

Biomarcadores en anemia aplásica.

Biomarkers in aplastic anemia.

Anggy Valentina Soto-Manzano^{1,a}, Samuel Giraldo-Jiménez^{1,a}, Luis Miguel Flórez-Castaño^{1,a},
Julián David Caballero-Henao^{1,a}, Mateo Uribe-Ramírez^{1,a}, Lina María Martínez-Sánchez^{2,a}

1. Estudiante de Medicina.
 2. Bacterióloga, Especialista en Hematología, Magister en Educación, Profesora Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina.
- a. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana (Colombia)

CORRESPONDENCIA

Luis Miguel Flórez Castaño
ORCID ID <https://orcid.org/0000-0003-1088-1334>
Universidad Pontificia Bolivariana (Colombia)
E-mail: luis.florezc@upb.edu.co

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores del artículo hacen constar que no existe, de manera directa o indirecta, ningún tipo de conflicto de intereses que pueda poner en peligro la validez de lo comunicado.

RECIBIDO: 03 de mayo de 2023.

ACEPTADO: 30 de septiembre de 2023.

RESUMEN

Objetivo: Ampliar el conocimiento que se tiene sobre la anemia aplásica, la implicación de los biomarcadores diagnósticos y el uso de los mismos. **Materiales y métodos:** Se realizó una revisión de la literatura en la base de datos PubMed y Elsevier, usando palabras claves como "anemia aplásica", "biomarcadores" y "anemia". **Resultados:** Después de revisar la información, se ha concluido que existen varios biomarcadores útiles en la anemia aplásica. Se han descubierto diversas moléculas nuevas que también resultan beneficiosas en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad, las cuales contribuyen activamente a la insuficiencia hematopoyética, tales como la edad, el sexo, citoquinas como la Trombopoyetina (TPO), el interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 8 (IL-8), IL-12p70, IL17, IL-23 e IL-27, entre otros. **Conclusiones:** Se evidenció que las citoquinas tienen un papel importante en el proceso de falla de la médula, por su papel como citoquinas anti hematopoyéticas, lo cual es importante para la progresión de la enfermedad y evaluar el nivel de compromiso de la médula ósea. Adicionalmente los miARN son biomarcadores de importancia clínica en el desarrollo de la anemia aplásica, ya que en diversos estudios se evidencia que estos están implicados en la modulación de la expresión génica, lo que podría ser un nuevo enfoque terapéutico para estos pacientes, el único obstáculo, es la disponibilidad de las técnicas en la práctica clínica.

Palabras clave: Biomarcadores, anemia, anemia aplásica.

ABSTRACT

Objective: To broaden the knowledge that we have about aplastic anemia, the implication of diagnostic biomarkers and their use. **Materials and methods:** A review of the literature was carried out in the PubMed and Elsevier databases, using keywords such as "aplastic anemia", "biomarkers" and "anemia". **Results:** After reviewing the data, it has been concluded that there are several useful biomarkers in aplastic anemia. Several new molecules have been discovered that are also beneficial in the diagnosis and prognosis of this disease, which actively contribute to hematopoietic failure, such as age, gender, cytokines like Thrombopoietin (TPO), interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 (IL-8), IL-12p70, IL17, IL-23 and IL-27, among others. **Conclusions:** It was evidenced that cytokines have an important role in the marrow failure process, due to their role as anti-hematopoietic cytokines, which is important for the progression of the disease and to evaluate the level of bone marrow compromise. Additionally, miRNAs are biomarkers of clinical importance in the development of aplastic anemia, since various studies show evidence that they are involved in the modulation of gene expression, which could be a new therapeutic approach for these patients, the only obstacle, is the availability of techniques in clinical practice.

Key words: Biomarkers, anemia, anemia aplastic.

Soto-Manzano AV, Giraldo-Jiménez S, Flórez-Castaño LM, Caballero-Henao JD, Uribe-Ramírez M, Martínez-Sánchez L. Biomarcadores en anemia aplásica. *Salutem Scientia Spiritus* 2023; 9(4):47-52.



La Revista *Salutem Scientia Spiritus* usa la licencia Creative Commons de Atribución – No comercial – Sin derivar:

Los textos de la revista son posibles de ser descargados en versión PDF siempre que sea reconocida la autoría y el texto no tenga modificaciones de ningún tipo.

INTRODUCCIÓN

La anemia aplásica (AA) es un desorden hematológico raro, que se caracteriza por la disminución abrupta en la producción de todas las líneas celulares en la médula ósea (pancitopenia), dicha reducción en la formación de células sanguíneas es la responsable del término “aplásica”. El fallo hematopoyético es el efecto final de diversos mecanismos fisiopatológicos entre los que se incluye la hiperactividad de las células T.^{1,2}

Las tasas de incidencia en Europa y Estados Unidos son de 0,8 y 1,5 casos nuevos por millón, respectivamente, dos o tres veces más que en Asia. La etiología no está clara, pero muchos estudios han informado de que los factores genéticos y ambientales son los determinantes de la susceptibilidad a la anemia aplásica. Mientras tanto, algunos estudios han indicado que los componentes genéticos de la respuesta inmunitaria y el sistema de antígenos leucocitarios humanos tienen una correlación positiva en diferentes grupos étnicos en particular.³ Diversos estudios han señalado que algunos alelos del antígeno leucocitario humano (HLA) están asociados a la anemia aplásica. Los genes HLA se localizan en el cromosoma 6p2.13 y codifican las proteínas principales del complejo de histocompatibilidad humano. En un estudio realizado en Japón se examinaron los alelos HLA de 74 pacientes con AA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas serológicas, en dicho estudio, reportaron que, en comparación con los individuos sanos, la frecuencia de los alelos DRB1*15 (56,8%) y DQB1*06 (70,3%) era mayor en los pacientes con AA. Basándose en múltiples estudios, se determinó que DRB1*15, DRB1*03, DQB1*0601 y DQB1*0603 eran alelos protectores.⁴

La presentación clínica de la anemia aplásica varía entre una enfermedad aguda potencialmente mortal (grave) y una enfermedad debilitante progresiva (moderada). Varios agentes, entre ellos numerosos fármacos, virus, radiaciones ionizantes y sustancias químicas, sobre todo el benceno, han sido implicados en el desarrollo de la patología.⁵

La anemia aplásica adquirida idiopática suele ser un diagnóstico de exclusión después de descartar trastornos hereditarios, síndromes mielodisplásicos adquiridos, infecciones, enfermedades metabólicas o deficiencias nutricionales. En contraste con los síndromes de displasias celulares en ancianos, la mayoría de los casos de citopenia refractaria de la infancia, el subtipo más común de síndromes mielodisplásicos pediátrico, son hipocelulares con un cariotipo normal.⁶

FISIOPATOLOGÍA DE LA ANEMIA APLÁSICA

Existen múltiples estados relacionados con la insuficiencia de la médula ósea, dentro de estos se encuentra: la anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, aplasia eritrocítica pura, y mieloptosis.⁷

La anemia aplásica se define como una pancitopenia con reducción del número de células en la médula ósea por la incapacidad de esta para producir líneas celulares sanguíneas,⁸ es por ello que la mayoría de pacientes con esta patología cursan con disminución de plaquetas, glóbulos blancos y eritrocitos, que conllevan a una falla hematopoyética, resultado de diversos mecanismos fisiopatológicos. La anemia aplásica puede ser constitutiva/heredada, es decir, asociada a otra patología o adquirida secundaria a un evento durante la vida,² Fisiopatológicamente, existen tres posibles escenarios que podrían explicar la afectación de la médula ósea:

DAÑO DIRECTO A LA MÉDULA

Ocurre principalmente por causas iatrogénicas, como la radioterapia o quimioterapia, generando efectos que varían dependiendo a la dosis del tratamiento y condiciones del individuo.^{9,10} El benceno, es otro protagonista externo de daño medular, que altera directamente el proceso hematopoyético, este daño depende directamente del grado y tiempo de exposición. Sin embargo, la exposición industrial en la actualidad ha descendido exponencialmente, representando un porcentaje muy bajo de pacientes con anemia aplásica secundaria al benceno; exceptuando China, país donde el benceno continúa siendo una toxina presente en áreas de trabajo local.^{11,12}

PATOLOGÍA CONSTITUCIONAL

La insuficiencia de la médula puede originarse como resultado de mutaciones específicas en el ADN, que afectan la línea germinal y por consiguiente genera pérdida de sus funciones.^{13,14} Estas lesiones genéticas, que en su mayoría son hereditarias, disminuyen la capacidad de las células madre hematopoyéticas para la reparación y corrección del material genético, como es el caso de la anemia de Fanconi (remoción dependiente de la replicación de los enlaces cruzados del ADN), disqueratosis congénita (afectación del mantenimiento y acortamiento de telómeros) y deficiencia del GATA2 (afectación en las vías de diferenciación y autorrenovación).¹⁵⁻¹⁷

Por otra parte, la insuficiencia medular puede ocurrir en síndromes que afectan la regulación inmunitaria, por ejemplo, aquellos que afectan el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos o la deficiencia de adenosina desaminasa 2 (DADA2).^{18,19} Adicionalmente, nuevos resultados muestran que en algunos casos con anemia aplásica (AA) aparentemente adquirida existen mutaciones subyacentes en los genes del complejo telomerasa/shelterina, que predisponen a la aparición de insuficiencia hematopoyética.²⁰

Los síndromes constitucionales en su mayoría aparecen en la infancia con manifestaciones físicas, involucrando múltiples órganos o pueden revelarse en la edad adulta sin características típicas. El reconocimiento de la alteración de una línea germinal

es fundamental para guiar el tratamiento y erradicar las consecuencias de la enfermedad en el paciente y en la línea familiar.^{6,21}

ANEMIA APLÁSICA INMUNE

Algunos casos de anemia aplásica suelen ser explicados por causas autoinmunes, la evidencia demuestra que, tras suministrarles una terapia inmunosupresora variada, la mejoría en el recuento celular es significativa.²² Por consiguiente, se encuentra asociada a enfermedades inmunológicas como la hepatitis seronegativa, o la fascitis eosinofílica, pero lastimosamente, otro número de casos no evidencia una causa real, siendo idiopática.^{23,24}

BIOMARCADORES EN ANEMIA APLÁSICA

Existen marcadores que pueden proporcionar información para la toma de decisiones clínicas; sin embargo, ninguno ha sido ampliamente aceptado en la práctica clínica. Los biomarcadores tienen utilidad en la predicción de la respuesta a los inmunosupresores, pronósticos y selección del tratamiento individual.²⁵ Entre los biomarcadores clínicos se encuentran las citoquinas y los recuentos celulares, estos pueden orientar en el curso de la enfermedad para la toma de decisiones (Tabla 1).

Los microARN (miARN) son ARN cortos no codificantes que regulan la expresión génica a través de una unión al ARN mensajeros (ARNm), que ocasiona una represión traduccional.^{36,37} Desde su identificación la comprensión de las funciones de estas moléculas ha incrementado para conocer su participación en la regulación tanto de la función celular normal como de numerosos procesos patológicos.^{36,38}

Los miARN circulantes se pueden medir en la sangre, y representan nuevos biomarcadores de importancia tanto para el diagnóstico de enfermedades como para la evaluación de las respuestas terapéuticas (Tabla 2).³⁶

Otros biomarcadores relacionados con la anemia aplásica son:

1. Autoanticuerpo contra la COX-2 (aCOX-2 Ab): El aCOX-2 Ab se define como un biomarcador potencial de enfermedad clínica, ya que muestra buena sensibilidad y especificidad, además un bajo costo y es fácil de realizar utilizando plataformas técnicas y logísticas preexistentes en laboratorios clínicos.⁴³
2. Apolipoproteína-A (Apo-A): La Apo-A sérica es un biomarcador de pronóstico para pacientes menores de 60 años con diagnóstico reciente de anemia aplásica que recibieron tratamiento inmuno supresor basado en anti-timoglobulina.⁴⁴
3. Inmunoglobulina A (IgA): Los niveles de IgA también pueden ser un indicador de la respuesta al tratamiento inmunosupresor.⁴⁴

Tabla 1. Biomarcadores para la predicción terapéutica.

| Biomarcador | Características |
|-----------------------|---|
| Edad | A menor edad mejor respuesta al tratamiento. ^{25,26} |
| Sexo | Mejor respuesta al tratamiento en el sexo femenino. ^{25,27} |
| Recuentos celulares | Predice una respuesta y supervivencia en pacientes con tratamiento inmunosupresor. ^{25,27,28} |
| Citoquinas | Sobreproducción de citoquinas como la Trombopoyetina (TPO), el interferón gamma (IFN-γ), factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), interleucina 8 (IL-8), IL-12p70, IL17, IL-23 e IL-27. ²⁹⁻³² |
| Osteonectina | Soporte en el crecimiento de células T. ³³ |
| Proteínas reguladoras | Disminuyen su expresión como la p-quinaasa regulada por señal extracelular (p-ERK) y la escurfina (FoxP3). ³⁴ |
| Tamaño del telómero | Hay un acortamiento significativo de los telómeros en los linfocitos, se presume que puede ser secundario al estrés hematopoyético. ³⁵ |

Tabla 2. miARN en anemia aplásica.

| miARN | Implicación en la anemia |
|--------------------------|--|
| miR-1 | Disminuye en la anemia aplásica, puede desempeñar un papel en la autoinmunidad. ^{36,39} |
| miR-150-5p | Marcador de Respuestas al tratamiento de la inmunosupresión. ^{36,40} |
| miR-146b-5p | Es útil para el diagnóstico. ⁴⁰ |
| miR-126-3p miR-145-5p | Se relacionan con niveles elevados de MYC (familia de protooncogenes) y PIK3R2 (La subunidad reguladora beta de la fosfatidilinositol 3-quinasa). ^{40,41} |
| miR-1202 | Se da regulación negativa de los genes manosidasaendoalfa (MANEA) y el gen RAPGEF5 que codifica el factor de intercambio de nucleótidos de guanina rap 5. ^{31,42} |

4. Fractalquina y neurotactina (CX3CL1): En la anemia aplásica puede aumentar la liberación de CX3CL1 por células endoteliales activas, este aumento contribuye con la patogénesis, mediante el reclutamiento de células T (CX3CR1+) de sangre periférica.^{31,45}

CONCLUSIONES

En general la anemia aplásica es una enfermedad de origen autoinmune que se caracteriza por presentar pancitopenia en la médula ósea y sangre periférica. En esta los procesos inflamatorios están aumentados y esto, sumado a la acción del sistema inmune generan daños considerables a la médula ósea. Las células madre presentan defectos cualitativa y cuantitativamente lo que junto con otros factores influye en la progresión de esta patología.³¹ Para una mejor atención y enfoque de esta enfermedad, es necesario tener en cuenta diversos análisis para el tratamiento adecuado y oportuno de cada paciente, esto con el fin de mejorar el pronóstico y la calidad de vida.⁴⁶

Las citoquinas tienen un papel importante en el proceso de falla de médula ósea ya que se sabe que el INF- γ , y el TNF α se les conoce como citoquinas anti hematopoyéticas, lo cual es importante para la progresión de la enfermedad y evaluar el nivel de compromiso de la médula ósea. Un claro ejemplo de esto es que se ha evidenciado una elevación de los niveles séricos y en médula ósea de INF- γ y en los pacientes con anemia aplásica adquirida.^{47,48}

Los miARN son biomarcadores de importancia clínica en el desarrollo de la anemia aplásica, ya que en diversos estudios se evidencia que estos están implicados en la modulación de la expresión génica, lo que podría ser un nuevo enfoque terapéutico para estos pacientes. Cada vez tenemos más evidencia que señala que los miARN circulantes cumplen funciones en la regulación del metabolismo de las células cancerígenas, la respuesta inmune y alteración en los procesos tumorales. Sin embargo, en la práctica clínica el uso de miARN es incierto, debido a la dificultad en la realización de la técnica.⁴⁹

En la literatura se ha reportado que la sobreexpresión de algunos miARN se asocia con la aparición de anemia aplásica y también están implicados en una supresión o disminución en la expresión de algunos genes, lo que empeoraría el pronóstico.⁴²

REFERENCIAS

1. Wu Y, Yan L, Wang H, Liu H, Xing L, Fu R, *et al.* Clinical study on empirical and diagnostic-driven (pre-emptive) therapy of voriconazole in severe aplastic anaemia patients with invasive fungal disease after intensive immunosuppressive therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021; 40(5):949-54. DOI: 10.1007/s10096-020-04054-9.
2. Young NS. Aplastic Anemia. *N Engl J Med.* 2018; 379(17):1643-56. DOI: 10.1056/NEJMra1413485
3. Deng XZ, Du M, Peng J, Long JX, Zheng CJ, Tan Y, *et al.* Associations between the HLA-A/B/DRB1 polymorphisms and aplastic anemia: evidence from 17 case-control studies. *Hematology.* 2018; 23(3):154-62. DOI: 10.1080/10245332.2017.1375064
4. Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, *et al.* Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood.* 2017; 129(21):2908-16. DOI: 10.1182/blood-2016-11-752378
5. Gross SA, Irons RD, Schnatter AR, Ryder J, Wang XQ, *et al.* A hospital-based case control study of aplastic anemia in Shanghai, China. *Chem Biol Interact.* 2010; 184(1-2):165-73. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.12.015
6. Keel SB, Scott A, Sanchez-Bonilla M, Ho PA, Gulsuner S, Pritchard CC, *et al.* Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients. *Haematologica.* 2016; 101(11):1343-50. DOI: 10.3324/haematol.2016.149476.
7. García Iglesias MF, Bernardino de la Serna JI, Díez Porres L, Mora Rillo M, Lavilla Uriol P, Gil Aguado A. Un paciente con anemia. *Medicina Integral.* Elsevier. 2001; 38(1):8-17.
8. Peffault de Latour R, Kulasekararaj A, Iacobelli S, Terwel SR, Cook R, Griffin M, *et al.* Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Eltrombopag Added to Immunosuppression in Severe Aplastic Anemia. *N Engl J Med.* 2022; 386(1):11-23. DOI: 10.1056/NEJMoa2109965.
9. Issaragrisil S, Kaufman DW, Anderson T, Chansung K, Leaverton PE, Shapiro S, *et al.* The epidemiology of aplastic anemia in Thailand. *Blood.* 2006; 107(4):1299-307. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0161.
10. Young NS. Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med.* 2002; 136(7):534-46. DOI: 10.7326/0003-4819-136-7-200204020-00011.
11. Chen J, Liu W, Yu W, Chen L, Wu J, Zhan Y, *et al.* A novel cell-based therapy for patients with aplastic anemia. *Cytherapy.* 2010; 12(5):678-83. DOI: 10.3109/14653241003695000.
12. Maluf E, Hamerschlag N, Cavalcanti AB, Júnior AA, Eluf-Neto J, Falcão RP, *et al.* Incidence and risk factors of aplastic anemia in Latin American countries: the LATIN case-control study. *Haematologica.* 2009; 94(9):1220-6. DOI: 10.3324/haematol.2008.002642.
13. Atmar K, Ruivenkamp CAL, Hooimeijer L, Nibbeling EAR, Eckhardt CL, Huisman EJ, *et al.* Diagnostic Value of a Protocolized In-Depth Evaluation of Pediatric Bone Marrow Failure: A Multi-Center Prospective Cohort Study. *Front Immunol.* 2022; 13:883826. DOI: 10.3389/fimmu.2022.883826.
14. Deng J, McReynolds LJ. Inherited bone marrow failure syndromes: a review of current practices and potential future research directions. *Curr Opin Pediatr.* 2023; 35(1):75-83. DOI: 10.1097/MOP.0000000000001196.
15. Walne AJ, Vulliamy T, Bewicke-Copley F, Wang J, Alnajjar J, Bridger MG, *et al.* Genome-wide whole-blood transcriptome profiling across inherited bone marrow failure subtypes. *Blood Adv.* 2021; 5(23):5360-71. DOI: 10.1182/bloodadvances.
16. Dong H, Nebert DW, Bruford EA, Thompson DC, Joenje H, Vasiliou V, *et al.* Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum Genomics.* 2015; 9:32. DOI: 10.1186/s40246-015-0054-y.

17. Tholouli E, Sturgess K, Dickinson RE, Gennery A, Cant AJ, Jackson G, *et al.* In vivo T-depleted reduced-intensity transplantation for GATA2-related immune dysfunction. *Blood*. 2018; 131(12):1383-87. DOI: 10.1182/blood-2017-10-811489.
18. Giri N, Alter BP, Penrose K, Falk RT, Pan Y, Savage SA, *et al.* Immune status of patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Am J Hematol*. 2015; 90(8):702-8. DOI: 10.1002/ajh.24046.
19. Michniacki TF, Hannibal M, Ross CW, Frame DG, DuVall AS, Khoriaty R, *et al.* Hematologic Manifestations of Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2) and Response to Tumor Necrosis Factor Inhibition in DADA2-Associated Bone Marrow Failure. *J Clin Immunol*. 2018; 38(2):166-73. DOI: 10.1007/s10875-018-0480-4.
20. Schrezenmeier H, Körper S, Höchsmann B. Aplastische Anämie [Aplastic anemia]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2014; 139(49):2503-6. German. DOI: 10.1055/s-0034-1387407.
21. Bluteau O, Seberr M, Leblanc T, Peffault de Latour R, Quentin S, Lainey E, *et al.* A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood*. 2018; 131(7):717-32. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806489.
22. Zhang L, Ni R, Li J, Fan L, Song Y, Wang H, *et al.* Dioscin Regulating Bone Marrow Apoptosis in Aplastic Anemia. *Drug Des Devel Ther*. 2022; 16:3041-53. DOI: 10.2147/DDDT.S370506.
23. Kanamitsu K, Chayama K, Washio K, Yoshida R, Umeda Y, Yagi T, *et al.* Long-term Remission of Hepatitis-associated Aplastic Anemia Possibly due to Immunosuppressive Therapy after Liver Transplantation. *Acta Med Okayama*. 2018; 72(5):515-18. DOI: 10.18926/AMO/56250.
24. de Masson A, Bouaziz JD, de Latour RP, Benhamou Y, Moluçon-Chabrot C, Bay JO, *et al.* Severe aplastic anemia associated with eosinophilic fasciitis: report of 4 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2013; 92(2):69-81. DOI: 10.1097/MD.0b013e3182899e78.
25. Narita A, Kojima S. Biomarkers for predicting clinical response to immunosuppressive therapy in aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2016; 104(2):153-8. DOI: 10.1007/s12185-016-2009-z.
26. Scheinberg P. Prognostic value of telomere attrition in patients with aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2013; 97(5):553-7. DOI: 10.1007/s12185-013-1332-x.
27. Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, *et al.* Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2011; 96(5):771-4. DOI: 10.3324/haematol.2010.032805.
28. Chang MH, Kim KH, Kim HS, Jun HJ, Kim DH, Jang JH, *et al.* Predictors of response to immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine and prognostic factors for survival in patients with severe aplastic anemia. *Eur J Haematol*. 2010; 84(2):154-9. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2009.01378.x.
29. Sloand E, Kim S, Maciejewski JP, Tisdale J, Follmann D, Young NS. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood*. 2002; 100(4):1185-91. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0035.
30. Kojima S, Matsuyama T, Koderia Y, Tahara T, Kato T. Measurement of endogenous plasma thrombopoietin in patients with acquired aplastic anaemia by a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol*. 1997; 97(3):538-43. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1997.992915.x.
31. Javan MR, Saki N, Moghimian-Boroujeni B. Aplastic anemia, cellular and molecular aspects. *Cell Biol Int*. 2021; 45(12):2395-2402. DOI: 10.1002/cbin.11689.
32. Zhang J, Wu Q, Shi J, Ge M, Li X, Shao Y, *et al.* Involvement of interleukin-21 in the pathophysiology of aplastic anemia. *Eur J Haematol*. 2015; 95(1):44-51. DOI: 10.1111/ejh.12471.
33. Park M, Park CJ, Jang S, Kim DY, Lee JH, Lee JH, *et al.* Reduced expression of osteonectin and increased natural killer cells may contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015; 23(2):139-45. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000023.
34. Li H, Wang L, Pang Y, Jiang Z, Liu Z, Xiao H, *et al.* In patients with chronic aplastic anemia, bone marrow-derived MSCs regulate the Treg/Th17 balance by influencing the Notch/RBP-J/FOXP3/ROR γ t pathway. *Sci Rep*. 2017; 7:42488. DOI: 10.1038/srep42488.
35. Brümmendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood*. 2001; 97(4):895-900. DOI: 10.1182/blood.v97.4.895.
36. Bell JB, Abedin S, Plataniias LC. Circulating microRNAs: promising biomarkers in aplastic anemia. *Haematologica*. 2017; 102(1):1-2. DOI: 10.3324/haematol.2016.156117.
37. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA. *Cell*. 2013; 153(3):516-9. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.003.
38. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
39. Takyar S, Vasavada H, Zhang JG, Ahangari F, Niu N, Liu Q, *et al.* VEGF controls lung Th2 inflammation via the miR-1-Mpl (myeloproliferative leukemia virus oncogene)-P-selectin axis. *J Exp Med*. 2013; 210(10):1993-2010. DOI: 10.1084/jem.20121200.
40. Hosokawa K, Kajigaya S, Feng X, Desierto MJ, Fernandez Ibanez MD, Rios O, *et al.* A plasma microRNA signature as a biomarker for acquired aplastic anemia. *Haematologica*. 2017; 102(1):69-78. DOI: 10.3324/haematol.2016.151076.
41. Hosokawa K, Muranski P, Feng X, Keyvanfar K, Townsley DM, Dumitriu B, *et al.* Identification of novel microRNA signatures linked to acquired aplastic anemia. *Haematologica*. 2015; 100(12):1534-45. DOI: 10.3324/haematol.2015.126128.
42. Adhikari S, Mandal P. Integrated analysis of global gene and microRNA expression profiling associated with aplastic anaemia. *Life Sci*. 2019; 228:47-52. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.04.045.
43. Kelkka T, Tyster M, Lundgren S, Feng X, Kerr C, Hosokawa K, *et al.* Anti-COX-2 autoantibody is a novel biomarker of immune

- aplastic anemia. *Leukemia*. 2022; 36(9):2317-27. DOI: 10.1038/s41375-022-01654-6.
44. Liu Q, Dong H, Li Y, Shen Y, Hong Y, Chen Y, *et al.* Apolipoprotein-A is a potential prognostic biomarker for severe aplastic anemia patients treated with ATG-based immunosuppressive therapy: a single-center retrospective study. *Lipids Health Dis*. 2022; 21(1):93. DOI: 10.1186/s12944-022-01703-0.
 45. Ren J, Hou XY, Ma SH, Zhang FK, Zhen JH, Sun L, *et al.* Elevated expression of CX3C chemokine receptor 1 mediates recruitment of T cells into bone marrow of patients with acquired aplastic anaemia. *J Intern Med*. 2014; 276(5):512-24. DOI: 10.1111/joim.12218.
 46. Wang L, Liu H. Pathogenesis of aplastic anemia. *Hematology*. 2019; 24(1):559-66. DOI: 10.1080/16078454.2019.1642548.
 47. Chen X, Zhang Y, Zhang Y, Zhang Y, Wang S, Yu Z, *et al.* Increased IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ mucosal-associated invariant T cells in patients with aplastic anemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2023. DOI: 10.1002/cyto.b.22115.
 48. Shukla S, Tripathi AK, Verma SP, Awasthi N. Prognostic value of TNF-a-308 and IFN-g-874 single nucleotide polymorphisms and their plasma levels in patients with aplastic anemia. *Blood Res*. 2020; 55(4):193-99. DOI: 10.5045/br.2020.2020009.
 49. Giudice V, Banaszak LG, Gutierrez-Rodrigues F, Kajigaya S, Panjwani R, Ibanez MDPF, *et al.* Circulating exosomal microRNAs in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2018 ; 103(7):1150-59. DOI: 10.3324/haematol.2017.182824.