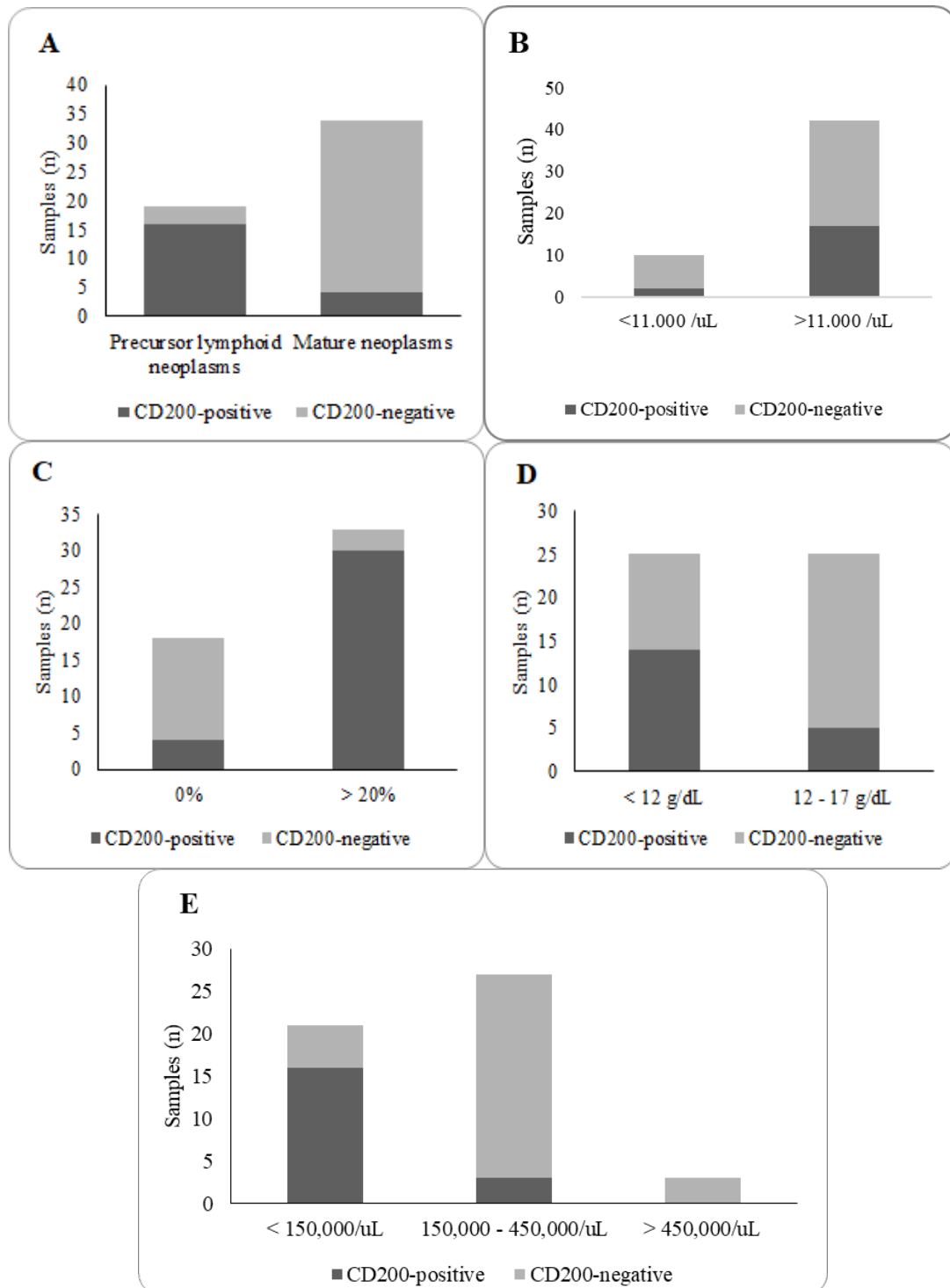


Figure 1: CD200 (n=52) expression related to (A) type of disorder ($p=0.001$), (B) leucocytes count, (C) blasts (%) ($p < 0.001$), (D) hemoglobin level and (E) platelets count. Data presented as numbers and the chi-squared test was performed to achieve the p-value.

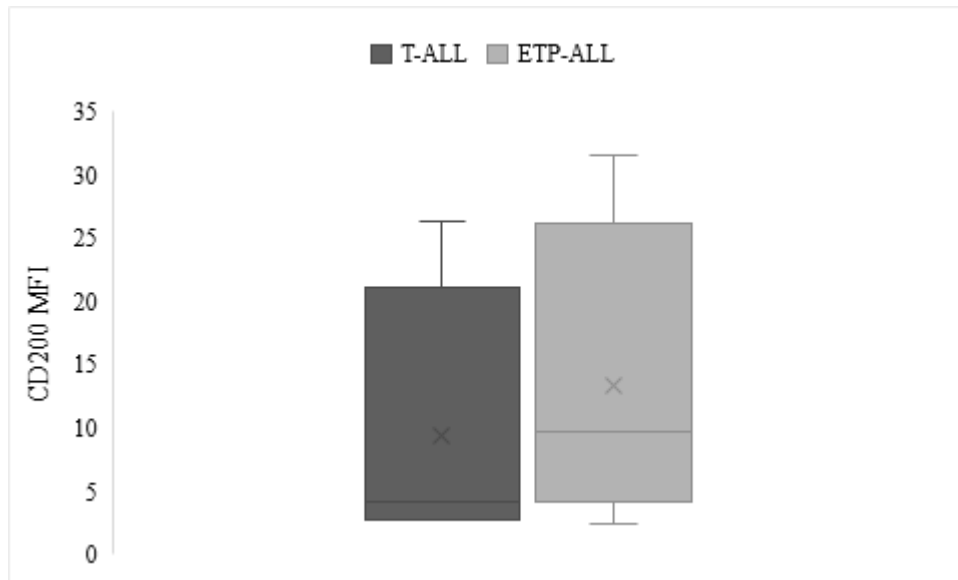
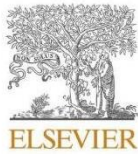


Figure 2: CD200 MFI in precursor lymphoid neoplasms ($p=0.055$). Data presented in quartiles.



Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

CD200 expression in hematopoietic neoplasms: Beyond a marker for diagnosis of B-cell neoplasms

Renata B. Staub^a, Natália A. Marcondes^b, Liane N. Rotta^{a,*,*}^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil^b Laboratório Zanol, Porto Alegre, Brazil^c Departamento de Métodos Diagnósticos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
CD200
OX-2
Hematopoietic neoplasms
Immune response

ABSTRACT

CD200 (OX-2) is expressed in myeloid cells, B cells, subsets of T cells and on other normal and neoplastic non-hematopoietic cells. It interacts with CD200R and has a suppressive effect on T cells immune mediated response. We aimed to review CD200 expression and its role in the immune evasion of non-B cell hematopoietic neoplasms. In acute myeloid leukemia, CD200 seems to be related to the worst outcome, even in diseases of good prognosis, possibly due to an immunosuppressive effect. In plasma cell myeloma studies, while some have associated CD200 expression with worst prognosis possibly due to its suppressive effect on monocyte and T cell-mediated immune response, in others CD200 appeared to be a marker of a better outcome, or even showed no impact in event-free survival (EFS). Few studies have evaluated CD200 expression in T cell neoplasms; however, it appears to be a good immunophenotypic marker for angioimmunoblastic T cell lymphoma. In conclusion, CD200 appears to be involved in the immune evasion of malignant cells, which could affect the survival of these patients.

1. Introduction

CD200 (OX-2) is a type I transmembrane glycoprotein of about 45 kDa encoded by the MRC gene. It is naturally expressed in platelets, endothelial cells, in the central and peripheral nervous system cells, in neoplastic cells of a variety of solid tumors, B cells, subsets of T cells and myeloid cells, where its role is to protect immune-privileged sites and promote peripheral tolerance (Barclay et al., 2002). CD200 has no known intracellular signaling motif but induces immunosuppression by binding with CD200R, an inhibiting receptor of the immunoglobulin superfamily. CD200R is expressed mainly in myeloid cells and subsets of the T cells and promotes a suppressive effect on T cell immune mediated response (Dorfman and Shahsafari, 2011) and favors tumor growth (Liao et al., 2013). CD200 is expressed in several hematopoietic neoplasms, including acute myeloid leukemia (AML) and some B cell lymphocyte-derived diseases such as chronic lymphocytic leukemia (CLL) and hairy cell leukemia (HCL).

Because it is naturally present in B cells, the expression of CD200 in these diseases is considered significant when in its absence, as in mantle cell lymphoma characteristic immunophenotype. It is known that the gene that codes for CD200 is present on chromosome 3q13.2 and the gain of chromosome 3 or 3q has already been observed in patients with

CLL and in those with marginal zone B-cell lymphoma, suggesting that upregulation may in some cases be due to CD200 duplication within the B cell (Kretz-Rommel and Bowditch, 2008).

CD200 was identified as a marker of worse prognosis in some hematopoietic malignancies (AML and plasma cell myeloma) and has been associated with the progression of several carcinomas (head and neck carcinoma, renal carcinoma, and colon carcinoma), probably because of its immunosuppressive effect on the individual's immune system (Moreaux et al., 2008). In an animal model, it was found that CD200-positive neoplasms inhibited the ability of lymphocytes to eradicate tumor cells (Kretz-Rommel et al., 2007).

Some scientists have proposed the use of anti-CD200 therapy in diseases where there is an overexpression of this glycoprotein. A study involving children diagnosed with B cell precursor acute lymphoblastic leukaemia investigates the use of anti-CD200 antibodies, since they exert their effect by binding to CD200 antigen and blocking its interaction with CD200R and not by directly inducing cell death (Diamanti et al., 2016). Once the CD200-CD200R connection is prevented, tumor evasion by this route is hindered. Though targeting CD200 with an antibody that both prevents CD200-CD200R interactions and that directs cytotoxicity against the tumor through cellular or complement-mediated pathways, thus potentially generating lysed cells

* Corresponding author at: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, 90050-170, Brazil.
E-mail address: lnrotta@ufespa.edu.br (L.N. Rotta).

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103509>

Received 25 April 2021; Received in revised form 31 August 2021; Accepted 10 October 2021

Available online 21 October 2021

1040-8428/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

as immunogen, might intuitively appear to be the best way forward to developing a therapeutic anti-CD200 candidate, the expression of CD200 on other normal tissues suggests otherwise. Thus, an agent that merely prevents CD200 on the surface of the tumor cells from interacting with the receptor on macrophages and dendritic cells may be the best therapeutic approach (Kretz-Rommel and Bowditch, 2008).

In this article, we aimed to review studies that identified CD200 expression and its probable role in the immune evasion of malignant cells from the hematopoietic origin, other than B cell neoplasms due to its well-known behavior. In addition, the correct description of CD200 expression in hematopoietic malignant entities of lower prevalence is of great importance in order to improve their diagnostic methods.

2. Myeloid neoplasms

The regulation of myeloid cell activity by direct cell-cell contact allows a more localized control than that mediated by cytokines; this type of contact is also promoted by the CD200-CD200R interaction (Jenmalm et al., 2006). The deletion of CD200 results in dysregulation of myeloid cells and high susceptibility to autoimmune inflammation, as seen in Jenmalm (2006) *in vitro* model. Wong's (2010) group observed that tumor expression of CD200 *in vitro* altered the tumor microenvironment via inhibition of suppressive activity and IL-10 production by macrophages, which resulted in the prevention of tumor recurrence during cytotoxic T cell lymphocyte (CTL) therapy (Wong et al., 2010). Memarian et al. (2013) showed that functional activities of CD200-CD200R binding are also present in healthy cells, but they are exacerbated in tumor cells, which generates an immunosuppressive environment and, thus, negative effects on immune responses, contributing to an increased risk of recurrence and worse progression. They also found that CD200, but not CD200R, had elevated expression in AML myeloid progenitor cells compared to normal subjects (Memarian et al., 2013).

Some studies have proposed that CD200 expression in patients with myeloid neoplasms implies a worsening prognosis and even decreased overall survival (OS). Tonks et al. (2007) study described that CD200 expression may have prognostic value in AML patients, since there may be an association between expression of CD200 and worse outcome in AML with abnormality genetics related to core binding factor (CBF), such as t(8;21) (RUNX1-RUNX1T1) and inv(16) (CBFB-MYH11), both linked to complete remission and favorable outcome (Tonks et al., 2007a). Tonks et al. (2007) following study showed that this worsening occurs, possibly, because of immunosuppression and inhibition of immunological clearance of residual disease. Thus, it is possible that CD200 expression in diseases of good clinical course could represent a worse outcome through immune evasion or immune modulation by neoplastic cells (Tonks et al., 2007b). Other studies also showed that AML patients with CD200 high expression were found to have inferior OS compared to those patients with CD200 low expression (Zahrán et al., 2018; Aref et al., 2020).

Chen et al. (2017) and Aref et al. (2020) showed that in myelodysplastic syndromes (MDS), a group of diseases with clonal proliferation of dysplastic bone marrow haematopoietic cells, patients with high expression level of CD200 had a shorter OS and a high leukemic transformation than those with low expression. Chen et al. (2017) also demonstrated that refractory anemia with excess blasts I and II (RAEB-I and II) showing a high percentage of CD200-positive blasts than refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCUD) and refractory anemia with increased ring sideroblasts (RARS) (Xi et al., 2017).

Damiani et al. (2015) showed that more than 70 % of patients with positive expression of CD34 had a concomitant expression of CD200 (Damiani et al., 2015). Ho et al. (2020) identified CD200 as a novel leukemia stem cells (LSC) marker in AML. CD200 expression marked LSCs, including both CD34+ and CD34- LSCs, from individual samples, supporting broad applicability of CD200 as a marker for prospective isolation of LSC activity (Ho et al., 2020). Tiribelli et al. (2017) showed that patients with high CD200 expression are less likely to maintain

complete remission and have an extremely poor outcome, with a maximum survival of 3-years after diagnosis. They also identified a higher frequency of CD200 expression in patients with CD34-positive neoplasms, and patients with strong CD200 expression had a significantly lower probability of OS compared to those with low CD200 expression (Tiribelli et al., 2017). Oda et al. (2017) showed that CD200 expression is increased in a small population of LSC with high proliferative capacity, those CD200-positive LSC initiate and maintain the disease and are resistant to radiotherapy and chemotherapy (Oda et al., 2017).

Coles et al. (2012) showed that AML patients with strong CD200 expression have reduced cytotoxic activity of memory T cells when compared to patients with low expression of CD200. Likewise, CD4-positive memory T cells, which produce TNF- α , IL-2, and IFN- γ , are reduced to almost 50 % in these patients (Coles et al., 2012). Individuals with low CD200 expression had a higher response to IFN- γ , even when compared to healthy patients, suggesting that this cytokine may play a role in AML, which is attenuated by CD200 (Coles et al., 2012). It was also shown that there was no influence of CD200 expression on the frequency of CD3-positive T cell, that is, there is no general decrease in T cell, only inhibition of these in patients with strong CD200 expression (Coles et al., 2012).

Also, Coles' group evidenced that this glycoprotein is associated with suppression of Th1 memory T cell by an antigen-specific mechanism, suggesting that CD200 expression may exacerbate the susceptibility of these patients to co-infections, which ends up hindering recovery and causing worse outcome (Coles et al., 2012). Gorczynski et al. (2005) showed that CD200 has the potential to induce the formation of regulatory T cells (Treg) (CD4+CD25+FoxP3+), a subgroup of immunosuppressive T cells that are associated with a worse prognosis in AML patients (Gorczynski et al., 2005). Coles et al. (2012) study corroborates that CD200 expression has the potential to induce the formation of the regulatory T cells (CD4+CD25+FoxP3+) (Coles et al., 2012). In agreement, Zahrán et al. (2018) study found that patients with CD200 over-expression in leukemic cells have an elevated level of Tregs (Zahrán et al., 2018).

CD200R is strongly expressed on macrophages and mast cells and, in an animal model, this expression appears to limit autoimmune inflammation caused by viral infections (Snelgrove et al., 2008), arthritis (Hoek et al., 2000) and multiple sclerosis, as CD200-deficient mice exhibit hyper active macrophages with significant increases in disease severity (Liu et al., 2021). Expression of CD200 on tumor cells incites the expansion of myeloid-derived suppressive cells (MDSC) in tumor microenvironment and increases tumor-increased immunosuppression (Kotwica-Mojzycz et al., 2021). CD200 blockade significantly inhibits tumor growth and diminishes the percentage and number of MDSCs that penetrate in tumor tissue (Kotwica-Mojzycz et al., 2021).

Interactions between CD200:CD200R1 in IFN- γ and TNF α activate macrophages (M1-type) derived from human cells and lead to inhibition of function through Dok2 (Kotwica-Mojzycz et al., 2021). Suppression of macrophage function is implicated in the inhibition of autoaggressive T cell responses (Hoek et al., 2000; Feuer, 2007). Elevated expression of CD200R is associated with increased numbers of an alternatively activated (M2a) subtype of human macrophages (Kotwica-Mojzycz et al., 2021). These M2a, CD206+ cells, generated by IL-4 and IL-13, exert an anti-inflammatory effect and are involved in Th2 immune responses (Kotwica-Mojzycz et al., 2021). CD200R-mediated repression of classical macrophage (M1) activation by default allows M2 cells to remain in their polarized state, favoring induction of Th2 immune responses (Koning et al., 2010). In murine mast cells, CD200 inhibits activation/degranulation through the inhibition of Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in a process involving docking protein 1 (Dok1) and docking protein 2 (Dok2) (Kotwica-Mojzycz et al., 2021). In human myeloid cells, Dok2 plays a more significant role, leading to inhibition of function in human myeloid cells (Kotwica-Mojzycz et al., 2021).

Coles et al. (2015) showed that CD200-CD200R and PD-L1:PD-1 binding in T cells can produce an even more immunosuppressive effect on CD8-positive T lymphocytes when expressed in leukemic cells, which has an important meaning for AML that usually have CD200 and PD-L1 expression (Coles et al., 2015). Beyond that, AML cells exert direct immunosuppressive effects on natural killer (NK) cells mediated by immunosuppressive ligands or soluble factors and induce regulatory T lymphocytes (Treg) that weaken NK cell responses (Ustun et al., 2011).

A strong expression of CD200 in myeloid blasts is associated with a significant decrease in the frequency of NK cells, which ultimately suppresses cytolytic activity and secretion of proinflammatory cytokines mediated by these cells. However, the immunological activity of NK cells is reestablished when the interaction between CD200 and its receptor (CD200R) is blocked, which may have therapeutic value in terms of the immune response (Coles et al., 2011). Studies showed that most patients who express CD200 did not respond to induction therapy, which could be explained by memory T cell suppression and NK cell activity reduction in CD200-positive AML patients, especially in the NK cells with high lytic activity (Zahran et al., 2018; Damiani et al., 2015; Muhsin and Al-Mudallal, 2018; Rygiel and Meyaard, 2012).

Thus, a treatment based on anti-CD200 antibodies can promote both the innate immune response and antitumor T cell-mediated treatment in AML (Coles et al., 2011). It has also been inferred that an anti-CD200 therapy could be effective in terms of remission when applied at the beginning of lymphoid repopulation and, mainly, in the presence of stem cells with CD200 expression (Coles et al., 2011). Hence, CD200-CD200R inhibition has been proposed as a useful tool for cancer immunotherapy, as has already been studied in cases of CLL and plasma cell myeloma (PCM) (Memarian et al., 2013; Jadidi-Niaragh et al., 2013).

3. Plasma cell neoplasms

PCMs were previously reported to express CD200 in 78 % of cases by gene expression profiling and 86 % of cases by flow cytometry immunophenotyping (FCI), with variable fluorescence intensity (Moreaux et al., 2006). CD200 expression by PCM is an independent prognostic factor that could represent a new therapeutic target for these patients (Moreaux et al., 2006). Alapat et al. (2012) observed that normal plasma cells were uniformly negative for CD200; however, CD200 was expressed by 70 % of PCM cases, with variable fluorescence intensity (Alapat et al., 2012). In Douds' (2014) cohort study, CD200 was not expressed by reactive plasma cells but was expressed by a large subset of PCM cases (73 %), similar to other immunohistochemistry and FCI studies (Douds et al., 2014). Dorfmann et al. (2010) observed in an immunohistochemistry assay that more than 70 % of PCM cases were positive for CD200, with intensities ranging from weak to moderate (Dorfman and Shahsafaei, 2010).

Olteanu et al. (2012) compared plasma cells of non-myeloma immunoproliferative disorders and plasma cells of PCM, showing that the proportion of PCM cases with CD200-positive plasma cells was significantly higher than in monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) (73.0 % vs 54.0 %, $p = 0.030$). Notably, however, they did not find any difference in clinical or laboratory features of CD200-positive and CD200-negative MGUS cases (Olteanu et al., 2011). In addition, a larger proportion of CD200-positive plasma cells exceeded the isotype control threshold in CD200-positive PCM cases as compared to CD200-positive MGUS cases, indicating a higher density of CD200 antigen on plasma cells of the former (Dorfman and Shahsafaei, 2010). It may be hypothesized that the difference in CD200 expression between PCM and MGUS is related to the risk of patients with MGUS progressing to PCM or related disorders (Dorfman and Shahsafaei, 2010). It is postulated that the lack of CD200 expression may avoid the deleterious effect of CD200-mediated suppression of cytotoxic T cell immune response (Gorczyński et al., 2005). It is therefore conceivable that patients with MGUS lacking CD200 are less likely to progress to PCM (Olteanu et al., 2011).

Moreaux et al. (2006) demonstrated that the majority of PCM patients with CD200-negative expression had longer EFS after autologous stem cell transplantation than those with CD200-positive expression (Moreaux et al., 2006). Conversely, Aberuyi et al. (2012) study with 52 PCM patients, mostly post-treatment cases, identified CD200-negative cases as the significantly more prevalent PCM proliferative subtype, as defined by gene expression signature, and this subtype was associated with poor clinical outcome. In other words, CD200-positive PCM appeared to have a better outcome than CD200-negative cases (Aberuyi et al., 2012). By contrast, CD200 expression was not associated with a change in OS and progression-free survival (PFS), either when all patients were included or when only newly diagnosed patients were analyzed (Douds et al., 2014). Aref et al. (2017) illustrated that CD200 negative PCM patients had a better PFS and OS as compared with those positive for CD200 expression (Aref et al., 2017).

Shi et al. (2020) confirmed that CD200 negative expression predicted a better outcome in newly diagnosed PCM patients. Of note, CD200 positive expression was related to the advanced clinical stage (R-ISS III) as compared with earlier ones (R-ISS I and II) (Shi et al., 2020). Besides, they also analyzed the effect of different induction strategies on PFS of patients with CD200 expression, showing that no matter what kind of treatment patients receive, CD200 expression could be used as a prognostic marker (Shi et al., 2020). They further compared CD200 expression along with conventional high-risk prognostic factors and, as a result, CD200 negative expression was identified as an independent predictor of OS in multivariable analysis (Shi et al., 2020). Of note, they also found that loss of CD200 expression predicted superior outcome and a better therapeutic response in the course of the disease (Shi et al., 2020). Also, compared with older patients, CD200 expression was lower among younger subjects (Lu et al., 2016).

Olteanu et al. (2011) assessed CD200 expression with FCI and immunohistochemistry in samples from 76 PCM patients (44 newly diagnosed and 32 previously treated individuals) and confirmed the worst EFS in CD200-positive cases. They further found CD200 expression was associated with lower LDH (lactate dehydrogenase) and haemoglobin levels (Olteanu et al., 2012). Moreaux et al. (2006) showed that CD200 expression was associated with high frequency of lambda light-chain expression and worse EFS, while the absence of CD200 on neoplastic plasma cells correlated with age ≥ 65 -years old (Moreaux et al., 2006).

Conticello et al. (2013) showed that the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is active in CD200-positive PCM and that expression of CD200 protein on those neoplastic cells is regulated by ERK (Conticello et al., 2013). It is noteworthy that the mitogen-activated protein kinase (MEK)/ERK signal transduction pathway significantly contributes to PCM pathogenesis, by supporting PCM cell growth and survival, angiogenesis and cell-adhesion phenomena, thus conferring growth and drug resistance in the bone marrow milieu (Kim et al., 2010). CD200 expression appears to have prognostic significance in PCM because CD200-negative cases have a longer EFS, and loss of CD200 expression may serve as a marker for disease progression (Aberuyi et al., 2012).

Recently, a phase 1 study was conducted to evaluate targeting of the CD200-CD200R immune checkpoint by an anti-CD200 monoclonal antibody (samalizumab; ALXN6000) in patients with CLL and PCM (Mahadevan et al., 2019). Although CD200 expression on normal hematopoietic stem cells (HSCs) increases the potential for off-target effects, patients in this dose-finding study experienced no significant hematologic adverse effects, and the maximum tolerated dose was not reached (Mahadevan et al., 2019).

4. T-cell neoplasms

Rare studies have shown the expression of CD200 in T cell neoplasms, whether they are precursor or mature lymphocytes, therefore the impact of this marker in T-lymphoproliferative disease is largely

unknown. Dorfman and Shahsafaei (2011) are one of the only that assessed CD200 expression, together with PD-1 and CXCL13, in follicular T-helper cells of lymphoid tissues and observed that a small subgroup of T cell-derived neoplasms was reactive to CD200, mainly that CD200 is a good marker for neoplastic angioimmunoblastic T lymphoma cells (Dorfman and Shahsafaei, 2011). There is still no evidence that CD200 is a good marker for other T cell neoplasms.

5. Conclusion

In conclusion, CD200 can be found in several hematopoietic neoplasms, besides the already well-described expression in B-cell neoplasms, where it appears to be involved in immune evasion of malignant cells. More studies are needed to clarify whether this marker and its effect on decreasing immune response have an impact on patient prognosis. Moreover, CD200 expression has yet to be more explored, especially its relation to disease treatment response and the possible impact on patient survival.

Author contributions

RBS performed the literature review, selected the articles and wrote the paper. NAM assisted in literature review and contributed to the writing of the paper. LNR performed a critical review of the paper. All authors approved the final version of the paper.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that they have no conflict of interest.

References

- Aberuyi, N., Rahgozar, S., Ghodousi, E.S., et al., 2012. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Leukemia* 137 (1), 665–667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07644.x>.
- Alapat, D., Coviello Malle, J., Owens, R., et al., 2012. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 137 (1), 93–100. <https://doi.org/10.1309/AJCP59UORCYZEVQO>.
- Aref, S., Azmy, E., El-Gilany, A.H., 2017. Upregulation of CD200 is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in multiple myeloma. *Hematol. Oncol.* 35 (1) <https://doi.org/10.1002/hon.2206>.
- Aref, S., Abousamra, N., El-Helaly, E., Mamed, M., 2020. Clinical significance of CD200 and CD56 expression in patients with acute myeloid leukemia. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 21 (3) <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.3.743>.
- Barclay, A.N., Wright, G.J., Brooke, G., Brown, M.H., 2002. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 23 (6), 285–290. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02223-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02223-8).
- Coles, S.J., Wang, E.C., Man, S., et al., 2011. CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 25 (5), 792–799. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.1>.
- Coles, S.J., Hills, R.K., Wang, E.C.Y., et al., 2012. Expression of CD200 on AML blasts directly suppresses memory T-cell function. *Leukemia* 26 (9), 2148–2151. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.77>.
- Coles, S.J., Gilmour, M.N., Reid, R., et al., 2015. The immunosuppressive ligands PD-L1 and CD200 are linked in AML T-cell immunosuppression: identification of a new immunotherapeutic synapse. *Leukemia* 29 (9), 1952–1954. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.62>.
- Conticello, C., Giuffrida, R., Parrinello, N., et al., 2013. CD200 expression in patients with Multiple Myeloma: another piece of the puzzle. *Leuk. Res.* 37 (12), 1616–1621. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.08.006>.
- Damiani, D., Tiribelli, M., Raspadori, D., et al., 2015. Clinical impact of CD200 expression in patients with acute myeloid leukemia and correlation with other molecular prognostic factors. *Oncotarget* 6 (30), 30212–30221. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4901>.
- Diamanti, P., Cox, C.V., Ede, B.C., Petrova, P.S., Uger, R.A., Blair, A., 2016. Investigating the effects of Anti-CD200 therapy for childhood ALL. *Blood* 128 (22), 4021. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.4021.4021>.
- Dorfman, D.M., Shahsafaei, A., 2010. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in B cell-derived neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol.* 134 (5), 726–733. <https://doi.org/10.1309/AJCP38XRRUGSQVOC>.
- Dorfman, D.M., Shahsafaei, A., 2011. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) is expressed by follicular T helper cells and in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 35 (1), 76–83.
- Douds, J.J., Long, D.J., Kim, A.S., Li, S., 2014. Diagnostic and prognostic significance of CD200 expression and its stability in plasma cell myeloma. *J. Clin. Pathol.* 67 (9), 792–796. <https://doi.org/10.1136/jclinpath.2014.202421>.
- Feuer, R., 2007. Tackling the CD200 receptor: a remedy for those irritating macrophages. *Am. J. Pathol.* 171 (2), 396–398. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070474>.
- Gorczyński, R.M., Lee, L., Boudakov, I., 2005. Augmented induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation* 79 (4), 488–491. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000152118.51622.F9>.
- Ho, J.M., Dobson, S.M., Voisin, V., et al., 2020. CD200 expression marks leukemia stem cells in human AML. *Blood Adv.* 4 (21) <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001802>.
- Hoek, R.H., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., et al., 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* (80), 290 (5497), 1768–1771. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1768>.
- Jadidi-Niaragh, F., Yousefi, M., Memarian, A., et al., 2013. Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest.* 31 (2), 121–131. <https://doi.org/10.3109/07357907.2012.756110>.
- Jennah, M.C., Cherwinski, H., Bowman, E.P., Phillips, J.H., Sedgwick, J.D., 2006. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J. Immunol.* 176 (1), 191–199. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.191>.
- Kim, K., Kong, S.Y., Fulciniti, M., et al., 2010. Blockade of the MEK/ERK signalling cascade by AS703026, a novel selective MEK1/2 inhibitor, induces pleiotropic anti-myeloma activity in vitro and in vivo. *Br. J. Haematol.* 149 (4), 537–549. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08127.x>.
- Koning, N., Van Eijk, M., Pouwels, W., et al., 2010. Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. *J. Innate Immun.* 2 (2), 195–200. <https://doi.org/10.1159/000252803>.
- Kotwicz, K., Jodłowska Jędrzych, B., Mojszycz, M., 2021. Cd200: Cd200r interactions and their importance in immunoregulation. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22041602>.
- Kretz-Rommel, A., Bowdish, K.S., 2008. Rationale for anti-CD200 immunotherapy in B-CLL and other hematologic malignancies: new concepts in blocking immune suppression. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8 (1), 5–15. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.1.5>.
- Kretz-Rommel, A., Qin, F., Dakappagari, N., et al., 2007. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to Cancer immunotherapy. *J. Immunol.* 178 (9) <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5595>.
- Liao, K.L., Bai, X.F., Friedman, A., 2013. The role of CD200-CD200R in tumor immune evasion. *J. Theor. Biol.* 328, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.03.017>.
- Liu, J., Hu, A., Zhu, J., et al., 2021. CD200-CD200R pathway in the regulation of tumor immune microenvironment and immunotherapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1223, 155–165. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-35582-1>.
- Liu, J., Lu, J., Chen, W., et al., 2016. More frequent IgD and reduced CD200 expression in Chinese patients younger than 50 years old with multiple myeloma: a multicenter analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* 10, 3673–3679. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S100062>.
- Mahadevan, D., Lanasa, M.C., Farber, C., et al., 2019. Phase I study of samalizumab in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: blockade of the immune checkpoint CD200. *J. Immunother. Cancer* 7 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0710-1>.
- Memarian, A., Nourizadeh, M., Masouni, F., et al., 2013. Upregulation of CD200 is associated with Foxp3+ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. *J. Immunother. Enphasis Tumor Immunol.* 34 (1), 531–542. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0578-x>.
- Moreaux, J., Hose, D., Reme, T., et al., 2006. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 108 (13), 4194–4197. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-029355>.
- Moreaux, J., Veyrune, J.L., Reme, T., De Vos, J., Klein, B., 2008. CD200: A putative therapeutic target in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366 (1) <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.103>.
- Mulsin, Z., Al-Mudallal, S., 2018. Evaluation of the expression of CD200 and CD56 in CD34-positive adult acute myeloid leukemia and its effect on the response to induction of chemotherapy. *Iraqi J. Hematol.* 7 (1) <https://doi.org/10.4103/ijh.ijh.37.17>.
- Oda, S.K., Daman, A.W., Garcia, N.M., et al., 2017. A CD200R-CD28 fusion protein appropriates an inhibitory signal to enhance T-cell function and therapy of murine leukemia. *Blood* 130 (22), 2410–2419. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-777052>.
- Olteanu, H., Harrington, A.M., Hari, P., Kroft, S.H., 2011. CD200 expression in plasma cell myeloma. *Br. J. Haematol.* 153 (3), 408–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08555.x>.
- Olteanu, H., Harrington, A.M., Kroft, S.H., 2012. CD200 expression in plasma cells of nonmyeloma immunoproliferative disorders: Clinicopathologic features and comparison with plasma cell myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 138 (6), 867–876. <https://doi.org/10.1309/AJCP37QRT1TFHIGAS>.
- Rygiel, T.P., Meysaard, L., 2012. CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: a tricky balance. *Curr. Opin. Immunol.* 24 (2), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.002>.
- Shi, Q., Wu, C., Han, W., et al., 2020. Clinical significance of CD200 expression in newly diagnosed multiple myeloma patients and dynamic changing during treatment. *Leuk. Lymphoma*. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1839653>. Published online October 27.
- Snelgrove, R.J., Goulding, J., Didierlaurent, A.M., et al., 2008. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat. Immunol.* 9 (9), 1074–1083. <https://doi.org/10.1038/ni.1637>.

- Tiribelli, M., Raspadori, D., Geromin, A., et al., 2017. High CD200 expression is associated with poor prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, even in FLT3-ITD-/NPM1+ patients. *Leuk. Res.* 58 (February), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.04.001>.
- Tonks, A., Pearn, L., Musson, M., et al., 2007a. Transcriptional dysregulation mediated by RUNX1-RUNX1T1 in normal human progenitor cells and in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 21 (12), 2495–2505. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404961>.
- Tonks, A., Hills, R., White, P., et al., 2007b. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia [7]. *Leukemia* 21 (3), 566–568. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404559>.
- Ustun, C., Miller, J.S., Munn, D.H., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., 2011. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: Is it time for immunomodulation? *Blood* 118 (19), 5084–5095. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365817>.
- Wong, K.K., Khatri, L., Shaha, S., Spaner, D.E., Gorczynski, R.M., 2010. The role of CD200 in immunity to B cell lymphoma. *J. Leukoc. Biol.* 88 (2), 361–372. <https://doi.org/10.1189/jlb.1009686>.
- Xi, Chen J., Ping, Mei L., Guo, Chen B., et al., 2017. Over-expression of CD200 predicts poor prognosis in MDS. *Leuk. Res.* 56, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.01.021>.
- Zahran, A.M., Mohammed Saleh, M.F., Sayed, M.M., Rayan, A., Ali, A.M., Hetta, H.F., 2018. Up-regulation of regulatory T cells, CD200 and TIM3 expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Cancer Biomark.* 22 (3) <https://doi.org/10.3233/CBM-181368>.
- Renata Bartolomeu Staub** holds a BA in Biomedical Sciences from Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA) (2018). Master' student in Health Sciences at UFCSPA. Serves as Clinical Study Specialist 1 at the biggest CRO, ICON plc. Has experience in the field of clinical research, in clinical pathology with an emphasis in hematology, in STIs, in database maintenance and genetics.
- Natalia Aydos Marcondes** holds a BA in Biomedical Sciences from UFCSPA (2011), Master's in Medicine: Medical Sciences from the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) (2013) and p.H.D. in Medicine: Medical Sciences from UFRGS (2017). She is currently a medical laboratory scientist at Laboratório Zanol Ltda. She has experience in the field of Hematology with an emphasis on flow cytometry.
- Liane Nanci Rotta** is graduated in Biochemical Pharmacy from the Federal University of Santa Maria (UFSM) (1990), graduated in Biomedical Sciences from the Lutheran University of Brazil (ULBRA) (2011), Master in Biological Sciences (Biochemistry) from UFRGS (1997) and p.H.D. in Biological Sciences (Biochemistry) from UFRGS (2003). She is currently a professor at UFCSPA, working at undergraduate level (Pharmacy and Biomedicine) and at postgraduate level (Postgraduate Program in Health Sciences).

6. Conclusão

A expressão de CD200 avaliada por imunofenotipagem por citometria de fluxo se mostrou como um achado mais comum em LLA-T e LLA-ETP, ao passo que esse marcador não foi expresso na maioria das neoplasias T maduras, sugerindo que a avaliação deste marcador pode ser útil no diagnóstico diferencial dessas entidades distintas. CD200 foi mais prevalente naquelas amostras que apresentaram parâmetros laboratoriais condizentes com doenças precursoras. Do mesmo modo, a média de intensidade de fluorescência de CD200 se mostrou maior na leucemia de células T precursoras.

Estudos mais aprofundados e robustos são necessários, mas não se pode descartar o fato de que esses marcadores possam auxiliar no diagnóstico diferencial em doenças dos linfócitos T.

Anexos

Anexo A: Aprovação do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
Elaborado pela Instituição Coparticipante
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: Avaliação da expressão de CD200 e CD43 em linfoproliferações T e NK por citometria de fluxo
Pesquisador: Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 80989617.4.3005.5345
Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Patrocinador Principal: LABORATORIO ZANOL LTDA
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 4.766.814
Apresentação do Projeto:
"Trata-se de análise de resposta ao parecer pendente n. 4.710.287 emitido pelo CEP UFCSPA em 13/05/2021".
Resumo
Referencial teórico: CD200 ou OX-2 é uma glicoproteína transmembrana expressa em células T e B, monócitos, granulócitos e plaquetas, a expressão de CD200 em neoplasias parece ser associada a pior prognóstico. CD43 é uma proteína transmembrana expressa na superfície da maior parte das células hematopoéticas, incluindo linfócitos T, leucemias e neoplasias sólidas, a expressão de CD43 parece estar associada a tumorigênese, particularmente de neoplasias hematológicas. A avaliação da expressão de CD200 e CD43 nas diferentes neoplasias linfoides de linhagem T e NK pode vir a auxiliar no diagnóstico diferencial e no acompanhamento do tratamento. Objetivo: Avaliar a expressão de CD200 e CD43 em células de doenças linfoproliferativas de linhagem T/NK utilizando a técnica de citometria de fluxo. Delineamento experimental: Estudo transversal. Local de pesquisa: Laboratório Zanol. Pacientes: Cerca de 50 pacientes com diagnóstico de leucemia/linfoma linfoblástico T/NK e cerca de 70 pacientes com diagnóstico de doenças linfoproliferativas T/NK maduras. Procedimento experimental: Será realizada inclusão dos pacientes com diagnóstico das referidas neoplasias em que a expressão dos marcadores em estudo tenha sido avaliada. Os pacientes serão agrupados
Endereço: Rua Samento Leite, 245 CEP: 90.050-170 Bairro: Samento Município: PORTO ALEGRE UF: RS E-mail: cep@ufcspa.edu.br Telefone: (51) 3303-8804

Continuação do Parecer: 4.766.814

por tipo de neoplasia para fins de análise. Será realizada a revisão dos gráficos, com quantificação da expressão de CD200 e/ou CD43. Análise estatística: As diferenças entre grupos serão avaliadas por teste de ANOVA. Será considerado resultado significativo quando $p < 0,05$. Custo/benefício do projeto: Por não existirem muitos dados na literatura médica sobre a expressão de CD200 e CD43 nas neoplasias em estudo, espera-se que os resultados sejam complementares ao conhecimento dos perfis imunofenotípicos e auxiliares no diagnóstico e acompanhamento dessas doenças. Resultados esperados: Os marcadores terão expressões com intensidades variáveis nas diferentes neoplasias, facilitando o diagnóstico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a expressão de CD200 e CD43 em células de doenças linfoproliferativas de linhagem T e NK. **Objetivo Secundário:** - Estabelecer relação entre a expressão dos marcadores em estudo nas células de doenças hematológicas e nas células normais correspondentes. - Avaliar a expressão dos marcadores em estudo em células de LLA T e NK, no diagnóstico e em avaliações pós tratamento. - Avaliar a expressão dos marcadores em estudo em células de doenças linfoproliferativas T e NK maduras, no diagnóstico e em avaliações pós tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente estudo não acarreta em riscos aos pacientes. As amostras não serão coletadas especificamente para realização das análises do projeto, sendo utilizados os gráficos provenientes do diagnóstico dos pacientes.

Benefícios:

Por não existirem muitos dados na literatura médica sobre a expressão de CD200 e CD43 nas neoplasias em estudo, espera-se que os resultados sejam complementares ao conhecimento dos perfis imunofenotípicos e auxiliares no diagnóstico e acompanhamento dessas doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme carta resposta, referente ao projeto intitulado "Avaliação da expressão de CD200 e CD43 em linfoproliferações T e NK por citometria de fluxo", anexada à PB em 14/05/2021, pelo pesquisador responsável Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber, foram encaminhadas as justificativas

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51) 3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 4.766.814

às pendências do parecer CEP UFCSPA Nº 4.710.287, bem como os seguintes documentos:

- 1) Termo de anuência assinado pelo Dr. Flavo Beno Fernandes, diretor do Laboratório Zanol, onde se dá a parte metodológica do trabalho;
- 2) O termo de entrega de relatório com entrega alterada para frequência semestral;
- 3) Termo de compromisso de utilização de dados e termo de compromisso para utilização de material biológico e informações associadas, com a inclusão de Renata Bartolomeu Staub, na equipe de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise da carte-resposta e documentação encaminhada, todas as pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1666409.pdf	14/05/2021 10:08:48		Aceito
Outros	Resposta_CEP_maio2021.pdf	14/05/2021 10:08:10	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Termo_Material_Biologico_maio2021.pdf	14/05/2021 10:07:35	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Termo_utilizacao_dados_maio2021.pdf	14/05/2021 10:06:47	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Termo_relatorio_semestral_e_final_maio2021.pdf	14/05/2021 10:06:28	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Resposta_CEP.pdf	17/04/2021 16:46:03	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Termo_relatorio_semestral_final.pdf	17/04/2021 16:45:40	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 91.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51) 3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 4.766.814

Outros	Termo_utilizacao_dados.pdf	17/04/2021 16:44:56	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Termo_Material_Biologico.pdf	17/04/2021 16:44:16	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia.pdf	17/04/2021 16:43:11	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Delegacao.pdf	17/04/2021 16:42:33	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Termo_compromisso_entrega_relatorio_final.doc	19/11/2020 15:37:53	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Carta_de_justificativa_da_emenda.docx	05/11/2020 17:11:35	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Justificativa_da_emenda.pdf	15/04/2020 11:10:18	NATÁLIA AYDOS MARCONDES	Aceito
Outros	Carta_de_justificativa.pdf	21/11/2019 11:37:06	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
Outros	Resposta_CEP.docx	11/01/2018 12:21:59	NATÁLIA AYDOS MARCONDES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_atualizado.doc	11/01/2018 12:20:12	NATÁLIA AYDOS MARCONDES	Aceito
Outros	Formulario_Delegacao_Funcoes.pdf	08/12/2017 16:44:10	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TCLE.pdf	04/12/2017 15:23:46	Gustavo Adolpho Moreira Faulhaber	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 10 de Junho de 2021

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51) 3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br