



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Tatiana Fonseca Alvarenga

**Análise morfológica e citogenética de medula óssea  
em pacientes com síndrome mielodisplásica primária**

Rio de Janeiro  
2011

Tatiana Fonseca Alvarenga

**Análise morfológica e citogenética de medula óssea  
em pacientes com síndrome mielodisplásica primária**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Faria Ornellas de Souza

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Teresa de Souza Fernandez

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A473 Alvarenga, Tatiana Fonseca.  
Análise morfológica e citogenética de medula óssea em  
pacientes com síndrome mielodisplásica primária / Tatiana  
Fonseca Alvarenga. – 2011.  
100 f.: il.

Orientadora: Maria Helena Faria Ornellas de Souza  
Coorientadora: Teresa de Souza Fernandez.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Medula óssea - Teses. 2. Análise citogenética. 3. Medula  
óssea – patologia. 4. Síndromes mielodisplásicas. 5. Leucemia  
mieloide aguda – genética. I. Souza, Maria Helena Faria Ornellas  
de. II. Fernandez, Teresa de Souza. III. Universidade do Estado  
do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.71-008.46

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial  
desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Tatiana Fonseca Alvarenga

**Análise morfológica e citogenética de medula óssea  
em pacientes com síndrome mielodisplásica primária**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de Julho de 2011.

Orientadores:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Faria Ornellas de Souza  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas  
Instituto Nacional de Câncer - INCA

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Albanita Viana de Oliveira  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Stella Beatriz Sampaio Gonçalves de Lucena  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana Wernersbach Pinto  
Instituto Nacional de Câncer – INCA

Rio de Janeiro

2011

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, José Carlos, e à minha mãe, Fátima,  
pois em todos os momentos, de algum modo, sempre estão presentes.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM-UERJ).

Às orientadoras Maria Helena Faria Ornellas de Souza e Teresa de Souza Fernandez pela dedicação.

Às professoras Daurita Paiva e Luciana Wernersbach pelos ensinamentos e colaboração indispensáveis para que este trabalho fosse realizado.

À Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pelo acolhimento, em especial à professora Albanita Viana pelo apoio, e aos funcionários Eliomar, Márcia, Ana Paula, Maurício e Marilene pelo auxílio.

Ao Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pela colaboração, particularmente às professoras Christina Maioli e Stella Beatriz de Lucena.

À Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

À aluna de iniciação científica Ludmila Lacerda pela participação.

Agradeço a todos aqueles que ajudaram e apoiaram para que a construção deste trabalho fosse possível.

*É a música que a alma tem,  
É o perfume que vem,  
Vago, inútil, trazido  
Por uma brisa de agrado,  
Do fundo do que é esquecido,  
Dos jardins do passado*

Fernando Pessoa





## RESUMO

ALVARENGA, Tatiana Fonseca. *Análise morfológica e citogenética de medula óssea, em pacientes com síndrome mielodisplásica primária*. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A síndrome mielodisplásica primária (SMD) compreende um grupo de doenças hematopoéticas clonal de célula tronco pluripotente caracterizada por vários graus de pancitopenia e alterações morfológica das células hematopoéticas e risco aumentado de transformação para leucemia mielóide aguda. A citogenética e a morfologia da medula óssea desempenham um papel fundamental para o diagnóstico e o prognóstico desses pacientes. Alterações cromossômicas são encontradas em aproximadamente 30-50% dos casos. Devido à importância da análise desses fatores para escolha terapêutica, torna-se necessário definir as alterações morfológicas e citogenéticas que possam contribuir para o prognóstico. Esse trabalho visa correlacionar as características morfológicas e citogenéticas da medula óssea em pacientes com SMD primária com as classificações OMS e FAB e com o IPSS. Foram estudados 32 pacientes com SMD primária diagnosticados entre 2000 e 2009 no HUPE-UERJ. As características clínicas foram analisadas através do levantamento de prontuários. A análise citogenética foi feita pela técnica de bandeamento GTG em células da medula óssea. A análise morfológica da biópsia de medula óssea e do mielograma foram realizadas através da revisão de lâminas. Vinte e três pacientes foram classificados em estágios iniciais da doença (22 AR, 1 ARSA) e 9 em estágio avançado – AREB de acordo com a FAB. Alterações cromossômicas foram detectadas em 16 pacientes (50%). As mais frequentes foram: del(11)(q23) e del(17p). Dos pacientes com doença avançada, seis (66%) apresentaram aumento significativo da relação M:E ( $p=0,003$ ) e sete (77%) possuíam alterações arquiteturais acentuadas ( $p<0,001$ ) em comparação ao grupo de doença inicial. Pacientes classificados como intermediário 2 e alto risco pelo IPSS tiveram importante perda arquitetural ( $p<0,001$ ), número significativamente maior de micromegacariócitos ( $p=0,017$ ) e seis (85%) sofreram transformação leucêmica ( $p=0,006$ ). ALIP foi significativamente aumentada nos pacientes de pior prognóstico ( $p=0,021$ ) e naqueles com doença avançada ( $p=0,001$ ). Nossos resultados apresentaram implicações potenciais para o diagnóstico e o prognóstico da SMD primária. As alterações morfológicas foram associadas com as classificações FAB, OMS e com os grupos de risco segundo o IPSS.

Palavras-chave: Biópsia de medula óssea. Citogenética. OMS. FAB. IPSS.

## ABSTRACT

The primary myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of clonal bone marrow disorders characterized by varying degrees of pancytopenia and morphological abnormalities of hematopoietic cells, and an increased risk of transformation into acute myeloid leukemia. The morphology and the cytogenetic of bone marrow play a key role in the diagnosis and the prognosis. Chromosomal abnormalities are found in 30-50% of cases. Due to the importance of analyzing these factors for therapeutic choice, it becomes necessary to define the morphological and the cytogenetic changes which could contribute to the prognosis. The aim of this study was to analyze the morphological and cytogenetic features of bone marrow and their correlations with FAB and WHO classification and IPSS. We studied 32 patients with primary MDS between 2000 - 2009. The clinical data was recovered from medical records. Morphological characteristics were analyzed through a review of bone marrow biopsies and mielogram slides. Cytogenetic analysis was performed by GTG banding from bone marrow cells. The patients were classified according to FAB in initial stages: RA (22 patients) and RARS (1 patient) and nine in advanced stages - RAEB. Chromosomal abnormalities were detected in 16 patients (50%). The most frequent abnormalities were: del(11)(q23) and del(17p). Patients with advanced disease, six (66%) had significant increased M:E ratio ( $p=0.003$ ) and seven patients (77%) had increased architectural changes ( $p<0.001$ ). Patients classified as intermediary 2 and high risk according IPSS had important architectural loss ( $p<0.001$ ), presence of micromegakaryocyte was considered significant higher ( $p=0.017$ ) and six patients (85%) underwent leukemia transformation ( $p=0.006$ ). ALIP was significant higher in the patients with a worse prognosis ( $p=0.021$ ) and advanced stage of disease ( $p=0.001$ ). Our results showed potential implications for diagnosis and prognosis of MDS. The morphological findings in this study were associated with FAB and WHO groups and prognostic risk (IPSS).

Keywords: Bone marrow biopsies. Cytogenetic. WHO. FAB. IPSS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 -  | Topografia normal de cada linhagem celular na medula óssea.....  | 20 |
| Figura 2 -  | Micromegacariócito com hipolobulação nuclear ao lado de um megacariócito em um paciente com SMD primária.....  | 22 |
| Figura 3 -  | Displasia na linhagem eritróide.....   | 23 |
| Figura 4 -  | Displasia na linhagem granulocítica.....   | 24 |
| Figura 5 -  | Displasia na linhagem megacariocítica.....   | 25 |
| Figura 6 -  | Blastos tipo I, II e III no mielograma.....  | 25 |
| Figura 7 -  | Curva de Kaplan-Meier de acordo com os subgrupos da FAB.....   | 47 |
| Figura 8 -  | A Frequência de pacientes com SMD primária de acordo com o IPSS. Número de pacientes com evolução leucêmica e óbitos estratificados por grupo de risco.....            | 48 |
| Figura 9 -  | Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico pelo IPSS.....   | 49 |
| Figura 10 - | Cariótipo parcial de célula de medula óssea, bandeamento GTG.....  | 50 |
| Figura 11 - | Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico.....   | 52 |
| Figura 12 - | Exemplos de medula óssea hipercelular e hipocelular.....   | 53 |
| Figura 13 - | Curva de Kaplan-Meier de acordo com celularidade em biópsia de medula óssea.....   | 54 |
| Figura 14 - | Paciente com ARSA apresentando medula óssea hipercelular devido a hiperplasia eritróide.....   | 55 |
| Figura 15 - | Curva de Kaplan-Meier de acordo com relação mielóide:eritróide.....  | 57 |
| Figura 16 - | Paciente com AREB apresentando aumento da linhagem megacariocítica, sendo evidenciada pela imuno-histoquímica para CD61.....   | 58 |
| Figura 17 - | Curva de Kaplan-Meier de acordo com a quantificação de megacariócitos.....   | 59 |
| Figura 18 - | Paciente com ARSA apresentando megacariócitos hipolobulados atípicos agrupados (A). Micromegacariócito pela imuno-histoquímica para CD61 em paciente com AREB (B)..... | 60 |
| Figura 19 - | Curva de Kaplan-Meier de acordo com presença micromegacariócitos.....  | 61 |
| Figura 20 - | Curva de Kaplan-Meier de acordo com hipolobulação nuclear megacariocítica.....   | 63 |
| Figura 21 - | Medula óssea de paciente com AREB.....   | 64 |
| Figura 22 - | Curva de Kaplan-Meier de acordo com perda de orientação arquitetural.....  | 65 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 23 - Grupamento de células CD34 positivas - ALIP - e outras células isoladas marcadas pela imuno-histoquímica em medula óssea de paciente com AREB..... | 66 |
| Figura 24 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com presença de ALIP.....  | 67 |
| Figura 25 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de ALIP e de células CD34 positivas.....  | 69 |
| Figura 26 - Agrupamento de megaloblastos ao lado de um “nicho” de células eritróides.....  | 70 |
| Figura 27 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de megaloblastos.....   | 71 |
| Figura 28 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de alteração estromal.....  | 73 |
| Figura 29 - Sinusoide dilatado em biópsia de medula óssea.....   | 73 |
| Figura 30 - Coloração para reticulina, indicando fibrose medular (grau I).....   | 75 |
| Figura 31 - Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de fibrose medular.....   | 76 |
| Figura 32 - Distribuição do número de pacientes com SMD primária de acordo com o prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....                                    | 80 |

## LISTA DE TABELAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabela 1 -  | Classificação da síndrome mielodisplásica segundo os critérios propostos pelo grupo FAB em 1982.....  | 28 |
| Tabela 2 -  | Classificação da síndrome mielodisplásica segundo a proposta OMS em 2008.....   | 30 |
| Tabela 3 -  | Cariótipo sugestivo de SMD em citopenia idiopática de significado indeterminado (OMS, 2008).....  | 31 |
| Tabela 4 -  | Pontuação segundo os parâmetros críticos do IPSS em síndrome mielodisplásica (1997).....  | 32 |
| Tabela 5 -  | Pontuação segundo os parâmetros críticos do WPSS em síndrome mielodisplásica (2007).....  | 33 |
| Tabela 6 -  | Características clínicas e laboratoriais dos pacientes estudados com síndrome mielodisplásica primária.....   | 45 |
| Tabela 7 -  | Alterações citogenéticas nos pacientes com síndrome mielodisplásica classificados segundo o grupo FAB (1982) de acordo com o prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....     | 50 |
| Tabela 8 -  | Celularidade de pacientes com síndrome mielodisplásica primária pela fase da doença (FAB).....  | 54 |
| Tabela 9 -  | Relação mielóide:eritróide em pacientes com síndrome mielodisplásica primária agrupados pela fase da doença e pelo risco de evolução leucêmica (IPSS).....                  | 56 |
| Tabela 10 - | Relação da quantidade de megacariócitos em pacientes com síndrome mielodisplásica primária de acordo com a fase da doença e o risco de evolução leucêmica (IPSS).....       | 58 |
| Tabela 11 - | Alteração morfológica megacariocítica em pacientes com síndrome mielodisplásica primária agrupados pela fase da doença e pelo risco de evolução leucêmica (IPSS).....       | 62 |
| Tabela 12 - | Perda arquitetural em pacientes com síndrome mielodisplásica primária avaliados pela fase da doença e pelo risco de evolução leucêmica (IPSS).....                          | 65 |
| Tabela 13 - | Alteração morfológica na linhagem mielóide em pacientes com síndrome mielodisplásica primária de acordo com a fase da doença e pelo risco de evolução leucêmica (IPSS)..... | 68 |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 14 - Análise de megalo­blastos em pacientes com síndrome mielodisplásica primária pela fase da doença e pelo risco de evolução leucêmica (IPSS).....  | 70 |
| Tabela 15 - Alteração estromal em pacientes com síndrome mielodisplásica primária avaliada pela fase da doença e pelo risco de evolução leucêmica (IPSS).....  | 72 |
| Tabela 16 - Fibrose medular em pacientes com síndrome mielodisplásica primária de e sua associação com a fase da doença e o risco de evolução leucêmica (IPSS).....  | 75 |
| Tabela 17 - Comparação da celularidade medular e da relação mielóide:eritróide de pacientes com síndrome mielodisplásica primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea.....               | 77 |
| Tabela 18 - Comparação da presença de megalo­blastos em pacientes com síndrome mielodisplásica primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea.....   | 78 |
| Tabela 19 - Comparação entre a presença de ALIP pela biópsia de medula óssea e a porcentagem de blastos analisados pelo mielograma em pacientes com síndromes mielodisplásicas primária.....                   | 79 |
| Tabela 20 - Comparação das análises qualitativas e quantitativas da linhagem megacariocítica de pacientes com síndrome mielodisplásica primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea..... | 79 |
| Tabela 21 - Celularidade medular de pacientes com síndrome mielodisplásica primária avaliada pelo prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....   | 81 |
| Tabela 22 - Relação mielóide:eritróide em pacientes com síndrome mielodisplásica primária de acordo com o prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....   | 81 |
| Tabela 23 - Relação da quantidade de megacariócitos em pacientes com síndrome mielodisplásica primária pelo prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....   | 82 |
| Tabela 24 - Alteração morfológica megacariocítica em pacientes com síndrome mielodisplásica primária avaliada pelo prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....  | 83 |
| Tabela 25 - Perda arquitetural em pacientes com síndrome mielodisplásica primária de acordo com o prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....   | 83 |

|   |    |
|---|----|
| Tabela 26 - Alteração morfológica na linhagem mielóide em pacientes com síndrome mielodisplásica primária avaliada pelo prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....                  | 84 |
| Tabela 27 - Megaloblastos em pacientes com síndrome mielodisplásica primária de acordo com o prognóstico citogenético (IPSS, 1997).....   | 85 |
| Tabela 28 - Análise da alteração estromal e da fibrose medular em pacientes com síndrome mielodisplásica primária e sua associação com o prognóstico citogenético (IPSS, 1997)..... | 85 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ARA-C                         | - citosina arabinosídeo                                     |
| AREB                          | - anemia refratária com excesso de blastos                  |
| AREB-t                        | - anemia refratária com excesso de blastos em transformação |
| ARSA                          | - anemia refratária com sideroblastos em anel               |
| CEP                           | - Comitê de Ética em Pesquisa                               |
| CO <sub>2</sub>               | - dióxido de carbono  |
| CRDM                          | - citopenia refratária com displasia em multilinhagem       |
| CRDU                          | - citopenia refratária com displasia em uma linhagem        |
| del                           | - Deleção   |
| DNA                           | - ácido desoxirribonucléico                                 |
| FAB                           | - Grupo Franco-Americano-Britânico                          |
| FCM                           | - Faculdade de Ciências Médicas                             |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | - peróxido de hidrogênio                                    |
| HUPE                          | - Hospital Universitário Pedro Ernesto                      |
| IAM                           | - infarto agudo do miocárdio                                |
| ICC                           | - insuficiência cardíaca congestiva                         |
| INT                           | - Intermediário   |
| inv                           | - Inversão  |
| IPSS                          | - Sistema Internacional de Escala Prognóstica               |
| KCl                           | - cloreto de potássio                                       |
| LLA                           | - leucemia linfóide aguda                                   |
| LMA                           | - leucemia mielóide aguda                                   |
| LMMC                          | - leucemia mielomonocítica crônica                          |
| M.O.                          | - medula óssea  |
| M:E                           | - relação mielóide:eritróide                                |
| OMS                           | - Organização Mundial de Saúde                              |
| p                             | - braço curto do cromossomo                                 |
| q                             | - braço longo do cromossomo                                 |
| QT                            | - Quimioterapia   |
| rpm                           | - rotações por minuto                                       |



- SMD - síndrome mielodisplásica
- SMD-F - síndrome mielodisplásica com fibrose
- SMD-U - síndrome mielodisplásica não classificável
- t - Translocação
- TCTH - transplante de células tronco hematopoéticas
- UERJ - Universidade do Estado do Rio de Janeiro
- WPSS - Sistema de Escala Prognóstica baseado na classificação da OMS

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
|       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 16 |
| 1     | <b>ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA</b> .....   | 16 |
| 1.1   | <b>Características morfológicas de biópsia de medula óssea em pacientes com smd primária</b> .....                 | 19 |
| 1.2   | <b>Características morfológicas de aspirado de medula óssea - mielograma - em pacientes com smd primária</b> ..... | 22 |
| 1.3   | <b>Alterações cromossômicas em smd primária</b> .....  | 26 |
| 1.4   | <b>Classificação e escala prognóstica em smd primária</b> .....  | 27 |
| 2     | <b>OBJETIVO GERAL</b> .....  | 35 |
| 2.1   | <b>Objetivos específicos</b> .....   | 35 |
| 3     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 36 |
| 3.1   | <b>Pacientes</b> .....   | 36 |
| 3.2   | <b>Estudo clínico</b> .....  | 36 |
| 3.3   | <b>Estudo morfológico</b> .....  | 37 |
| 3.3.1 | <u>Análise de biópsia de medula óssea</u> .....  | 37 |
| 3.3.2 | <u>Estudo imuno-histoquímico</u> .....   | 38 |
| 3.3.3 | <u>Estudo morfológico – mielograma</u> .....   | 40 |
| 3.4   | <b>Estudo citogenético</b> .....   | 41 |
| 3.5   | <b>Análise estatística</b> .....   | 42 |
| 4     | <b>RESULTADOS</b> .....  | 44 |
| 4.1   | <b>Análise das características clínicas</b> .....  | 44 |
| 4.2   | <b>Análise citogenética</b> .....  | 49 |
| 4.3   | <b>Análise morfológica – biópsia de medula óssea</b> .....   | 52 |
| 4.3.1 | <u>Celularidade</u> .....  | 53 |
| 4.3.2 | <u>Relação mielóide:eritróide</u> .....  | 55 |
| 4.3.3 | <u>Linhagem megacariocítica</u> .....  | 57 |
| 4.3.4 | <u>Arquitetura medular</u> .....   | 63 |
| 4.3.5 | <u>Linhagem mielóide</u> .....   | 66 |
| 4.3.6 | <u>Linhagem eritróide</u> .....  | 69 |
| 4.3.7 | <u>Análise do componente estromal</u> .....  | 71 |
| 4.3.8 | <u>Fibrose medular</u> .....   | 74 |
| 4.4   | <b>Análise morfológica comparativa entre biópsia de medula óssea e mielograma</b> .....                            | 76 |

|     |   |            |
|-----|---|------------|
| 4.5 | <b>Correlação entre a análise morfologia - biópsia de medula óssea - e citogenética.....</b>            | <b>79</b>  |
| 5   | <b>DISCUSSÃO.....</b>   | <b>87</b>  |
| 6   | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | <b>96</b>  |
|     | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>97</b>  |
|     | <b>APÊNDICE A - Ficha de identificação do paciente.....</b>   | <b>104</b> |
|     | <b>APÊNDICE B - Avaliação dos achados morfológicos em biópsia de medula óssea em smd primária .....</b> | <b>106</b> |
|     | <b>ANEXO A - Carta do comite de ética do HUPE.....</b>  | <b>108</b> |
|     | <b>ANEXO B - Manuais do fabricante dos anticorpos primários.....</b>                                    | <b>109</b> |

## INTRODUÇÃO

A síndrome mielodisplásica (SMD) primária compreende um grupo de doenças hematológicas de natureza clonal de célula tronco pluripotente, que se caracteriza por hematopoese ineficaz, presença de displasias na medula óssea e citopenias em uma ou mais linhagens e risco de transformação para leucemia aguda. Dentre as citopenias periféricas, nos adultos, a anemia é a mais comum seguida de neutropenia e de trombocitopenia. As displasias apresentam-se como alterações morfológicas decorrentes de defeitos de diferenciação. Estas alterações podem acometer as linhagens eritróide, granulocítica, monocítica e megacariocítica (Ogata *et al*, 2006).

### 1. ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PRIMÁRIA

Nos estágios iniciais da SMD, ocorre um aparente paradoxo entre citopenia periférica associada com uma medula óssea hiperclular devido ao aumento da porcentagem de apoptose intramedular (morte celular programada) dos precursores das células hematopoéticas (Shimazaki, 2000; Shimazaki *et al*, 2002). A progressão da SMD para LMA ocorre concomitantemente com a redução da apoptose e o aumento da sobrevivência das células neoplásicas, o que permite a expansão clonal subsequente (Wang *et al*, 2010).

Morfologicamente, os granulócitos hiposegmentados tipo pseudo-Pelger-Huet vistos em mielograma de pacientes com SMD possuem alterações sugestivas de apoptose quando observadas em relação a sua ultra-estrutura por microscopia eletrônica. Além disso, a presença de micromegacariócitos nesses pacientes leva ao questionamento se estas alterações morfológicas também seriam formas apoptóticas (Shetty *et al*, 2001).

A nível molecular, a expressão aumentada ou desregulada de oncogenes e de genes supressores como *BCL-2*, *MYC*, *RAS* e *PT53* pode estar envolvida no processo de apoptose em SMD. Por exemplo, a família *bcl-2*, inclui proteínas pró-

apoptóticas e anti-apoptóticas que estão envolvidas na ativação das caspases que são proteases efetoras da apoptose subsequente (Wang *et al*, 2010). Diversos mecanismos citogenéticos e moleculares como: translocação, mutação, deleção ou amplificação gênica têm um papel fundamental no desenvolvimento de oncogênese que podem afetar o controle do ciclo celular, estimular a produção de citocinas e promover ou suprimir a apoptose (Economopoulou *et al*, 2008).

A SMD primária ou “de novo” corresponde a cerca de 90% dos casos de mielodisplasia (Barzi & Sekeres, 2010). Ocorre quando o paciente não foi submetido a nenhum tratamento prévio com medicamentos citotóxicos nem esteve em contato com agentes mutagênicos, como a quimioterapia e a radioterapia para o tratamento de câncer, nesses casos a SMD é chamada de secundária (Barzi & Sekeres, 2010). Na SMD primária, não há causa conhecida para o aparecimento da doença. Entretanto, há um consenso de que fatores hereditários, ambientais e a senescência da hematopoese possam influenciar no surgimento desta neoplasia hematológica (Lorand-Metze, 2005).

A SMD primária afeta preferencialmente pacientes acima dos 50 anos de idade. A sua incidência anual é de aproximadamente 3,5 a cada 100.000 indivíduos da população geral e de 36 a cada 100.000 indivíduos da população idosa. Sua prevalência é de 20,7 a cada 100.000 indivíduos da população geral (Sekeres, 2010). O aumento da frequência e da incidência da SMD primária podem ser atribuídos ao crescimento da expectativa de vida e ao reconhecimento e diagnóstico desta doença (Nishino & Chang, 2005). No Brasil, o número de idosos ( $\geq 60$  anos) aumentou de 3 milhões em 1960, para 7 milhões em 1975 e para 14 milhões em 2002 (Lima-Costa & Veras, 2003). Isto mostra que as síndromes mielodisplásicas devem ser uma das enfermidades hematológicas mais frequentes nessa população, merecendo por parte de investigadores e clínicos brasileiros uma maior reflexão.

A história natural da SMD é altamente variável, podendo apresentar formas brandas, com alta sobrevida e baixa taxa de transformação leucêmica e formas mais agressivas que podem evoluir rapidamente para leucemia mielóide aguda (LMA). Pacientes com SMD primária raramente transformam para leucemia linfóide aguda (LLA), embora casos isolados tenham sido descritos (Disperati *et al*, 2006).

A suspeita diagnóstica da SMD primária ocorre quando se realiza um hemograma que evidencia a presença de uma ou mais citopenias no sangue periférico, pois os sintomas, quando ocorrem, são vagos e inespecíficos. Quando há

anemia isolada, causas não hematológicas devem ser pesquisadas como sangramento do trato gastrointestinal, causas cardíacas e deficiências nutricionais. Nos casos que apresentem trombocitopenia ou neutropenia isoladas, ou citopenia de mais de uma linhagem, geralmente há necessidade de investigação diagnóstica hematológica precoce, pois sugerem disfunção da medula óssea e doença avançada (Barzi & Sekeres, 2010).

A investigação diagnóstica segue-se com análise do mielograma e da biópsia de medula óssea para identificar displasias e a possível presença de blastos, caracterizando estágios mais avançados. Estudos adicionais auxiliam no estabelecimento do diagnóstico, incluindo a análise citogenética (List *et al*, 2004).

Grande variedade de tratamentos vem sendo utilizada em pacientes com SMD primária, com o objetivo de eliminar as citopenias, assim como de recuperar a hematopoese. As terapias utilizadas envolvem transfusões sanguíneas, antibióticos, fatores de crescimento isolados ou em combinação, ciclosporina ou globulina anti-linfócito que também são utilizadas em pacientes que apresentam medula óssea hipocelular. Nos subtipos mais avançados da SMD (AREB, AREB-t e LMMC) é utilizada a quimioterapia com agente único: hidroxiurea, etoposídeo, mercaptopurina ou baixa dose de arabinosídeo citosina (ARA-C). Em alguns casos é utilizada a quimioterapia intensiva similar àquela dada à pacientes com LMA, como a combinação de fludarabina e alta dose de ARA-C (Hellström-Lindberg, 2000).

O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico é a única opção terapêutica curativa para pacientes com SMD. No entanto, o seu uso é limitado a pacientes até 55 anos de idade e que possuem doadores histocompatíveis (Giralt *et al*, 2005). Esse limite de idade contra-indica o procedimento na maioria dos pacientes com SMD primária, pois esta doença incide principalmente em idosos (Espigado *et al*, 2005).

Com a delimitação das características biológicas que norteiam o fenótipo da SMD, novas drogas introduzidas no tratamento desta doença têm mostrado um grande potencial terapêutico. Como por exemplo, agentes imunossupressores, anti-angiogênicos (principalmente a talidomida) (Musto *et al*, 2004), citoprotetores (amifostina), inibidores do receptor da tirosina quinase (mesilato de imatinibe) (Giles *et al*, 2003) e inibidor de farnesil transferase (inibidor da via Ras) (Kurzrock *et al*, 2004). Além disso, uma nova classe terapêutica chamada inibidores da metiltransferase vem sendo utilizada no tratamento da SMD. Os representantes

desta classe incluem a azacitidina (5-azacitidina) e decitabina (5-aza 2' deoxicitidina). Ambos são agentes hipometilantes que se incorporam no DNA e irreversivelmente ligam-se e inibem a ação da DNA metiltransferase. A ação destes fármacos leva à reativação de genes epigeneticamente reprimidos, como genes supressores de tumor. Resultados iniciais demonstraram que pacientes com SMD de alto risco apresentam um aumento no tempo de transformação para LMA e sobrevida (Silverman & Mufti, 2005; Atallah *et al*, 2007).

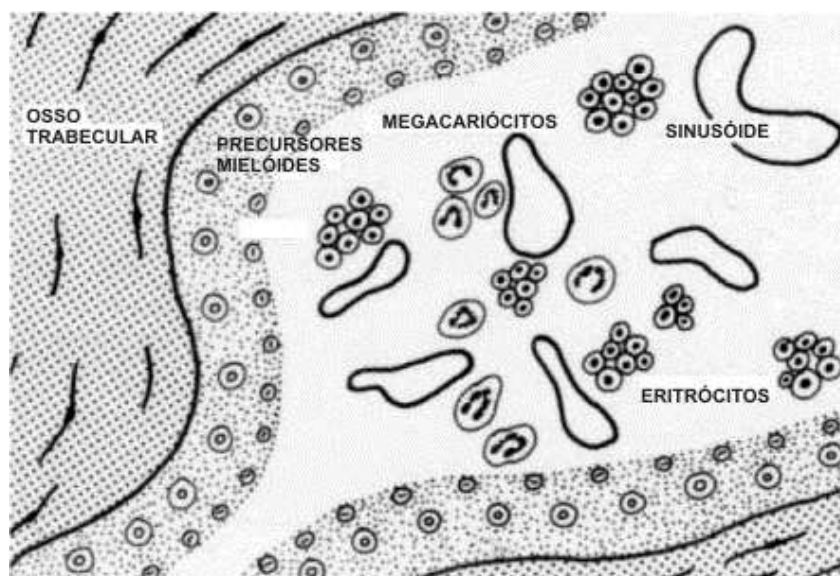
Devido à introdução de novas formas de tratamento torna-se importante o estudo da associação das características histológicas, celulares e citogenéticas com as características clínicas da doença e a resposta ao tratamento, auxiliando desta forma no desenvolvimento de classificação, de escalas prognósticas e de esquemas terapêuticos adequados à patogênese.

### **1.1. Características Morfológicas de Biópsia de Medula Óssea em Pacientes com SMD Primária**

A definição histopatológica de displasia compreende em perda das características celulares individuais e da orientação arquitetural medular. A maioria dos pacientes apresenta medula óssea hipercelular, contrastando com as citopenias periféricas, mas pode-se encontrar normocelularidade e hipocelularidade (Orazi, 2007). Estudos demonstraram que a alta taxa de proliferação é compensada pela grande taxa de apoptose das células da medula óssea, incluindo as células do estroma (Hellström-Lindberg *et al*, 1997). No entanto, essa característica é observada nos estágios iniciais da doença (AR e ARSA). Conforme a doença evolui, a taxa de apoptose diminui contribuindo para a transformação leucêmica (Pecci *et al*, 2003).

Em decorrência das alterações estruturais na SMD primária, as células precursoras das três linhagens podem ser encontradas em todas as regiões na medula óssea, ou seja, a arquitetura medular é perdida durante o desenvolvimento dessa doença hematológica. A displasia pode afetar uma ou mais linhagens, o que culmina com as células da linhagem envolvida apresentando topografia fora da sua

região normal da medula óssea. A distribuição topográfica normal de cada linhagem celular está esquematizada na figura 1.



**Figura1:** Topografia normal de cada linhagem celular na medula óssea. Em um espaço trabecular observam-se, os precursores mielóides paratrabeculares, a distribuição central da linhagem eritróide e os megacariócitos perivascularares (Vishnu & Reddy, 2001).

Na SMD primária os grupamentos de eritrócitos e os megacariócitos podem ser observados no espaço paratrabecular, afastado do centro do espaço trabecular e dos sinusóides, respectivamente. Enquanto isso, os precursores mielóides podem estar distribuídos difusamente na medula óssea ou formando grupamentos distantes das trabéculas. São chamados de precursores imaturos de localização anormal (ALIP) os agrupamentos de mieloblastos e/ou promielócitos na região central da medula óssea, afastado das trabéculas ósseas, seja formado por três a cinco células (agregados) ou por cinco ou mais células (aglomerado) (Vishnu & Reddy, 2001; Niero-Melo *et al*, 2006). Os ALIPs são mais frequentes nos pacientes com doença avançada. As células blásticas (células progenitoras e precursores imaturos) podem ser identificados pela imuno-positividade pelo anticorpo anti-CD34 (Soligo, 1991).

A presença de células CD34 positivas corresponde a menos de 1% da celularidade da medula óssea de indivíduos sem alterações hematológicas. Entretanto, valores aumentados podem ser encontrados em biópsia de medula



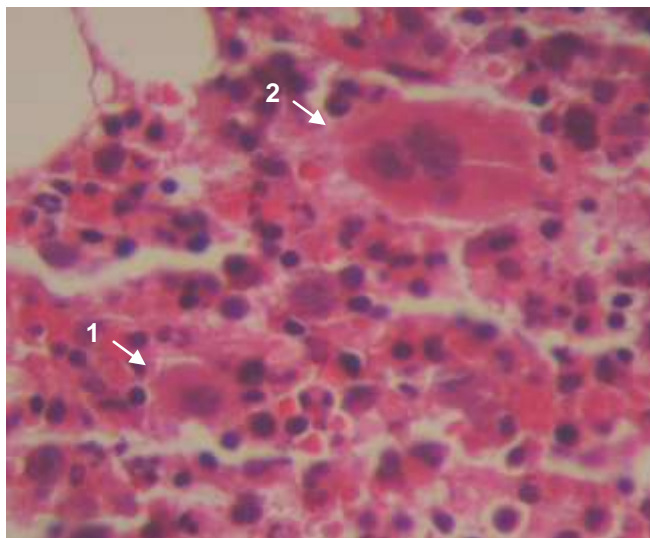
óssea de pacientes com SMD, independente dessas células blásticas estarem agrupadas formando ALIP (Porta, 2009).

A relação mielóide:eritróide (M:E) pode estar alterada em pacientes com mielodisplasia dependendo se há hiperplasia ou hipoplasia isolada de alguma dessas linhagens. Caso as duas linhagens estejam sofrendo o mesmo processo, por exemplo, hipoplasia, a celularidade medular pode reduzir, produzindo medula óssea hipocelular, porém, a relação M:E se mantém dentro da normalidade.

As alterações estromais na SMD são mais proeminentes nas medulas ósseas hipocelulares. Algumas dessas alterações correspondem a áreas de edema, infiltrado de células inflamatórias como linfócitos, por vezes formando agregados. Macrófagos com debris celulares e hemossiderina no seu interior podem ser observados, provavelmente decorrente do uso de hemotransfusão por período prolongado. Outras células inflamatórias que podem ser observadas são plasmócitos e mastócitos, sendo estas melhor visualizadas pelo mielograma. Pode-se verificar ectasia sinusoidal e, raramente, blastos no interior dos vasos (Forman, 1996).

A síndrome mielodisplásica com fibrose (SMD-F) é observada em aproximadamente 10% dos casos. Nesses pacientes a medula óssea apresenta fibrose reticulínica coesa e difusa, com ou sem fibras colágenas associadas e evidências morfológicas de displasia em pelo menos duas linhagens celulares. Entretanto, ainda não há consenso qual seria o grau de fibrose medular necessário para esse caso ser considerado SMD-F. Esses pacientes costumam apresentar doença avançada e displasia megacariocítica marcante com variação acentuada no tamanho dessas células (Brunner *et al*, 2008).

Algumas anormalidades celulares compatíveis com displasia podem ser observadas na biópsia de medula óssea. Pode-se encontrar eritropoese megaloblástica. Os megacariócitos podem ter hipolobulação nuclear e se apresentar no formato de micromegacariócitos que evidenciam intensa redução citoplasmática e nuclear comparados aos megacariócitos normais (Figura 2) (Kouides & Bennett, 1992).



**Figura 2:** Corte histológico de medula óssea em coloração Hematoxilina e Eosina. Presença de micromegacariócito com hipolobulação nuclear, indicado pelo número 1, ao lado de um megacariócito sem alteração morfológica, indicado pelo número 2 em um paciente com SMD primária.

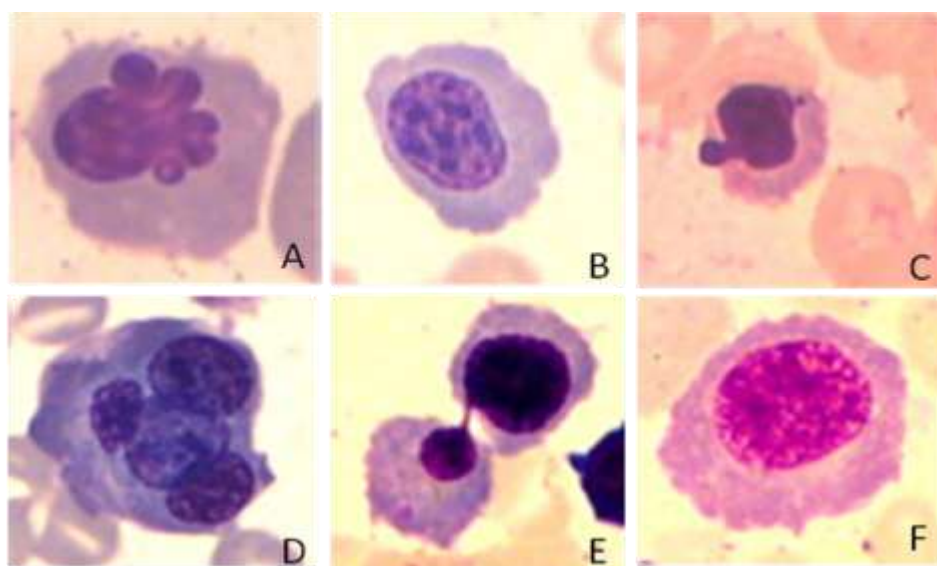
Alguns desses achados na medula óssea de pacientes com SMD estão associados a um pior prognóstico e a maior chance de evolução leucêmica. Os parâmetros mais estudados são: presença de precursores imaturos de localização anormal (ALIP) e fibrose intramedular (Georggi, 1997; Romeo *et al*, 2001). Por outro lado, há dados morfológicos indicando bom prognóstico, como a hipocelularidade medular e a síndrome 5q - onde a medula óssea possui muitos megacariócitos pequenos e hipolobulados (Kouides & Bennett, 1992; Yue *et al*, 2008).

## **1.2. Características morfológicas de aspirado de medula óssea - mielograma - em pacientes com SMD Primária**

A análise do aspirado de medula óssea possibilita avaliação citomorfológica das três séries hematológicas, permitindo a caracterização da displasia em cada linhagem. Pelo menos 10% de células de cada linhagem devem apresentar alterações displásicas para serem significativas (Brunnering *et al*, 2008).

Em relação à linhagem eritróide, a displasia é caracterizada pela diseritropoese que é avaliada por alterações nucleares, citoplasmáticas e pelo

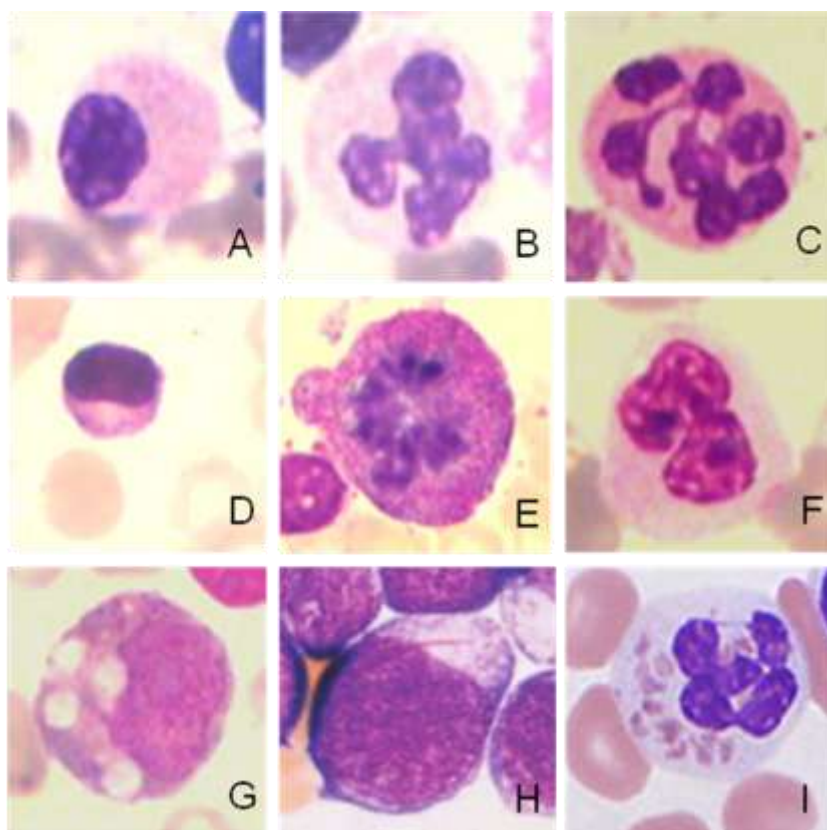
dissincronismo entre a maturação nuclear e citoplasmática. As alterações nucleares são identificadas pelas formas aberrantes que incluem: irregularidade nuclear, formas bizarras, aumento da lobulação nuclear e mais de um núcleo (Figura 3). Podem ocorrer alterações megaloblásticas (eritrócitos imaturos com núcleo volumoso) e outras alterações como brotamentos nucleares e pontes internucleares. Mitoses atípicas, cariorréxis (fragmentação de núcleo picnótico) e cariólise (dissolução da cromatina com perda da basofilia nuclear) (Liu *et al*, 2009). Ainda são observadas nessa linhagem alterações citoplasmáticas como sferoblastos em anel. (Brunning *et al*, 2008).



**Figura 3:** Displasia na linhagem eritróide. (A) núcleo irregular (B) cariólise (C) brotamentos nucleares (D) multinucleação (E) ponte internuclear (F) alterações megaloblásticas (Liu *et al*, 2009).

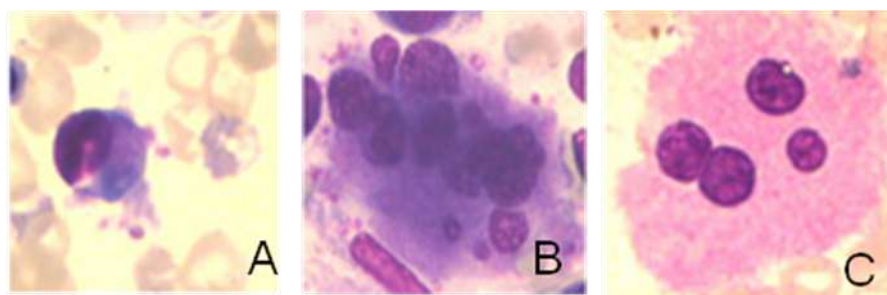
As alterações mielodisplásicas na linhagem granulocítica (disgranulopose) são caracterizadas por hipolobulação nuclear tipo pseudo-Pelger-Hüet, podendo também ocorrer hipersegmentação irregular e binucleação. Há células com formato nuclear bizarro, por vezes com aumento do tamanho celular, mas podem se apresentar como granulócitos pequenos, do mesmo tamanho da hemácia. Assim como ocorre na diseritropose, há um dissincronismo entre a maturação núcleo-citoplasma e figuras de mitose atípica. No citoplasma podem ser observados hipogranulação ou ausência de grânulos, grânulos tipo pseudo Chediak-Higashi,

bastão de Auer e vacúolos intracitoplasmáticos (Figura 4) ( Liu *et al*, 2009; Brunning *et al*, 2008).



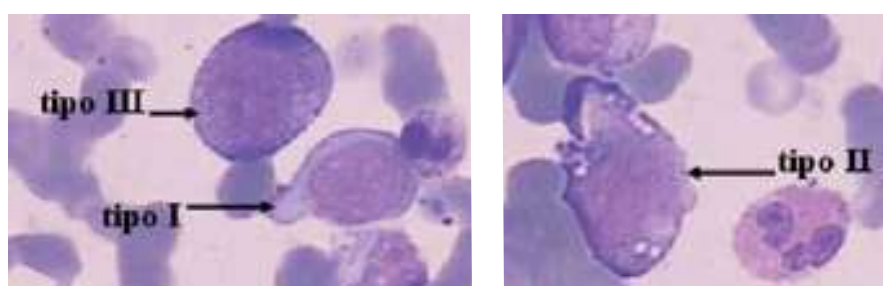
**Figura 4:** Displasia na linhagem granulocítica. (A) pseudo-Pelger-Hüet (B) núcleo bizarro (C) hipersegmentação (D) tamanho reduzido (E) mitose (F) hipogranulação (G) vacuolização (H) bastão de Auer (I) grânulos tipo pseudo Chediak-Higashi (Liu *et al*, 2009).

Em relação às alterações displásicas observadas nos megacariócitos, encontram-se tamanhos variados, inclusive na forma de micromegacariócitos. Os núcleos podem apresentar hipolobulação, serem hipersegmentados, bizarros e terem mais de um núcleo pequeno, redondo e separado entre si (figura 5) (Liu *et al*, 2009 Brunning *et al*, 2008).



**Figura 5:** Displasia na linhagem megacariocítica. (A) micromegacariócito (B) hipersegmentação nuclear (C) núcleos separados (Liu et al, 2009).

Morfologicamente os blastos no mielograma podem ter três apresentações. Os blastos tipo I que são os menores, com alta relação núcleo-citoplasmática, cromatina reticulada e fina, sendo observado de um a três nucléolos. O citoplasma possui basofilia discreta, sem grânulos e sem bastões de Auer. Os blastos tipo II são em geral maiores que o I, mas possuem menor relação núcleo-citoplasma e a cromatina mais condensada com um a três nucléolos. O citoplasma apresenta discreta granulação primária (azurófila) e aparelho de Golgi proeminente. Os blastos tipo III são semelhantes aos do tipo II, mas com granulação azurófila mais abundante ( $\geq 20$  grânulos), sem granulação secundária (metacromática) e sem zona de Golgi (Figura 6) (Niero-Melo, 2006).



**Figura 6:** Blastos tipo I, II e III no mielograma (Niero-Melo, 2006).

A caracterização das alterações morfológicas em síndrome mielodisplásica primária é fundamental para o diagnóstico e o prognóstico desta doença, assim como a presença de alterações cromossômicas que caracterizam a clonalidade da SMD primária, o que possibilita o diagnóstico diferencial entre SMD e doenças não neoplásicas.

### 1.3. Alterações Cromossômicas em SMD Primária

As alterações citogenéticas clonais podem ser detectadas em 30 a 50% dos pacientes adultos com SMD primária. No entanto, nenhuma alteração citogenética específica foi definida nesses pacientes (Panani & Roussos, 2005). Essas alterações podem variar de uma simples mudança estrutural ou numérica até lesões genômicas complexas envolvendo três ou mais cromossomos distintos. Alterações citogenéticas simples podem ocorrer nos estágios iniciais da doença, entretanto, nos estágios mais avançados da doença e/ou durante a progressão da SMD para LMA são comuns alterações citogenéticas mais complexas (Fernandez *et al*, 2000).

As alterações cromossômicas numéricas são mais frequentes em SMD primária e envolvem perdas e ganhos cromossômicos. Quanto às deleções, as mais encontradas são as que envolvem o braço longo dos cromossomos: 5 [del(5q)], 7 [del(7q)] e 20 [del(20q)]. As deleções do braço curto são menos comuns e acometem principalmente os cromossomos 17 [del(17p)] e 12 [del(12p)]. O ganho cromossômico mais observado é a trissomia do cromossomo 8 (+8) e a perda cromossômica mais comum é a monossomia do 7 (-7) (Haase *et al*, 2007). Quanto às anormalidades estruturais, destaca-se a inversão do cromossomo 3 [inv(3)]. Translocações podem ocorrer, mas não são frequentes em SMD primária (Panani & Roussos, 2005).

Na síndrome mielodisplásica na infância, a monossomia do cromossomo 7 é a alteração citogenética mais comum. Outras alterações como cariótipos complexos podem ser observadas. As crianças que apresentam t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22), t(16;16)(p13;q22) ou t(15;17)(q22;q12) devem ser consideradas como portadoras de LMA, independente da contagem de blastos (Yin *et al*, 2010). Portanto, esses pacientes apresentam aspectos biológicos que os diferem dos pacientes adultos.

A incidência destas alterações citogenéticas pode refletir uma instabilidade genômica clonal, levando à predisposição para aquisições adicionais de lesões genéticas. Estudos citogenéticos de acompanhamento da evolução de SMD primária para LMA puderam demonstrar que anomalias cromossômicas simples ocorrendo em subtipos de SMD são acrescidas de outras anomalias durante a progressão da doença (Fernandez *et al*, 2000 e Wang *et al*, 2010), estando envolvidos oncogenes e

genes supressores de tumor (Mhaweck & Saleem, 2001). A presença de uma segunda alteração cromossômica, envolvendo deleções do cromossomo 7 ou o ganho do cromossomo 8, associada à lesão genética inicial mostrou conferir um curso mais agressivo, com maior predisposição ao desenvolvimento de leucemia (Bernasconi *et al*, 2010).

Devido à importância das informações obtidas na análise morfológica e citogenética, algumas características foram utilizadas para elaboração de sistemas de classificação e escalas prognósticas.

#### **1.4. Classificação e Escala Prognóstica em SMD Primária**

Em 1976 Linman & Bagby descreveram a síndrome pré-leucêmica que compreendia uma variedade de alterações da célula progenitora caracterizadas por citopenias, aumento de blastos na medula óssea, mas sem alteração na sua celularidade. Esses autores sugeriram que anemias inexplicáveis como anemia refratária e anemia sideroblástica, por exemplo, poderiam representar o estágio inicial desse processo mielodisplásico que seguiriam com plaquetopenia e leucopenia. Uma grande proporção entre os pacientes com citopenias, finalmente progredia para leucemia aguda. Entretanto, pacientes, por vezes, não apresentavam evolução leucêmica e alguns fatores como a quantidade de blastos na medula óssea foram considerados relevantes para a ocorrência desse desfecho (Senn *et al*, 1982).

Em 1982, o grupo Franco-Americano-Britânico (grupo FAB) definiu a “síndrome mielodisplásica” e a classificou em 5 subgrupos utilizando como critérios: a porcentagem de blastos na medula óssea e no sangue periférico e características morfológicas (presença ou ausência de sideroblastos em anel e de bastões de Auer) (tabela 1) (Bennett *et al*, 1982).

**Tabela 1:** Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo os Critérios propostos pelo Grupo FAB em 1982.

| Subtipo | Monócitos (µl) Sangue periférico | Sideroblastos em anel (%) Medula óssea | Células Blásticas (%) |              | Bastões de Auer Medula óssea |
|---------|----------------------------------|--|-----------------------|--------------|------------------------------|
|         |                                  |  | Sangue periférico     | Medula óssea |                              |
| AR      | Não                              | < 15                                   | < 1                   | < 5          | Não                          |
| ARSA    | Não                              | > 15                                   | < 1                   | < 5          | Não                          |
| AREB    | Não                              | Não                                    | < 5                   | 5 - 20       | Não                          |
| AREB-t  | Não                              | Não                                    | > 5                   | 20 - 30      | Sim ou Não                   |
| LMMC    | > 1000                           | Não                                    | < 5                   | < 20         | Não                          |

**AR-** anemia refratária; **ARSA-** anemia refratária com sideroblastos em anel; **AREB-** anemia refratária com excesso de blastos; **AREB-t-** anemia refratária com excesso de blastos em transformação; **LMMC-** leucemia mielomonocítica crônica (Bennett *et al*, 1982).

Desde que essa classificação foi introduzida, vários estudos comprovaram sua utilidade, tanto para o monitoramento envolvendo um grande número de pacientes com SMD, quanto para o tratamento destes pacientes, permitindo comparações entre os diversos trabalhos. No entanto, para a determinação de um prognóstico preciso, esta classificação apresentava alguns problemas: distinguia somente duas categorias de risco, baixo (AR e ARSA) e alto risco (AREB, AREB-t e LMMC) e dentro de um mesmo subgrupo FAB os pacientes mostravam grandes variações na evolução da doença e na sobrevida, especialmente dentro dos subgrupos AR e ARSA. A denominação “anemia refratária” nem sempre era adequada, sendo a anemia apenas uma das três possíveis citopenias em SMD. A expressão citopenia refratária foi sugerida por alguns autores (Garandeanu *et al*, 2000). A LMMC apresenta em alguns casos características de síndrome mielodisplásica e em outros de síndrome mieloproliferativa, desta forma sua inclusão na SMD vem sendo discutida nas classificações mais recentes, como a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2000 que sofreu alterações em 2008 com critérios mais apurados (Tabela 2) (Harris *et al*, 2000; Brunning *et al*, 2008).

A Organização Mundial da Saúde sugeriu novos critérios de classificação para SMD, sendo incorporados muitos conceitos e definições do grupo FAB, acrescentando dados visando melhorar a definição dos subgrupos, assim como a sua relevância clínica. A maior diferença entre as duas classificações foi o



desaparecimento do subtipo AREB-t, sendo considerada a transformação para LMA a partir de 20% de blastos na medula óssea (Harris *et al*, 2000).

As citopenias refratárias, com ou sem sideroblastos, são divididas em 1) CRDU quando a medula óssea apresenta somente displasia em uma linhagem, em 2) ARSA quando há somente anemia, mais de 15% de sideroblastos em anel e sem displasias significativas nas linhagens mielóides e megacariocítica, na medula óssea e em 3) citopenia refratária com displasia em multilinhagem (CRDM) quando a medula óssea apresenta displasias em duas ou mais linhagens.

Foram criados dois subtipos para AREB: AREB-1 (5 a 9% de blastos na medula óssea) e AREB-2 (acima de 10% até 19% de blastos na medula óssea). O subtipo LMMC foi retirado da categoria de SMD para um novo grupo de doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas.

Dados citogenéticos foram incorporados à classificação OMS, como a adição do subtipo síndrome do 5q-, como uma entidade separada. Esta síndrome é bem estabelecida entre os pacientes com SMD, estando associada com características clínicas específicas como anemia em geral macrocítica, hiperplasia micromegacariocítica. Displasia nas linhagens eritróide e mielóide são incomuns. A faixa etária de acometimento é constituída principalmente por pacientes acima dos 50 anos de idade e do sexo feminino (Mhaweck & Saleem, 2001).

**Tabela 2:** Classificação da Síndrome Mielodisplásica segundo a proposta OMS em 2008.

| Subtipo             | Sangue periférico   | Medula óssea   |
|---------------------|---|--|
| <b>CRDU</b>         | Uma ou duas citopenias<br>Blastos ausentes ou <1%   | Displasia ≥ 10% das células de uma linhagem mielóide<br>Blastos <5%<br>Sideroblastos em anel <15%  |
| <b>ARSA</b>         | anemia<br>ausência de blastos   | Sideroblastos em anel >15%<br>Somente displasia eritróide<br>Blastos <5%   |
| <b>CRDM</b>         | Citopenia(s)<br>Blastos ausentes ou <1%<br>Sem bastão de Auer<br>Monócitos < 1x10 <sup>9</sup> /L | Displasia ≥ 10% das células em 2 ou 3 linhagens mielóides<br>Blastos <5%<br>Sem bastões de Auer<br>Sideroblastos em anel ±15%                                    |
| <b>AREB-1</b>       | Citopenia(s)<br>Blastos > 5%<br>Sem bastão de Auer<br>Monócitos < 1x10 <sup>9</sup> /L            | Displasia em uma ou mais linhagens mielóides<br>Blastos 5 - 9%<br>Sem bastões de Auer  |
| <b>AREB-2</b>       | Citopenia(s)<br>Blastos 5 - 19%<br>Bastão de Auer ±<br>Monócitos < 1x10 <sup>9</sup> /L           | Displasia em uma ou mais linhagens mielóides<br>Blastos 10 - 19%<br>Bastões de Auer ±  |
| <b>Síndrome 5q-</b> | Anemia<br>Número de plaquetas normais ou aumentadas<br>Blastos ausentes ou <1%                    | Megarariócitos aumentados ou normais com núcleos hipolobulados<br>Blastos < 5%<br>Citogenética: del(5q) isolado<br>Sem bastões de Auer                           |
| <b>SMD-U</b>        | Citopenias<br>Blastos ≤1%   | Displasia inquestionável <10% das células de uma ou mais linhagem mielóide quando acompanhada de alteração citogenética indicativa do diagnóstico<br>Blastos <5% |

**CRDU:** Citopenia Refratária com Displasia de uma linhagem; **ARSA:** Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel; **CRDM:** Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagem; **AREB:** Anemia Refratária com Excesso de Blastos; **SMD-U:** Síndrome Mielodisplásica – não classificável (*Brunning et al, 2008*).

Além disso, os achados citogenéticos listados na tabela 3 em pacientes com citopenia persistente (mais de seis meses) de origem indeterminada em uma ou mais linhagens – citopenia idiopática de significado indeterminado – mesmo sem critérios morfológicos de displasia, passaram a ser considerados sugestivos de SMD. Esses pacientes devem ser acompanhados para que alterações morfológicas possam ser monitoradas para caracterização da SMD (*Yin et al, 2010*).

**Tabela 3:** Cariótipo sugestivo de SMD em citopenia idiopática de significado indeterminado (OMS, 2008).

| Tipo                  | Alterações citogenéticas   |
|-----------------------|--|
| <b>Balanceada</b>     | t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p23;q23), inv(3)(q21;q26.2), t(6;9)(p23;q34) |
| <b>Não balanceada</b> | -7 ou del(7q), -5 ou del(5q), i(17q) ou t(17p), -13 ou del(13q), del(11q), del(12p) ou t(12p), del(9q), idic(X)(q13) |

Os pacientes com síndrome mielodisplásica não classificável (SMD-U) são aqueles em que faltam critérios para serem considerados de outros subgrupos. Esse diagnóstico pode ser realizado mediante a: 1) alterações morfológicas displásicas em uma ou mais linhagens acompanhadas de 1% de blastos no sangue periférico; 2) casos com displasia de uma linhagem associada a pancitopenia e 3) pacientes com citopenia persistente de uma ou mais linhagens, com 1% ou menos de blastos no sangue periférico e menos que 5% de blastos na medula óssea, displasia em menos de 10% das células em uma ou mais linhagens mielóides e aqueles que possuam alguma das alterações citogenéticas listadas na tabela 3.

Uma categoria provisória – citopenia refratária da infância – foi formulada, devido ao entendimento das diferenças clínicas, morfológicas e citogenéticas entre os pacientes pediátricos e os pacientes adultos. Nela se incluem pacientes menores de 14 anos, com citopenia persistente, menos de 5% de blastos na medula óssea ou menos de 2% de blastos no sangue periférico com displasia em duas linhagens ou em mais de 10% em uma única linhagem. É recomendado que mesmo aquelas crianças que se enquadrem nos critérios para CRDM devam ser consideradas nesse grupo, pois ainda não foi definido se o número de citopenias apresenta valor prognóstico nessa faixa etária (Brunner *et al*, 2008).

Estudos comparando ambas as classificações sugerem que a classificação da OMS estabelece subgrupos mais homogêneos de pacientes e apresenta um maior valor prognóstico quando comparada com o sistema FAB (Howe *et al*, 2004). Entretanto, controvérsias permanecem (Bennett, 2005). Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar quais os fatores que mais influenciam a sobrevivência e a frequência de evolução para LMA nos pacientes com SMD, de modo a permitir a elaboração de escalas prognósticas. A porcentagem de blastos na medula óssea, as alterações citogenéticas e o número de citopenias são atualmente

utilizados como os parâmetros mais importantes para as escalas prognósticas; outros fatores incluem sexo, idade, contagem de plaquetas e de hemoglobina no sangue periférico e presença de ALIP (Greenberg *et al*, 1997).

A classificação de grupos de risco em SMD primária mais utilizada corresponde ao Sistema Internacional de Escala Prognóstica (IPSS) (Greenberg *et al*, 1997). Estes investigadores estudaram retrospectivamente dados citogenéticos, morfológicos e clínicos de 816 pacientes. Os autores concluíram que a porcentagem de blastos na medula óssea, o número de citopenias no sangue periférico e a citogenética eram os fatores prognósticos de maior importância, tanto em relação ao tempo de sobrevivência, como quanto à taxa de transformação leucêmica. A maneira como a pontuação foi atribuída a cada parâmetro está descrita na tabela 4.

**Tabela 4:** Pontuação segundo os Parâmetros Críticos do IPSS em Síndrome Mielodisplásica (1997).

| <b>Variáveis Prognósticas</b> | <b>Pontuação</b> |               |          |            |            |
|-------------------------------|------------------|---------------|----------|------------|------------|
|                               | <b>0</b>         | <b>0,5</b>    | <b>1</b> | <b>1,5</b> | <b>2,0</b> |
| Blastos M.O.                  | < 5%             | 5 -10%        | -        | 11 - 20%   | 21 - 30%   |
| Cariótipo *                   | Bom              | Intermediário | Mau      | -          | -          |
| Citopenias                    | 0 - 1            | 2 - 3         |          | -          | -          |

“Pontuação” para os grupos de risco: **Baixo risco** (0 pontos); **Intermediário 1** (0,5-1,0 pontos); **Intermediário 2** (1,5-2,0); **Alto risco** (> ou = 2,5).

Cariótipos\*: **bom prognóstico**: cariótipos normais, -Y, del(5q), del(20q), **mau prognóstico**: cariótipos complexos, anomalias envolvendo o cromossomo 7; **prognóstico intermediário**: outras anomalias cromossômicas (Greenberg *et al*, 1997).

O IPSS dividiu a SMD em 4 grupos de risco: baixo, intermediário 1, intermediário 2 e alto risco. A aplicação do IPSS tem gerado discussão em relação aos grupos separados por cariótipo. Em alguns estudos, a trissomia do cromossomo 8 e a del(11)(q23), por exemplo, estão frequentemente associadas com a evolução da doença (Solé *et al*, 2000; Fernandez *et al*, 2000). Entretanto, o IPSS classifica estas alterações cromossômicas como prognóstico intermediário, sendo, portanto, necessária uma análise mais refinada em relação aos grupos de risco segundo o cariótipo (Aul *et al*, 2002).

O IPSS tem se mostrado eficaz no sentido de predizer a sobrevida do paciente e auxiliar a escolha terapêutica na ocasião do diagnóstico. Entretanto, os estudos para avaliação da eficiência do tratamento não necessariamente correspondem à sobrevida do grupo de risco calculada no prognóstico. Levando esse aspecto em consideração, foi desenvolvido um modelo de avaliação de prognóstico dinâmico.

Em 2007, uma nova classificação prognóstica, o Sistema de Escala Prognóstica baseado na classificação da OMS (WPSS) que usou como parâmetros, além da classificação da OMS, a citogenética e a necessidade de hemotransusão. Os valores de cada variável estão discriminados na tabela 5. A pontuação atribuída pelo cariótipo é a mesma utilizada pelo IPSS. Os pacientes são divididos em cinco categorias de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto (Malcovati *et al*, 2007).

**Tabela 5:** Pontuação segundo os Parâmetros Críticos do WPSS em Síndrome Mielodisplásica (2007).

| <b>Variáveis Prognósticas</b>          | <b>Pontuação</b> |               |          |          |
|--|------------------|---------------|----------|----------|
|  | <b>0</b>         | <b>1</b>      | <b>2</b> | <b>3</b> |
| Categoria OMS                          | AR, ARSA, 5q-    | CRDM, CRDM-SA | AREB-1   | AREB-2   |
| Cariótipo *                            | Bom              | Intermediário | Mau      | -        |
| Necessidade transfusional <sup>+</sup> | Não              | Regular       | -        | -        |

“Pontuação” para os grupos de risco: **Muito Baixo risco** (0 pontos); **Baixo risco** (2 pontos) **Intermediário** (2 pontos); **Alto risco** (3 - 4 pontos); **Muito Alto risco** (5 -6 pontos).

Cariótipos\*: **bom prognóstico**: cariótipos normais, -Y, del(5q), del(20q), **mau prognóstico**: cariótipos complexos, anomalias envolvendo o cromossomo 7; **prognóstico intermediário**: outras anomalias cromossômicas

Necessidade transfusional<sup>+</sup>: dependência transfusional é definida como necessidade de pelo menos uma hemotransusão a cada oito semanas durante um período de quatro meses.

**AR**: Anemia Refratária com Displasia de uma linhagem; **ARSA**: Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel; **5q-**: síndrome 5q-; **CRDM**: Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagem; **CRDM-SA**: Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagem e Sideroblastos em Anel; **AREB-1**: Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1; **AREB-2**: Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2 (Malcovati *et al*, 2007).

A vantagem dessa classificação é que pode ser aplicada em qualquer momento da evolução da doença (Malcovati *et al*, 2007). Isso poderia ajudar nas decisões terapêuticas durante o acompanhamento do paciente. Entretanto, em 2008, a classificação da OMS sofreu alterações, o que torna necessário novos estudos para que essa escala seja usada na prática clínica.

Diante dos aspectos biológicos que caracterizam a síndrome mielodisplásica, vários fatores prognósticos foram investigados e classificações e escalas prognósticas desenvolvidas. Dentre as diversas variáveis estudadas, incluem-se as alterações citogenéticas e as características clínicas, representadas pelo número de citopenias e mais recentemente pela necessidade de hemo-transfusão. Entretanto, a morfologia da medula óssea é fundamental para o diagnóstico definitivo dessa neoplasia hematológica e durante o acompanhamento para avaliação de evolução leucêmica.

Dentre as diversas alterações que podem ser observadas e estudadas pela biópsia de medula óssea e pelo mielograma, apenas esse segundo é considerado como tendo achados indicativos de prognóstico pelas classificações atualmente utilizadas para SMD. Nota-se, portanto, a necessidade do estudo das alterações morfológicas em biópsia de medula óssea para que, além do diagnóstico da displasia, sua avaliação permita contribuir para a escolha terapêutica. Alguns estudos apontam a necessidade, por exemplo, de correlacionar a contagem de blastos pelo mielograma com a avaliação da quantidade de blastos pela biópsia de medula óssea principalmente nos casos de fibrose medular (Orazi *et al*, 2009; Orazi, 2007).

Dentre as classificações elaboradas para SMD até o momento, somente a classificação da OMS ressalta as características da biópsia de medula óssea de modo complementar aos resultados do mielograma e da citogenética (Brunnering *et al*, 2008). Apesar de alguns estudos terem evidenciado alterações cito-arquiteturais e estromais com impacto na sobrevida (Porta *et al*, 2009; Verburgh *et al*, 2003; Sakuma, 2006), a análise de biópsia de medula óssea é subutilizada na prática clínica. Portanto, é necessário que os aspectos morfológicos em biópsia de medula óssea sejam avaliados em pacientes com síndrome mielodisplásica quanto a sua relevância para o diagnóstico, prognóstico e escolha terapêutica.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Correlacionar as características morfológicas e citogenéticas com as classificações FAB e OMS e com o IPSS avaliando o impacto prognóstico e a estratificação dos grupos de risco dos pacientes com SMD primária.

### **2.1. Objetivos específicos**

1. Avaliar os achados morfológicos indicadores de prognóstico em biópsia de medula óssea, considerando-se os seguintes fatores: celularidade, relação mielóide:eritróide, alteração qualitativa e quantitativa de megacariócitos, arquitetura medular, ALIP, presença de células CD34 +, megaloblastos, alterações estromais e fibrose medular;
2. Correlacionar os achados morfológicos em biópsia de medula óssea com a análise do mielograma de cada paciente, verificando a significância estatística;
3. Realizar análise citogenética no momento do diagnóstico em pacientes com SMD primária e acompanhar citogeneticamente e clinicamente estes pacientes para observar as principais anomalias numéricas e estruturais envolvidas no processo de transformação leucêmica;
4. Correlacionar os achados morfológicos em biópsia de medula óssea com a análise citogenética;
5. Analisar o impacto prognóstico de acordo com as classificações FAB e OMS e com o IPSS correlacionando com os dados morfológicos e citogenéticos;
6. Aplicar métodos estatísticos para verificar a significância da análise morfológica de biópsia de medula óssea, do estudo citogenético, das classificações utilizadas e do IPSS em relação à sobrevida dos pacientes.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Pacientes**

Foram analisados no período de 2000 a 2009, 32 pacientes com SMD primária empregando parâmetros clínicos, morfológicos e citogenéticos. Os pacientes foram provenientes do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). O diagnóstico da SMD foi baseado nas características clínicas, morfológicas do aspirado e da biópsia de medula óssea e no estudo citogenético. Foram excluídos: pacientes com SMD secundária, os que não possuíam avaliação citogenética conclusiva, aqueles cujo material para análise morfológica não estava disponível no arquivo da instituição (lâminas e bloco de parafina da biópsia de medula óssea), as biópsias consideradas artefatuais e aquelas com menos de cinco espaços trabeculares. Os pacientes pediátricos foram excluídos por apresentarem aspectos clínicos, morfológicos e citogenéticos diferentes dos adultos. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HUPE conforme a Resolução nº 196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde (protocolo nº 2001 - CEP/HUPE) (Anexo 1).

#### **3.2 Estudo Clínico**

O levantamento das características clínicas de cada paciente foi realizado através da análise de prontuários, incluindo exames laboratoriais (anexo 2).



### 3.3 Estudo morfológico

#### 3.3.1 Análise de biópsia de medula óssea

As lâminas utilizadas para o diagnóstico foram revistas e avaliadas quanto às características morfológicas da SMD primária utilizando as colorações de hematoxilina-eosina, reticulina e Giemsa que são realizadas na rotina diagnóstica no Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A descrição de cada biópsia dos pacientes estudados foi padronizada de acordo com a ficha "Avaliação dos Achados Morfológicos em Biópsia de Medula Óssea em Síndrome Mielodisplásica primária" elaborada para esse estudo (Anexo 3).

A avaliação dos achados nas biópsias de medula óssea foi dividida em: alterações estromais, incluindo fibrose medular e alterações celulares qualitativas e quantitativas. A contagem de espaços trabeculares indicou se a amostra era representativa para ser avaliada, desconsiderando-se a área paracortical. Foram consideradas inadequadas para análise as biópsias de medula óssea com menos de cinco espaços trabeculares. As análises qualitativas e quantitativas foram realizadas por dois observadores.

As alterações estromais foram classificadas como "ausente", "discreta", "moderada", "importante" e "não avaliável" seguindo os parâmetros apresentados nas "diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas" (Niero-Melo *et al*, 2006). Foram avaliadas a existência de edema, ectasia sinusoidal, plasmócitos, linfócitos, nódulos linfóides e precursores intravasculares (Cotelingam, 2003).

O estudo da fibrose medular foi realizado pela coloração para reticulina e havendo necessidade, seria realizada coloração com tricrômico de Gomori para visualização de fibras colágenas (Steensma *et al*, 2001). Considerou-se a escala de Bauermeister para graduar a quantidade de fibrose (Niero-Melo *et al*, 2006). Essa escala possui cinco graduações. No grau 0 não há fibrose; no grau 1 há fibras ocasionais e/ou focos finos e no grau 2 nota-se rede fina em grande parte do corte, sem fibras grossas. O grau 3 possui rede difusa, com focos esparsos e fibras

grossas, mas sem colágeno, enquanto que no grau 4 os focos são grossos e notam-se áreas de colagenização.

As alterações quantitativas analisadas envolveram celularidade global e a específica de cada linhagem e a sua organização arquitetural na medula óssea. A celularidade da medula óssea foi quantificada em porcentagem. Sua classificação em hipocelular, normocelular e hipercelular dependeu da idade do paciente. Em pacientes com menos de 60 anos e com a celularidade igual ou menor que 30%, foi considerado hipocelular e, com mais de 70%, hipercelular. Nos pacientes com mais de 60 anos e celularidade igual ou menor que 20%, foi considerado hipocelular e hipercelular com mais de 60% (Cotelingam, 2003; Thieli *et al*, 2005).

Em relação à quantificação da celularidade específica de cada série foi utilizado a razão entre as linhagens mielóide:eritróide (relação M:E) e analisada se estava dentro dos limites da normalidade, ou seja, de 2:1 a 3:1 (Cotelingam, 2003). A contabilidade da linhagem megacariocítica foi feita por uma média do número de megacariócitos presentes em dez campos de 400X no microscópio Olympus modelo BX41TF, sendo considerado normal as médias entre 2 a 5 megacariócitos por campo. A perda da orientação arquitetural foi avaliada em “ausente”, “discreta”, “moderada”, “importante” e “não avaliável”, onde foram consideradas todas as três linhagens mielóides.

As alterações qualitativas foram classificadas em “ausente”, “discreta”, “moderada”, “importante” e “não avaliável”. Na linhagem eritróide foi investigada a presença de megaloblastos. Em relação à linhagem megacariocítica, foi observada a presença de micromegacariócitos e de hipolobulação nuclear. Em relação à linhagem mielóide, foi analisada a existência de ALIP e de células blásticas isoladas (CD34 positivas).

### 3.3.2 Estudo Imuno-histoquímico

Os blocos de parafina foram submetidos aos cortes histológicos e estes sofreram desparafinização e hidratação. Os cortes histológicos obtidos a partir dos blocos de parafina, em temperatura ambiente, foram deixados em estufa a 58-60<sup>0</sup>C por 20 horas. Em seguida as lâminas foram colocadas em cubas contendo xilol por

20 minutos. Posteriormente, foram colocadas no álcool etílico a 100% por 10 minutos e hidratadas em água destilada por 5 minutos. Em seguida, esse material foi submetido à recuperação antigênica utilizando o tampão Tris EDTA com pH 9,0 à 95-98<sup>0</sup>C por 25 minutos no “*steamer*”. O material foi deixado em temperatura ambiente por 20 minutos.

Ao final da recuperação antigênica, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% por 20 minutos em temperatura ambiente. Após retirado o excesso, as lâminas ficaram em repouso por 5 minutos no Tris com pH 6,0. Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas utilizando o “Background Sniper do Kit MACH 1” universal (Biocare Medical) por 10 minutos. Nesse estudo foram utilizados os anticorpos primários para CD34 (clone QBEnd/10, diluição 1:80, Cell Marque), para mieloperoxidase (policlonal, diluição 1:1000, Cell Marque) e para CD61 (clone 2f2, diluição 1:800, Cell Marque). Os manuais do fabricante desses três anticorpos primários encontram-se em anexo (Anexo 4).

Os anticorpos foram diluídos em tubos de ensaio contendo substância diluidora, constituída de albumina de soro bovino 0,1% (BSA), em TBS a 1% e azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,2%.

As lâminas com os cortes histológicos preparadas anteriormente foram incubadas com os anticorpos primários previamente diluídos e acondicionadas em geladeira 4°C durante a noite. Para amplificar a reação antigênica foi utilizado o sistema de amplificação com polímero MACH 1 (Biocare Medical). Nesse sistema de amplificação, as lâminas foram incubadas por 15 minutos com o “mouse probe”, em temperatura ambiente (esta etapa só foi necessária quando utilizado anticorpo monoclonal de camundongo, para anticorpos de coelho esta etapa foi omitida), seguindo-se de incubação com o polímero universal HPR por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após esse período, foram realizadas a revelação e a contra coloração para visualização das células representadas no corte histológico e para que fosse possível distinguir as células marcadas pelo anticorpo primário. A revelação foi realizada com o substrato cromogênico 3,3’ diaminobenzidina (DAB) (DAKO) e a contra revelação foi feita usando o corante hematoxilina de Harris. Posteriormente, as lâminas foram montadas.

### 3.3.3 Estudo morfológico – Mielograma

As lâminas utilizadas para o diagnóstico dos pacientes analisados foram revistas por dois observadores para caracterizar as alterações morfológicas em SMD primária, utilizando a coloração de May-Grünwald/Giemsa, que é realizada na rotina diagnóstica no Serviço de Hematologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os critérios diagnósticos seguiram as recomendações da Organização Mundial de Saúde (Brunnering *et al*, 2008). Nos casos em que não foi possível realizar essa revisão, foi utilizada a descrição do exame presente no prontuário do paciente.

Os esfregaços de medula óssea - mielograma - foram analisados de acordo com a celularidade em hipercelular, normocelular e hipocelular, a partir da quantidade de células e de espículas ósseas presentes na lâmina.

A contagem da celularidade específica para cada linhagem foi realizada contando-se 500 células em cada exame e seu valor expresso em porcentagem em separado para as linhagens: eritróide, megacariocítica e mielóide, além da porcentagem de blastos.

A presença de alterações citológicas mielodisplásicas foi considerada significativa a partir do acometimento de 10% das células nucleadas para as linhagens mielóide e eritróide. A displasia na linhagem megacariocítica foi considerada significativa a partir do acometimento de 15% em 30 células avaliadas.

A pesquisa de sideroblastos em anel foi realizada utilizando-se a coloração azul da Prússia realizada na rotina diagnóstica do Serviço. Foram contados 100 eritroblastos, para avaliação da porcentagem de sideroblastos em anel, ou seja, da porcentagem de eritroblastos que possuíam cinco ou mais siderossomos ou 1/3 da circunferência nuclear com depósito azulado do corante marcando a presença de ferro.

### 3.4 Estudo citogenético

As células da medula óssea foram lavadas com RPMI 1640 (Sigma), em seguida, foi feita uma diluição de 1:20 da suspensão celular em líquido de Thomas (1mL de ácido acético glacial, uma gota de violeta genciana, 100mL de água destilada) e as células foram contadas na câmara de Neubauer em microscópio óptico Zeiss (contraste de fase). Foram incubadas de  $5 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  células em 80% de RPMI e 20% de soro fetal bovino GIBCO, a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Duas horas antes do término da cultura, foram adicionados 0.05µg/mL de colchicina e a cultura foi incubada novamente por mais 1 hora nas mesmas condições.

Ao final da incubação, o material foi centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf modelo - 5804) por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso em 5mL de uma solução hipotônica (KCl 0.075M). O material foi incubado a 37°C por 15 minutos, sendo em seguida centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf modelo - 5804) por 6 minutos. O sedimento foi fixado com Solução Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético), sendo na primeira fixação adicionado lentamente um volume de 5 mL. Após 20 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Eppendorf modelo - 5804) durante 6 minutos e o sobrenadante desprezado. O procedimento foi repetido mais 2 vezes e o sedimento da última fixação foi ressuspenso em um pequeno volume de fixador, que variou de acordo com a quantidade de material. As lâminas foram preparadas pingando-se uma gota de suspensão celular em uma lâmina limpa e umedecida e o material foi fixado sobre a lâmina na chama. A primeira lâmina obtida foi corada com corante Giemsa 2% em tampão fosfato (pH 6.8) e observada no microscópio óptico para verificar o índice mitótico e a qualidade das metáfases. As demais lâminas foram envelhecidas em um espaço de tempo que variou de 1 dia a 1 semana a temperatura constante para o bandeamento GTG.

Para obtenção de padrões de bandeamento GTG foi utilizada a técnica de (Seabright, 1971), com o seguinte procedimento: as lâminas foram incubadas em uma solução de tripsina 0.1% em solução Dulbeco (pH 7.8), em tempos que variaram de 1 segundo a 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas com

solução de soro fisiológico e coradas em uma solução de Giemsa (Merck) a 2% em tampão fosfato (pH 6.8) durante 15 minutos.

Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN, 2009). A análise cromossômica foi realizada em microscopia ótica examinando no mínimo 20 metáfases por paciente. Um caso foi considerado anormal quando três ou mais metáfases apresentaram a mesma anomalia cromossômica estrutural e/ou numérica. Foram adquiridas através do Sistema de Cariotipagem Cytovision Applied Image de 5 a 10 metáfases para a montagem dos cariótipos de cada paciente. Os cromossomos metafásicos foram analisados com 150-300 bandas / set haplóide.

### 3.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada para verificar a associação entre as variáveis morfológicas, as classificações FAB e OMS, IPSS e citogenética utilizando-se o teste exato de Fisher (Clarkson *et al*, 1993). Todas as análises foram conduzidas com o pacote estatístico R, versão 2.11.1 (R Development Core Team, 2010).

O teste de Stuart-Maxwell foi utilizado para comparar o mielograma com a biópsia de medula óssea, exceto a contagem de blastos. Todos os pacientes realizaram os dois métodos, sendo considerado um teste pré-pós. Quando o p-valor é significativo (menor que 0,05), há uma diferença estatisticamente significativa entre mielograma e biópsia (Stuart, 1955; Maxwell, 1970).

As análises de comparações de médias entre a contagem de blastos pelo mielograma e os subgrupos de acordo com ALIP pela biópsia de medula óssea foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, visto que a amostra é de 32 (N=32). O nível de significância estabelecido foi de  $\alpha=0,05$ .

Para compor as análises de sobrevida, utilizaram-se as seguintes variáveis: classificação FAB, IPSS, análise citogenética, celularidade, relação mielóide:eritróide, quantidade de megacariócitos, presença de micromegacariócitos, hipolobulação nuclear megacariocítica, arquitetura medular, ALIP, presença de células CD34+, megaloblastos, alterações estromais e fibrose medular. O tempo de

sobrevida (em meses) foi estabelecido como o período decorrente da data do diagnóstico até o último evento. O desfecho foi considerado óbito por LMA. Todos os indivíduos que não apresentaram o desfecho foram classificados como censura, ou seja, excluídos.

As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier para cada variável e o teste de Log-Rank para comparar os tempos de sobrevida entre os grupos de cada variável. Este teste identifica se as curvas de Kaplan-Meier apresentam diferença entre os grupos estudados. Há diferença estatisticamente significativa quando p-valor for menor que 0,05 (Shrout, & Fleiss, 1979; Streiner & Norman, 2003).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise das Características Clínicas

Foram avaliados 32 pacientes com síndrome mielodisplásica primária diagnosticados e acompanhados pelo Serviço de Hematologia do HUPE-UERJ entre 2000 e 2009. A tabela 6 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes. A idade média dos pacientes foi de 61,5 anos, variando de 32 a 91 anos, sendo 17 pacientes do sexo masculino e 15 pacientes do sexo feminino. Na época do diagnóstico, os pacientes apresentavam os seguintes índices hematimétricos médios: hemoglobina de 9,02g/dL, leucometria de 7.502 células/mm<sup>3</sup>, número de plaquetas de 145.990 células/mm<sup>3</sup> e, respectivamente, as seguintes medianas: hemoglobina de 10g/dL, leucometria de 7.650 células/mm<sup>3</sup> e número de plaquetas de 107.000 células/mm<sup>3</sup>. As citopenias periféricas foram expressas por sinais e sintomas relacionados a síndrome anêmica (17 AR, 1 ARSA e 7 AREB), por equimoses e hematomas (7 AR e 3 AREB) e por infecções e febre (8 AR e 7 AREB).

Os pacientes foram classificados segundo os critérios FAB em AR (22 pacientes), ARSA (1 paciente) e AREB (9 pacientes) e pela classificação OMS em CRDU (4 pacientes), CRDM (19 pacientes), AREB-1 (6 pacientes) e AREB-2 (3 pacientes). Os pacientes do grupo com AR e ARSA apresentaram sobrevida média de 45 meses, variando de 1 a 135 meses, enquanto que aqueles do grupo AREB, apresentaram sobrevida média de 28,7 meses, variando de 1,8 a 102,5 meses. Essa diferença de sobrevida está ilustrada na figura 7 ( $p=0,007$ ).



**Tabela 6:** Características Clínicas, Laboratoriais e Citogenéticas dos Pacientes Estudados com Síndrome Mielodisplásica Primária.

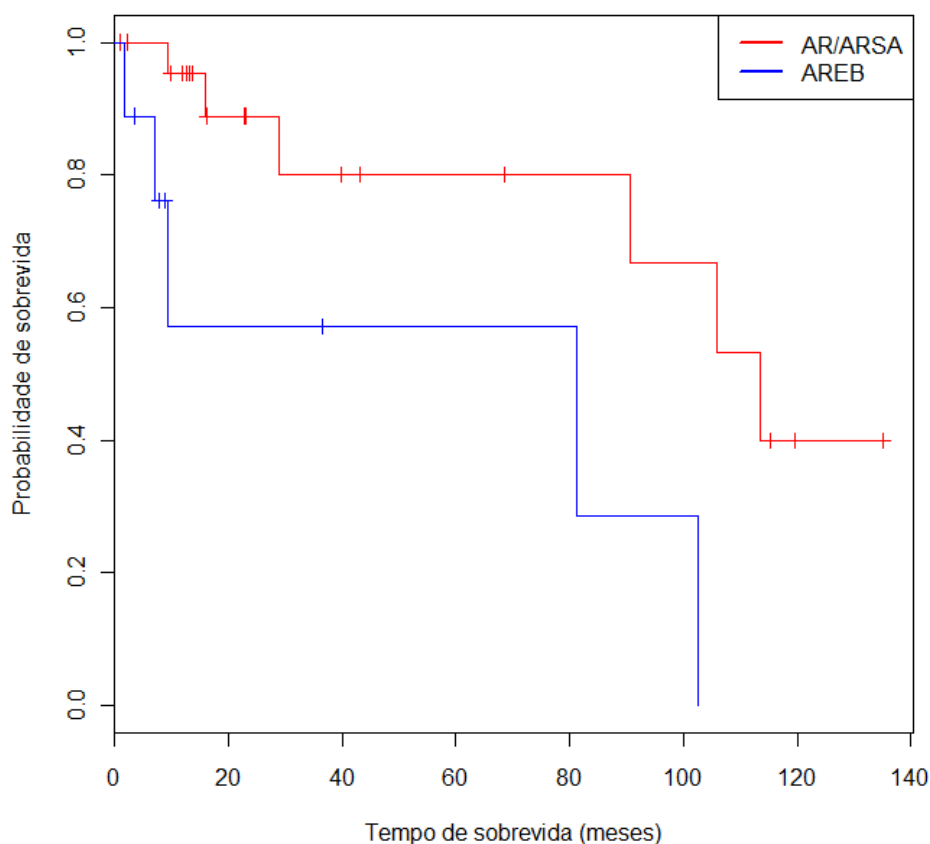
| Nº | Idade | Gênero | Cor | OMS  | FAB | Hb (d/dL) | Leucócitos (cc/ mm <sup>3</sup> ) | Plaquetas (cc/ mm <sup>3</sup> ) | Citogenética | IPSS  | Tratamento      | Óbitos (Causa) | Sobrevida (meses) |
|----|-------|--------|-----|------|-----|-----------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|-------|-----------------|----------------|-------------------|
| 1  | 51    | F      | P   | CRDU | AR  | 13,7      | 2400                              | 98000                            | Inv(3q)      | INT1  | Suporte         |                | 135               |
| 2  | 76    | M      | N   | CRDU | AR  | 11        | 1960                              | 47700                            | del(3p)      | INT1  | Hemo            | Peritonite     | 68,5              |
| 3  | 87    | F      | B   | CRDU | AR  | 8,9       | 6400                              | 311000                           | Normal       | BAIXO | Hemo            |                | 23                |
| 4  | 84    | M      | B   | CRDU | AR  | 12,9      | 9300                              | 113000                           | add(16q)     | INT1  | Hemo/QT         | LMA            | 90,7              |
| 5  | 84    | M      | B   | CRDM | AR  | 6,6       | 20900                             | 137000                           | del(17p)     | INT1  | Hemo/QT         | LMA            | 9,3               |
| 6  | 79    | F      | B   | CRDM | AR  | 12        | 2540                              | 66000                            | Normal       | INT1  | Hemo            | ICC            | 16,2              |
| 7  | 53    | F      | N   | CRDM | AR  | 11,2      | 3100                              | 206000                           | Normal       | BAIXO | Suporte         |                | 12,6              |
| 8  | 61    | M      | P   | CRDM | AR  | 5,4       | 1900                              | 74000                            | del(12p)     | INT1  | Hemo            |                | 39,9              |
| 9  | 33    | F      | B   | CRDM | AR  | 8,8       | 23000                             | 140000                           | -7           | INT1  | QT              | LMA            | 15,9              |
| 10 | 56    | M      | P   | CRDM | AR  | 7,6       | 5500                              | 150000                           | del(12p)     | INT1  | Hemo/QT         | LMA            | 28,8              |
| 11 | 32    | M      | P   | CRDM | AR  | 6,8       | 7100                              | 112000                           | Normal       | INT1  | Hemo            |                | 11,8              |
| 12 | 48    | F      | P   | CRDM | AR  | 11,1      | 5400                              | 113000                           | Normal       | INT1  | Suporte         |                | 119,4             |
| 13 | 58    | M      | B   | CRDM | AR  | 8,5       | 1850                              | 93000                            | Normal       | INT1  | Suporte         |                | 2,3               |
| 14 | 43    | F      | P   | CRDM | AR  | 9,1       | 6900                              | 163000                           | Normal       | BAIXO | Hemo/talidomida |                | 43,2              |
| 15 | 46    | F      | N   | CRDM | AR  | 7,9       | 2250                              | 78500                            | Normal       | INT1  | Hemo            |                | 105,8             |
| 16 | 64    | F      | P   | CRDM | AR  | 6         | 2950                              | 416000                           | Normal       | INT1  | Hemo/talidomida |                | 22,8              |

Continua na próxima página

**Tabela 6:** Continuação.

| Nº | Idade | Gênero | Cor | OMS   | FAB  | Hb (d/dL) | Leucócitos (cc/mm <sup>3</sup> ) | Plaquetas (cc/mm <sup>3</sup> ) | Citogenética | IPSS  | Tratamento         | Óbitos (Causa) | Sobrevida (meses) |
|----|-------|--------|-----|-------|------|-----------|----------------------------------|---------------------------------|--------------|-------|--------------------|----------------|-------------------|
| 17 | 35    | F      | N   | CRDM  | AR   | 13        | 8200                             | 102000                          | Normal       | BAIXO | Suporte            |                | 9,8               |
| 18 | 70    | M      | B   | CRDM  | AR   | 7,2       | 10000                            | 288000                          | Normal       | INT1  | Hemo               | Endocardite    | 1                 |
| 19 | 66    | M      | P   | CRDM  | AR   | 13        | 4800                             | 79500                           | Normal       | INT1  | Hemo               | Pneumonia      | 115,2             |
| 20 | 75    | M      | P   | CRDM  | AR   | 12,9      | 3850                             | 75000                           | del(17p)     | INT1  | Suporte            | IAM            | 23,1              |
| 21 | 66    | M      | B   | CRDM  | AR   | 8,1       | 6610                             | 286000                          | del(11)(q23) | INT1  | Hemo               | IAM            | 13,5              |
| 22 | 41    | F      | N   | CRDM  | AR   | 12        | 5540                             | 60000                           | Normal       | BAIXO | Suporte            |                | 13,2              |
| 23 | 62    | M      | B   | CRDM  | ARSA | 7,3       | 2820                             | 431000                          | t(6,12)      | INT1  | Hemo/talidomida/QT | LMA            | 113,4             |
| 24 | 78    | F      | B   | AREB1 | AREB | 8         | 13000                            | 50000                           | Complexo     | INT2  | QT                 | LMA            | 81,2              |
| 25 | 60    | F      | P   | AREB1 | AREB | 8,3       | 2850                             | 472000                          | del(5q)      | INT1  | Hemo/Talidomida/QT | LMA            | 102,5             |
| 26 | 77    | M      | N   | AREB1 | AREB | 9,3       | 2720                             | 39000                           | +8           | INT2  | Hemo/QT            | LMA            | 6,9               |
| 27 | 68    | M      | P   | ARAB1 | AREB | 8,8       | 9000                             | 8000                            | del(11)(q23) | INT2  | Suporte            | Pneumonia      | 36,6              |
| 28 | 58    | M      | B   | AREB1 | AREB | 2,3       | 1910                             | 45000                           | Normal       | INT2  | Hemo/QT            |                | 7,7               |
| 29 | 81    | M      | P   | AREB1 | AREB | 12,1      | 4940                             | 148000                          | Normal       | BAIXO | Suporte            |                | 8,9               |
| 30 | 37    | F      | P   | AREB2 | AREB | 4,8       | 3520                             | 146000                          | Normal       | ALTO  | QT                 | LMA            | 9,4               |
| 31 | 91    | M      | P   | AREB2 | AREB | 5,8       | 53870                            | 31000                           | inv(17)(q10) | ALTO  | Hemo/QT            | LMA            | 3,4               |
| 32 | 58    | F      | P   | AREB2 | AREB | 8,3       | 3000                             | 93000                           | del(11)(q23) | ALTO  | QT                 | LMA            | 1,8               |

Abreviaturas: **F**- feminino; **M**- masculino; **B**-branco; **P**- pardo; **N**- negro; **AR**- anemia refratária; **ARSA**- anemia refratária com sideroblastos em anel; **AREB**- anemia refratária com excesso de blastos; **INT**- intermediário **LMA**- Leucemia Meilóide Aguda; **ICC**- insuficiência cardíaca congestiva; **IAM**- infarto agudo do miocárdio; **Hemo**- hemo-trasfusão; **QT**- quimioterapia.



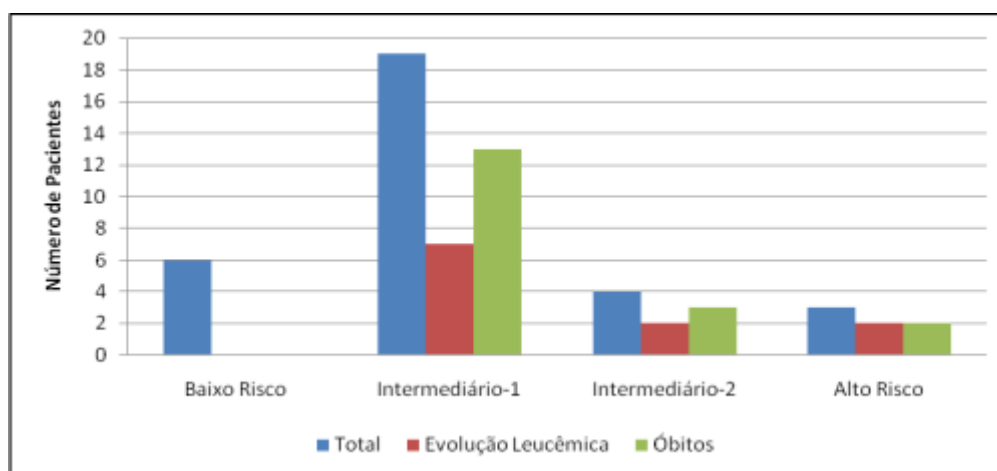
**Figura 7:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com os subgrupos da FAB ( $p=0,00795$ ).

Durante o acompanhamento clínico desses pacientes, 18 faleceram, sendo onze pacientes devido à evolução para leucemia mielóide aguda (LMA) – AR (4), ARSA (1) e AREB (6) pela classificação FAB e CRDU (1), CRDM (4), AREB-1 (4) e AREB-2 (2) de acordo com a OMS. Os outros sete pacientes foram ao óbito devido às causas cardiovasculares ou infecciosas. No grupo AR as outras causas foram: infarto agudo do miocárdio acometendo dois pacientes, insuficiência cardíaca (1 paciente), pneumonia fúngica (1 paciente), endocardite relacionada à prótese mitral (1 paciente) e peritonite fecalóide como complicação de endoscopia digestiva baixa (1 paciente). No subtipo AREB, um paciente faleceu em decorrência de pneumonia associada à DPOC.

A terapia envolvendo hemotransfusões dependeu da necessidade clínica, sendo administrada em 14 pacientes com anemia refratária, um com ARSA e quatro com AREB. Sete entre nove pacientes com AREB e aqueles que evoluíram com

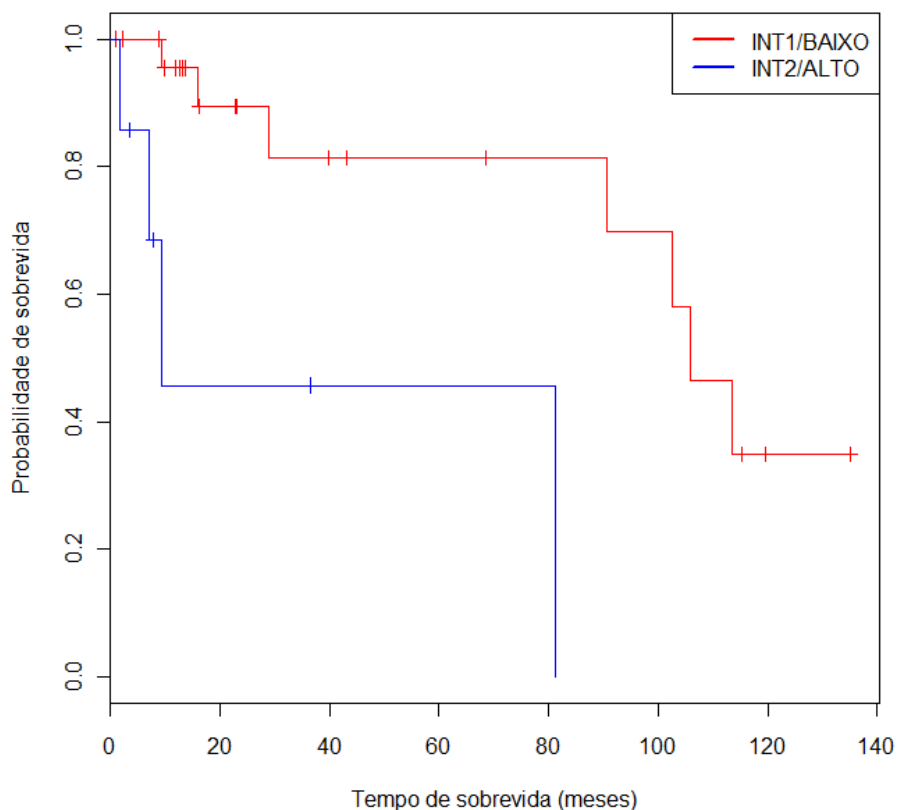
transformação leucêmica foram submetidos à quimioterapia. Quatro pacientes fizeram uso de talidomida como pode ser observado na tabela 6. Nenhum paciente foi submetido ao transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico por possuir mais de 55 anos de idade ou pela ausência de doadores histocompatíveis.

Foram utilizados critérios adotados pelo IPSS para classificar os pacientes segundo os grupos de risco (Greenberg *et al*, 1997). Verificamos que o grupo de risco mais frequente foi o intermediário 1. Dos 32 pacientes, seis (18,75%) foram classificados como baixo risco, 19 (59,37%) intermediário 1, quatro (12,5%) intermediário 2 e três (9,37%) alto risco (Figura 8).



**Figura 8:** A Frequência de pacientes com SMD primária de acordo com o IPSS. Número de pacientes com evolução leucêmica e óbitos por grupo de risco.

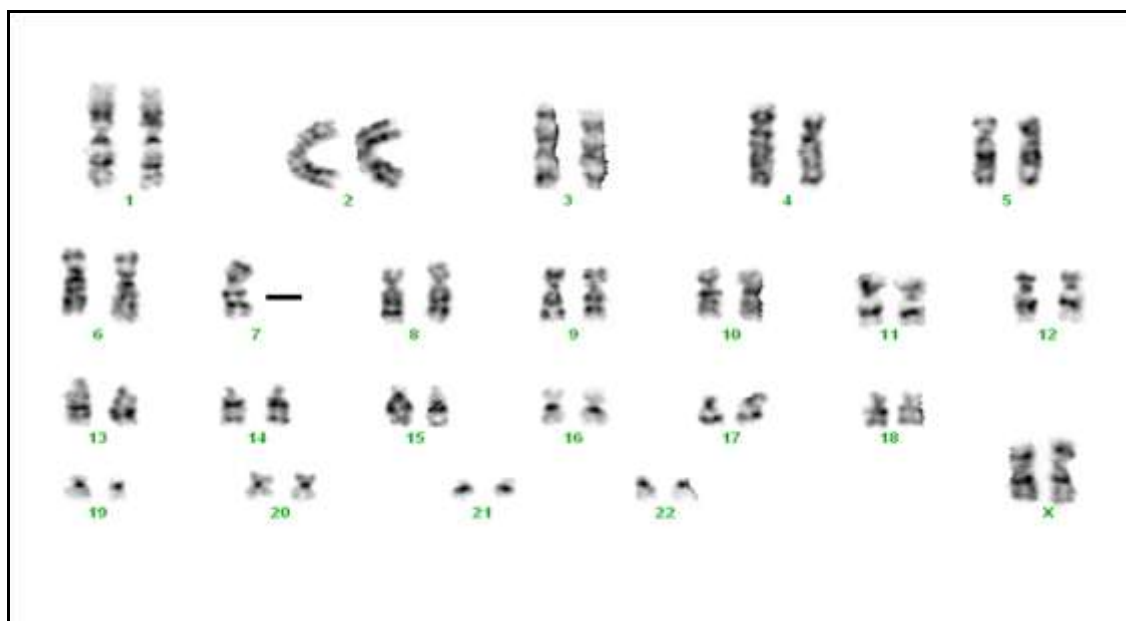
Avaliando os grupos de risco com a taxa de evolução da doença, verificamos que os pacientes classificados com intermediário 2 e alto risco, apresentaram a maior tendência de evolução da doença ( $p=0,098$ ). Dos pacientes classificados como intermediário 1, sete pacientes (36,8%) apresentaram evolução da doença; no grupo intermediário 2, dois pacientes (50%) apresentaram evolução e no grupo alto risco outros dois pacientes (66,6%) evoluíram para LMA. Não houve transformação leucêmica no grupo de baixo risco. Os pacientes com menor risco de evolução leucêmica (baixo risco e intermediário 1) apresentaram sobrevida maior em relação aqueles com maior risco (alto risco e intermediário 2) ( $p=0,00155$ ), como pode ser observado na figura 9.



**Figura 9:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico pelo IPSS ( $p=0,00155$ ).

## 4.2 Análise Citogenética

A análise citogenética mostrou alteração cromossômica em 16 pacientes (50%). Três apresentaram  $del(11)(q23)$ , dois possuíam  $del(12p)$  e outros dois  $del(17p)$ . Oito pacientes apresentaram, cada um, uma das seguintes alterações:  $del(3p)$ ,  $inv(3q)$ ,  $del(5q)$ ,  $t(6;12)$ ,  $-7$ ,  $+8$ ,  $add(16q)$  e  $inv(17)(q10)$  (figura 10). Um paciente possuía mais de três alterações, sendo considerado cariótipo complexo. Os achados citogenéticos foram estratificados segundo o prognóstico conferido pelo cariótipo em “bom”, “intermediário” e “mau” de acordo com o IPSS, 1997 (tabela 7).



**Figura 10:** Cariótipo completo de célula de medula óssea, bandeamento G: monossomia do cromossomo 7 (Paciente nº 9, 33 anos, CRDM).

**Tabela 7:** Alterações Citogenéticas nos Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Classificados segundo o Grupo FAB (1982) de acordo com o Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Subtipo      | Prognóstico Citogenético |               |     | Total |
|--------------|--------------------------|---------------|-----|-------|
|              | Bom                      | Intermediário | Mau |       |
| AR           | 0                        | 8             | 1   | 9     |
| ARSA         | 0                        | 1             | 0   | 1     |
| AREB         | 1                        | 4             | 1   | 6     |
| <b>Total</b> | 1                        | 13            | 2   | 16    |

**AR**- anemia refratária; **ARSA** - anemia refratária com sideroblastos em anel; **AREB** - anemia refratária com excesso de blastos (Bennett *et al*, 1982).

Dos pacientes estudados, onze sofreram transformação leucêmica durante o estudo. Os pacientes que possuíam alterações citogenéticas tiveram maior risco de desenvolver LMA ( $p=0,0233$ ). Aqueles que desenvolveram LMA e possuíam

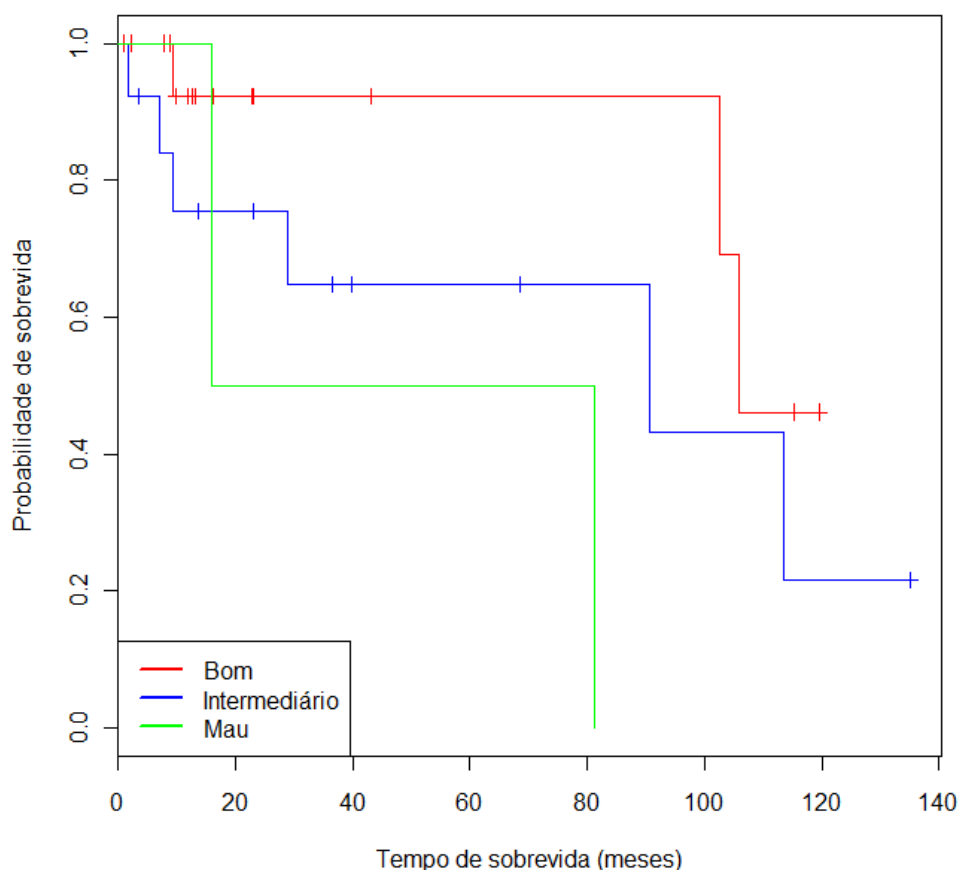
alteração cromossômica apresentaram uma sobrevida média de 43,5 meses, de 1,8 a 90,7 meses, por outro lado, aqueles com LMA sem alterações cromossômicas tiveram uma sobrevida média de 72,5 meses – de 9,4 a 105,8 meses ( $p = 0,52$ ).

Segundo a classificação FAB, os pacientes que sofreram transformação leucêmica foram classificados do seguinte modo: AR(4), ARSA(1) e AREB(6). Segundo os critérios da OMS, a distribuição desses pacientes em subgrupos seria: CRDU (1), CRDM (4), AREB-1 (4) e AREB-2 (2). Dois pacientes não apresentavam alterações citogenéticas (um com AR e um com AREB). O paciente com ARSA apresentava alteração citogenética [t(6,12)], considerada de prognóstico intermediário. Em relação aos pacientes com AR, três possuíam prognóstico citogenético intermediário [del(12p), del(17p) e del(16q)] e um paciente apresentou mau prognóstico citogenético (- 7).

Entre os seis pacientes com AREB que sofreram transformação para LMA e possuíam alterações citogenéticas, quatro tinham prognóstico citogenético intermediário [+8, inv(17)(q10) e dois com del(11)(q23)] e um com cariótipo complexo considerado de mau prognóstico. Um paciente classificado como AREB pelo grupo FAB possuía bom prognóstico citogenético - del(5q) - e ao longo do acompanhamento apresentou uma segunda alteração citogenética - del(9p) quando foi diagnosticada a transformação leucêmica.

Além desse paciente, dois pacientes que apresentavam inicialmente cariótipos normais com AR, durante o acompanhamento adquiriram alterações citogenéticas. Um deles evidenciou t(8;12)(q22;p12) um mês antes de falecer por pneumonia fúngica, mas sem sinais de evolução leucêmica. O outro paciente mostrou del(17p) e manteve-se estável sem alterações dos aspectos clínicos e laboratoriais.

Os pacientes com alterações citogenéticas consideradas de mau prognóstico e de prognóstico intermediário tiveram uma tendência de sobrevida menor do que aqueles com bom prognóstico citogenético ( $p=0,0781$ ), conforme demonstrado na figura 11.



**Figura 11:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com o prognóstico citogenético ( $p=0,0781$ ).

#### 4.3. Análise Morfológica – biópsia de medula óssea

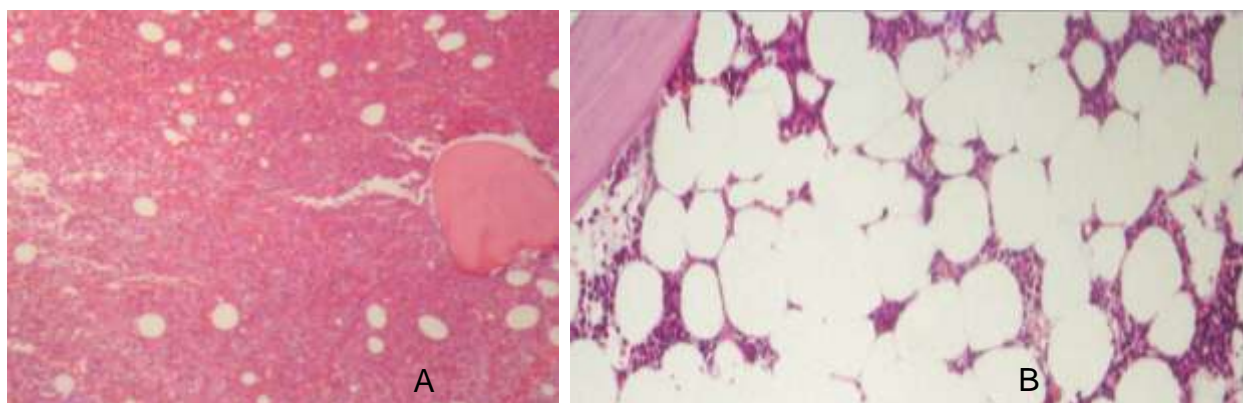
A avaliação morfológica das biópsias de medula óssea foi realizada considerando-se o componente celular e estromal incluindo fibrose medular. A morfologia das biópsias de medula óssea foi avaliada em conjunto com o estudo imuno-histoquímico para CD34, CD61 e mieloperoxidase para avaliação cito-arquitetural mais acurada.

Para esse objetivo, os 32 pacientes foram agrupados segundo os subtipos da classificação FAB e da OMS em 1) doença inicial (AR e ARSA pela FAB; CRDU, CRDM e ARSA pela OMS) - 23 pacientes e em 2) doença avançada (AREB pela FAB; AREB-1 e AREB-2 pela OMS) - nove pacientes e estratificados pela escala de prognóstico IPSS em 1) menor risco (baixo risco e intermediário 1) - 25 pacientes e em 2) maior risco (intermediário 2 e alto risco) - sete pacientes.



#### 4.3.1 Celularidade

Em relação à celularidade medular do grupo de pacientes com doença inicial, a medula óssea foi hiper celular em 14 pacientes (68,8%) e normocelular em oito (34,8%). Exemplos de celularidade medular podem ser observados na figura 12. A medula óssea foi considerada hipocelular em um paciente (4,4%) desse grupo. Por outro lado, no grupo de pacientes com doença avançada, sete (77,8%) possuíam medula óssea hiper celular. Os outros dois pacientes (22,2%) com doença avançada foram classificados como hipocelular ( $p=0,07308$ ).



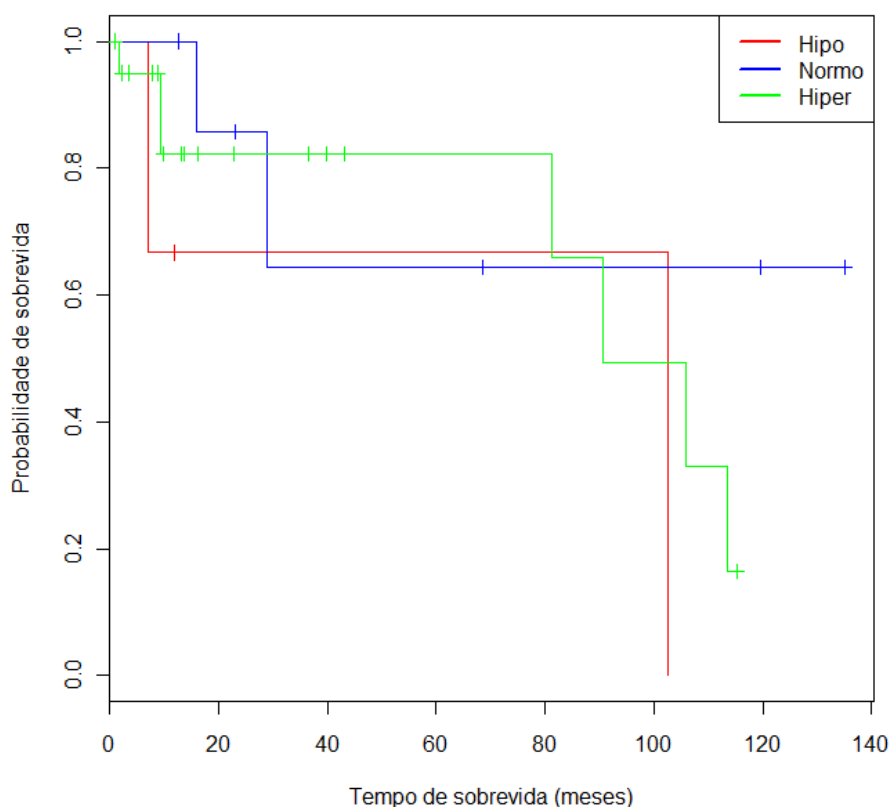
**Figura 12:** Exemplo paciente (nº 22) com medula óssea hiper celular clasificado como AR (A) e de paciente (nº 26) com medula ossea hipocelular clasificado como AREB(B). Coloração de Hematoxilina e Eosina, 10X e 20X, respectivamente.

Durante a avaliação do risco de evolução leucêmica, foi verificado que no grupo de pacientes com menor risco de evolução leucêmica, 15 pacientes (60%) possuíam medula óssea hiper celular. Ainda nesse grupo, a medula óssea foi considerada normocelular em oito pacientes (32%) e em outros dois pacientes (8%), foi considerada hipocelular. No grupo de pacientes com maior risco de transformação leucêmica não havia pacientes com medula normocelular. A maioria dos pacientes desse grupo (85,7%) possuíam medula óssea hiper celular. Somente um paciente (14,3%) apresentou medula óssea hipocelular ( $p=0,2413$ ). Esses dados podem ser observados na tabela 8.

O estudo da sobrevida não revelou diferença entre os pacientes que possuíam medula óssea hipercelular, normocelular e hipocelular ( $p = 0,348$ ), como pode ser observado na figura 13.

**Tabela 8:** Celularidade de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária pela Fase da Doença.

| Avaliação da celularidade | Fase da doença |           | Risco de evolução leucêmica |           |
|---------------------------|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|                           | Inicial        | Avançada  | Menor                       | Maior     |
|                           | Nº (%)         | Nº (%)    | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| Hiper                     | 14 (60,8%)     | 7 (77,8%) | 15 (60%)                    | 6 (85,7%) |
| Normo                     | 8 (34,8%)      | 0 (0%)    | 8 (32%)                     | 0 (0%)    |
| Hipo                      | 1 (4,4%)       | 2 (22,2%) | 2 (8%)                      | 1 (14,3%) |



**Figura 13:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com celularidade em biópsia de medula óssea classificada em hipercelular (Hiper), normocelular (Normo) e hipocelular (Hipo) ( $p = 0,348$ ).

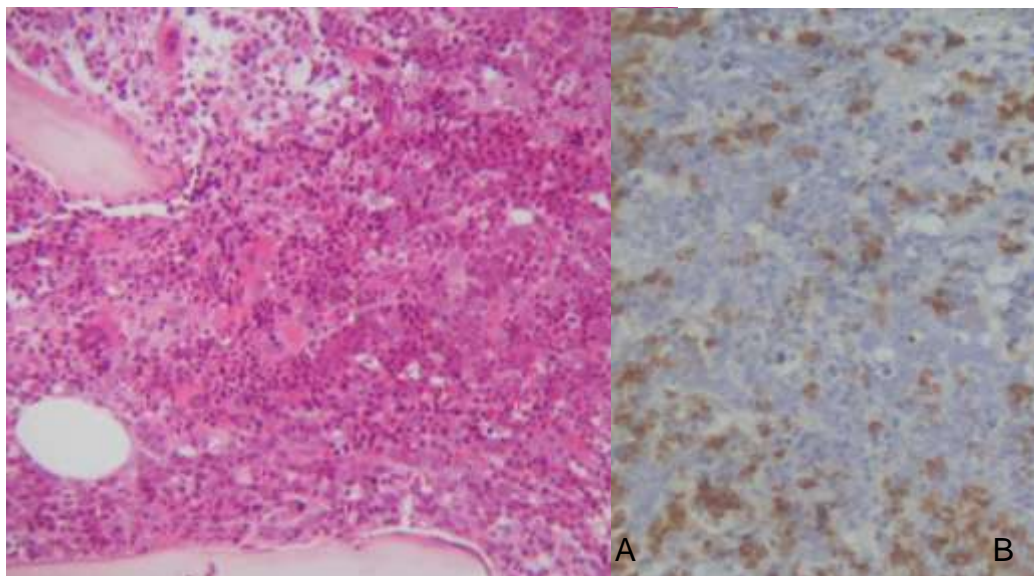
#### 4.3.2 Relação mielóide:eritróide

Ao avaliar a relação mielóide:eritróide (M:E), 16 pacientes (69,7%) do grupo com doença inicial apresentavam redução da relação M:E. Somente em dois pacientes evidenciou-se relação mielóide:eritróide aumentada. Os demais pacientes desse grupo não demonstraram alteração dessa relação. Enquanto isso, nos pacientes com doença avançada, o aumento da relação mielóide:eritróide, foi observada em seis pacientes (66,65%). Três pacientes com doença avançada (33,35%) apresentavam relação M:E reduzida. No grupo com doença avançada não houve pacientes com relação M:E dentro da normalidade. Houve significância estatística entre os grupos ( $p=0,00335$ ).

Foi avaliado o risco de progressão leucêmica dos pacientes de acordo com a relação mielóide:eritróide. Cinco pacientes (71,45%) com maior risco possuíam esta relação aumentada e dois possuíam valores reduzidos. Não houve paciente com relação normal nesse grupo (Tabela 9). Por outro lado, a quantidade de pacientes no grupo de baixo risco com relação mielóide:eritróide reduzida foi significativamente maior ( $p=0,00945$ ), compreendendo 17 pacientes (68%) como pode ser visto na figura 14. Além desses pacientes, oito apresentavam baixo risco, sendo três com relação mielóide:eritróide aumentada e cinco com esta relação normal.

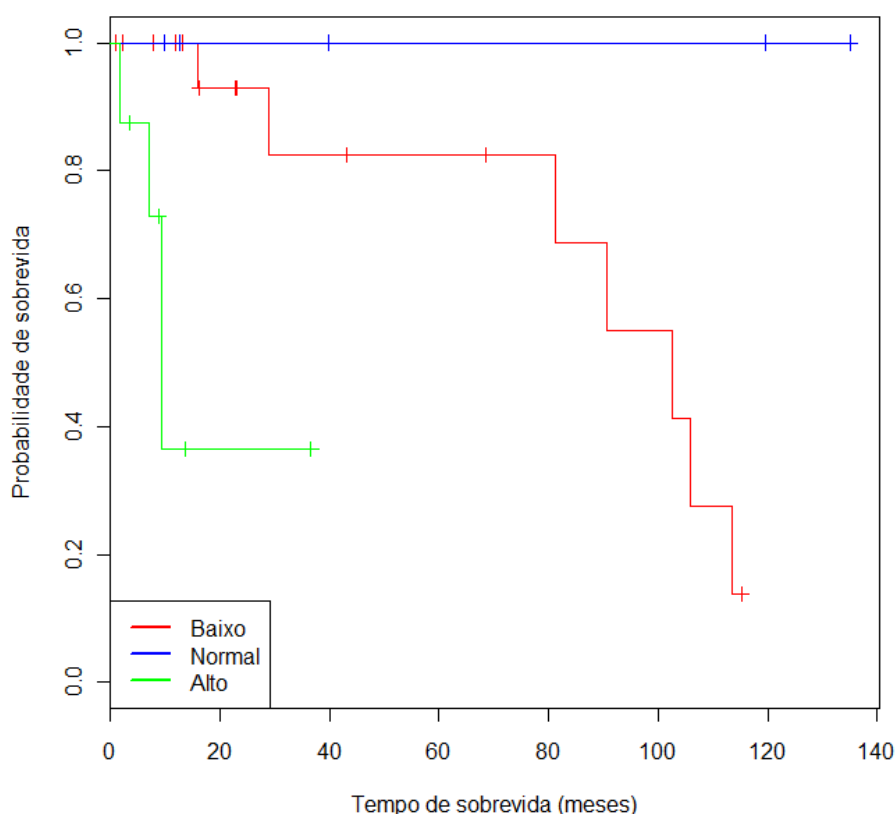
**Tabela 9:** Relação Mielóide:Eritróide em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Agrupados pela Fase da Doença e pelo Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Avaliação da relação<br>M:E | Fase da doença |            | Risco de evolução leucêmica |           |
|-----------------------------|----------------|------------|-----------------------------|-----------|
|                             | Inicial        | Avançada   | Menor                       | Maior     |
|                             | Nº (%)         | Nº (%)     | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| <b>Aumentada</b>            | 2 (8,6%)       | 6 (66,65%) | 3 (12%)                     | 5 (71,5%) |
| <b>Normal</b>               | 5 (21,7%)      | 0 (0%)     | 5 (20%)                     | 0 (0%)    |
| <b>Reduzida</b>             | 16 (69,7%)     | 3 (33,35%) | 17 (68%)                    | 2 (28,5%) |



**Figura 14:** Paciente com ARSA (nº 23) apresentando medula óssea hipercelular devido a hiperplasia eritróide. Coloração de Hematoxilina e Eosina, 40X (A). Imuno-histoquímica para mieloperoxidase evidenciando a redução da linhagem mielóide (B).

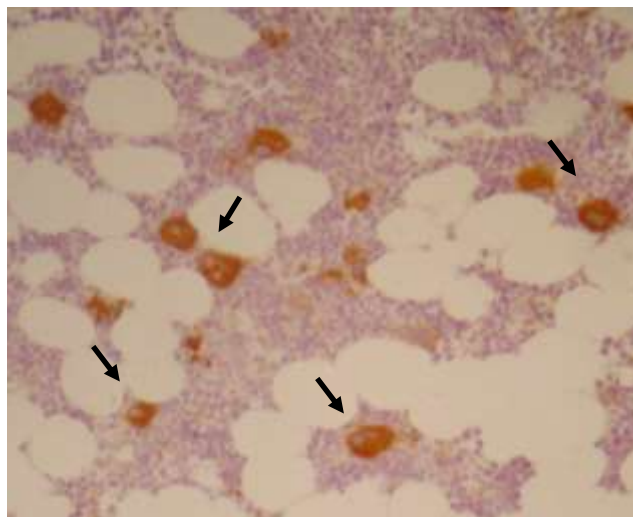
Os pacientes com relação mielóide:eritróide aumentada apresentaram sobrevida reduzida quando comparados aos pacientes com esta relação baixa ou normal ( $p=0,000379$ ), como pode ser observado na figura 15.



**Figura 15:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com relação mielóide:eritróide pela avaliação da biópsia de medula óssea distribuídos em aumentada, normal e reduzida ( $p = 0,000379$ ).

#### 4.3.3 Linhagem megacariocítica

Na avaliação quantitativa da linhagem megacariocítica, nos pacientes do grupo com doença inicial, onze (47,8%) tinham quantidades consideradas normais de megacariócitos e nove (39,2%) possuíam quantidades reduzidas (Figura 16). Três pacientes (13%) apresentaram número de megacariócitos aumentados. Dos pacientes do grupo com doença avançada, em cinco (55,5%) houve aumento da linhagem megacariocítica. Em três pacientes (33,4%) o número de megacariócitos encontrava-se reduzido e em um paciente (11,1%) foi observado quantidades normais de megacariócitos ( $p=0,03371$ ).



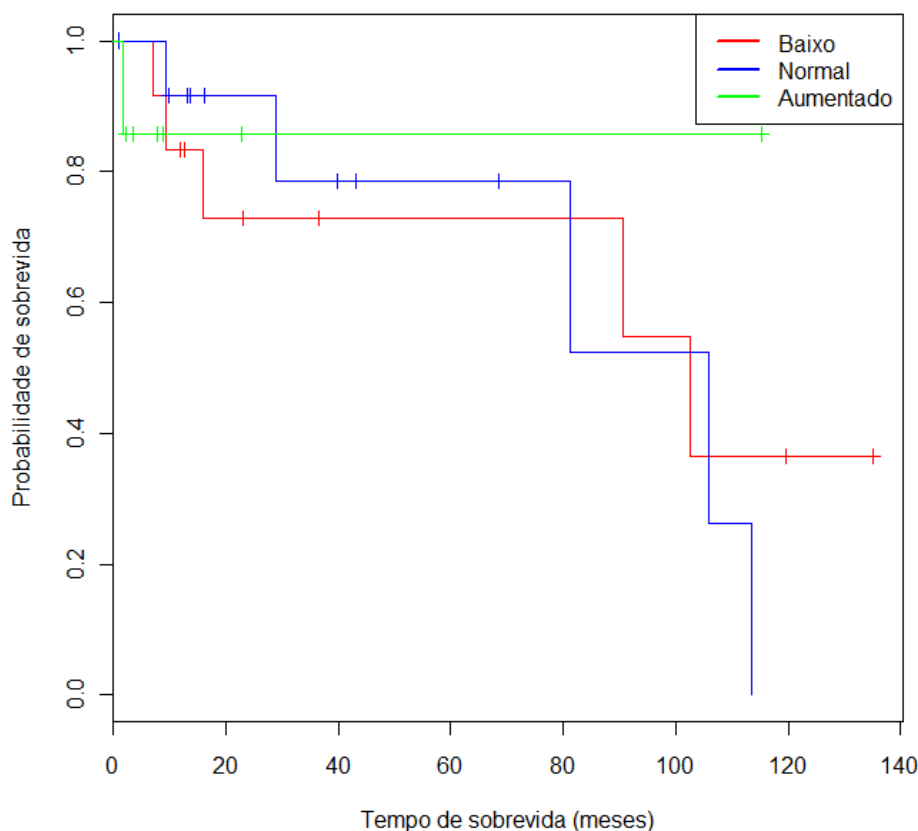
**Figura 16:** Paciente com AREB (nº 28) apresentando aumento da linhagem megacariocítica, sendo evidenciada pela imuno-histoquímica para CD61 (seta).

A avaliação do risco para evolução leucêmica revelou que os pacientes do grupo com menor risco apresentaram na sua maioria quantidades normais ou reduzidas de megacariócitos. Onze pacientes (44%) possuíam quantidades normais e dez (40%) tinham quantidades reduzidas. Outros quatro pacientes (16%) desse grupo possuíam quantidades aumentadas de megacariócitos. No grupo de pacientes de maior risco para evolução leucêmica, quatro (57,1%) apresentavam quantidades aumentadas, enquanto dois pacientes (28,6%) possuíam quantidades reduzidas. Um paciente (14,3%) desse grupo apresentava quantidades normais de megacariócitos ( $p=0,1190$ ). Essa avaliação pode ser observada na tabela 10.

**Tabela 10:** Relação da quantidade de megacariócitos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com a Fase da Doença e o Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Alteração megacariocítica quantitativa | Fase da doença |           | Risco de evolução leucêmica |           |
|--|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|  | Inicial        | Avançada  | Menor                       | Maior     |
|  | Nº (%)         | Nº (%)    | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| <b>Aumentados</b>                      | 3 (13%)        | 5 (55,5%) | 4 (16%)                     | 4 (57,1%) |
| <b>Normais</b>                         | 11 (47,8%)     | 1 (11,1%) | 11 (44%)                    | 1 (14,3%) |
| <b>Reduzidos</b>                       | 9 (39,2%)      | 3 (33,4%) | 10 (40%)                    | 2 (28,6%) |

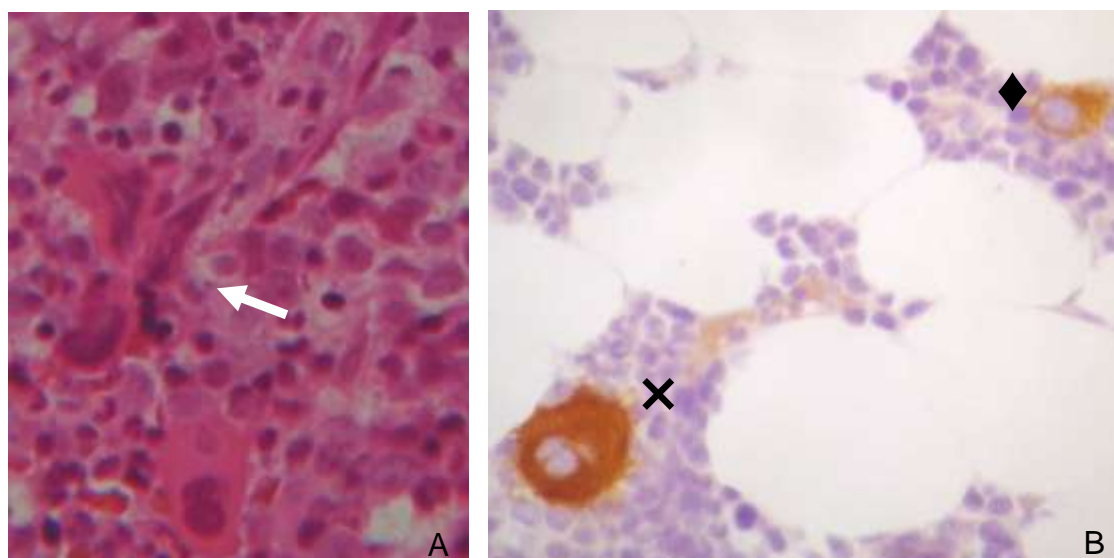
A avaliação da sobrevida estratificando os pacientes pelo número de megacariócitos em aumentado, normal e baixo não evidenciou diferença entre os grupos ( $p=0,855$ ), conforme pode ser observado na figura 17.



**Figura 17:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com a quantificação de megacariócitos pela biópsia de medula óssea agrupada em aumentada, normal e reduzida ( $p = 0,855$ ).

A análise qualitativa da linhagem megacariocítica evidenciou que quando apresentava alterações citológicas, essas eram expressas como micromegacariócitos e com hipolobulação nuclear (figura 18). Ao considerar a fase da doença, verificou-se que quatro pacientes (17,4%) em doença inicial apresentavam micromegacariócitos em quantidade considerada de modo importante e oito pacientes de modo moderado. Onze pacientes (65,2%) apresentavam essas alterações morfológicas de forma discreta ou ausente. No grupo de pacientes em doença avançada, cinco (55,5%) apresentavam na biópsia de medula óssea quantidade de micromegacariócitos considerada como importante e em um paciente essa alteração foi considerada moderada. Em três pacientes (33,5%), esse achado

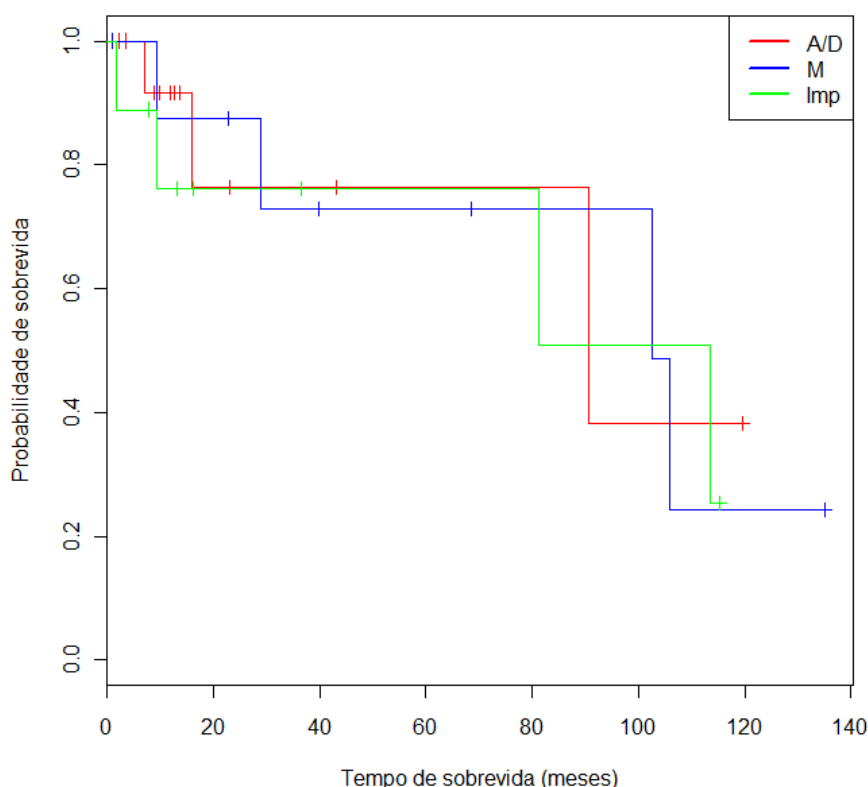
foi considerado como discreto ou ausente. Não houve significância estatística entre os grupos ( $p=0,1554$ ).



**Figura 18:** Paciente com ARSA (nº 23) apresentando megacariócitos hipolobulados atípicos agrupados. Coloração de Hematoxilina e Eosina, 40X (A). Micromegacariócito (identificado com ◆) ao lado de um megacariócito hipolobulado (identificado com ×) sendo evidenciados pela imuno-histoquímica para CD61 em paciente com AREB (nº 32) (B).

Em relação ao prognóstico (IPSS, 1997), no grupo com maior risco de transformação leucêmica, cinco pacientes (71,4%) apresentavam micromegacariócitos considerado como importante e em outros dois, essa alteração foi considerada como discreta ou ausente. No grupo com menor risco de evolução para LMA, na maioria dos pacientes (48%) essa alteração morfológica foi considerada discreta ou ausente de modo significativo ( $p=0,01799$ ). Nove pacientes (36%) desse grupo apresentaram micromegacariócitos em quantidade moderada e em apenas quatro (16%) a presença de micromegacariócitos foi considerada importante. Não houve diferença significativa em relação à sobrevida entre os grupos com micromegacariócitos considerados discretos ou ausentes, moderados ou importantes ( $p=0,955$ ), o que pode ser observado na figura 19.





**Figura 19:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com presença micromegacariócitos em biópsia de medula óssea em importante (Imp), moderada (M) e discreta ou ausente (A/D) ( $p=0,955$ ).

Na avaliação da hipolobulação nuclear megacariocítica de acordo com a fase da doença, verificou-se que cinco pacientes (55,5%) em doença avançada apresentavam essa alteração de modo importante, dois pacientes apresentavam essa alteração morfológica como moderada e outros dois como discreta. No grupo de pacientes em doença inicial, seis (26%) apresentavam na biópsia de medula óssea hipolobulação nuclear de megacariócitos considerada como importante e em oito pacientes (34,8%) como moderada. Em nove pacientes (39,2%), esses achados foram considerados como discretos. Não houve significância estatística entre os grupos ( $p=0,4176$ ).

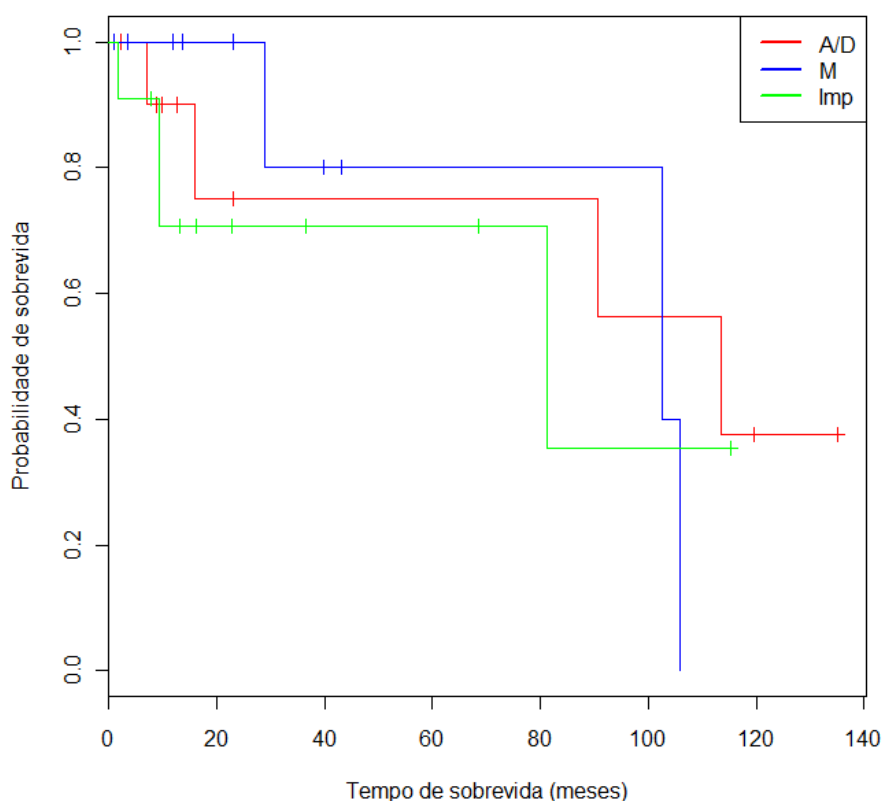
Na avaliação do risco de evolução leucêmica foi verificado que no grupo de maior risco, cinco pacientes (71,4%) possuíam hipolobulação nuclear megacariocítica de modo importante, enquanto um apresentava de modo moderado e em outro paciente não havia essa alteração. No grupo de menor risco, seis pacientes (24%) apresentavam essa alteração considerada como importante e nove pacientes (36%) como moderada. Em dez pacientes (40%), essa alteração foi

considerada discreta ou ausente. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,1264$ ). A avaliação qualitativa de linhagem megacariocítica pode ser observada na tabela 11.

**Tabela 11:** Alteração Morfológica Megacariocítica em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Agrupados pela Fase da Doença e pelo Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Alteração megacariocítica qualitativa | Fase da doença |            | Risco de evolução leucêmica |           |
|---------------------------------------|----------------|------------|-----------------------------|-----------|
|                                       | Inicial        | Avançada   | Menor                       | Maior     |
|                                       | Nº (%)         | Nº (%)     | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| <b>Micromegacariócito</b>             |                |            |                             |           |
| Importante                            | 4 (17,4%)      | 5 (55,5%)  | 4 (16%)                     | 5 (71,4%) |
| Moderado                              | 8 (34,8%)      | 1 (11%)    | 9 (36%)                     | 0 (0%)    |
| Discreto/Ausente                      | 11 (65,2%)     | 3 (33,5%)  | 12 (48%)                    | 2 (28,6%) |
| <b>Hipolobulação nuclear</b>          |                |            |                             |           |
| Importante                            | 6 (26%)        | 5 (55,5%)  | 6 (24%)                     | 5 (71,4%) |
| Moderado                              | 8 (34,8%)      | 2 (22,25%) | 9 (36%)                     | 1 (14,3%) |
| Discreto/Ausente                      | 9 (39,2%)      | 2 (22,25%) | 10 (40%)                    | 1 (14,3%) |

Analisando a sobrevida dos pacientes em relação à hipolobulação nuclear, foi observado que não houve diferença em relação a presença dessa alteração de forma importante, moderada, discreta ou ausente ( $p=0,782$ ), como pode ser observado na figura 20.

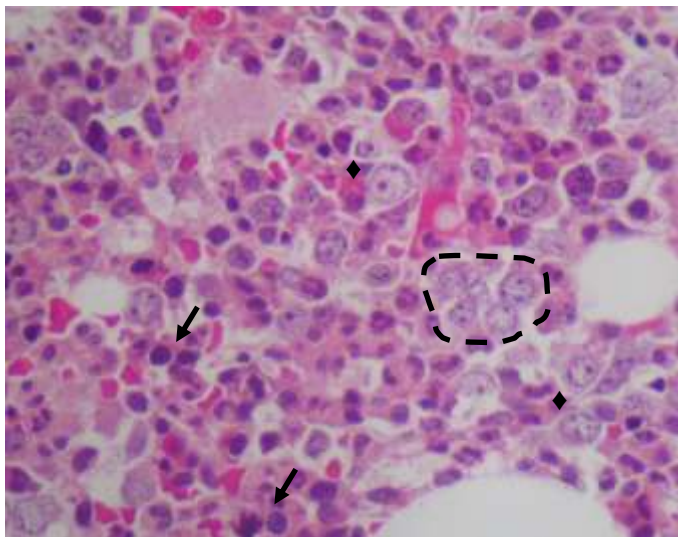


**Figura 20:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com hiplobulação nuclear megacariocítica observada em biópsia de medula óssea em importante (Imp), moderada (M) e discreta ou ausente (A/D) ( $p=0,782$ ).

#### 4.3.4 Arquitetura medular

A avaliação da arquitetura da medula óssea foi primariamente realizada em separado para cada uma das três linhagens. Entretanto, durante o estudo, evidenciou-se que quando havia perda da orientação arquitetural, esta atingia, na maioria dos casos, as três linhagens. Alteração arquitetural considerada importante foi visualizada em nove pacientes (28%) e em outros 15 pacientes (46,9%), foi considerada moderada. Em oito casos a perda da orientação arquitetural não acometia as três linhagens: em seis acometia somente a linhagem eritróide (2 CRDU, 3 CRDM e 1 AREB-1), em um paciente (CRDM) acometia somente a linhagem mielóide e em outro paciente com CRDM acometia as linhagens eritróide e megacariocítica. Entre os pacientes com doença na fase inicial, dois (8,7%) foram classificados com alteração arquitetural importante e 14 (60,8%) como moderada

(figura 21). No grupo de pacientes com doença avançada, esse achado morfológico acometia sete pacientes (77,8%) deste grupo de forma importante e um paciente (11,1%) de forma moderada ( $p=0,0005$ ).



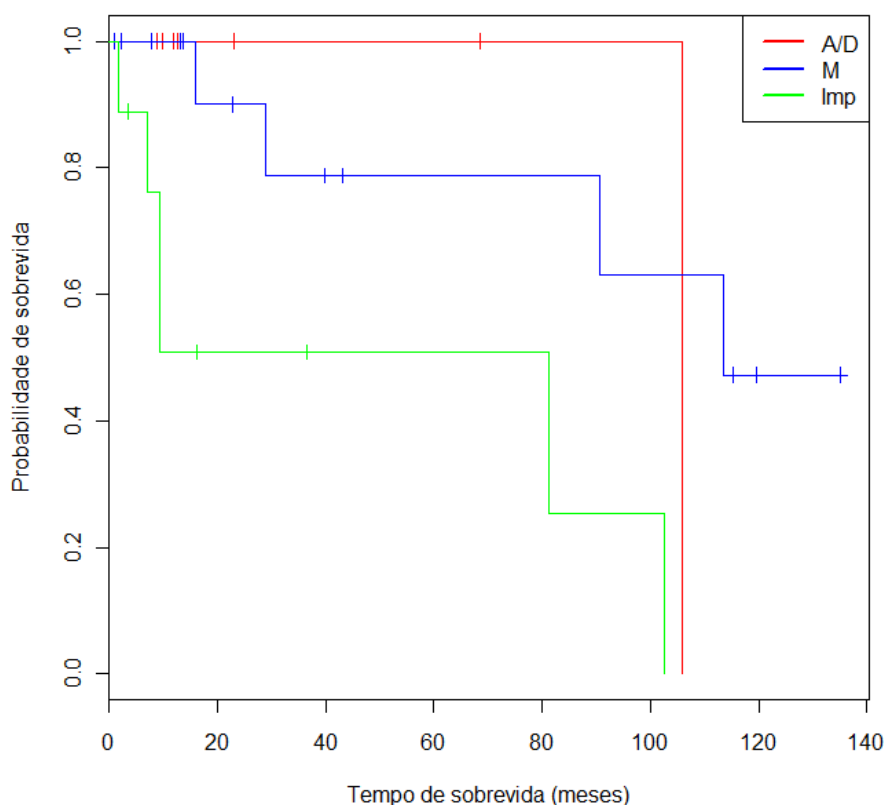
**Figura 21:** Medula óssea de paciente com AREB (nº 31) apresentando precursores mielóides imaturos no espaço trabecular agrupados (ALIP identificado com linha tracejada), outros isolados (identificado com ◆) e células da linhagem eritróide sem delimitar grupamentos (seta). Coloração de Hematoxilina e Eosina, 40X.

Entre os pacientes com maior risco de evolução leucêmica – intermediário 2 e alto risco pelo IPSS – seis pacientes (85,7%) foram considerados com alteração arquitetural importante e um paciente (14,3%) com esta alteração considerada moderada. Nesse grupo de pacientes, não houve casos considerados discretos ou ausentes para perda arquitetural. No grupo de pacientes com menor risco de evolução leucêmica, 14 pacientes (56%) possuíam perda arquitetural de forma moderada e oito pacientes (32%) sendo discreto ou ausente. Somente três pacientes (12%) desse grupo apresentaram alteração arquitetural importante ( $p=0,00079$ ). Esses dados podem ser observados na tabela 12.

**Tabela 12:** Perda arquitetural em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pela Fase da Doença e pelo Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Avaliação da perda arquitetural | Fase da doença |           | Risco de evolução leucêmica |           |
|---------------------------------|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|                                 | Inicial        | Avançada  | Menor                       | Maior     |
|                                 | Nº (%)         | Nº (%)    | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| <b>Importante</b>               | 2 (8,7%)       | 7 (77,8%) | 3 (12%)                     | 6 (85,7%) |
| <b>Moderado</b>                 | 14 (60,8%)     | 1 (11,1%) | 14 (56%)                    | 1 (14,3%) |
| <b>Discreto/Ausente</b>         | 7 (30,4%)      | 1 (11,1%) | 8 (32%)                     | 0 (0%)    |

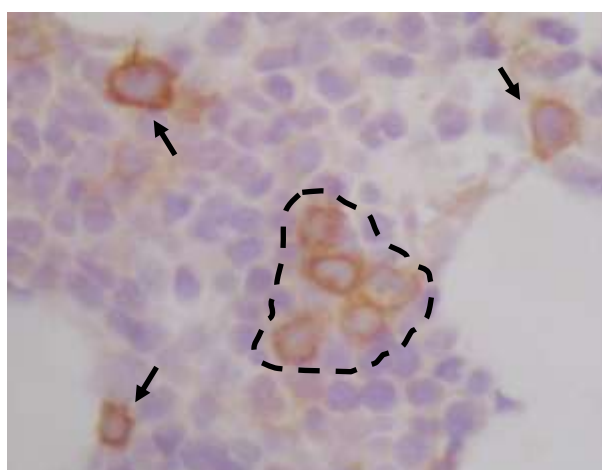
Esses grupos de pacientes com alteração arquitetural considerada importante, moderada e discreta ou ausente demonstraram possuir uma diferença significativa de sobrevida ( $p=0,00556$ ) (Figura 22).



**Figura 22:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com perda de orientação arquitetural avaliada em biópsia de medula óssea considerada como importante (Imp), moderada (M) e discreta ou ausente (A/D) ( $p=0,00556$ ).

#### 4.3.5 Linhagem mielóide

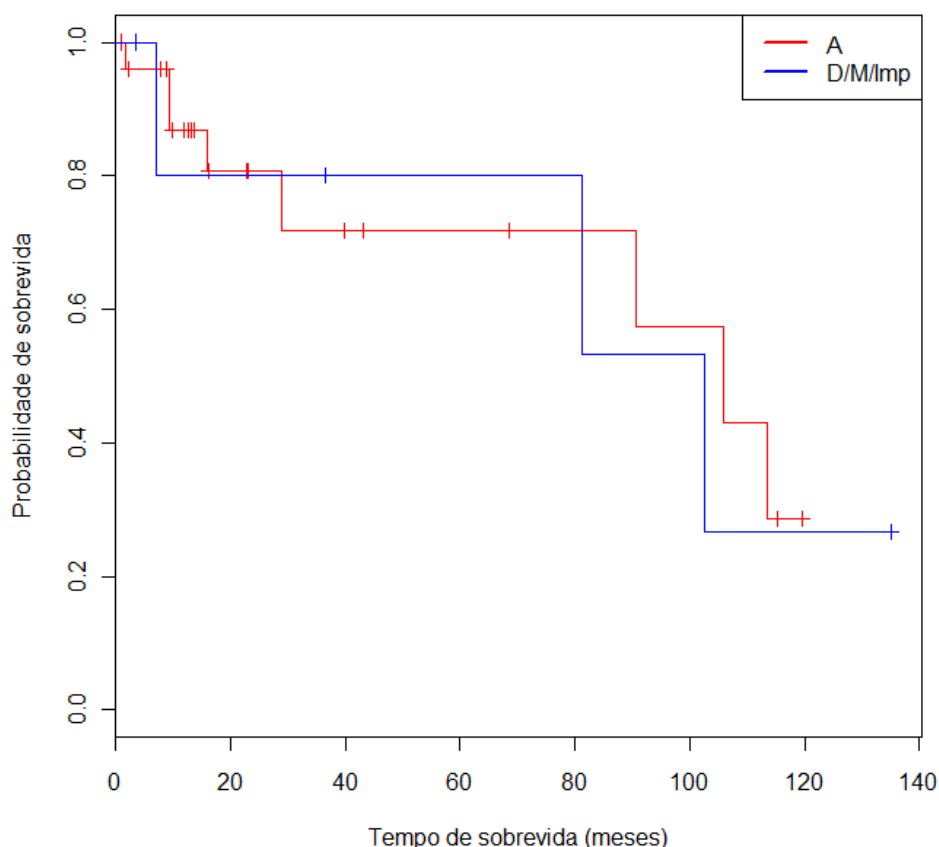
A linhagem mielóide foi avaliada para a presença de precursores imaturos de localização anormal (ALIP) e de células CD34 positivas isoladas (figura 23). A presença de ALIP foi visualizada principalmente na medula óssea dos pacientes na fase avançada da doença. Nesse grupo de pacientes, três (33,3%) possuíam essa alteração considerada como importante, um (11,1%) como moderada e outro paciente como discreta. Quatro pacientes (44,5%) desse grupo não apresentavam essa alteração ( $p=0,00169$ ). Na fase inicial da doença, somente um paciente (4,4%) evidenciou-se a presença de ALIP como discreta. Os demais 22 pacientes (95,6%) desse grupo não apresentavam essa alteração.



**Figura 23:** Grupamento de células CD34 positivas - ALIP – circundado por linha tracejada e outras células isoladas (setas) marcadas pela imuno-histoquímica em medula óssea de paciente com AREB (nº 27).

Na avaliação do risco de evolução leucêmica pelo IPSS, dois pacientes (28,6%) com maior risco apresentaram precursores imaturos de localização anormal considerado importante. Em um paciente (14,3%) desse grupo essa alteração foi considerada moderada e em outro discreta. Em três pacientes (42,8%) desse grupo não foi evidenciado essa alteração ( $p=0,02106$ ). Por outro lado, no grupo de pacientes de menor risco de evolução leucêmica pelo IPSS, a maioria dos pacientes (92%) não apresentava ALIP. Essa alteração foi observada somente em um paciente

(4%) com menor risco, de modo importante, que foi a óbito por transformação leucêmica e em outro de modo discreto. Esse paciente apresentou sobrevida elevada. Entretanto, o estudo da sobrevida comparando os pacientes com e sem ALIP não evidenciou diferença significativa entre esses dois grupos ( $p=0,816$ ) como pode ser observado na figura 24.



**Figura 24:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com presença de ALIP considerada como importante (Imp), moderada (M) e discreta (D) e a sua ausência (A) na biópsia de medula óssea ( $p=0,816$ ).

Posteriormente, excluiu-se os pacientes com ALIP para analisar o valor da presença de células CD34 positivas isoladas – sem formar grupamentos – nas biópsias de medula óssea dos pacientes estudados. No grupo de doentes na fase avançada da doença, dois (50%) possuíam células CD34 positivas isoladas e outros dois (50%) não as apresentavam. No grupo de pacientes na fase inicial da doença, quinze pacientes (68,2%) não apresentavam células CD34 positivas enquanto que

sete pacientes (31,8%) possuíam células imunorreativas para CD34. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,5906$ ).

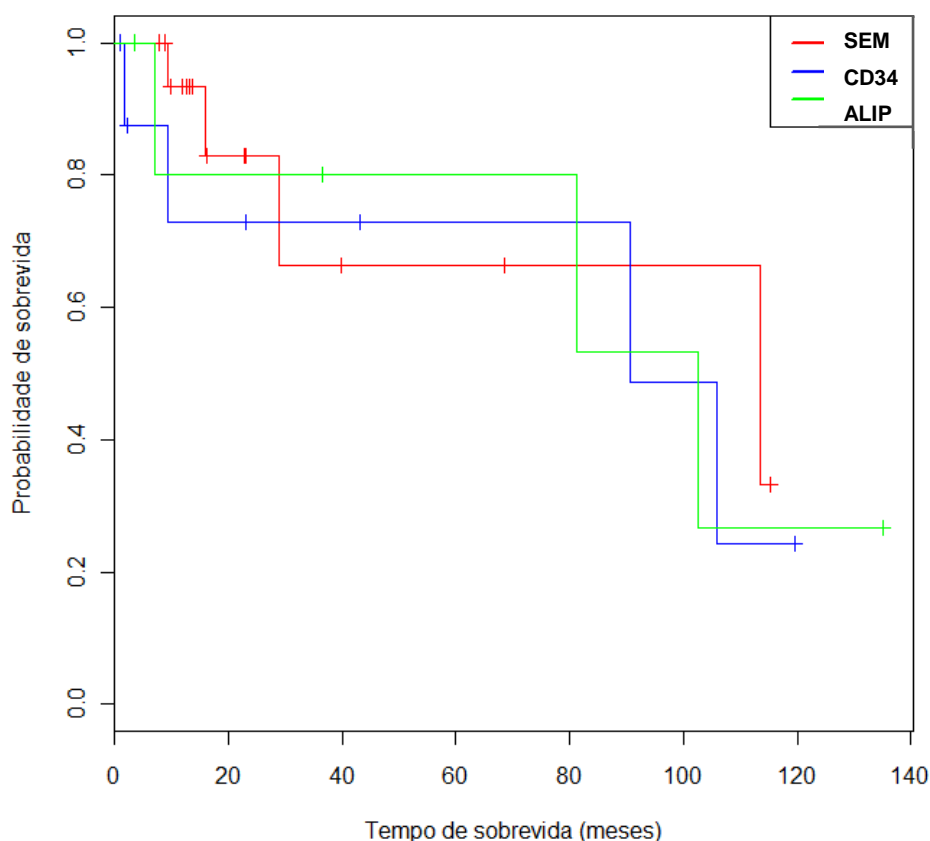
Na avaliação do risco de evolução leucêmica, entre os pacientes com maior risco – intermediário 2 e alto risco – dois pacientes (66,6%) possuíam células CD34 positivas isoladas e um paciente (33,4%) não possuía essa alteração morfológica. Entre os pacientes com menor risco – intermediário 1 e baixo risco – sete (30,4%) pacientes apresentaram. Dezesesseis pacientes (69,6%) desse grupo não apresentaram células CD34 positivas isoladas ( $p=0,2677$ ). As alterações morfológicas na linhagem mielóide estão resumidas na tabela 13.

**Tabela 13:** Alteração Morfológica na Linhagem Mielóide em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com pela Fase da Doença e pelo Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Alteração morfológica na linhagem mielóide | Fase da doença |           | Risco de evolução leucêmica |           |
|--|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|  | Inicial        | Avançada  | Menor                       | Maior     |
|  | Nº (%)         | Nº (%)    | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| <b>ALIP</b>                                |                |           |                             |           |
| Importante                                 | 0 (0%)         | 3 (33,3%) | 1 (4%)                      | 2 (28,6%) |
| Moderado                                   | 0 (0%)         | 1 (11,1%) | 0 (0%)                      | 1 (14,3%) |
| Discreto                                   | 1 (4,4%)       | 1 (11,1%) | 1 (4%)                      | 1 (14,3%) |
| Ausente                                    | 22 (95,6%)     | 4 (44,5%) | 23 (92%)                    | 3 (42,8%) |
| <b>Células CD34 +</b>                      |                |           |                             |           |
| Presente                                   | 7 (31,8%)      | 2 (50%)   | 7 (30,4%)                   | 2 (66,6%) |
| Ausente                                    | 15 (68,2%)     | 2 (50%)   | 16 (69,6%)                  | 1 (33,4%) |

A análise comparativa da sobrevida entre os grupos de pacientes com ALIP, células CD34 isoladas e sem essas alterações morfológicas não mostrou diferença estatística ( $p=0,816$ ) como pode ser observado na figura 25.

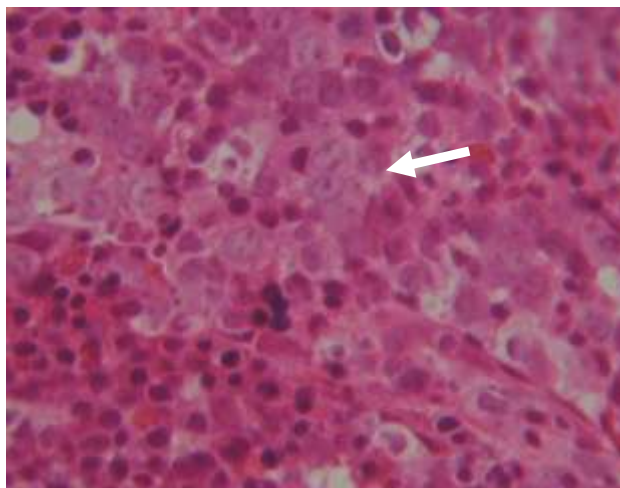




**Figura 25:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de ALIP e de células CD34 positivas isoladas e a ausência de células blásticas (SEM) ( $p=0,816$ ).

#### 4.3.6 Linhagem eritróide

Outro aspecto morfológico estudado foi a presença de megaloblastos na avaliação da linhagem eritróide (figura 26). Nesse estudo, houve 14 pacientes com megaloblastos aumentados. Na fase inicial da doença, em cinco pacientes (21,8%) a presença de megaloblastos foi considerada como importante e sete (30,4%) pacientes tiveram esse achado considerado como moderado. Em onze pacientes (47,8%) a presença de megaloblastos foi considerada como discreto ou ausente. Na fase avançada da doença, um paciente (11,1%) foi considerado com esse achado como importante e outro como moderado. Sete pacientes (77,8%) desse grupo apresentavam megaloblasto de modo discreto ou ausente. Não houve diferença significativa entre esses dois grupos ( $p=0,4257$ ) (tabela 14).



**Figura 26:** Agrupamento de megaloelastos (seta) ao lado de um “nicho” de células eritróides. Coloração de Hematoxilina e Eosina (40X) (nº 23).

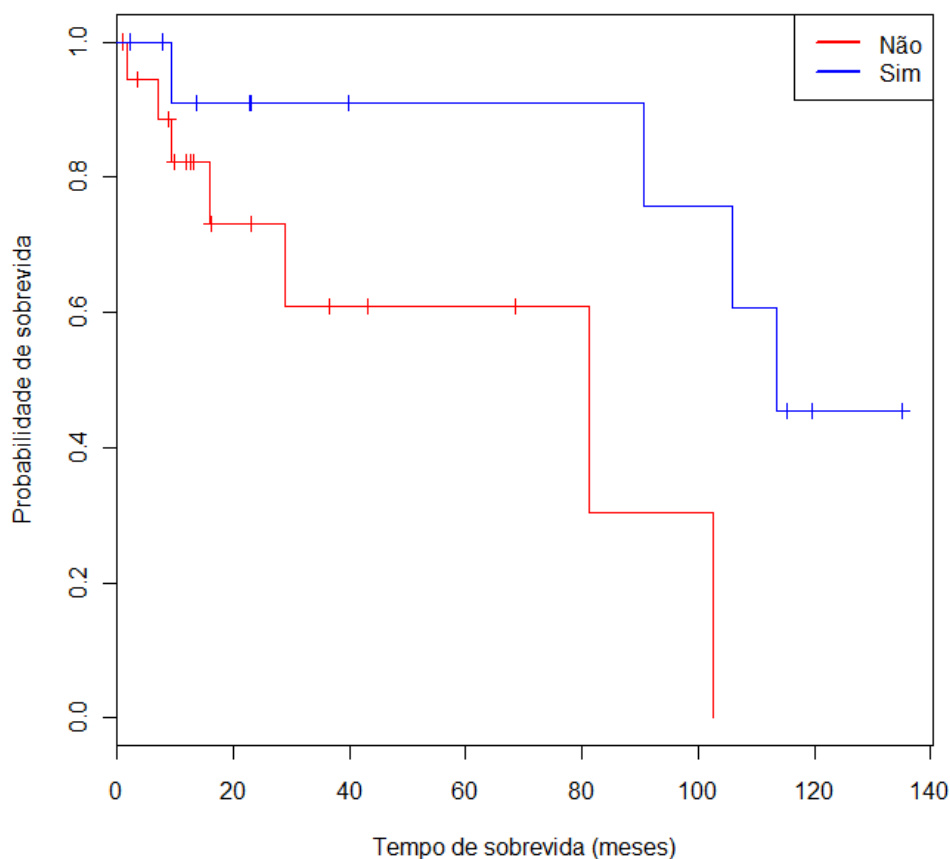
**Tabela 14:** Análise de Megaloelastos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária pela Fase da Doença e pelo Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Avaliação de megaloblasto | Fase da doença |           | Risco de evolução leucêmica |           |
|---------------------------|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|                           | Inicial        | Avançada  | Menor                       | Maior     |
|                           | Nº (%)         | Nº (%)    | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| Importante                | 5 (21,8%)      | 1 (11,1%) | 5 (20%)                     | 1 (14,3%) |
| Moderado                  | 7 (30,4%)      | 1 (11,1%) | 8 (32%)                     | 0 (0%)    |
| Discreto/Ausente          | 11 (47,8%)     | 7 (77,8%) | 12 (48%)                    | 6 (85,7%) |

Entre os pacientes com maior risco de evolução leucêmica, seis pacientes (85,7%) apresentaram megaloblastos de forma discreta ou ausente e um paciente (14,3%) possuía megaloblastos de forma importante. Não houve nesse grupo casos considerados moderados. O grupo de pacientes com menor risco para desenvolvimento de leucemia, a maioria dos pacientes (48%) apresentou essa alteração morfológica de modo discreto ou ausente. Entre os demais pacientes desse grupo, oito (32%) pacientes apresentaram megaloblastos de forma moderada, enquanto que cinco pacientes (20%) possuíam megaloblastos de modo importante ( $p=0,1512$ ).

A análise da sobrevivência dos pacientes com e sem megaloblastos na biópsia de medula óssea revelou que os pacientes que possuíam esta alteração morfológica na

ocasião do diagnóstico possuíam uma sobrevida maior. Essa análise apresentou significância estatística ( $p=0,0218$ ) como pode ser observado na figura 27.



**Figura 27:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de megaloblastos ( $p=0,0218$ ).

#### 4.3.7. Análise do Componente Estromal

Entre os 32 pacientes estudados, oito apresentavam alterações estromais, sendo seis com alterações consideradas moderadas e dois somente com alterações consideradas discretas. Entre os pacientes com alterações moderadas, três encontravam-se na fase avançada da doença. No grupo de pacientes com doença avançada também havia dois pacientes com alterações estromais discretas. Os três pacientes do grupo (13%) da fase inicial da doença apresentavam alterações estromais discretas ( $p=0,02332$ ). Em relação ao risco de evolução leucêmica pelo

IPSS, quatro pacientes (57,1%) possuíam maior risco de evolução leucêmica – intermediário 2 e alto risco – e os outros quatro pacientes (16%) apresentavam menor risco – intermediário 1 e baixo risco – ( $p=0,04689$ ). A distribuição dos pacientes pelo grupo FAB e pelo IPSS pode ser observada na tabela 15.

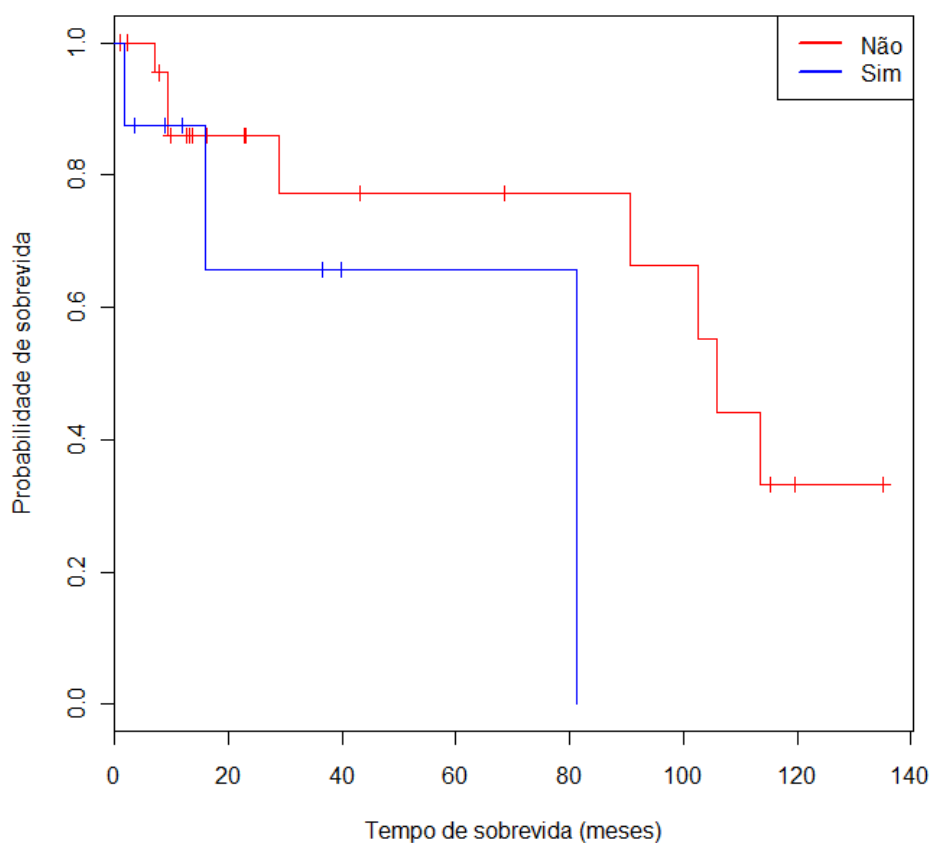
**Tabela 15:** Alteração Estromal em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pela Fase da Doença e pelo Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Avaliação de alteração estromal | Fase da doença |           | Risco de evolução leucêmica |           |
|---------------------------------|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|                                 | Inicial        | Avançada  | Menor                       | Maior     |
|                                 | Nº (%)         | Nº (%)    | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| Presente                        | 3 (13%)        | 5 (55,5%) | 4 (16%)                     | 4 (57,1%) |
| Ausente                         | 20 (87%)       | 4 (44,5%) | 21 (84%)                    | 3 (42,9%) |

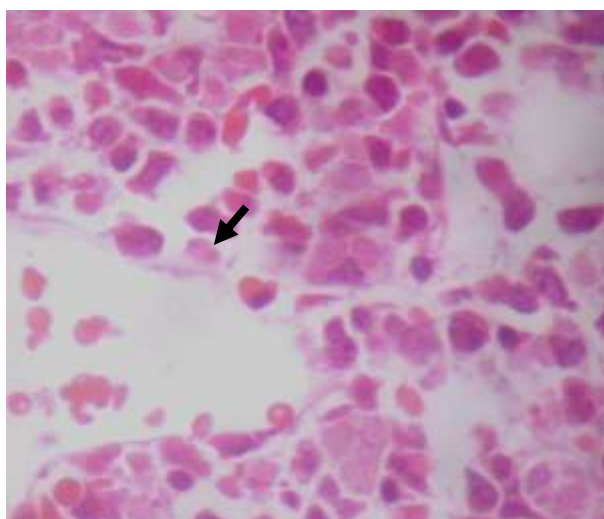
O estudo da sobrevida não evidenciou diferença significativa entre os grupos de pacientes com e sem alteração estromal conforme pode ser observado na figura 28 ( $p=0,15$ ).

O achado morfológico mais frequente foi ectasia sinusoidal (Figura 29). Em relação à ectasia sinusoidal, essa alteração acometia três pacientes de modo moderado, sendo que dois pacientes pertenciam ao grupo com doença inicial. Outros dois pacientes com doença avançada apresentaram esse achado de forma discreta.

Ao analisar a presença de edema, esse foi considerado moderado em um paciente com doença inicial e em dois com doença avançada. Outros dois pacientes, um com doença inicial e outro com doença avançada possuíam esse achado considerado discreto.



**Figura 28:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de alteração estromal ( $p=0,15$ ).



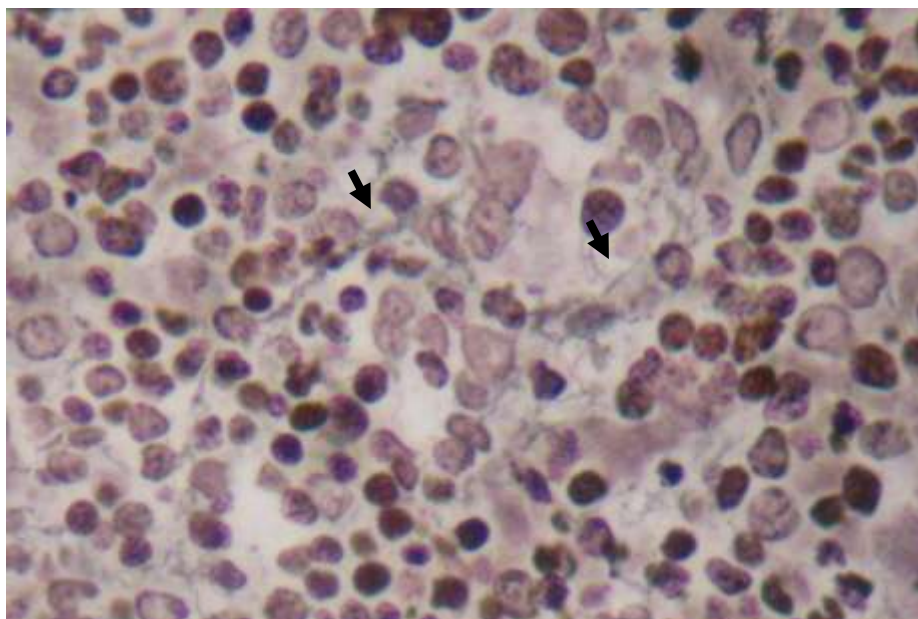
**Figura 29:** Sinusóide dilatado em biópsia de medula óssea de paciente com SMD primária. Coloração de Hematoxilina e Eosina, 40x em paciente com AREB (nº 24).

Foram observadas outras alterações estromais, sendo dois casos de doença inicial e com baixo risco de evolução leucêmica apresentando plasmócitos em quantidade considerada discreta. Além disso, em um paciente com doença inicial e em outro com doença avançada, observou-se aumento discreto em relação à presença de linfócitos.

Não foi visualizada presença de precursores intravascular e de formação de nódulos/agregados linfóides nas biópsias de medula óssea estudadas.

#### 4.3.8. Fibrose Medular

A fibrose medular foi visualizada na coloração para reticulina em onze pacientes. Em seis pacientes, esta foi considerada grau I, sendo pela classificação da OMS, quatro CRDM, e dois AREB-1 (figura 30). Nos outros cinco pacientes, esta foi considerada grau II, dois deles classificados como CRDM, um como AREB-1 e os outros dois como AREB-2. Ao analisar pela fase da doença, no grupo com doença inicial encontramos seis pacientes (26,1%) com fibrose medular e no grupo com doença avançada, encontramos cinco pacientes (55,5%). Observando-se uma tendência da fibrose ser mais frequente no grupo de pacientes com doença avançada ( $p = 0,06653$ ).



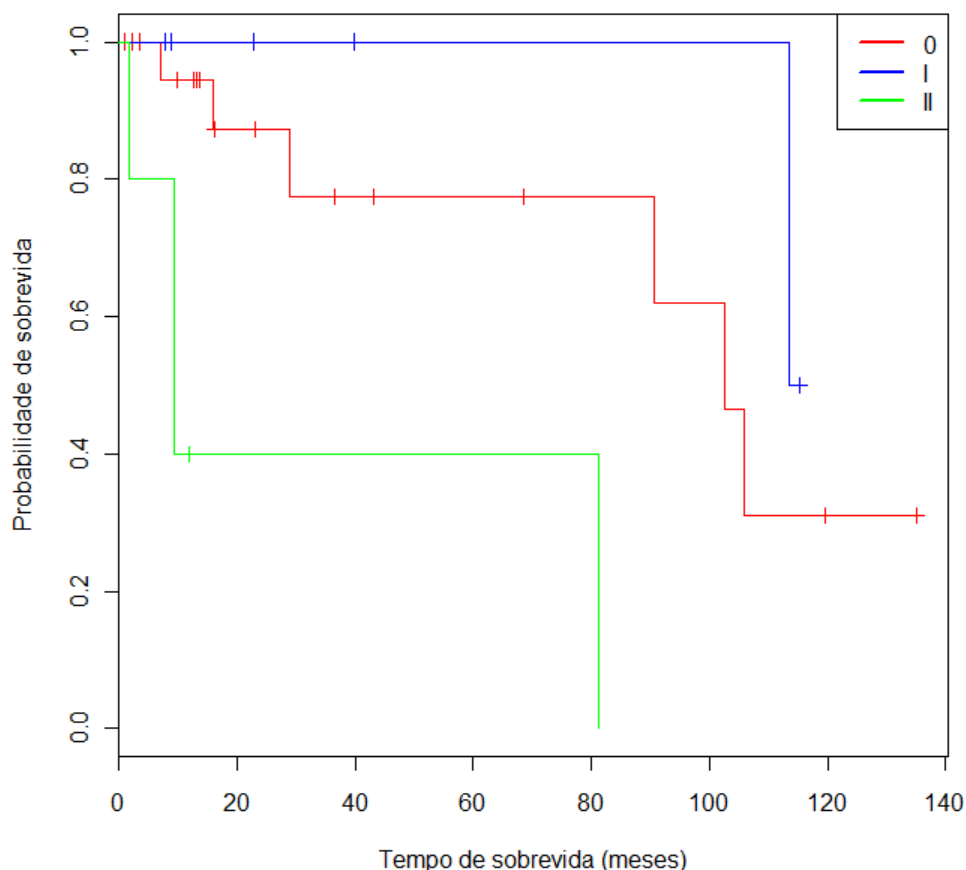
**Figura 30:** Coloração para reticulina. Nota-se foco de fibras finas, indicando fibrose medular (grau I) em paciente com ARSA (nº 23).

De acordo com o risco de evolução leucêmica pelo IPSS os pacientes com maior risco de evolução apresentaram principalmente fibrose medular grau II, acometendo três pacientes (42,8%). Nesse grupo, um paciente (14,4%) possuía fibrose medular grau I. Nos pacientes classificados como intermediário 1 e baixo risco, a minoria dos pacientes apresentou fibrose medular. Entre estes, cinco (20%) possuíam fibrose medular grau I e outros dois (8%) apresentavam fibrose medular grau II ( $p=0,04598$ ). A distribuição dos pacientes pelo grupo FAB e pelo IPSS pode ser observada na tabela 16.

**Tabela 16:** Fibrose medular em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária e sua associação com a Fase da Doença e o Risco de Evolução Leucêmica (IPSS).

| Avaliação de fibrose medular | Fase da doença |           | Risco de evolução leucêmica |           |
|------------------------------|----------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|                              | Inicial        | Avançada  | Menor                       | Maior     |
|                              | Nº (%)         | Nº (%)    | Nº (%)                      | Nº (%)    |
| 0                            | 17 (73,9%)     | 4 (44,5%) | 18 (72%)                    | 3 (42,8%) |
| I                            | 4 (17,4%)      | 2 (22,2%) | 5 (20%)                     | 1 (14,4%) |
| II                           | 2 (8,7%)       | 3 (33,3%) | 2 (8%)                      | 3 (42,8%) |

O estudo da sobrevida estratificando os pacientes nos seguintes grupos fibrose medular grau I, fibrose medular grau II e sem fibrose (grau 0) evidenciou uma diferença significativa entre os grupos ( $p=0,000789$ ). Os pacientes com fibrose grau II apresentaram menor sobrevida como pode ser observado na figura 31.



**Figura 31:** Curva de Kaplan-Meier de acordo com a presença de fibrose medular estratificados em grau 0, grau I e grau II ( $p=0,000789$ ).

#### 4.4. Análise morfológica comparativa entre biópsia de medula óssea e mielograma

As características encontradas no mielograma foram comparadas com aquelas observadas na biópsia de medula óssea realizada no mesmo período em cada paciente. A análise comparativa entre esses dois exames foi realizada avaliando-se os seguintes parâmetros: celularidade medular, relação



mielóide:eritróide, número de megacariócitos, presença de micromegacariócito, de megacariócitos atípicos, de megaloblastos e de blastos mielóides. Como há parâmetros que somente a biópsia pode informar como arquitetura medular e fibrose medular esses foram excluídos da avaliação. Além desses, o número de linhagens displásicas também foi excluído dessa comparação, pois, ao contrário do mielograma, na biópsia de medula óssea não há uma padronização dos parâmetros a serem avaliados para que essa análise possa ser feita, pois, há dificuldade em se estabelecer critérios e um ponto de corte para que as alterações, quando presentes, sejam significativas, principalmente em relação à linhagem eritróide que é frequentemente acometida. Além disso, foi excluída a análise do componente estromal, pois a ectasia sinusoidal não pode ser avaliada pelo mielograma e esta foi a alteração estromal mais frequente na análise da biópsia de medula óssea.

A celularidade da medula óssea foi melhor analisada pela biópsia de medula óssea do que pelo mielograma ( $p=0,04776$ ). Entretanto, não houve diferença entre a avaliação da relação mielóide:eritróide na utilização das duas metodologias ( $p=0,275$ ). Esses dados podem ser observados na tabela 17.

**Tabela 17:** Comparação da celularidade medular e da relação mielóide:eritróide de pacientes com síndrome mielodisplásica primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea.

| <b>Mielograma</b>  | <b>Biópsia de medula óssea</b> |                     |                     | <b>Total</b> |
|--------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|
|                    | <b>Celularidade</b>            | <b>Hipercelular</b> | <b>Normocelular</b> |              |
| Hipercelular       | 11                             | 3                   | 0                   | 14           |
| Normocelular       | 8                              | 3                   | 0                   | 11           |
| Hipocelular        | 2                              | 2                   | 3                   | 7            |
| <b>Total</b>       | 21                             | 8                   | 3                   | 32           |
| <b>Relação M:E</b> | <b>Aumentada</b>               | <b>Normal</b>       | <b>Reduzida</b>     | <b>Total</b> |
| Aumentada          | 4                              | 1                   | 0                   | 5            |
| Normal             | 2                              | 3                   | 4                   | 9            |
| Reduzida           | 2                              | 1                   | 15                  | 18           |
| <b>Total</b>       | 8                              | 5                   | 19                  | 32           |

A linhagem eritróide foi avaliada pela presença de megaloblastos, pois é a única alteração morfológica dessa linhagem que foi possível de ser observada pelos dois métodos empregados. A partir dos dados obtidos, pode-se verificar que o

mielograma é um método melhor do que a biópsia de medula óssea para verificar essa alteração ( $p=0,03481$ ). A comparação dos dois métodos pode ser observada na tabela 18.

**Tabela 18:** Comparação da presença de megaloblastos em pacientes com síndromes mielodisplásicas primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea.

| Mielograma<br>Megaloblastos | Biópsia de medula óssea |         | Total |
|-----------------------------|-------------------------|---------|-------|
|                             | Presente                | Ausente |       |
| Presente                    | 11                      | 8       | 19    |
| Ausente                     | 3                       | 10      | 13    |
| <b>Total</b>                | 14                      | 18      | 32    |

O estudo comparativo da presença de blastos na medula óssea foi realizado, separando os pacientes de acordo com a presença de ALIP pela biópsia de medula óssea em importante, moderada, discreta e ausente. A partir desses grupos, foi feita a média da porcentagem de blastos pelo mielograma desses pacientes. Os pacientes com ALIP considerado importante possuíam em média 9,0% de blastos no mielograma. Aqueles pacientes cuja biópsia revelou quantidades moderadas de ALIP apresentaram em média 7,3% de blastos. Os pacientes com ALIP considerado discreto apresentavam em média 3,3% de blastos pelo mielograma ( $p=0,03165$ ). O grupo de pacientes que não apresentaram ALIP durante a análise da biópsia de medula óssea possuía em média 1,8% de blastos pelo mielograma (tabela 19).

**Tabela 19:** Comparação entre a presença de ALIP pela biópsia de medula óssea e a porcentagem de blastos analisados pelo mielograma em pacientes com síndromes mielodisplásicas primária.

| <b>Biópsia de medula óssea</b> |    | <b>Mielograma</b>                            |              |
|--------------------------------|----|--|--------------|
| <b>ALIP</b>                    |    | <b>Média da % de Blastos (menor – maior)</b> |              |
| Importante                     | 3  | 9,0  | (5,0 – 15,8) |
| Moderado                       | 1  | 7,3  | (7,3)        |
| Discreto                       | 2  | 3,3  | (0,8 – 5,8)  |
| Ausente                        | 26 | 1,8  | (0 – 10)     |

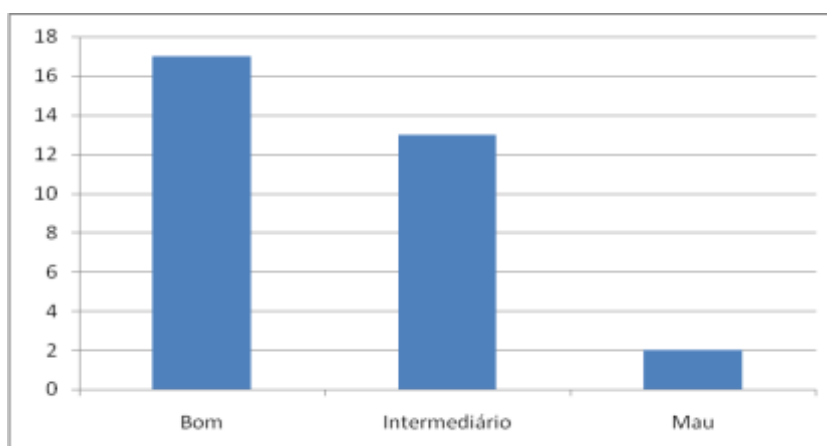
A avaliação da linhagem megacariocítica não revelou diferença quantitativa e qualitativa entre os métodos comparados (Tabela 20). Os parâmetros analisados foram: quantidade de megacariócitos ( $p=0,5004$ ), presença de micromegacariócito ( $p=0,08326$ ) e a presença de megacariócito atípico ( $p=0,1655$ ).

**Tabela 20:** Comparação das análises qualitativas e quantitativas da linhagem megacariocítica de pacientes com síndromes mielodisplásicas primária analisados pelo mielograma e pela biópsia de medula óssea.

| <b>Mielograma</b>                   | <b>Biópsia de medulla óssea</b> |                |                 |              |
|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------|--------------|
| <b>Micromegacariócito</b>           | <b>Presente</b>                 | <b>Ausente</b> | <b>Total</b>    |              |
| Presente                            | 9                               | 8              | 17              |              |
| Ausente                             | 9                               | 6              | 15              |              |
| Total                               | 18                              | 14             | 32              |              |
| <b>Megacariócitos atípicos</b>      |                                 |                |                 |              |
| Presente                            | 12                              | 4              | 16              |              |
| Ausente                             | 9                               | 7              | 16              |              |
| Total                               | 21                              | 11             | 32              |              |
| <b>Quantidade de megacariócitos</b> |                                 |                |                 |              |
|                                     | <b>Aumentada</b>                | <b>Normal</b>  | <b>Reduzida</b> | <b>Total</b> |
| Aumentada                           | 4                               | 4              | 2               | 10           |
| Normal                              | 4                               | 4              | 5               | 13           |
| Reduzida                            | 0                               | 4              | 5               | 9            |
| <b>Total</b>                        | <b>8</b>                        | <b>12</b>      | <b>12</b>       | <b>32</b>    |

#### 4.5. Correlação entre a Análise Morfológica - biópsia de medula óssea - e Citogenética

Os 32 pacientes do estudo foram divididos em três grupos segundo o prognóstico citogenético definido pelo IPSS, 1997. Um grupo reuniu os pacientes com bom prognóstico. Nesse grupo havia 16 pacientes com cariótipo normal e um com del(5q). Outro grupo foi constituído de 13 pacientes com prognóstico citogenético intermediário. O terceiro grupo incluía dois pacientes considerados de mau prognóstico (um com monossomia do 7 e o outro com cariótipo complexo). A distribuição dos pacientes pelo prognóstico citogenético pode ser observada na figura 32.



**Figura 32:** Distribuição do número de pacientes com SMD primária de acordo com o prognóstico citogenético (IPSS, 1997).

Esses três grupos foram comparados morfológicamente em relação aos parâmetros estudados em biópsia de medula óssea: celularidade, relação mielóide:eritróide, presença de ALIP, células CD34 positivas, megaloblastose, número de megacariócitos, micromegacariócito, megacariócitos hipolobulados, perda de orientação arquitetural, alteração estromal e fibrose medular.

Os pacientes apresentaram na maioria dos casos medula óssea hipercelular, independente do prognóstico citogenético, mas esse achado foi mais frequente (70,6%) nos pacientes com bom prognóstico citogenético quando comparado com os grupos de prognóstico intermediário e de mau prognóstico. Nos pacientes com mau

prognóstico esse achado foi visto em 61% dos casos de prognóstico intermediário e em um paciente (50%) com mau prognóstico. Em relação aos pacientes que apresentaram medula óssea hipocelular, dois pertenciam ao grupo com bom prognóstico citogenético, um apresentava del(5q) inicialmente e durante a evolução apresentou também del(9p), o outro paciente possuía cariótipo normal. No grupo de pacientes com prognóstico citogenético intermediário, havia um paciente com medula óssea hipocelular e que apresentava trissomia do 8. Os pacientes com mau prognóstico citogenético não apresentaram hipocelularidade medular (Tabela 21). Não houve diferença estatística entre os grupos estudados ( $p=0,7943$ ).

**Tabela 21:** Celularidade Medular de Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados pelo Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Avaliação de celularidade | Bom        | Intermediário | Mau     |
|---------------------------|------------|---------------|---------|
|                           | Nº (%)     | Nº (%)        | Nº (%)  |
| Hipercelular              | 12 (70,6%) | 8 (61,3%)     | 1 (50%) |
| Normocelular              | 3 (17,6%)  | 4 (30,8%)     | 1 (50%) |
| Hipocelular               | 2 (11,8%)  | 1 (7,7%)      | 0 (0%)  |

A relação mielóide:eritróide mostrou-se reduzida nos dois pacientes com mau prognóstico citogenético. No grupo de pacientes com prognóstico citogenético intermediário, a maioria dos pacientes apresentava alteração dessa relação, em seis pacientes (46,2%) encontrava-se aumentada e em cinco pacientes (38,4%) havia redução ( $p=0,2086$ ). No grupo de pacientes com bom prognóstico citogenético, houve uma tendência de redução desses valores, visto em 70,6% dos casos (Tabela 22). A redução desses valores pode indicar hiperplasia da linhagem eritróide.

**Tabela 22:** Relação Mielóide:Eritróide em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Avaliação de relação M:E | Bom        | Intermediário | Mau      |
|--------------------------|------------|---------------|----------|
|                          | Nº (%)     | Nº (%)        | Nº (%)   |
| Aumentada                | 2 (11,8%)  | 6 (46,2%)     | 0 (0%)   |
| Normal                   | 3 (17,6%)  | 5 (38,4%)     | 0 (0%)   |
| Reduzida                 | 12 (70,6%) | 2 (15,4%)     | 2 (100%) |

Em relação à linhagem megacariocítica, esta se encontrou reduzida ou normal nos pacientes com mau prognóstico citogenético. No grupo intermediário a redução dessa linhagem foi observada em seis pacientes (46,2%), enquanto no grupo com bom prognóstico citogenético, foi observada em cinco pacientes (29,4%) ( $p=0,9193$ ). O mesmo número de pacientes (29,4%) com bom prognóstico citogenético apresentava contagem de megacariócitos aumentada (tabela 23).

**Tabela 23:** Relação da Quantidade de Megacariócitos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Alteração megacariocítica quantitativa | Bom       | Intermediário | Mau     |
|--|-----------|---------------|---------|
|  | Nº (%)    | Nº (%)        | Nº (%)  |
| Aumentada                              | 5 (29,4%) | 3 (23,1%)     | 0 (0%)  |
| Normal                                 | 7 (41,2%) | 4 (30,7%)     | 1 (50%) |
| Reduzida                               | 5 (29,4%) | 6 (46,2%)     | 1 (50%) |

Qualitativamente, a presença de micromegacariócitos mostrou-se predominantemente importante ou moderada nos grupos de pacientes com prognóstico citogenético bom e intermediário. No grupo de bom prognóstico, em cinco pacientes (29,4%) esse achado foi considerado importante, enquanto que em quatro (23,5%), foi considerado moderado. Os pacientes com prognóstico citogenético intermediário, apresentaram uma distribuição similar, sendo que em quatro pacientes (30,8%) esse achado foi considerado importante e em outros quatro (30,8%) foi moderado ( $p=0,8577$ ). Um paciente com mau prognóstico

citogenético apresentou essa alteração considerada importante e no outro paciente a presença de micromegacariócitos foi considerada discreta.

A hipolobulação nuclear megacariocítica mostrou-se importante/moderada nos grupos de prognóstico citogenético bom e intermediário ( $p=1,000$ ). Dentre os pacientes que possuíam esse achado de forma importante, seis (35,3%) pertenciam ao grupo de bom prognóstico citogenético, quatro (30,8%) ao grupo de prognóstico intermediário e um paciente (50%) com mau prognóstico citogenético. Essa alteração morfológica foi considerada moderada em seis pacientes (35,3%) com bom prognóstico citogenético e em quatro pacientes com prognóstico intermediário (30,8%). Esses dados podem ser observados na tabela 24.

**Tabela 24:** Alteração Morfológica Megacariocítica em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Alteração megacariocítica qualitativa | Bom       | Intermediário | Mau     |
|---------------------------------------|-----------|---------------|---------|
|                                       | Nº (%)    | Nº (%)        | Nº (%)  |
| <b>Micromegacariócito</b>             |           |               |         |
| Importante                            | 5 (29,4%) | 3 (23,2%)     | 1 (50%) |
| Moderado                              | 4 (23,5%) | 5 (38,4%)     | 0 (0%)  |
| Discreto/Ausente                      | 8 (47,1%) | 5 (38,4%)     | 1 (50%) |
| <b>Hipolobulação nuclear</b>          |           |               |         |
| Importante                            | 6 (35,3%) | 4 (30,8%)     | 1 (50%) |
| Moderado                              | 6 (35,3%) | 4 (30,8%)     | 0 (50%) |
| Discreto/Ausente                      | 5 (29,4%) | 5 (38,4%)     | 1 (50%) |

A avaliação da perda arquitetural demonstrou que a maioria dos pacientes com bom prognóstico citogenético apresentavam esse achado considerado moderado ou discreto/ausente, enquanto que no grupo com mau prognóstico citogenético os dois pacientes (100%) apresentavam esse achado de forma importante ( $p=0,2281$ ). Enquanto isso, no grupo de pacientes com prognóstico citogenético intermediário, foi observada perda arquitetural moderada em sete pacientes (53,8%) e em quatro pacientes (30,8%) essa alteração foi considerada importante (Tabela 25).

**Tabela 25:** Perda Arquitetural em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Estratificados de Acordo com o Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Avaliação da perda arquitetural | Bom       | Intermediário | Mau      |
|---------------------------------|-----------|---------------|----------|
|                                 | Nº (%)    | Nº (%)        | Nº (%)   |
| Importante                      | 3 (17,6%) | 4 (30,8%)     | 2 (100%) |
| Moderada                        | 8 (47%)   | 7 (53,8%)     | 0 (0%)   |
| Discreto/Ausente                | 6 (35,3%) | 2 (15,4%)     | 0 (0%)   |

A presença de ALIP foi observada em quatro pacientes (30,8%) com prognóstico citogenético intermediário, em um paciente (50%) com mau prognóstico e em um (6%) entre os pacientes com bom prognóstico citogenético ( $p=0,1133$ ). As alterações citogenéticas encontradas foram: trissomia 8, del(11)(q23), inv(3q), inv(17)(q10) e cariótipo complexo. A avaliação da presença de células CD34 positivas nos pacientes que não apresentavam ALIP demonstrou que sete pacientes (43,83%) pertenciam ao grupo de bom prognóstico citogenético e dois pacientes (22,3%) do grupo de prognóstico intermediário apresentavam células CD34 positivas isoladas ( $p=0,3616$ ) (Tabela 26).

**Tabela 26:** Alteração Morfológica na Linhagem Mielóide em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária Avaliada pelo Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Alteração morfológica na linhagem mielóide | Bom       | Intermediário | Mau     |
|--|-----------|---------------|---------|
|  | Nº (%)    | Nº (%)        | Nº (%)  |
| <b>ALIP</b>                                |           |               |         |
| Presente                                   | 1 (6%)    | 4 (30,8%)     | 1 (50%) |
| Ausente                                    | 16 (94%)  | 9 (69,2%)     | 1 (50%) |
| <b>Células CD34 +</b>                      |           |               |         |
| Presente                                   | 7 (43,8%) | 2 (22,3%)     | 0 (50%) |
| Ausente                                    | 9 (56,2%) | 7 (77,7%)     | 2 (50%) |

A presença de megalo blastos foi considerada discreta/ausente na maioria dos casos independente do prognóstico citogenético ( $p=0,934$ ). Dentre os pacientes que



possuíam esse achado considerado como importante, quatro (23,5%) pertenciam ao grupo de bom prognóstico citogenético e dois (15,4%) ao grupo de prognóstico intermediário. Essa alteração morfológica foi considerada moderada em quatro pacientes (23,5%) com bom prognóstico citogenético e em outros quatro (26,7%) com pior prognóstico (Tabela 27). Não foi observada essa alteração nos pacientes com mau prognóstico citogenético.

**Tabela 27:** Megaloblastos em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária de Acordo com o Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Avaliação de megaloblasto | Bom       | Intermediário | Mau      |
|---------------------------|-----------|---------------|----------|
|                           | Nº (%)    | Nº (%)        | Nº (%)   |
| <b>Importante</b>         | 4 (23,5%) | 2 (15,4%)     | 0 (0%)   |
| <b>Moderada</b>           | 4 (23,5%) | 4 (30,8%)     | 0 (0%)   |
| <b>Discreto/Ausente</b>   | 9 (53%)   | 7 (53,8%)     | 2 (100%) |

A alteração estromal moderada foi observada em seis pacientes, sendo dois (11,8%) com bom prognóstico citogenético, dois (15,4%) com prognóstico citogenético intermediário e em todos os dois pacientes (100%) com mau prognóstico citogenético (tabela 28). Esses dados foram estatisticamente significativos ( $p=0,03498$ ).

**Tabela 28:** Análise da Alteração Estromal e da Fibrose Medular em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica Primária sua associação com o Prognóstico Citogenético (IPSS, 1997).

| Alteração morfológica     | Bom        | Intermediário | Mau      |
|---------------------------|------------|---------------|----------|
|                           | Nº (%)     | Nº (%)        | Nº (%)   |
| <b>Alteração estromal</b> |            |               |          |
| Presente                  | 2 (11,8%)  | 2 (15,4%)     | 2 (100%) |
| Ausente                   | 15 (88,2%) | 11 (84,6%)    | 0 (0%)   |
| <b>Fibrose medular</b>    |            |               |          |
| 0                         | 11 (64,7%) | 9 (69,2%)     | 1 (50%)  |
| I                         | 4 (32,5%)  | 2 (15,4%)     | 0 (50%)  |
| II                        | 2 (11,8%)  | 2 (15,4%)     | 1 (50%)  |

A fibrose medular grau I foi vista em quatro pacientes (23,5%) com bom prognóstico citogenético e em dois pacientes (15,4%) com prognóstico citogenético intermediário. As alterações citogenéticas encontradas nesses pacientes foram del(12p) e t(6;12). Um paciente que apresentava fibrose medular grau I e cariótipo normal durante o acompanhamento clínico apresentou t(8;12)(q22;p12). Cinco pacientes apresentaram fibrose medular grau II, sendo dois pacientes (11,8%) com bom prognóstico citogenético, dois (15,4%) com prognóstico intermediário e um paciente (50%) com mau prognóstico citogenético. Entre os pacientes com fibrose medular grau II, observou-se as seguintes alterações citogenéticas: del(11)(q23), del(17p) e cariótipo complexo ( $p=0,7536$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Em 1982, a classificação FAB definiu critérios diagnósticos para a SMD primária e separou os pacientes em grupos de acordo com a fase da doença. A partir disso, os critérios morfológicos, incluindo a biópsia de medula óssea foram revistos com objetivo de auxiliar o diagnóstico (De Wolf-Peeters *et al*, 1994). Em seguida, novas classificações e escalas prognósticas foram elaboradas e passaram a incluir características citogenéticas. A classificação mais recente formulada pela OMS em 2008 enfatizou a importância da correlação da biópsia de medula óssea com o mielograma, a citogenética e as características clínicas do paciente. Dessa forma, faz-se necessário explorar as características morfológicas da biópsia de medula óssea para verificar seu possível emprego como instrumento prognóstico. O desenvolvimento da padronização dos itens necessários nos laudos anatomo-patológico dos pacientes com SMD primária auxiliará no desenvolvimento de classificações futuras com maior grau de refinamento.

Apesar do pequeno número amostral (32 pacientes), os nossos resultados morfológicos em biópsia de medula óssea e sua associação com o mielograma mostraram valor diagnóstico e prognóstico e se associaram com as classificações FAB e OMS.

No presente estudo, ALIP, descrita primariamente por Tricot e colaboradores em 1984, foi mais observada nos pacientes com doença avançada quando comparados com os doentes em fase inicial. A presença de ALIP em biópsia de medula óssea como fator prognóstico para evolução leucêmica foi demonstrada em nossos resultados. Outros autores descreveram resultados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho (Verburgh *et al*, 2003; Porta *et al*, 2009).

Um aspecto ainda controverso na literatura é o significado da presença de células CD34 positivas em mais de 1% da celularidade medular como fator prognóstico. Baur e colaboradores estudaram a presença de células CD34 positivas isoladas e em agregados/aglomerados (ALIP) em biópsias de medula óssea de pacientes com SMD e LMA relacionada à SMD, comparando com medulas ósseas reativas. Os autores observaram que a porcentagem de células CD34 na medula óssea era maior nos pacientes com SMD do que nas condições reativas e sua porcentagem aumentava conforme a progressão da doença de acordo com a

classificação FAB, sendo observado ALIP principalmente nos subtipos avançados (AREB e AREB-t). Em outros estudos que analisaram a porcentagem de células CD34 positivas como fator prognóstico independente, a análise quantitativa foi realizada sem levar em consideração se essas células formavam ou não agregados/aglomerados (ALIP) (Verburgh *et al*, 2003; Porta *et al*, 2009). No presente estudo, o aumento de células CD34 isoladas não apresentou diferença estatística significativa em relação à fase da doença, ao risco de evolução leucêmica e em relação à sobrevida, quando comparado aos pacientes que apresentavam um número de células CD34+ < 1%. O aumento de células blásticas em pacientes com SMD sem formação de ALIP pode ser considerado como indicativo de perda arquitetural dentro do contexto da displasia. Ou seja, essa alteração reforça o diagnóstico clínico-patológico e auxilia no diagnóstico diferencial de condições reativas, mas a presença de células CD34+ isoladas não deve ser utilizada para definir conduta terapêutica.

Trabalhos têm mostrado uma boa correlação entre ALIP diagnosticado na coloração de hematoxilina-eosina e a expressão de CD34 (Dunphy *et al* 2007; Horhy *et al* 2007; Verburgh *et al*, 2003; Porta *et al*, 2009). Entretanto, essa correlação não é absoluta devido a diversos motivos. Um deles é a semelhança morfológica dos mieblastos com os eritroblastos (Dunphy *et al* 2007). Outro é pela marcação de células endoteliais pelo anticorpo monoclonal CD34. A presença de angiogênese, com sinais de aumento da densidade microvascular, comumente observada nos pacientes com SMD, pode levar a uma interpretação enganosa de ALIP, pois as células endoteliais também são positivas para o anticorpo anti-CD34 (Medinger *et al* 2010; Horhy *et al*, 2007). Além disso, existem raros casos de SMD com blastos CD34 negativos. Nestes casos é conveniente a utilização do anticorpo anti-CD117, o qual não é específico para progenitores mielóides, pois também é expresso por mastócitos, o que torna necessário para avaliação dos resultados de células CD117 positivas, a correlação da morfologia celular com o estudo imuno-histoquímico (Horhy *et al*, 2007).

A relação mielóide:eritróide dos pacientes com doença avançada encontrava-se aumentada por estímulo da proliferação celular principalmente de mielócitos e promielócitos (Wang *et al*, 2010). Por outro lado, em estágios iniciais da doença, há um estímulo à hiperplasia do setor eritróide e ocorre uma hematopoese ineficaz com aumento da quantidade de células apoptóticas, causando o aparente paradoxo entre

citopenia periférica, principalmente anemia, associada com uma medula óssea hiperclonal (Shimazaki *et al*, 2002). No nosso trabalho, esse fato foi observado e corroborado por evidenciarmos nos pacientes com alterações maturativas megaloblásticas observadas em biópsia de medula óssea uma maior sobrevida, independente da classificação OMS, FAB e do IPSS. Isso indica que a disfunção da eritropoese seja um processo contínuo que se inicia na fase inicial da doença e que pode se estender durante a fase avançada, a partir da qual predomina alteração maturativa mielóide. Esses achados levam a sugerir que existe o acometimento de uma célula pluripotente, entretanto, ainda não foi totalmente esclarecido como ocorre essa progressão.

De Wolf-Peeters e colaboradores em 1994 descreveram uma redução gradual da eritropoese concomitante ao aumento da mielopoese, durante o curso da doença, correlacionando com os grupos da classificação FAB, o que pode ser reforçado pelo fato da relação mielóide:eritróide encontrar-se aumentada principalmente na fase avançada e reduzida na fase inicial da doença. No nosso estudo, pacientes que apresentaram megaloblastos em quantidade elevada tiveram sobrevida significativamente aumentada em relação aos demais pacientes. Isso indica que se o paciente apresentar hiperclonalidade devido à hiperplasia eritróide, independentemente da presença de megaloblastose, sua sobrevida tende a ser maior do que aquele cuja clonalidade está aumentada por dismaturação mielóide ineficaz e aumento de células blásticas intramedular. Ou seja, a clonalidade *per se* não deve alterar o prognóstico do paciente, e sim, a linhagem celular que a predomina e a sua maturação. Nosso estudo reforça essa idéia, pois a clonalidade, ao contrário da relação M:E, não apresentou associação com os grupos definidos pela OMS, FAB e pelo IPSS e com a sobrevida.

A hiperclonalidade medular é encontrada na maioria dos pacientes adultos com SMD. Em ordem decrescente esta hiperplasia acomete linhagens eritróide, mielóide e megacariocítica (De Wolf-Peeters, 1991). No presente estudo, o achado predominante foi a hiperclonalidade, independente da fase da doença. Observou-se medula óssea normoclonal somente em pacientes com anemia refratária e com baixo risco de desenvolver LMA pelo IPSS. Na literatura não há relato da correlação entre a clonalidade medular estratificada em normoclonal, hiperclonal e hipoclonal com os grupos de risco pelo IPSS. Não houve diferença significativa em relação à análise da clonalidade entre os pacientes com e sem alteração citogenética.

Atualmente, a SMD com hipocelularidade tem sido assunto de grande interesse por parte dos pesquisadores (Yue *et al*, 2008; Sloand, 2009). Nesses estudos, há dados que sugerem que a medula óssea hipocelular seja um fator independente de bom prognóstico, considerando a taxa de sobrevida e de evolução leucêmica.

Entre os 32 pacientes estudados, houve três pacientes com medula óssea hipocelular. É importante, nesses casos, uma análise cuidadosa para excluir outros diagnósticos diferenciais como a anemia aplástica (Goyal *et al*, 1999). A dificuldade diagnóstica nesses casos encontra-se no fato do aspirado de medula óssea ser seco com maior frequência, o que impede a realização do mielograma e prejudica a análise citogenética, pois, no cultivo de células pode não haver mitose (Sloand, 2009). Nessa situação a biópsia de medula óssea torna-se o principal meio de avaliação dos elementos medulares, incluindo a contagem de blastos. Em um dos pacientes (nº 26) que se encontrou medula óssea com celularidade menor que 5%, houve evolução para LMA com uma sobrevida de 6,9 meses. A biópsia de medula óssea desse paciente mostrou além da hipocelularidade, ALIP e diversas células CD34 positivas isoladas em localização atípica. Outro paciente (nº 25) com medula óssea com celularidade de 30% também apresentava ALIP e sofreu transformação leucêmica. Desta forma, a hipocelularidade não pode ser considerada um fator independente de bom prognóstico conforme descrito por alguns autores (Sloand, 2009; Yue *et al*, 2007) havendo outros fatores morfológicos e citogenéticos que influenciam na evolução leucêmica.

A análise citogenética de pacientes com SMD hipocelular envolve alterações nos cromossomos 5, 7 e 8 (Wong & So, 2002). Essas alterações citogenéticas presentes em células da medula óssea de pacientes com SMD hipocelular são importantes porque os diferenciam daqueles pacientes portadores de anemia aplástica. A trissomia do cromossomo 8, uma das alterações que podem acometer esses pacientes, foi classificada primariamente como de risco intermediário pelo IPSS (Greensberg *et al*, 1997). No entanto, há trabalhos que a associam com um risco aumentado de evolução para leucemia e uma diminuição de sobrevida (Solé *et al*, 2000; Fernandez *et al*, 2000). O primeiro paciente (nº 26) descrito acima reforça essa observação onde essa alteração citogenética é associada com mau prognóstico, pois o mesmo apresentava trissomia do cromossomo 8. O segundo paciente (nº 25) apresentava inicialmente del(5q) e durante a evolução foi

evidenciado também del(9p). Apesar desse paciente no momento do diagnóstico apresentar somente a del(5q), a série megacariocítica encontrava-se em quantidade reduzida, o que não é compatível com a síndrome 5q-. Na biópsia de medula óssea foram observados alguns micromegacariócitos e megacariócitos com hipolobulação nuclear, entretanto. Além disso, no mielograma foi evidenciado 5% de blastos.

Em relação à avaliação da linhagem megacariocítica, foi verificado que os pacientes com aumento do número de megacariócitos apresentavam fase avançada da doença. Sakuma e colaboradores em 2006 também verificaram essa associação, na qual os pacientes estudados apresentaram sobrevida reduzida com desfecho desfavorável. A avaliação qualitativa dessa linhagem revelou que os pacientes com maior risco de evolução leucêmica apresentaram maior quantidade de micromegacariócitos. A outra alteração qualitativa avaliada, hipolobulação nuclear, não evidenciou relação com a fase da doença ou com o prognóstico pelo IPSS. Não há relatos na literatura da avaliação megacariocítica qualitativa em biópsia de medula óssea em relação a esses parâmetros estudados.

A avaliação da perda arquitetural foi realizada considerando-se as três linhagens estudadas em relação a sua topografia habitual, dando-se ênfase, principalmente à linhagem mielóide. Entretanto, foram utilizados critérios subjetivos e notou-se a necessidade da elaboração de critérios mais restritos para essa avaliação, no que se refere ao que se deve considerar significativo para evitar casos falso positivos. Além disso, é necessário avaliar a alteração arquitetural presente em cada linhagem. Mesmo utilizando critérios subjetivos a perda arquitetural foi mais significativa em pacientes com doença avançada e com maior risco de evolução leucêmica. Portanto, há necessidade de estudos para que seja padronizado como deve ser avaliada a perda arquitetural em pacientes com SMD. Atualmente, na literatura não há trabalhos visando esse objetivo.

A presença de alterações estromais em pacientes com SMD pode ser, em alguns casos, confundida com aquela compatível com alterações associadas ao envelhecimento medular como agregado linfóide e linfocitose em pacientes idosos, principal faixa etária de acometimento de SMD (Girodon *et al*, 2001) Entretanto, a presença de ectasia vascular foi a principal alteração estromal por nós verificada durante o estudo, principalmente em estágios avançados da doença. A partir disso, outras alterações estromais concomitantes devem ser pesquisadas e podem ser valorizadas (De Wolf-Peetes, 1994). A ectasia vascular pode estar relacionada com

o aumento da densidade microvascular observada em por imuno-histoquímica em estudo anterior (Pruneri *et al*, 1999). Essa angiogênese anormal está relacionada na patogênese da SMD, havendo relação com os grupos FAB (Lundberg *et al*, 2006). Além disso, os sinusóides dilatados podem ser associados a estágios fibróticos medular (Cotrlingam, 2003). Entre os cinco pacientes estudados que possuíam ectasia sinusoidal, três também possuíam fibrose medular.

Outra observação que se mostrou relevante durante a análise dos resultados foi a fibrose medular, sendo observada em 34% dos pacientes. Os pacientes com menor risco de evolução para leucemia de acordo com o IPSS não apresentavam fibrose medular. Entretanto, os pacientes com maior risco possuíam fibrose medular, principalmente grau II. Esta alteração morfológica deve-se a uma produção acentuada de fibras colágenas tipo I e II por fibroblastos medulares estimulados por citocinas derivadas das células clonais (Steensma *et al*, 2001). Estudos demonstraram que pacientes com essa alteração apresentam pior comportamento biológico e esta alteração é considerada um fator de risco independente para a evolução leucêmica (Porta *et al*, 2009; Steensma *et al*, 2001). Entretanto, ainda não há critérios estabelecidos de como deve ser feita essa avaliação para pacientes com SMD primária e qual deve ser o grau de fibrose para a mesma ter valor prognóstico (Sakuma *et al*, 2006; Brunning *et al*, 2008).

A variante fibrótica da SMD tem sido associada a uma proeminente hiperplasia da linhagem megacariocítica (Sakuma *et al*, 2006). Entre os pacientes com fibrose medular avaliados, quatro (36,3%) apresentavam essa associação.

Um estudo multicêntrico envolvendo 200 pacientes com SMD primária evidenciou que a fibrose medular foi mais frequente nos pacientes com CRDM e AREB, mas não houve associação com os grupos de risco para evolução leucêmica pelo IPSS (Buesche *et al*, 2008). Ainda nesse estudo, foi verificada redução da sobrevida dos pacientes com fibrose medular independente do grau de fibrose em relação aos demais pacientes. No nosso estudo, os pacientes com fibrose medular grau II apresentaram sobrevida significativamente reduzida em relação aqueles com fibrose grau I. Esses dois grupos apresentaram sobrevida menor do que o grupo de pacientes sem fibrose.

As alterações citogenéticas ocorrem em aproximadamente 65% dos casos dos pacientes com fibrose medular (Buesche *et al*, 2008). As mais encontradas nesses pacientes são deleções do braço longo do cromossomo 5 e do 7,



monossomia do 7, trissomia do 8, deleção do braço longo do cromossomo 11 e 20, deleção do braço curto do cromossomo 12 e isocromossomo 17q (Steensma *et al*, 2001). Os resultados do nosso estudo apontaram uma tendência de fibrose medular nos pacientes com doença avançada pelos grupos da OMS e FAB, sendo observadas alterações citogenéticas em 45,5% dos pacientes. Foram encontradas as seguintes alterações citogenéticas: del(17p), del(12p), t(6;12) e del(11)(q23).

A fibrose medular pode estar associada em até um terço dos pacientes com alterações do metabolismo do ferro e com sideroblastos em anel (Buesche *et al*, 2008). No presente estudo, houve um paciente com fibrose medular que foi classificado como ARSA. Este paciente apresentava a t(6;12) como alteração cromossômica e, apesar de estar na fase inicial da doença, evoluiu rapidamente para leucemia mielóide aguda.

Entre os itens avaliados pela biópsia de medula óssea que também puderam ser avaliados pelo mielograma, apenas dois parâmetros mostraram-se divergentes durante essa análise. Um deles foi a celularidade medular global, na qual a análise da biópsia mostrou ser mais fidedigna. Entretanto, o mielograma mostrou ser mais eficiente na detecção de megablastos, fato que não exclui o impacto prognóstico na sobrevida e no prognóstico da presença desse achado em biópsia de medula óssea. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que fizesse esse tipo de análise comparativa entre a biópsia de medula óssea e o mielograma, apesar da OMS considerar que o estudo da linhagem megacariocítica seja mais fidedigno nas biópsias de medula óssea (Brunnering *et al*, 2008).

As outras alterações que puderam ser comparadas ao avaliar os dois métodos foram: as alterações quantitativa e qualitativa de megacariócitos, a relação M:E e a quantificação da presença de blastos. Nenhum destes fatores apresentou diferença estatística em relação à avaliação comparativa dos resultados obtidos através dos dois métodos - biópsia e mielograma.

Apesar da biópsia de medula óssea ser um exame invasivo e doloroso, o mielograma não permite avaliar celularidade, fibrose medular, perda arquitetural, formação de ALIP, presença de células CD34+ isoladas e ectasia sinusoidal que foi a principal alteração estromal observadas nos pacientes deste estudo. A contagem de blastos pelo mielograma deve ser cuidadosamente correlacionada com a estimativa da biópsia de medula óssea para classificar o paciente (Verburgh *et al*, 2008; Brunnering *et al*, 2008). Além disso, nos casos de pacientes com medula óssea

hipocelular ou com fibrose medular pode-se não obter representação celular significativa ou aspirado seco, o que torna a biópsia de medula óssea o melhor meio para avaliação das displasias e para a contagem de blastos, o que é reforçado pela possibilidade de usar estudo imuno-histoquímico com anticorpo anti-CD34.

Outro exame adicional que deve ser feito para classificação e prognóstico dos pacientes com SMD primária é a análise citogenética. Entre os pacientes estudados, aqueles com alteração citogenética de pior prognóstico tiveram maior risco de desenvolver LMA. Ao longo do acompanhamento, três pacientes apresentaram novas alterações citogenéticas: del(9p), t(8;12)(q22;p12) e del(17p), sendo que dois desses apresentaram transformação leucêmica.

Em 2006, Sakuma e colaboradores analisaram aspectos morfológicos em biópsia de medula óssea em 102 pacientes com SMD e correlacionaram com as características citogenéticas. Em sua metodologia, os pacientes foram agrupados em dois grupos citogenéticos: um com cariótipo normal e outro grupo com alterações citogenéticas. Entretanto, esse tipo de abordagem não reflete o verdadeiro valor prognóstico das alterações citogenéticas. Por exemplo, os pacientes com del(5q) pelo IPSS possuem bom prognóstico, enquanto pacientes com monossomia do cromossomo 7 possuem mau prognóstico. Portanto, essa abordagem condiz com o significado dessas alterações citogenéticas na patogênese da síndrome mielodisplásica primária e na sobrevida desses pacientes. Por outro lado, no presente estudo, foi observado diferença de sobrevida quando os pacientes foram agrupados de acordo com o prognóstico citogenético pelo IPSS. Nosso estudo analisou também as alterações estromais, o que não foi avaliado no estudo anterior. Os pacientes cuja biópsia de medula óssea evidenciou alterações estromais foram associados com mau prognóstico citogenético.

Durante o estudo, foram observados três pacientes com del(11)(q23) como única alteração citogenética (1 CRMD, 1 AREB-1 e 1 AREB-2). Nesses pacientes a medula óssea mostrou-se hiperclular com aumento da relação M:E com perda arquitetural importante. Na linhagem megacariocítica havia formas micromegacariocíticas e hipolobuladas de forma importante. Os pacientes na fase avançada da doença apresentaram aumento das células CD34 positivas e um desses possuía ALIP. Foram identificados, ainda, dois pacientes com CRDM e del(17p) cujas biópsias de medula óssea evidenciaram redução da linhagem megacariocítica. Os dois pacientes com del12p foram classificados como CRDM e

apesar de ambos apresentarem esplenomegalia, não houve correspondência morfológica comum aos dois pacientes.

Outro dado clínico que chamou atenção nos nossos resultados e pode estar relacionado com as alterações citogenéticas foi a leucocitose, pois os pacientes com SMD em geral apresentam leucopenia (Ogata *et al*, 2006), quando há alteração da contagem de leucócitos no sangue periférico. Dentre os pacientes estudados, sete apresentavam leucocitose no diagnóstico. Três pacientes foram classificados como AREB (dois AREB-1 e um AREB-2), todos possuíam alterações citogenéticas - dois tinham del(11)(q23) e um tinha cariótipo complexo, todos os pacientes evoluíram para LMA. Outros três pacientes com leucocitose também evoluíram para LMA, apesar de estarem na fase inicial da doença (um CRDU e dois CRDM) e apresentaram alterações citogenéticas: add(16q), del(17p) e monossomia do 7, que provavelmente auxiliaram para o desfecho desfavorável. Apenas uma paciente com leucocitose não evidenciou alteração citogenética, entretanto, nesta época veio a ser diagnosticada endocardite relacionada à prótese mitral que foi atribuída como causa da leucocitose nesse caso.

A partir dos dados obtidos, pode-se notar a necessidade de estudar a morfologia da medula óssea através da biópsia e de correlacionar com características citogenéticas, principalmente as alterações celulares, em um número maior de pacientes para auxiliar na identificação de genes envolvidos nas displasias e no entendimento da patogênese da SMD primária. Também foi observada a necessidade de estabelecer critérios para a análise morfológica de biópsia de medula óssea que possam ser utilizados como variáveis prognósticas em SMD primária.

## 6 CONCLUSÕES

1. ALIP, fibrose medular (principalmente grau II), perda arquitetural e alterações estromais foram associados com pacientes em fase avançada da doença e maior risco de evolução leucêmica.
2. A relação M:E aumentada e o aumento do número de megacariócitos foram associados a fase avançada da doença.
3. A presença de micromegacariócitos em maior quantidade foi associada a maior risco de evolução para LMA.
4. A presença de megaloblastos possuiu impacto na sobrevida.
5. A biópsia de medula óssea e o mielograma são métodos diagnósticos complementares em SMD primária.
6. Alterações citogenéticas de pior prognóstico foram associadas ao maior risco de evolução para LMA.
7. Houve associação entre as alterações estromais observadas em biópsia de medula óssea com o prognóstico citogenético, entretanto há necessidade de maior número de pacientes para avaliação das alterações citogenéticas em relação as alterações celulares em biópsia de medula óssea.

## REFERÊNCIAS

1. Atallah E, Kantarjian H, Garcia-Manero G. The role of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Pharmacother*. 2007; 8(1):65-73.
2. Aul C, Giagounidis A, Germing U, Ganser A. Evaluating the prognosis of patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2002; 81:485-497.
3. Barzi A, Sekeres MA. Myelodysplastic syndromes: A practical approach to diagnosis and treatment. *Cleveland Clinic of Medicine*. 2010; 77(1):37-44.
4. Baur AS, Meugé-Moraw C, Schmidt PM, Parlier V, Jotterand M, Delacrétaz F. CD34/QBEND10 immunostaining in bone marrow biopsies: an additional parameter for the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2000; 64(2):71-79.
5. Bennett JM. A comparative review of classification systems in myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin Oncol*. 2005; 32(4 suppl 5):S3-1.
6. \_\_\_\_\_, Catovsky, D, Daniel, MT, Flandrin, G, Galton, DA, Gralnick, HR, Sultan, C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982; 51:189-199
7. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Giardini I, Rocca B, et al. Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution. *Ann Hematol*. 2010; 89(6):545-51.
8. Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, et al. Myelodysplastic syndromes. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008: 88-107.
9. Buesche G, Teoman H, Wilczak W, Ganser A, Hecker H, Wilkens L, et al. Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2008; 22(2):313-322.
10. Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, Picard F, Melle J, Gisselbrecht S et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood*. 2002; 99(5):1594-1601.
11. Clarkson DB, Fan Y, Joe H. A remark on algorithm 643: FEXACT: An algorithm for performing Fisher's exact test in r x c contingency tables. 1993; 19:484.
12. Cotelingam JD. Bone marrow biopsy: interpretative guidelines for the surgical pathologist. *Advances in Anatomic Pathology*. 2003, 10(1): 8- 26.
13. Delforge M, Raets V, Van D, Vandenberghe P, Boogaerts M. CD34+ marrow progenitors from MDS patients with high levels of intramedullary apoptosis have reduced expression of alpha4beta1 and alpha5beta1 integrins. *Leukemia*. 2005; 19(1):57-63.
14. De Wolf-Peeters C. Bone marrow trephine interpretation: diagnostic utility and potential pitfalls. *Histopathology*. 1991; 18(6):489-493.

15. \_\_\_\_\_, Pittaluga S, Verhoef G. Histological characteristic of bone marrow trephines in myelodysplastic syndromes. *Current Diagnostic Pathology*. 1994; 189-193.
16. Disperati P, Ichim CV, Tkachuk D, Chun K, Schuh AC, Wells RA. Progression of myelodysplasia to acute lymphoblastic leukaemia: implications for disease biology. *Leuk Res*. 2006; 30(2):233-239.
17. Dunphy, CH, O'Malley DP, Perkins SL, Chang C. Analysis of Immunohistochemical Markers in Bone Marrow Sections to Evaluate for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007; 15(2): 154-159.
18. Economopoulou C, Pappa V, Kontsioti F, Papageorgiou S, Kapsimali V, Papasteriadi C, et al. Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res*. 2008; 32(1):61-69.
19. Espigado I, Marín-Niebla A, Pérez-Hurtado JM, Ríos E, Carmona, Plaza E, et al. Hematopoietic Stem Cell transplantation in Childhood: Reduction in Mortality and Improvement of Survival Over the Years. *Transplantation Proceedings*. 2005; 37:1555-1556.
20. Fernandez TS, Abdelhay E, de Souza FT, Ornellas MH, Otero L, Tabak D. Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2000; 24:839-848.
21. Forman ST. Myelodysplastic syndrome. *Opinion in Hematol*. 1996; 3(4):297-302.
22. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chavez J, Mayani H. Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: in vitro colony growth and long-term proliferation. *Leuk Res*. 1999; 23(4):385-394.
23. Garandeau C, Pautas E, Andreux M, Andreux J, Gaussem P, Siguret V. [Myelodysplastic syndromes]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2000; 58:405-416.
24. Georggi A. Impact of histopathology on diagnosis, clinics and outcome of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 1997; 21(1): S13.
25. Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL, et al. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2003; 102:795-801.
26. Giralt S. Bone marrow transplant in myelodysplastic syndromes: new technologies, same questions. *Curr Hematol Rep*. 2005; 4: 200-207.
27. Girodon F, Favre B, Carli PM, Nash N, Desbiolles N, Tatou E, Maynadié. Minor dysplastic changes are frequently observed in the bone marrow aspirate in elderly patients without haematological disease. *Clin Lab Haem*. 2001; 23: 297-300.
28. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89:2079-2088.

29. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Andrea Kundgen, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis A, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller T, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007; 110: 4385-4395.
30. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol*. 2000; 13:193-207.
31. Hellström-Lindberg E, Kanter-Lewensohn L, Öst A. Morphological changes and apoptosis in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes treated with granulocyte-CSF and erythropoietin. *Leuk Res*. 1997; 2(5):415-425.
32. \_\_\_\_\_, Willman C, Barrett AJ, Saunthararajah Y. Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic syndromes. *Hematology*. 2000; 110-132.
33. Horny HP, Sotlar K, Valent P. Diagnostic value of histology and immunohistochemistry in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2007; 31: 1609-1616.
34. Howe RB, Porwint-MacDonald A, Wanat R, Teranchi R, Helleström-Lindberg E. The WHO classification of SMD does make a difference. *Blood*. 2004; 103: 3265-3270.
35. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F, ed. Basel: S Karger, 2009.
36. Kikukawa M, Aoki N, Sakamoto Y, Mori M. Study of p53 in elderly patients with myelodysplastic syndromes by immunohistochemistry and DNA analysis. *American Journal of Pathology*. 1999; 155(3):717-721.
37. Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Hirokawa K, Kamiyama R. Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia*. 1998; 12(4):486-492.
38. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*. 2002; 16(9):1713-1724.
39. Kouides PA, Benett JM. Morphology and classification of myelodysplastic syndromes. *Oncol Clin North Am*. 1992; 6(3):485-499.

40. Kurzrock R, Albitar M, Cortes JE, Estey EH, Faderl SH, Garcia-Manero G, Thomas DA, Giles FJ, Ryback ME, Thibault A, De Porre P, Kantarjian HM. Phase II study of R115777, a farnesyltransferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2004; 22:1287-1292.
41. Lima-Costa MF, Veras R. Anging and public health. *Cad Saude Publica*. 2003; 19(3):701-700.
42. List AF, Vardiman J, Issa J-PJ, Dewitte TM. Myelodysplastic syndromes. *American Society of Hematology*. 2004; 297-316.
43. Linman JW & Bagby GC. The preleukemic syndrome: Clinical and laboratory features, natural course, and management. *Blood Cells*. 1976; 2:11-31.
44. Liu D, Chen Z, Xue Y, Lu D, Zhou Y, Gong J, Wu W, Liang J, Ma Q, Pan J, Wu Y, Wang Y, Zhang J, Shen J. The significance of bone marrow cell morphology and with cytogenetic features in diagnosis of MDS-RA patients. *Leukemia Res*. 2009(33): 1029-1038.
45. Lorand-Metze. Síndromes Mielodisplásicas. Conceito e Classificação. Diagnóstico. Evolução e Complicações. *Hematologia: Fundamentos e Práticas*. Editora Atheneu. Zago MA, 2005; 519-536.
46. Lungdberg LG, Hellström- Lungdberg E, Kanter-Lewensohn L, Lerner R, Palmblad J. Angiosenesis in Relation to Clinical Stage, Apoptose and Prognostic Score in Myeloidysplastic Syndromes. *Leukemia Reserch*; 2006; 30: 247-253.
47. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C, Cazzola M. Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25(23): 3503-3510.
48. Maxwell AE. Comparing the classification of subjects by two independent judges. *British Journal of Psychiatry*. 1970; 116: 651-655.
49. Medinger M, Fischer N, Tzankov A. Vascular Endothelial Growth Factor-Related Pathways in Hemato-Lymphoid Malignancies. *Jornal of Oncology*. 2010; 2010: 1-14.
50. Mhaweck P & Saleem A. Myelodysplastic syndrome: review of the cytogenetic and molecular data. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology*. 2001; 40:229-238.
51. Musto P. Thalidomide therapy for myelodysplastic syndromes: current status and future perspectives. *Leuk Res*. 2004; 28:325-332.
52. Niero-Melo L, Resende LSR, Gaiolla R, Oliveira CT, Domingues MAC, Neto, FAM. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006; 28(3):167-174.
53. Nishino HT & Chang C-C. Myelodysplastic Syndromes: Clinicopathologic features, phatobiology, and molecular pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med*. 2005; 129:1299-1310.



54. Orazi A. Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/ myeloproliferative diseases. *Pathobiology*. 2007; 74(2): 97-114.
55. \_\_\_\_\_, Czader MB. Myelodysplastic Syndromes. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132: 290-305.
56. Ogata K. Myelodysplastic Syndromes: Recent progress in diagnosis and understanding of their pathophysiology. *J. Nippon Med Sch*. 2006; 73(6):300-307.
57. Panani AD & Roussos C. Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: Clinical implications. *Cancer Letters*. 2005; 235:177–190.
58. Pecci A, Travaglino E, Klersy C, Invernizzi R. Apoptosis in relation to CD34 antigen expression in normal and myelodysplastic bone marrow. *Acta Haematol*. 2003; 109(1):29-34.
59. Porta MGD, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, Passamonti F, Invernizzi R, Castello A, Magrini U, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2009; 27(5):754-762.
60. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferrucci PF, Buffa R, Lambertenghi-Deliliers G, Pezzella F. Angiogenesis in Myelodysplastic Syndromes. *British Journal of Cancer*. 1999; 81(8): 1398-1401.
61. Raskind WH, Tirumali, N, Jacobson, R, Singer, J, Fialkow, PJ. Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. *Blood*. 1984; 63:1318-1323.
62. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2010.
63. Romeo M, Chauffaille MLF, Silva MRR, Kerbauy J. Myelodysplastic syndromes: histopathology as prognostic factor. *Rev Bas Hematol Hemoter*. 2001; 23(2):63-68.
64. Sakuma T, Hayashi Y, Kanomata N, Murayama T, Matsui T, Kajimoto K, Hanioka K, Chihara K, Maeda S. Histological and cytogenetic characterization of bone marrow in relation to prognosis and diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Pathol Int*. 2006; 56(4):191-199.
65. Senn JS, Messner HA, Pinkerton PH, Chang L, Nitsch B, McCulloch EA. Peripheral blood blast cell progenitors in human preleukemia. *Blood*. 1982; 59: 106-109.
66. Sekeres MA. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2010; 24: 287-294.
67. Shetty VT, Mundle SD, Raza A. Pseudo Pelger-Huët anomaly in myelodysplastic syndrome: hyposegmented or apoptotic neutrophil? *Blood*. 2001; 98 (4):1273-1275.
68. Shimazaki K, Ohshima K, Suzumiya J, Kawasaki C, Kikuchi M. Evaluation of apoptosis as a prognostic factor in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2000;110(3):584-590.

69. Shrout PE & Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*. 1979; 86:420-428.
70. Silverman LR & Mufti G. Methylation inhibitor therapy in the treatment of myelodysplastic syndrome. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2005; 2:12-23.
71. Sloand E. Hypocellular myelodysplasia. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2009; 23:347-360.
72. Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luño E, Prieto F, Granada I, Hernández JM, Cigudosa JC, Diez JL, Bureo E, Marqués ML, Arranz E, Ríos R, Martínez Climent JA, Vallespi T, Florensa L, Woessner S. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. Br J Haematol*. 2000;108(2):346-356.
73. Soligo D, Delia D, Oriani A, Cattoretti G, Orazi A, Bertolli V, Quirici N, Deliliers GL. Identification of CD34+ cell in normal and pathological bone marrow biopsies by QBEND10 monoclonal antibody. *Leukemia*. 1991; 5: 1026 -1030.
74. Steensma DP, Hanson CA, Letendre L, Tefferi A. Myelodysplasia with fibrosis: a distinct entity? *Leuk Res*. 2001; 25(10):829-838.
75. Streiner DL & Norman GR. *Health measurement scales. A practical guide to their development and use.* (3 ed.). Oxford: Oxford University Press, 2003.
76. Stuart AAA test for homogeneity of the marginal distributions in a two-way classification. *Biometrika*. 1955; 42: 412-416.
77. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, Walt J, Orazi. European Consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005; 90: 1128-1132.
78. Tricot G, De Wolf-Peeters C, Vlietinck R, Verwilghen RL. Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes. II. Prognostic value of abnormal localization of immature precursors in MDS. *Br J Haematol*. 1984; 58(2):217-225.
79. Verburgh E, Achten R, Maes B, Hagemeijer A, Boogaerts M, De Wolf-Peeters C, Verhoef G. Additional prognostic value of bone marrow histology in patients subclassified according to the International Prognostic Scoring System for myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2003; 21(2):273-282.
80. Vishnu VB, Reddy MD. Topics in bone marrow biopsy pathology: role of marrow topography in myelodysplastic syndromes and evaluation of post-treatment and post-bone marrow transplant biopsies. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2001; 5(2):110-120.
81. Wang H, Wang X, Xu X, Lin G. Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 196: 159-166.
82. Wong KF, So CC. Hypoplastic myelodysplastic syndrome-a clinical, morphologic, or genetic diagnosis? *Cancer Genet Cytogenet*. 2002; 138(1):85-88.

83. Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms – comments on the 2008 classification. *Intern Jour Lab Hem.* 2010; 32: 461-476.
84. Yue G, Hao S, Fadare O, Baker S, Pozdnyakova O, Galili N, Woda BA, Raza A, Wang SA. Hypocellularity in myelodysplastic syndrome is an independent factor which predicts a favorable outcome. *Leuk Res.* 2008; 32(4):553-558.

### APÊNDICE A - Ficha de Identificação do Paciente

|  |       |
|--|-------|
| IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE COM SMD PRIMÁRIA | Data: |
|--|-------|

|                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| Nome:                | Diagnósticos associados |
| Prontuário:          |                         |
| Idade (diagnóstico): |                         |
| Data de nascimento:  |                         |
| Cor:                 |                         |

|   |      |
|---|------|
| DIAGNÓSTICO DE SMD                                  | FAB  |
| Data (primeira consulta):                           | OMS  |
| Data ultima consulta (se não houver, data do óbito) | IPSS |

| SINTOMAS   |                            |
|------------|----------------------------|
| 1) INICIAS | 2) EVOLUÇÃO (indicar data) |
|            |                            |

|   |   |   |
|---|---|---|
| Tratamento<br>(tipo/resposta/Intercorrências/período) | Transformação<br>Leucêmica  | Óbito   |
|   | <input type="checkbox"/> Não<br><input type="checkbox"/> Sim<br>DATA: _____ | <input type="checkbox"/> Não<br><input type="checkbox"/> Sim<br>DATA: _____<br>CAUSA: _____ |

## EXAMES COMPLEMENTARES

| HEMOGRAMA (inicial e evolução - data) | MIELOGRAMA (inicial e evolução - data) |
|---------------------------------------|--|
|                                       |  |

|              |                  |
|--------------|------------------|
| CITOGENÉTICA | Cariótipo (data) |
|--------------|------------------|

|                         |  |
|-------------------------|--|
| BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA | Número do exame e hospital onde foi feito - Laudo (data) |
|-------------------------|--|

**APÊNDICE B** - Avaliação dos achados morfológicos em biópsia de medula óssea em síndrome mielodisplásica primária

PC n<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_

- N<sup>o</sup> de espaços trabeculares: \_\_\_\_\_
- Alterações estromais:

|                             | ausente | discreta | moderada | importante | Não avaliável |
|-----------------------------|---------|----------|----------|------------|---------------|
| Edema                       |         |          |          |            |               |
| Ectasia sinusóide           |         |          |          |            |               |
| Plasmócitos                 |         |          |          |            |               |
| Linfocitose                 |         |          |          |            |               |
| Nódulos linfóides           |         |          |          |            |               |
| Precursosores intravascular |         |          |          |            |               |

- Escada de Bauereister para fibrose medular:
  - 0 – sem fibra.
  - I – fibras com ocasionais e/ou focos finos.
  - II – rede fina em grande parte do corte, sem fibras grossas.
  - III – rede difusa, com focos esparsos de fibras grossas, mas sem colágeno.
  - IV – rede difusa, focos grossos e áreas de colageneização.

- Alterações celulares:

1. Gerais:

|  |  |
|--|--|
| Celularidade _____%                    | <input type="checkbox"/> Hipocelular   |
|  | <input type="checkbox"/> Normocelular  |
|  | <input type="checkbox"/> Hiper celular |
| Proporção Mielóide: Eritróide          |  |
| Média de megacariócitos por 10cap/400X |  |

| Parda da orientação arquitetural | ausente | discreta | moderada | importante | Não avaliável |
|----------------------------------|---------|----------|----------|------------|---------------|
| Eritróide                        |         |          |          |            |               |
| Mielóide                         |         |          |          |            |               |
| Megacariocítia                   |         |          |          |            |               |

## 2. Linhagem eritróide:

|               | ausente | discreta | moderada | importante | Não<br>avaliável |
|---------------|---------|----------|----------|------------|------------------|
| megaloblastos |         |          |          |            |                  |

## 3. Linhagem megacariocítica:

|                       | ausente | discreta | moderada | importante | Não<br>avaliável |
|-----------------------|---------|----------|----------|------------|------------------|
| micromegaloblóstos    |         |          |          |            |                  |
| Hipolobulação nuclear |         |          |          |            |                  |

## 4. Linhagem mielóide:

|                  | ausente | discreta | moderada | importante | Não<br>avaliável |
|------------------|---------|----------|----------|------------|------------------|
| ALIP             |         |          |          |            |                  |
| Células CD34 + * |         |          |          |            |                  |

\* avaliar porcentagem

## ANEXO A - Carta do comite de ética do HUPE



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA




Rio de Janeiro, 12 de março de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa  
Prof<sup>a</sup>. Patrícia Maria C. O. Duque  
Para: Aut. Tatiana Fonseca Alvarenga  
Orient. Prof<sup>a</sup>. Maria Helena F. O. de Souza

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2001-CEP/HUPE) "ANÁLISE MORFOLÓGICA E CITOGENÉTICA DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PRIMÁRIA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.



O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S<sup>a</sup>., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

  
Prof<sup>a</sup>. Patrícia Maria C. O. Duque  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa



## ANEXO B - Manuais do fabricante dos anticorpos primários

|  |   |  |  |                                 |
|--|---|--|--|---------------------------------|
|   |   | 6600 Sierra College Blvd. • Rocklin, CA 95677 USA • 800-665-7284 |  | Rev. 2.0<br>NEW000E CMC13421020 |
| <h2>CD34 (QBEnd/10)</h2>   |   |  |  |                                 |
| <p>Para Uso Em Diagnóstico In Vitro (IVD)<br/>         Português: Instruções Para O Uso</p>  |   |  |  |                                 |
| <p><b>Apresentação</b><br/>         Anti-CD34 consiste num anticorpo monoclonal de ratinho obtido a partir de sobrenadante diluído em solução salina com tampão fosfato, pH 7,4, com base proteica e conservado com azida de sódio.</p>  |   |  |  |                                 |
| <p><b>Aplicações</b><br/>         O anticorpo monoclonal CD34 reconhece um antígeno de superfície celular de aproximadamente 110 Kd que é expressado selectivamente de células progenitoras hematopoiéticas, incluindo linhagens progenitoras linfóides e mielóides e uma porção significativa de leucemias agudas. Além deste reconhecimento das células progenitoras, este marcador é expressado pelo endotélio vascular. Acresce ainda que, aparentemente as células endoteliais proliferativas expressam esta molécula em maior quantidade que as células em repouso. Em comparação com o factor VIII Rg, os marcadores do CD34 são mais fortes e parecem ser mais sensíveis que o Factor VIII Rg.</p>   |   |  |  |                                 |
| <p><b>Reactividade</b></p>   | Parafinados, congelados   |  |  |                                 |
| <p><b>Controlo</b></p>   | Apêndice, placenta, amígdala  |  |  |                                 |
| <p><b>Visualização</b></p>   | Membranar   |  |  |                                 |
| <p><b>Estabilidade</b></p>   | Até 36 meses; guardar a 2-8° C  |  |  |                                 |
| <p><b>Isotipo</b></p>  | IgG <sub>1</sub>  |  |  |                                 |
| <p>A cor do anticorpo não altera o desempenho</p>  |   |  |  |                                 |
| <p><b>Descrição</b></p>  | <p><b>N° Cat.</b></p>   | <p><b>Diluição/Comentários</b></p>                               |  |                                 |
| 0.1 ml, concentrado  | 134M-14   | 1:50 - 1:200*  |  |                                 |
| 0.5 ml, concentrado  | 134M-15   | 1:50 - 1:200*  |  |                                 |
| 1 ml, concentrado  | 134M-16   | 1:50 - 1:200*  |  |                                 |
| 1 ml, pré-diluído  | 134M-17   | Pronto-a-usar  |  |                                 |
| 7 ml, pré-diluído  | 134M-18   | Pronto-a-usar  |  |                                 |
| Controlo positivo  | 134S  | 5 lâminas/embalagem  |  |                                 |
| <p><input type="checkbox"/> pré-diluído</p> <p><input type="checkbox"/> concentrado</p>  |   |  |  |                                 |
| <p><b>Preparação e Pré-tratamento</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cortar secções de 3-4 µm de tecido fixado em formalina e embebido em parafina e colocá-los em lâminas carregadas positivamente; Secar durante a noite a 58° C.</li> <li>2. Desparafinar, re-hidratar e recuperar o epitopo; O método preferencial é o da Técnica de Indução da Recuperação do Epitopo por Aquecimento (HIER) utilizando o Trilogy™ Cell Marque em conjugação com uma Panela de Pressão. O método preferencial permite simultaneamente desparafinar, re-hidratar e recuperar o epitopo. Após completar, lavar 5 vezes com água destilada ou desionizada.</li> <li>3. Se usar o sistema de detecção HRP, colocar as lâminas em bloqueio de peróxido durante 10 minutos; Lavar. Se usar o Sistema de Detecção AP, não efectuar este passo.</li> </ol> |   |  |  |                                 |
| <p><b>Protocolo Recomendado Para Marcação à Temperatura Ambiente Usando o Sistema de Detecção CytoScan™ BSA</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar o anticorpo e incubar durante 30 - 60 minutos; Lavar.</li> <li>2. Aplicar o ligando e incubar durante 10 minutos; Lavar.</li> <li>3. Aplicar o marcador e incubar durante 10 minutos; Lavar.</li> <li>4. Aplicar ampla quantidade de cromogénio e incubar durante 1 - 10 minutos; Lavar.</li> <li>5. Desidratar e cobrir com lamela.</li> </ol>  |   |  |  |                                 |
| <p><b>Protocolo Recomendado Para Marcação à Temperatura Ambiente Usando o Sistema de Detecção PolyScan™ Polímero</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplicar o anticorpo e incubar durante 30 - 60 minutos; Lavar.</li> <li>2. Aplicar o Sistema de Detecção PolyScan™ Polímero Coelho/Ratinho e incubar durante 30 minutos; Lavar.</li> <li>3. Aplicar ampla quantidade de cromogénio e incubar durante 1 - 10 minutos; Lavar.</li> <li>4. Desidratar e cobrir com lamela.</li> </ol>   |   |  |  |                                 |
| <p><b>Bibliografia</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Civin, CL, et al., London Academic Press 1989:818-825</li> <li>2. Fina, L et al., Blood 1990;75:2417-2426</li> <li>3. Sankey, EA et al., J Pathol 1990;43:752-757</li> <li>4. Ramani, P et al., Histopathology 1990;17:237-242</li> <li>5. Aziza, J, et al., Am J Clin Pathol 199;96:25-31</li> <li>6. Torlakovic G et al. Arch Pathol Lab Med. 2002 Jul;126(7):823-8</li> <li>7. Salizzoni M et al. Transplantation 2003 Sep 15;76(5):844-8</li> <li>8. Fanburg-Smith JC et al. Mod Pathol. 2003 Mar;16(3):263-71</li> </ol>   |   |  |  |                                 |
| <p>*As diluições determinadas acima são estimativas; os resultados reais podem diferir por causa da variabilidade nos métodos e nos protocolos. Prova do anticorpo o desempenho e o protocolo são a responsabilidade do usuário da extremidade.</p>  |   |  |  |                                 |
| <p>EC REP</p>  | <p>EMERGO EUROPE<br/>         Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague, NL.</p> |  |  <p>MISOS disponível no pedido.</p> |                                 |

## CD61 (2f2)

Para Uso Em Diagnóstico In Vitro (IVD)  
Português: Instruções Para O Uso

### Apresentação

Anti-CD61 consiste num anticorpo monoclonal de ratinho obtido a partir de sobrenadante diluído em solução salina com tampão fosfato, pH 7,4, com base proteica e conservado com azida de sódio.

### Aplicações

O anticorpo para o CD61 marca a subunidade IIIa do complexo glicoproteico heterodimerico IIb/IIIa não covalentemente ligado, presente nas plaquetas humanas e seus percursoros. Este anticorpo é útil na identificação da diferenciação de megacarioblastos, tal como observada na leucemia megacarioblástica.

|                     |                                |
|---------------------|--------------------------------|
| <b>Reactividade</b> | Parafinados, congelados        |
| <b>Controlo</b>     | Medula óssea                   |
| <b>Visualização</b> | Citoplasmática                 |
| <b>Estabilidade</b> | Até 36 meses; guardar a 2-8° C |
| <b>Isotipo</b>      | IgG <sub>1</sub>               |

A cor do anticorpo não altera o desempenho

| Descrição           | Nº Cat. | Diluição/Comentários |
|---------------------|---------|----------------------|
| 0.1 ml, concentrado | 161M-14 | 1:25-1:100*          |
| 0.5 ml, concentrado | 161M-15 | 1:25-1:100*          |
| 1 ml, concentrado   | 161M-16 | 1:25-1:100*          |
| 1 ml, pré-diluído   | 161M-17 | Pronto-a-usar        |
| 7 ml, pré-diluído   | 161M-18 | Pronto-a-usar        |
| Controlo positivo   | 1615    | 5 lâminas/embalagem  |

- pré-diluído  
 concentrado

### Preparação e Pré-tratamento

1. Cortar secções de 3-4 µm de tecido fixado em formalina e embebido em parafina e colocá-los em lâminas carregadas positivamente; Secar durante a noite a 58° C.
2. Desparafinar, re-hidratar e recuperar o epitopo; O método preferencial é o da Técnica de Indução da Recuperação do Epitopo por Aquecimento (HIER) utilizando o Trilogy™ Cell Marque em conjugação com uma Panela de Pressão. O método preferencial permite simultaneamente desparafinar, re-hidratar e recuperar o epitopo. Após completar, lavar 5 vezes com água destilada ou desionizada.
3. Se usar o sistema de detecção HRP, colocar as lâminas em bloqueio de peróxido durante 10 minutos; Lavar. Se usar o Sistema de Detecção AP, não efectuar este passo.

### Protocolo Recomendado Para Marcação à Temperatura Ambiente Usando o Sistema de Detecção CytoScan™ BSA

1. Aplicar o anticorpo e incubar durante 30 - 60 minutos; Lavar.
2. Aplicar o ligando e incubar durante 10 minutos; Lavar.
3. Aplicar o marcador e incubar durante 10 minutos; Lavar.
4. Aplicar ampla quantidade de cromogéneo e incubar durante 1 - 10 minutos; Lavar.
5. Desidratar e cobrir com lamela.

### Protocolo Recomendado Para Marcação à Temperatura Ambiente Usando o Sistema de Detecção PolyScan™ Polímero

1. Aplicar o anticorpo e incubar durante 30 - 60 minutos; Lavar.
2. Aplicar o Sistema de Detecção PolyScan™ Polímero Coelho/Ratinho e incubar durante 30 minutos; Lavar.
3. Aplicar ampla quantidade de cromogéneo e incubar durante 1 - 10 minutos; Lavar.
4. Desidratar e cobrir com lamela.

### Bibliografia

1. Thiele J et al. Eur J Haematol 1990; 44:63-70
2. Thiele J et al. Virchows Archiv B Cell Pathol (1990) 58:295-302
3. Goldman BI et al. Modern Pathology 14:589-594 (2001)
4. Fox SB et al. 1990 Jul; 17(1):69-74
5. Duperray A et al. Blood. 1989 Oct; 74(5):1603-11
6. Campana D et al. Leukemia. 1990 Sep; 4(9):620-4
7. Thiele J et al. Anal Quant Histol. 1990 Aug; 12(4):285-9

\*As diluições determinadas acima são estimativas; os resultados não podem diferir por causa da variabilidade nos métodos e nos protocolos. Prova de anticorpo o desempenho e o protocolo são a responsabilidade do usuário da extremidade.

## Myeloperoxidase (policlonal)

Para Uso Em Diagnóstico In Vitro (IVD)

Português: Instruções Para O Uso

### Apresentação

Anti-Myeloperoxidase é uma fracção purificada de imunoglobulina de antisoro de coelho, diluída em Tampão Fosfato Salino, a pH 7.4, com base proteica, e conservado com azida de Sódio.

### Aplicações

O Mieloperoxidase detecta granulócitos e monócitos no sangue e precursores de granulócitos na medula óssea. Este anticorpo pode detectar populações celulares mieloides da medula óssea bem como noutras locais.

|                     |                                |
|---------------------|--------------------------------|
| <b>Reactividade</b> | Parafinados, congelados        |
| <b>Controlo</b>     | Medula óssea                   |
| <b>Visualização</b> | Citoplasmática                 |
| <b>Estabilidade</b> | Até 36 meses; guardar a 2-8° C |

A cor do anticorpo não altera o desempenho

| Descrição           | Nº Cat. | Diluição/Comentários |
|---------------------|---------|----------------------|
| 0.1 ml, concentrado | 289A-74 | 1:100 - 1:500*       |
| 0.5 ml, concentrado | 289A-75 | 1:100 - 1:500*       |
| 1 ml, concentrado   | 289A-76 | 1:100 - 1:500*       |
| 1 ml, pré-diluído   | 289A-77 | Pronto-a-usar        |
| 7 ml, pré-diluído   | 289A-78 | Pronto-a-usar        |
| Controlo positivo   | 2895    | 5 lâminas/embalagem  |

- pré-diluído  
 concentrado

### Preparação e Pré-tratamento

1. Cortar secções de 3-4 µm de tecido fixado em formalina e embebido em parafina e colocá-los em lâminas carregadas positivamente; Secar durante a noite a 58° C.
2. Desparafinar, re-hidratar e recuperar o epitopo; O método preferencial é o da Técnica de Indução da Recuperação do Epitopo por Aquecimento (HIER) utilizando o Trilogy™ Cell Marque em conjugação com uma Panela de Pressão. O método preferencial permite simultaneamente desparafinar, re-hidratar e recuperar o epitopo. Após completar, lavar 5 vezes com água destilada ou desionizada.
3. Se usar o sistema de detecção HRP, colocar as lâminas em bloqueio de peróxido durante 10 minutos; Lavar. Se usar o Sistema de Detecção AP, não efectuar este passo.

### Protocolo Recomendado Para Marcação à Temperatura Ambiente Usando o Sistema de Detecção CytoScan™ BSA

1. Aplicar o anticorpo e incubar durante 30 - 60 minutos; Lavar.
2. Aplicar o ligando e incubar durante 10 minutos; Lavar.
3. Aplicar o marcador e incubar durante 10 minutos; Lavar.
4. Aplicar ampla quantidade de cromogéneo e incubar durante 1 - 10 minutos; Lavar.
5. Desidratar e cobrir com lamela.

### Protocolo Recomendado Para Marcação à Temperatura Ambiente Usando o Sistema de Detecção PolyScan™ Polímero

1. Aplicar o anticorpo e incubar durante 30 - 60 minutos; Lavar.
2. Aplicar o Sistema de Detecção PolyScan™ Polímero Coelho/Ratinho e incubar durante 30 minutos; Lavar.
3. Aplicar ampla quantidade de cromogéneo e incubar durante 1 - 10 minutos; Lavar.
4. Desidratar e cobrir com lamela.

### Bibliografia

1. Pinkus GS, Pinkus JL. Mod Pathol 1991 Nov; 4(6): 733-41
2. Hudock J et al. Am J Clin Pathol 1994 Jul; 102(1): 55-60
3. Hamoudi WH et al. Arch Pathol Lab Med. 2000 Feb;124(2):315-8
4. Arber DA et al. Am J Clin Pathol. 1996 Oct;106(4):462-8
5. Chang CC et al. Am J Clin Pathol. 2000 Nov;114(5):807-11
6. Kaleem Z, White G. Am J Clin Pathol. 2001 Jun;115(6):876-84
7. Audouin J et al. Int J Surg Pathol. 2003 Oct;11(4):271-82
8. Kojima M et al. APMIS. 2003 Dec;111(12):1133-6

\*As diluições determinadas acima são estimativas; os resultados reais podem diferir por causa da variabilidade nos métodos e nos protocolos. Prova de anticorpo o desempenho e o protocolo são a responsabilidade do usuário da extremidade.

EC  REP EMERGO EUROPE  
 Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague, NL

 MSDS disponível no pedido.