

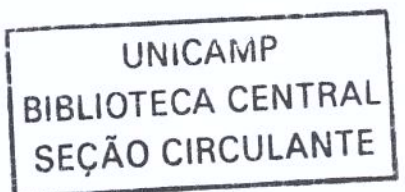
SILVIA MARIA MEIRA MAGALHÃES

**NÓDULOS LINFÓIDES MEDULARES EM PACIENTES PORTADORES
DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS: INCIDÊNCIA,
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E
ASSOCIAÇÃO COM CRITÉRIOS CLÍNICO-LABORATORIAIS,
PROGRESSÃO DA DOENÇA E SOBREVIDA**

CAMPINAS

2001

200307302



SILVIA MARIA MEIRA MAGALHÃES

**NÓDULOS LINFÓIDES MEDULARES EM PACIENTES PORTADORES
DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICAS: INCIDÊNCIA,
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E
ASSOCIAÇÃO COM CRITÉRIOS CLÍNICO-LABORATORIAIS,
PROGRESSÃO DA DOENÇA E SOBREVIDA**

*Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de
concentração Clínica Médica.*

ORIENTADORA: Profa..Dra. Irene Lorand-Metze
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. José Vassallo

CAMPINAS
2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M27n

Magalhães, Silvia Maria Meira

Nódulos linfóides medulares em pacientes portadores de síndrome mielodisplásicas: incidência, caracterização morfológica, imunohistoquímica e associação com critérios clínico-laboratoriais, progressão da doença e sobrevida. / Silvia Maria Meira Magalhães. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Irene Lorand-Metze, José Vassallo

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Medula óssea. 2. Imunohistoquímica. I. Irene Lorand-Metze. II. José Vassallo . III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

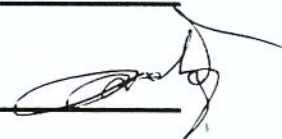
UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
M27n
V EX
TOMBO BC: 52707
PROC 16-124/03
E D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15/03/03
Nº CDD

CM00180983-9

BIB ID 284961

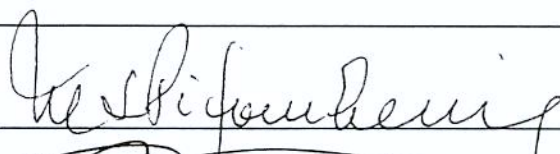
Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): *Profa. Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze*

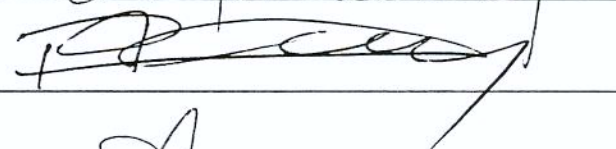


Membros:

1. Professora Doutora Maria da Silva Pitombeira



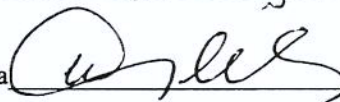
2. Professor Doutor Roberto Antonio Pinto Paes



3. Professor Doutor Fernando Ferreira Costa



4. Professora Doutora Maria Marluce dos Santos Vilela



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13.12.01

A realização deste trabalho contou com o apoio do Programa Institucional de Capacitação de Docentes - PICDT - da Universidade Federal do Ceará e do Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Campinas

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Gerardo Assunção Magalhães

À minha mãe Yara Meira Magalhães

Ao meu companheiro Carlos da Costa Ribeiro Neto

Às minhas filhas Aline, Andréia e Cecília

Universidade Estadual de Campinas

- ◆ Prof.^a Dra. Irene Lorand Metze, por apoiar e orientar a realização desse projeto
- ◆ Prof. Dr. José Vassallo, por aceitar e co-orientar esse projeto
- ◆ Prof. Dr. Konradin Metze, por assessorar a análise estatística dos dados
- ◆ Prof. Dr. José Butori Lopes Faria, coordenador da Sub-comissão de Pós-graduação
- ◆ Mariana Pimenta Pinheiro, por sua colaboração no levantamento de dados
- ◆ Dra. Glauce Pinto e funcionários do Laboratório de Patologia Experimental
- ◆ Arlete da Rocha de Avelar, secretária da Divisão de Hematologia, por sua disponibilidade e assistência competente
- ◆ Mônica de Almeida Falconi, por sua ajuda nos arquivos do Laboratório de Hematologia
- ◆ Eliana Miranda, pela assistência em informática
- ◆ Renata Maia, secretária da Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica
- ◆ Ana Cristina Adala Artusi

Universidade Federal do Ceará

- ◆ Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho, pelo estímulo e colaboração junto ao Departamento de Patologia e Medicina Legal

- ◆ Prof. Dr. José Murilo de Carvalho Martins
- ◆ Prof.^a. Dra. Maria Helena Pitombeira
- ◆ Dra Clara Bastos Eloy da Costa
- ◆ Dr. Ormando Rodrigues Campos
- ◆ Dra. Francisca Vânia Barreto Aguiar Ferreira Gomes
- ◆ Norma de Carvalho Linhares, da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde
- ◆ Aos funcionários do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará-
HEMOCE
- ◆ Angela Maria Meira Magalhães
- ◆ Alana Jocelina Montenegro de Castro
- ◆ Suely Maia Ponte
- ◆ Maria do Carmo Santos Nogueira
- ◆ Maria Iraci Holanda Teixeira

	<i>Pág</i>
RESUMO	xxvii
INTRODUÇÃO	31
Síndromes mielodisplásicas.....	33
O tecido linfóide nodal e medular.....	39
Nódulos linfóides medulares.....	43
Análise morfológica.....	44
Análise imunohistoquímica.....	46
Análise imunogenotípica.....	48
Nódulos linfóides medulares nas SMD.....	50
OBJETIVOS	53
MATERIAL E MÉTODOS	57
Pacientes.....	59
Estudo morfológico.....	59
Estudo imunohistoquímico.....	60
Anticorpos primários.....	62
Técnica imunoenzimática indireta.....	64
Análise estatística.....	66

RESULTADOS.....	69
DISCUSSÃO.....	99
CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
ANEXOS.....	145

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Classificação das SMDs segundo o grupo FAB (French-American-British Group).....	37
TABELA 2 : Classificação das SMDs segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde).....	38
TABELA 3 : População linfóide na medula óssea normal segundo diversos autores e diferentes técnicas.....	43
TABELA 4 : Critérios morfológicos para o diagnóstico diferencial entre nódulos linfóides medulares benignos e malignos.....	45
TABELA 5 : Revisão de dados da literatura sobre a frequência relatada de nódulos linfóides medulares em pacientes portadores de SMD.....	50
TABELA 6 : Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo o sexo em função da presença de nódulos linfóides medulares.....	72
TABELA 7 : Idade e dados de hemograma em pacientes portadores de SMD em função da presença de nódulos linfóides medulares.....	74
TABELA 8 : Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a classificação FAB em função da presença de nódulos linfóides medulares.....	74
TABELA 9 : Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a presença de fibrose no tecido hematopoético em função da presença de nódulos linfóides medulares.....	76

TABELA 10 : Distribuição dos pacientes portadores de SMD e nódulos linfóides medulares segundo a classificação FAB em função da presença de fibrose no tecido hematopoético.....	77
TABELA 11 : Caracterização histológica dos nódulos linfóides medulares em pacientes portadores de SMD.....	83
TABELA 12 : Classificação FAB e caracterização imunohistoquímica dos nódulos linfóides medulares.....	92
TABELA 13 : Distribuição dos pacientes portadores de SMD e nódulos linfóides medulares segundo o período de acompanhamento.....	93
TABELA 14 : Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a evolução da doença em função da presença de nódulos linfóides medulares.....	94
TABELA 15 : Distribuição dos pacientes portadores de SMD subtipo AREB/AREB-t segundo a evolução da doença em função da presença de nódulos linfóides medulares.....	95

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : O centro germinativo e suas regiões funcionais.....	41
FIGURA 2 : Método imunoenzimático do complexo avidina biotina Peroxidase..	61
FIGURA 3 : Percentagem de pacientes portadores de SMD segundo a presença de nódulos linfóides medulares.....	72
FIGURA 4 : Percentagem de pacientes portadores de SMD e nódulos linfóides medulares segundo os achados do hemograma.....	73
FIGURA 5 : Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide e espessamento da rede de reticulina.....	75
FIGURA 6 : Percentagem de pacientes portadores de SMD segundo a presença de fibrose em função da presença de nódulos linfóides medulares....	77
FIGURA 7 : Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide central.	78
FIGURA 8 : Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide intertrabecular.....	79
FIGURA 9 : Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide paratrabecular.....	80
FIGURA 10 : Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide de limites precisos.....	81
FIGURA 11 : Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide de limites imprecisos.....	82
FIGURA 12 : Cortes histológicos de medula óssea exibindo nódulos linfóides associados a vasos sanguíneos.....	84

FIGURA 13 :	Total de pacientes portadores de SMD avaliados, percentual de casos com nódulos linfóides e número de amostras submetidas à análise imunohistoquímica.....	85
FIGURA 14 :	Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão central. Técnica ABC (x 100).....	87
FIGURA 15 :	Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão central. Técnica ABC (x 400).....	88
FIGURA 16 :	Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão perinodular. Técnica ABC (x 100).....	89
FIGURA 17 :	Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão perinodular. Técnica ABC (x 400).....	90
FIGURA 18 :	Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão difuso.....	91
FIGURA 19 :	Percentagem de pacientes portadores de SMD segundo a evolução da doença em função da presença de nódulos linfóides medulares....	94
FIGURA 20 :	Curva de sobrevida de acordo com o subtipo FAB.....	96
FIGURA 21 :	Curva de sobrevida de acordo com a presença ou ausência de fibrose.....	96
FIGURA 22 :	Curva de sobrevida de acordo com a presença ou ausência de nódulos linfóides.....	97
FIGURA 23 :	Curva de sobrevida dos pacientes portadores de SMD subtipo AREB/AREB-t de acordo com a presença ou ausência de nódulos linfóides medulares.....	97



RESUMO

Síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de desordens caracterizado por anormalidades na proliferação e maturação dos precursores hematopoéticos, resultando em citopenias periféricas e potencial para transformação leucêmica. Nódulos linfóides (NL) medulares são, em geral, considerados fisiológicos e relacionados à idade. Em pacientes com SMD o seu significado clínico permanece obscuro. Nesse estudo, a presença de NL medulares foi investigada em 206 pacientes com SMD. A idade mediana foi de 58,5 anos (15-89). Segundo a classificação FAB, foram avaliados 129 AR, 29 ARSA, 31 AREB/AREB-t, 11 LMMC, 5 variantes hiperfibróticas e 1 caso inclassificável. NL foram observados em 24,8% dos casos (51/206). Em 25 casos foi possível uma análise imunohistoquímica utilizando-se os anticorpos: CD20, CD3, CD45RO e anti-bcl-2. Embora os NL apresentassem, em geral, localização central (88,3%) e limites precisos, alguns exibiam posição paratrabecular (3,9%) ou margens imprecisas (13,7%). O aumento nas fibras de reticulina foi evidenciado em 51,1% dos casos. Positividade para CD20 foi detectada em 92,0% das amostras (23/25) com padrão central, perinodular ou difuso. Marcação com CD3 e/ou CD45RO foi evidenciada em 48,0% dos casos (12/25). Em 15 pacientes só marcação para células B (13 casos) ou T (2 casos) foi observada e em 10 casos uma população mista de células B e T foi notada. A expressão de bcl-2 foi detectada em apenas 2 casos. A incidência de NL foi alta quando considerada a idade dos pacientes. Quando comparados os grupos com e sem NL não se observou diferença significativa com relação à idade, sexo, contagem de neutrófilos, plaquetas, subtipo FAB, progressão da doença ou sobrevida global. A presença de NL mostrou uma associação significativa com o aumento de fibras de reticulina no tecido hematopoético ($p=0,01$) e, ainda, com menor dosagem de hemoglobina ($p=0,03$). A análise multivariada mostrou que hemoglobina e subtipo FAB foram os fatores preditivos de sobrevida mais significativos. Os resultados mostraram que NL em pacientes com SMD têm características morfológicas e imunofenotípicas heterogêneas. Não se observou associação com doença linfoproliferativa. Esses agregados podem representar reatividade a uma estimulação imunológica anormal e persistente e estão, provavelmente, relacionados à alteração da arquitetura medular.



INTRODUÇÃO

SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

Síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de desordens clonais adquiridas, originadas na célula progenitora hematopoética (JANSEN, 1989; WEIMAR, 1994; HOAGLAND, 1995; HEANEY 1999), caracterizadas por anormalidades na proliferação e diferenciação celular. O quadro clínico varia amplamente desde anemias refratárias ou citopenias isoladas, com baixa propensão para transformação leucêmica, até pancitopenias graves com elevado risco de progressão para leucose aguda (FARHI, 1992; SANZ, 1997). São mais frequentes em indivíduos com idade superior a 50 anos e sua incidência aumenta com a idade (LIST, 1992; WILLIAMSON, 1994; SABA, 2001). A maior suscetibilidade para mielodisplasia nessa faixa etária é atribuída a fatores inerentes ao programa fisiológico de envelhecimento, como diminuição da reserva e capacidade proliferativa das células progenitoras hematopoéticas, associação entre senilidade restrição clonal e instabilidade genômica, com acúmulo gradual de mutações somáticas induzidas por agentes genotóxicos endógenos ou exógenos (MAKINODAN, 1980; LIST, 1992; AUL, 1998a; FERNÁNDEZ-FERRERO, 2001). Os fatores mencionados são, isoladamente, insuficientes para conferir um fenótipo maligno, mas aumentam a suscetibilidade para a aquisição de eventos adicionais tais como aberrações cromossômicas e consequente vantagem seletiva de proliferação (RASKIND, 1984). A patogênese da doença, portanto, constitui-se num processo de múltiplas etapas que, na sua complexidade, justifica a heterogeneidade dessa condição e disponibiliza múltiplos alvos para o desenho de novas intervenções terapêuticas (LIST, 1990; ASANO, 1994; GREENBERG, 1998; KARP, 1998; ROSENFELD, 2000; GREENBERG, 2001). Estão incluídos nesse acúmulo sequencial de eventos: a) injúrias ou mutações espontâneas ou induzidas nas células progenitoras hematopoéticas que conferem vantagem de proliferação, afetam adversamente a maturação celular, prejudicam os mecanismos normais de reparo do DNA, geram instabilidade genômica e, possivelmente, evocam uma resposta imunológica anormal (JACOBS, 1991; FENAUX, 1997; GALLAGHER, 1997); b) a taxa excessiva de morte celular intra-medular prematura induzida por citocinas pró-apoptóticas, com consequente hematopoese ineficaz (RAZA, 1996a; RAZA, 1996b; PARKER, 1998; GREENBERG, 1998; REZA, 1999; YOSHIDA, 1999); c) o estabelecimento de um clone anormal associado ao encurtamento do telômero contribuindo para a instabilidade cromossômica (BOULTWOOD, 1997); d) a

progressão da doença associada à perda ou inativação de genes supressores (JACOBS, 1991; FENAUX, 1997; GALLAGHER, 1997).

A etiologia e o mecanismo preciso da *iniciação* do processo de leucemogênese são ainda pouco conhecidos. Mutações no DNA nuclear e mitocondrial da célula progenitora hematopoética são provavelmente resultado de exposição a agentes genotóxicos ocupacionais e ambientais, ou ainda resultado do estresse oxidativo. Poluentes ambientais, notadamente os hidrocarbonetos poliaromáticos, com capacidade mutagênica comprovada por bioensaio, são agentes etiológicos potenciais, sobretudo em áreas urbanas muito poluídas (AUL, 1998a; De MARTINIS, 1999). A frequência de mutações somáticas espontâneas aumenta com a idade, o que faz supor que a exposição a agentes genotóxicos na idade adulta têm maior probabilidade de induzir danos genômicos que resultam em expansão clonal. Estudos epidemiológicos, do tipo caso-controle, realizados na tentativa de identificar fatores de risco para SMD, apontam para o benzeno e seus derivados (exposição ocupacional), tabagismo (fonte de exposição ao benzeno, nitrosaminas e outros compostos químicos potencialmente carcinogênicos), compostos orgânicos halogenados, resíduos de pesticidas (exposição ocupacional ou alimentar), uso de tintura para o cabelo, etilismo (efeito dose-dependente), petróleo e seus derivados, entre outros (WEST, 1995; NISSE, 2001). Dentre os fatores genéticos predisponentes envolvidos destaca-se o polimorfismo de genes que codificam enzimas responsáveis pelo processo de metabolização e destoxificação de agentes com potencial mutagênico, tais como NAD(P)H quinona oxidoreductase no caso específico do benzeno. A prevalência desses fatores sofre influência das diferenças étnicas. Merece destaque o gene da glutathione S-transferase, cujo genótipo "null" e consequente ausência de atividade da isoenzima Theta 1 (GSTT1 null) confere um risco de desenvolver SMD quatro vezes superior àquele da população controle (SASAI, 1999). Tais variáveis genéticas, assim como as variáveis regionais, podem interferir na interpretação de resultados positivos ou negativos de estudos de caso-controle. Os supostos agentes envolvidos na *iniciação* têm, provavelmente, efeito sinérgico com eventos mutacionais na *promoção* do processo de leucemogênese. Nessa fase, há expansão do clone aberrante com vantagem de proliferação, o que se acompanha de elevadas taxas de morte celular. A transformação é resultado de aumento no número de células blásticas leucêmicas com maior inibição da apoptose e consequente evolução para leucemia aguda. Cada um desses

estágios é provavelmente acompanhado por injúrias genéticas adicionais, sejam extrínsecas ou espontâneas. A evolução está associada ao aumento da hematopoese ineficaz, progressiva piora da função celular e das citopenias periféricas.

Os mecanismos etiológicos envolvidos na SMD secundária são melhor conhecidos. A evolução a partir da anemia aplástica e hemoglobinúria paroxística noturna é rara, porém bem estabelecida, e usualmente ocorre em pacientes não transplantados e submetidos a tratamento imunossupressor (TOOZE, 1999). A SMD pós tratamento quimioterápico (SMD-t) corresponde a aproximadamente 10% dos casos e difere da SMD *de novo* em apresentação clínica, morfológica e prognóstico. Clinicamente acomete indivíduos mais jovens, manifestando citopenias com maior frequência e intensidade. A medula óssea é mais frequentemente hipocelular e apresenta, em geral, espessamento da rede de reticulina. A transformação leucêmica é comum e a sobrevida significativamente menor (AUL, 1995; PARK, 1996). São agentes terapêuticos com reconhecido potencial leucemogênico: a) radiação ionizante, com efeito dependente da dose e duração da exposição; b) agentes alquilantes, também com efeito dose-dependente e período de latência de 5 a 10 anos; c) inibidores da topoisomerase II, com tempo de latência mais curto e associação frequente com alteração no cromossomo 11q23.

A distribuição da doença é igual para ambos os sexos. A incidência bruta anual oscila entre 2,1 e 12,6 casos por 100.000 habitantes (WILLIAMSON, 1994; AUL, 1995), o que se equipara ou ainda sobrepõe aquela da leucemia mieloide aguda em especial na faixa etária acima de 60 anos. Considerando a incidência específica para o grupo populacional com idade superior a 70 anos esses valores se elevam para 15 a 50 casos por 100.000 habitantes (AUL, 1998a). É provável que a incidência seja ainda subestimada, considerando-se a frequência de doença subclínica, a falta de um marcador específico confiável e, conseqüentemente, a dificuldade diagnóstica nos casos de citopenias refratárias com poucas atípicas nas linhagens hematopoéticas e cariótipo normal. Há, no entanto, o consenso de que a incidência é crescente, provavelmente um reflexo de melhores critérios de diagnóstico que incluem a disponibilidade da análise citogenética e genética molecular, alterações demográficas que resultam numa maior expectativa de vida, maior e/ou mais prolongada exposição a agentes leucemogênicos ambientais e ocupacionais, uso mais

abrangente de procedimentos diagnósticos invasivos em pacientes idosos, e, ainda, um número crescente de casos secundários a tratamento quimio e radioterápico (AUL, 1998b).

O diagnóstico, baseado no estudo do sangue periférico e aspirado medular, é considerado nos casos de anemia inexplicada e persistente, com resposta inapropriada de reticulócitos, citopenias isoladas ou combinadas e/ou monocitose, sem causa justificada de falência medular e não associadas a doenças sistêmicas. Condições tais como deficiências nutricionais (ferro, folato, vitamina B12, piridoxina), dispoese droga-induzida, alcoolismo, anemia das doenças crônicas, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida, citopenias de causa imunológica e disfunção hepática ou renal severa devem ser consideradas (LORAND-METZE, 1991; REIZENSTEIN, 1992; HOFMANN, 1996; RAMOS, 1999; GARDAIS, 2000).

Além das alterações quantitativas, o sangue periférico exibe alterações morfológicas e funcionais. A medula é usualmente normo ou hiper celular, o que, considerando a citopenia periférica, é consistente com o conceito de hematopoese ineficaz. Celularidade medular inferior a 30% pode ser observada em 10 a 30% dos casos (TUZUNER, 1995). O diagnóstico citológico se baseia essencialmente nos aspectos displásticos nucleares e/ou citoplasmáticos observados em graus variados nas três linhagens celulares. Alguns autores consideram apenas as alterações presentes em pelo menos duas linhagens celulares ou em mais de 10% dos elementos celulares da população envolvida (REIZENSTEIN, 1992; KOUIDES, 1996; BAIN, 1996; RAMOS, 1999).

A classificação das SMD se baseia em achados do sangue periférico e aspirado medular, obedecendo os critérios estabelecidos pelo grupo franco-americano-britânico (FAB) (BENNETT, 1982), numa tentativa de agrupar entidades com características similares e implicações prognósticas comuns. Cinco subtipos distintos são propostos de acordo com o percentual de blastos no sangue periférico e medula óssea, número absoluto de monócitos no sangue periférico e percentual de sideroblastos em anel na medula óssea: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Classificação das Síndromes Mielodisplásticas segundo o grupo FAB

SUBTIPO	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
ANEMIA REFRATÁRIA (AR)	CITOPENIAS	BLASTOS < 5%
	BLASTOS < 1%	
AR COM SIDEROBLASTOS EM ANEL (ARSA)	ANEMIA	BLASTOS < 5% SIDERO-
	BLASTOS < 1%	BLASTOS EM ANEL ≥ 15%
AR COM EXCESSO DE BLASTOS (AREB)	BLASTOS < 5%	BLASTOS 5-20%
AREB EM TRANSFORMAÇÃO (AREB-t)	PANCITOPENIA	MÚLTIPLAS ATIPIAS
	BLASTOS > 5%	BLASTOS 21-30%
LEUCEMIA MIELOMONO-CÍTICA CRÔNICA (LMMC)	PANCITOPENIA	BASTONETES DE AUER
	BLASTOS < 5%	BLASTOS < 20%
	MONÓCITOS > 1000/mm ³	

Situações de diagnóstico difícil existem, sobretudo nos casos onde não se observa aumento do número de blastos no sangue periférico ou medula óssea. Tais casos correspondem a aproximadamente 10% e têm sido identificados como "não classificáveis" (ROSATI, 1996). O advento de técnicas imunológicas, citogenéticas e moleculares nos últimos anos tornou necessária a inclusão de novos aspectos à essa classificação puramente morfológica, com a definição de novos subtipos e variantes (KOUIDES, 1996; MIJOVIC, 1998; STEENSMA, 2001).

Mais recentemente, uma classificação para neoplasias do tecido hematopoético foi proposta pela Organização Mundial de Saúde (HARRIS, 2000; BENNETT, 2000). Para as síndromes mielodisplásticas, essa proposta baseia-se parcialmente na contagem de blastos na medula óssea que, junto ao cariótipo, constituem parâmetros de reconhecida importância na definição do prognóstico. Estão incluídos a anemia refratária, com e sem sideroblastos em anel, a citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens, a anemia refratária com excesso de blastos, a síndrome do 5q- e um subgrupo denominado inclassificável. A leucemia mielomonocítica crônica é excluída das SMD e classificada, juntamente com a leucemia mielóide crônica atípica e a leucemia mielomonocítica juvenil, num grupo conjunto de desordens mielodisplásticas/mieloproliferativas. O subtipo AREB-t é excluído e o percentual de células blásticas estabelecido para o diagnóstico de leucemia

aguda passa a ser 20% (**Tabela 2**). Essa classificação permite o agrupamento de categorias mais homogêneas, reduz o número de casos não classificáveis e tem, associada ao sistema internacional de escore (IPSS), forte impacto prognóstico (GREENBERG, 1997; GERMING, 2000).

Tabela 2 - Classificação das Síndromes Mielodisplásticas segundo a OMS

SUBGRUPO	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
ANEMIA REFRACTÁRIA (AR)	ANEMIA	DISPLASIA ERITRÓIDE
	BLASTOS < 1%	BLASTOS < 5%
AR COM SIDEROBLASTOS EM ANEL (ARSA)	ANEMIA	DISPLASIA ERITRÓIDE
	AUSÊNCIA DE BLASTOS	SIDEROBLASTOS EM ANEL
		≥15% BLASTOS < 5%
CITOPENIA REFRACTÁRIA COM DISPLASIA MÚLTIPLA (CRDM)	BICITOPENIA OU PANCITOPENIA	DISPLASIAS MÚLTIPLAS (≥ DUAS LINHAGENS)
	BLASTOS<1%	BLASTOS < 5%
CRDM E SIDEROBLASTOS EM ANEL (CRDM - SA)	CITOPENIAS	DISPLASIAS MÚLTIPLAS
	BLASTOS <1%	SIDEROBLASTOS EM ANEL
		≥15% BLASTOS < 5%
AR COM EXCESSO DE BLASTOS - 1 (AREB-1)	CITOPENIAS	DISPLASIAS MÚLTIPLAS
	BLASTOS <5%	BLASTOS 5-9%
AR COM EXCESSO DE BLASTOS - 2 (AREB-2)	CITOPENIAS	DISPLASIAS MÚLTIPLAS
	BLASTOS 5-19%	BLASTOS 10-19%
	BASTONETES AUER ±	BASTONETES AUER ±
SMD INCLASSIFICÁVEL	CITOPENIAS	DISPLASIA ÚNICA
	BLASTOS <1%	BLASTOS <5%
SMD COM DELEÇÃO (5q-)	ANEMIA	MEGACARIÓCITOS
	BLASTOS <5%	HIPLOBULADOS
	PLAQUETAS NORMAIS OU ELEVADAS	BLASTOS <5%
		DEL(5q-) ISOLADA

A biópsia óssea se estabeleceu como complemento indispensável na avaliação de pacientes com SMD por fornecer informações adicionais de importância no diagnóstico e prognóstico: estimativa da celularidade global, avaliação de alterações na arquitetura medular como a localização anormal de precursores imaturos (ALIP) (TRICOT, 1984b),

relação do tecido hematopoético com a trabécula óssea, maior sensibilidade na detecção da displasia megacariocítica, presença de nódulos linfóides e associação com fibrose (TRICOT, 1984a; KITAGAWA, 1989; RIOS, 1990; DE WOLF-PEETERS, 1991; BARTL, 1992; LAMBERTENGHI-DELILERS, 1993; SAAD, 1994; REDDY, 2001). Baseado na contribuição da avaliação histológica nas SMD, formas variantes, tais como a SMD hipocelular e SMD hiperfibrótica, são atualmente definidas e têm impacto na apresentação clínica, evolução e prognóstico da doença (KAMPMEIER, 1992; MASCHECK, 1992; KOUIDES, 1996).

O estudo imunohistoquímico é, atualmente, um recurso indispensável no diagnóstico, classificação, seguimento e definição de prognóstico nas afecções da medula óssea (MOIR, 1983, FALINI, 1984; KUBIC, 1989; VAN DER VALK, 1989; WERNER, 1992; GALA, 1997). Nas SMD a análise imunohistoquímica da medula óssea potencializa o valor diagnóstico e prognóstico da morfologia, na medida em que sobrepuja algumas limitações inerentes à histologia e acrescenta novas informações, ampliando o conhecimento da sua biologia e fisiopatologia (KRISTENSEN, 1990; MANGI, 1992; SCHLESINGER, 1996; LAMBERTENGHI-DELILERS, 1998; ELGHETANY, 1998).

O TECIDO LINFÓIDE NODAL E MEDULAR

O tecido linfóide nodal é composto por diversas populações celulares atuantes na resposta imune, em especial sub-populações linfocitárias T e B e células especializadas na apresentação de antígenos (células dendríticas).

O gânglio linfático é dividido em duas zonas principais: o córtex (externo e interno) e a medula. No córtex externo se observam os folículos linfóides separados por um tecido interfolicular, enquanto no córtex interno ou paracórtex não se observam folículos. A medula é constituída pela região peri-hilar e contém os seios separados por agregados de células linfóides que formam os cordões medulares. Nos seios se observam uma população de células composta por macrófagos, pequenos linfócitos, plasmócitos e uma sub-população especial denominada células B monocitóides (BROUSSE, 1997).

Do ponto de vista funcional, o gânglio linfático se divide em compartimentos de células B, os folículos, e zonas de células T. O número e aspecto dos folículos linfóides (FL) são dependentes do grau de estimulação antigênica: os folículos primários são estruturas quiescentes, formadas por agregados nodulares de pequenos linfócitos que exprimem a proteína bcl-2. Os folículos secundários são observados após estimulação antigênica e são formados por uma zona periférica, ou zona do manto, e um centro germinativo. A zona do manto é constituída por células linfóides B de meia-vida longa, que expressam IgM/IgD na sua membrana, e têm características morfológicas e imunohistoquímicas semelhantes àquelas do folículo primário. O centro germinativo é sítio de um processo dinâmico no qual células B proliferativas (centroblastos) sofrem mutações somáticas no gene da região variável das imunoglobulinas (Ig) e as células não-proliferativas (centrócitos) são selecionadas na medida em que sua Ig de superfície mostra afinidade pelo antígeno apresentado pelas células dendríticas. Muitos centrócitos que falham na ligação com o seu antígeno específico entram em programa de morte celular, respondendo pelo elevado índice de apoptose que aí se observa. O centro germinativo é, portanto, um microambiente favorável para a proliferação e diferenciação de células B memória e plasmócitos induzidas pelo antígeno (TARLINTON, 1998; DELVES 2000a; DELVES 2000b). É polimorfo, com um aspecto polarizado: uma zona clara, voltada para a cápsula, constituída principalmente por centrócitos e uma zona escura, situada no polo oposto, constituída essencialmente por centroblastos, numerosas células em mitose e macrófagos (**Figura 1**). As células linfóides do centro germinativo ou centro-foliculares, exprimem os antígenos de diferenciação pan-B e, ao contrário da população B da zona do manto, não exprimem a proteína bcl-2, uma vez que são, predominantemente, destinadas à apoptose. A exceção se faz na zona clara apical, onde uma sub-população de células B é selecionada, através da sua afinidade pelo antígeno apresentado pelas células dendríticas foliculares, para geração e manutenção de células B memória.

Centro Germinativo

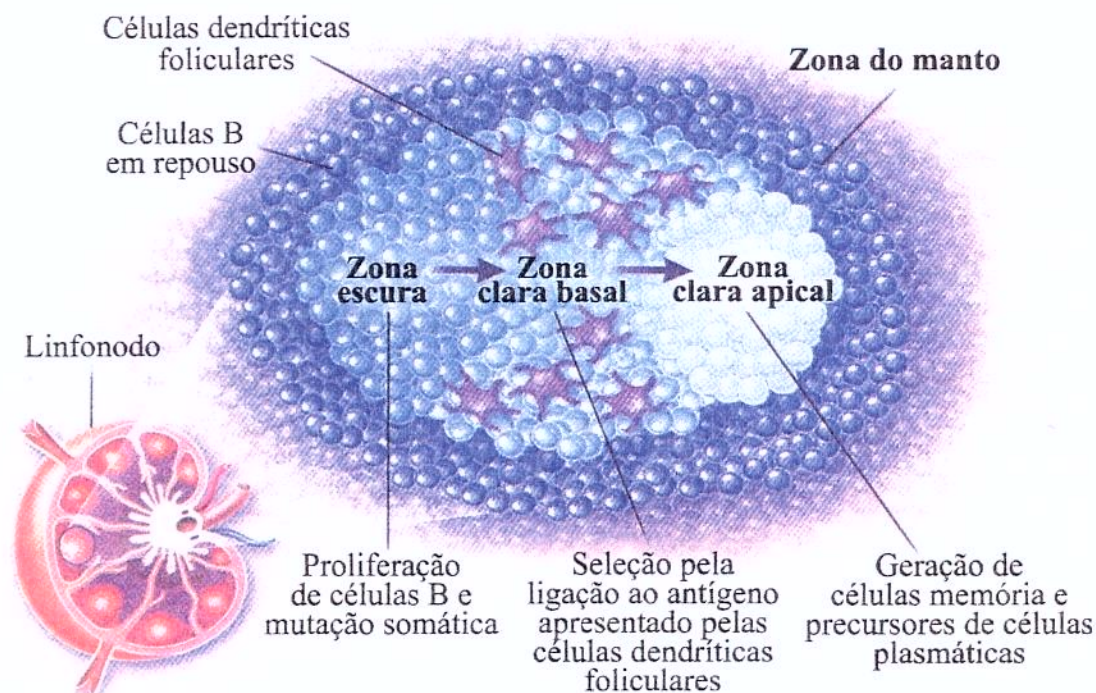


Figura 1 - O centro germinativo e suas regiões funcionais. Na zona escura ocorre proliferação de células B induzidas pelo antígeno, acompanhada de seleção que resulta de mutação somática no gene da região variável da imunoglobulina. Na zona clara basal ocorre seleção da célula B com especificidade para o antígeno apresentado pelas células dendríticas foliculares. As células assim selecionadas migram para a zona clara apical onde continua a proliferação e geração de células B memória e precursoras de células plasmáticas. Figura esquemática de Delves P. J. e Roitt J. M. *Advances in immunology: the immune system*. N. Engl. J. Med. 343: 108 - 117, 2000.

Folículos secundários contêm ainda células T, em especial aquelas com o fenótipo CD4, representando aproximadamente 5 a 30% das células linfóides. As células dendríticas apresentadoras de antígeno que expressam receptores do complemento e um número importante de receptores Fc para imunoglobulinas, são também numerosas nos FL (BROUSSE,1997; DELVES 2000a; DELVES 2000b).

O tecido interfolicular e paracórtex formam o compartimento de células T (fenótipo predominante CD4), junto às células interdigitantes (células histiocitárias apresentadoras de antígeno) e vênulas pós-capilares, características do compartimento de células T. As células endoteliais das vênulas pós-capilares expressam moléculas de adesão que interagem de maneira específica com uma estrutura correspondente da membrana linfocitária e portanto essas estruturas têm um papel importante na recirculação de linfócitos, controlando o tráfego de sub-populações linfocitárias nas diferentes zonas do tecido linfóide ("homíng"). O compartimento de células T contém ainda plasmócitos e imunoblastos numa proporção que varia de acordo com a estimulação antigênica (BROUSSE,1997; DELVES 2000a; DELVES 2000b). A região medular nodal é composta por uma população mista de células B e T e sobretudo numerosos plasmócitos e macrófagos.

A compartimentalização de células B e T é característica do tecido linfóide nodal e extra-nodal. A identificação de uma proliferação hiperplásica ou neoplásica numa localização específica de um desses órgãos permite pressupor o imunofenótipo da população envolvida baseado no conhecimento da arquitetura e compartimentalização normal desse órgão. Na medula óssea, no entanto, essas células estão dispersas ao acaso, num padrão descrito por Shin e colaboradores como intersticial não específico (SHIN, 1992) ou, ainda, ocasionalmente arranjadas em pequenos grupamentos na região central não paratrabecular do espaço medular. A composição celular desses agregados ou nódulos linfóides difere daquela observada na população difusamente distribuída. Linfócitos B são maioria nas formações nodulares, enquanto os linfócitos T predominam no padrão intersticial difuso (HORNY, 1989). No tecido linfóide maduro do adulto, cerca de 50 a 75% da população celular é constituída por células T e 25 a 50% é representada por células B (KNOWLES, 1993). Na medula óssea normal a avaliação do percentual de células B e T tem evidenciado resultados conflitantes. (CLARK, 1986; LOKEN, 1987; HORNY 1989; CLARK, 1990; THALER, 1989; SHIN, 1992; O'DONNELL, 1995; REGO, 1998). Em geral o percentual de células T relatado em medula óssea normal de adultos é bem superior àquele de células B. Os valores relatados, no entanto, variam de acordo com as condições de processamento da amostra, em especial fixação e descalcificação, e também com diferenças na sensibilidade e especificidade dos marcadores utilizados. Percentuais de

subpopulação linfocitária obtidos através de análise imunohistoquímica são, em geral, relativos ao total de células nucleadas, enquanto aqueles obtidos por citometria de fluxo se referem à população linfóide total, o que dificulta estudos comparativos. A distribuição normal de células B e T sofre, portanto, variações na dependência da técnica utilizada: a) citometria de fluxo: aspirados são inevitavelmente contaminados com sangue periférico, o que superestima sobretudo o percentual de células T (CLARK, 1986). Uma vez que um pequeno número de células B é observado no sangue periférico, a contaminação do material medular aspirado não altera substancialmente sua avaliação. b) análise imunohistoquímica em cortes de congelação: mostram um maior percentual de células B quando comparados com amostras incluídas em parafina (SHIN, 1992). c) análise imunohistoquímica em material incluído em parafina. Na **Tabela 3** estão representadas as diferentes avaliações do percentual de células B e T na medula óssea normal de acordo com vários autores, utilizando diferentes métodos.

Tabela 3 - População linfóide na medula óssea normal segundo diversos autores e diferentes técnicas

TÉCNICA	AUTORES	LINFÓCITOS B (%)	LINFÓCITOS T (%)
CITOMETRIA DE FLUXO	CLARK et al, 1986	8,0 - 11,0 (10,0)	20,0 - 23,0 (22)
	LOKEN et al, 1987	2,2 - 10,8 (6,5)	NA*
	REGO et al, 1998	16,5 - 40,3 (33,6)	22,6 - 50,6 (34,8)
IMUNOHISTOQUÍMICA	SHIN et al, 1992	(5,0)	(9,0)
EM CONGELAÇÃO	THALER et al, 1989	1,0 - 2,5 (1,6)	5,8 - 13,3 (9,0)
IMUNOHISTOQUÍMICA	HORNY et al, 1989	0,1 - 1,0 (0,5)	2,0 - 4,0 (2,0)
	SHIN et al, 1992	1,0 - 5,0 (3,0)	NA*
	O'DONNELL et al, 1995	0,0 - 5,9 (0,5)	0,0 - 6,7 (1,0)

*NA: não avaliado

NÓDULOS LINFÓIDES MEDULARES

Folículos linfóides são estruturas que têm merecido atenção recente no que diz respeito à sua estrutura e função (CROCKER, 1996). Não apenas pela complexidade da relação de células do sistema imune com moléculas de adesão e citocinas na formação de

complexos antígeno-anticorpo e geração de células de memória, mas também pela relação, por vezes tênue, entre hiperplasia folicular reacional e linfomas foliculares (BROUSSE, 1997; KAMEL, 1999).

Na medula óssea a presença de agregados de pequenos linfócitos maduros pode representar um processo reacional, frequentemente associado a um amplo espectro de desordens neoplásicas e não-neoplásicas (RYWLIN, 1974; MAEDA, 1977; NAVONE, 1985): doenças de caráter auto-imune, doenças do tecido conjuntivo (ROSENTHAL, 1989), anemia megaloblástica, anemia ferropriva, síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) (BAIN, 1998), síndromes mieloproliferativas (CERVANTES, 1988; FRANCO, 1991) e outras (LAROCHÉ, 1999). Em pacientes com doença linfoproliferativa conhecida, os nódulos linfóides supostamente representam invasão da medula óssea pela doença ou seu sítio de origem (BARTL, 1984; NAVONE, 1992; BISHOP, 1993). Nos linfomas de curso indolente, o envolvimento da medula óssea pode ser observado num percentual significativo de casos, alcançando em alguns relatos 90% (McKENNA, 1988; THALER, 1991; LAMBERTENGHI-DELILIERIS, 1992; SCHMID, 1992; SCHWONZEN, 1992; HENRIQUE, 1999). Pequenos infiltrados, no entanto, são usualmente obscurecidos por outras células medulares e podem passar despercebidos (TOREN, 1996). Considerando ainda que pacientes portadores de linfoma podem também apresentar nódulos linfóides reacionais, a definição do caráter benigno ou maligno é fundamental não apenas no diagnóstico mas também no processo de estadiamento e, portanto, definição do prognóstico.

• ANÁLISE MORFOLÓGICA

Nenhum critério histopatológico isolado se mostrou eficaz para o diagnóstico diferencial entre nódulos linfóides benignos e malignos. São consideradas características morfológicas de caráter benigno a presença de poucos nódulos, de pequeno tamanho, limites precisos, localização central não paratrabecular e composição celular polimórfica constituída de pequenos linfócitos maduros de permeio a raras células reticulares, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos (THIELE, 1999). Além do que, nódulos linfóides

benignos estão, em geral, associados a vasos (HASHIMOTO, 1963; MAEDA, 1977; BEN-EZRA, 1994). A presença de centro germinativo é observada esporadicamente, em cerca de 5% dos nódulos linfóides medulares, em especial quando associados a doenças inflamatórias ou de caráter auto-imune (FARHI, 1989). Sua presença, portanto, sugere caráter benigno (**Tabela 4**).

Numerosos e/ou grandes nódulos, em localização paratrabecular são características morfológicas que sugerem caráter maligno ou suspeito (THIELE, 1999). Limites imprecisos, evidenciam um padrão infiltrativo de crescimento. A presença de megacariócitos dentro do nódulo linfóide, envolvido por ele, também denota a natureza infiltrativa da lesão sendo, portanto, mais comumente observada nas lesões neoplásicas. Contrariamente, agregados benignos tendem a deslocar os elementos normais da hematopoese (BEN-EZRA, 1994) (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Critérios morfológicos para o diagnóstico diferencial entre nódulos linfóides benignos e malignos*

NÓDULOS LINFÓIDES BENIGNOS	NÓDULOS LINFÓIDES MALIGNOS
Localização central	Localização paratrabecular
Forma e limites precisos	Forma irregular e limites imprecisos
Ausência de infiltrado intersticial	Frequente infiltrado intersticial
População celular polimórfica	População celular monomórfica
Associação com vasos sanguíneos	Ausência de associação com vasos
Ausência de mielofibrose	Frequente mielofibrose no infiltrado
Eventual centro germinativo	Ausência de centro germinativo
Ausência de infiltração no aspirado medular	Presença infiltração no aspirado medular

*Adaptado de Brunning e McKenna, 1994 (BRUNNING, 1994)

A avaliação das fibras de reticulina pode colaborar na definição do caráter reacional ou neoplásico da lesão. Um espessamento moderado a intenso das fibras de reticulina nas áreas de infiltração medular ocorre em certos tipos de linfoma não-Hodgkin, tais como o centro-folicular, o linfoma linfoplasmocitóide e alguns linfomas de células T, além do linfoma de Hodgkin. Contrariamente, no padrão central nodular de infiltração da

leucemia linfóide crônica (LLC) esse achado não é, em geral, observado. Por outro lado, um espessamento discreto a moderado da rede de reticulina é um aspecto frequente na mielopatia induzida pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (BAIN, 1998; THIELE, 1999; HENRIQUE, 1999).

• ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A distinção entre nódulos linfóides benignos e malignos, requer, em alguns casos, além de critérios morfológicos, o uso de anticorpos monoclonais (CARTUN, 1987; BLUTH, 1993; HORNY, 1993; CHETTY, 1995; NGAN, 1989), técnicas especiais (SANGSTER, 1986; WU, 1997; WELLS, 1998; SALISBURY, 1996; SALISBURY, 1997) ou, ainda, a evidência da restrição clonal (KNOWLES, 1993; CROCKER, 1996).

A infiltração linfomatosa precoce ou mínima pode ser evidenciada ou se tornar aparente apenas com o uso de técnicas imunohistoquímicas (PIZZOLO, 1982; PICKER, 1987; SEGAL, 1991; PERKINS, 1993; GELB, 1994; THALER, 1991). A análise imunofenotípica contribui na determinação da linhagem celular, subpopulação e sugere o estágio de diferenciação da população linfóide envolvida. No entanto, o processo de fixação e descalcificação da medula pode, potencialmente, desnaturar parcial ou totalmente o antígeno, além do que, a reação química que ocorre entre proteína e formalina é capaz de mascarar o antígeno. O desenvolvimento de técnicas de recuperação antigênica e a disponibilidade de novos anticorpos monoclonais capazes de reconhecer epítomos resistentes à fixação em formalina possibilitaram a análise imunohistoquímica de material fixado, descalcificado e incluído em parafina. Notadamente nas desordens do tecido linfóide esses avanços ampliaram o potencial da análise imunohistoquímica (LOKEN, 1987; BATINIC, 1989; CLARK JR, 1990; CONTOS, 1992).

Apesar de numerosos estudos imunohistoquímicos realizados na tentativa de estabelecer critérios adicionais de valor diagnóstico, até o presente momento nenhum marcador isolado apresentou um valor preditivo no diagnóstico diferencial entre nódulos linfóides benignos e malignos. Porque no estudo do tecido linfóide muitos marcadores

exibem reação cruzada ou não específica com elementos hematopoéticos não-linfóides, é necessário, para maior acuracidade e correta interpretação, o uso de um painel de anticorpos (VAN DER WALK, 1989; WERNER, 1992; GALA, 1997; PILERI, 1997).

Dentre os marcadores utilizados, a expressão da proteína bcl-2 tem causado polêmica e controvérsias. O gene bcl-2, localizado no braço longo do cromossomo 18, embora originalmente identificado nos linfomas foliculares, exerce um papel importante não somente na fisiopatologia do sistema linfóide mas também numa variedade de tecidos normais e patológicos. O padrão de expressão está associado à proteção contra morte celular por apoptose, com consequente prolongamento da sobrevivência celular (HOCKENBERY, 1991; YANG, 1996). No tecido linfóide normal a expressão citoplasmática da proteína de membrana mitocondrial bcl-2 tem uma distribuição topográfica restrita às populações celulares destinadas à sobrevivência longa, sendo observada em pequenos linfócitos do sangue periférico, áreas interfoliculares B e T, folículo primário e zona do manto de folículos secundários em linfonodos e na medula tímica, onde predominam as células maduras $CD4^+8^-$ e $CD4^+8^+$. O córtex tímico, região de células imaturas $CD4^+8^+$, e as células reacionais do centro germinativo, muitas das quais vão entrar em processo de apoptose, são usualmente negativos (HOCKENBERY, 1991). A restrição da proteína bcl-2 à porção apical da zona clara do centro germinativo, implicada na seleção e manutenção das células plasmáticas e B memória, sugere o seu envolvimento na fisiologia da resposta imune (KORSMEYER, 1992; NUÑEZ, 1991). Mais recentemente, um efeito inibitório sobre o ciclo celular, via prolongamento de G_1 ou favorecimento de um estado de latência, tem sido atribuído à proteína bcl-2, o que justifica níveis indetectáveis em células linfóides em proliferação (PUTHIER, 1999). Embora a maioria dos estudos envolvendo o bcl-2 nas células hematopoéticas tenha se limitado à linhagem linfóide, a proteína bcl-2 está presente também em precursores granulocíticos (blastos, promielócitos e mielócitos), onde foi evidenciado um papel na diferenciação celular, com níveis inversamente proporcionais ao grau de maturação. (DELIA, 1992; HOCKENBERY, 1991).

Nos tecidos neoplásicos de origem linfóide a expressão aumentada de bcl-2 é observada na leucemia linfóide crônica, linfomas não-Hodgkin difuso de grandes células, linfoma de Hodgkin e linfomas foliculares. Os linfomas foliculares (LF) representam uma

proliferação nodular clonal de células B caracterizadas, no gânglio linfático, por subversão da arquitetura nodal com substituição por folículos linfóides relativamente uniformes. Tipicamente um considerável número de células B neoplásicas é observado nas regiões interfoliculares. As células apresentam expressão aumentada da oncoproteína bcl-2 em cerca de 85% dos casos (GAULARD, 1992), em sua maioria atribuída à translocação t(14;18) (q32, q21). Essa anormalidade cromossômica, observada em aproximadamente 66% dos pacientes, foi primeiramente descrita em associação com linfomas foliculares, em 1979 (FUKUHARA, 1979). O gene que codifica a cadeia pesada das imunoglobulinas no cromossomo 14 é justaposto ao gene bcl-2 no cromossomo 18, o que resulta na produção de níveis anormalmente elevados da proteína bcl-2. Sabe-se atualmente, no entanto, que essa expressão aumentada não é restrita às células com a translocação t(14;18), o que sugere que mecanismos alternativos, tais como a hipermetilação ou ainda uma mutação somática, podem interferir na regulação de sua expressão (PEZZELA, 1990; ZUTTER, 1991; KONDO, 1992). Portanto, três grupos de linfomas foliculares podem ser reconhecidos: aqueles com t(14;18) e expressão proteica, aqueles com expressão proteica mas sem translocação e um pequeno grupo sem translocação ou expressão de bcl-2. Esses diferentes padrões não mostraram qualquer significado prognóstico ou implicação terapêutica (PEZZELA, 1992).

• ANÁLISE IMUNOGENOTÍPICA

Na última década, técnicas moleculares têm sido utilizadas para demonstrar monoclonalidade em doenças linfoproliferativas. A demonstração da monoclonalidade dá suporte ao diagnóstico de processo neoplásico. Seu uso como critério inequívoco de malignidade, no entanto, é questionável (COLLINS, 1997) e requer técnicas, nem sempre disponíveis, tais como "Southern Blotting" e reação em cadeia da polimerase (PCR) (ROCKMAN, 1997). A evidência da restrição de cadeias leves de imunoglobulinas (Ig) por imunohistoquímica, se baseia no conhecimento de que cerca de 80% das neoplasias linfóides B expressam apenas kappa ou lambda, enquanto nos processos hiperplásticos reacionais o padrão é policlonal. Embora alguns autores relatem resultados satisfatórios

com o uso de material incluído em parafina (ASHTON-KEY, 1996), a detecção de expressão monoclonal de cadeias leves requer, como método de escolha, tecido congelado e, ainda assim, existem limitações devido a presença de Ig no interstício, a não expressão de Ig de superfície em cerca de um terço dos linfomas de células B e ainda a possibilidade de existirem células B policlonais reacionais remanescentes no tecido neoplásico. Os melhores resultados, portanto, são obtidos através da demonstração de Ig citoplasmáticas, o que restringe a sua utilização para desordens de células plasmáticas (VASSALLO, 1999).

O estudo morfológico, ainda que baseado em critérios bem definidos, apresenta limitações, o que torna necessária a utilização de testes complementares para o correto diagnóstico e seguimento dos pacientes. Eventualmente também o estudo imunohistoquímico tem valor limitado, sobretudo nos casos em que nódulos linfóides B neoplásicos se acompanham de percentuais variáveis de células T reacionais. A análise imunogenotípica, portanto, através da reação em cadeia da polimerase da região CDR3 da cadeia pesada das imunoglobulinas é capaz de determinar a clonalidade de proliferações linfóides B a nível molecular e detectar população clonal que escapa à detecção morfológica e imunohistoquímica, tornando-se um importante estudo complementar na avaliação das desordens linfoproliferativas (KNOWLES, 1993). O estudo de DNA extraído de fragmentos de biópsia óssea, fixados, descalcificados e incluídos em parafina mostram resultados superiores àqueles obtidos de material aspirado (MAES, 2000), uma vez que o padrão de envolvimento medular, frequentemente heterogêneo e focal, pode resultar na ausência de células neoplásicas no aspirado. A diluição inevitável com células normais do sangue periférico pode alterar de forma crítica o limiar de detecção pela técnica utilizada. Além do que, o espessamento da rede de reticulina, frequentemente induzido no tecido medular pela proliferação linfomatosa, pode contribuir para a obtenção de um número reduzido de linfócitos neoplásicos no material aspirado. Os resultados apresentados até então mostram a análise genotípica como um recurso de alta especificidade mas com elevado número de falso-negativos, com uma sensibilidade em torno de 60% (MAES, 2000; BRINCKMANN, 2000; BEN-EZRA, 2000). A análise morfológica, portanto, continua sendo o padrão-ouro na avaliação diagnóstica de infiltrados linfóides e a análise molecular é atualmente reservada para casos duvidosos ou inconclusivos.

NÓDULOS LINFÓIDES MEDULARES NAS SMD

Nas SMD a incidência de nódulos linfóides é variável, alcançando, em alguns estudos, valores superiores a 27,0% (TRICOT, 1984a; NAVONE, 1985; RIOS, 1990; MASCHEK, 1992; MANGI, 1992; FLORENSA, 1996; RAMOS, 1999) (Tabela 5).

Tabela 5- Revisão de dados da literatura sobre a frequência relatada de nódulos linfóides medulares em pacientes portadores de SMD

AUTORES	ANO	Nº DE CASOS	FREQUÊNCIA
TRICOT	1984	40	2,5%
NAVONE	1985	96	25,0%
RIOS	1990	126	10,0%
MANGI	1992	63	15,8%
MASCHEK	1992	352	27,3%
MAGALHÃES	1997	33	27,3%
RAMOS	1999	24	16,7%

A importância e o significado desse achado medular são ainda motivo de controvérsias na literatura. Assim como em outras patologias nas quais são observados, questiona-se o papel, na sua formação, do sistema imunológico, da idade avançada e do desarranjo do microambiente medular por fibrose associada (MASCHEK, 1992). Faulkner-Jones e colaboradores, estudaram a evolução de pacientes que haviam realizado biópsia de medula no seu Serviço e em cuja biópsia haviam sido encontrados nódulos linfóides sem que no momento tenham tido alguma evidência de linfoma. Em 22% dos casos houve manifestação posterior de doença linfoproliferativa. Por isso sugeriram que o achado de agregados linfóides, ainda que morfológicamente normais pode ser a primeira manifestação de um linfoma (FAULKNER-JONES, 1988).

A associação SMD - doença linfoproliferativa tem sido amplamente relatada (MANOHARAN, 1981; GREENBERG, 1983; COPPLESTONE, 1986; FERRARA, 1992; SCHULZE, 1992; RUPNIEWSKA, 1993; UEMATSU, 1995; ABRUZZESE, 1996; FLORENSA, 1996; ELGHETANY, 1997; SILVESTER, 1997). Essa associação não é observada na leucemia mieloide crônica (LMC), onde o envolvimento de células linfóides

no clone maligno está bem estabelecido (FADERL, 1999). Embora existam evidências de que, pelo menos em alguns casos, as células linfóides fazem parte do clone displástico na SMD (MONGKONSRITRAGOON, 1998; JAJU, 2000), linfócitos policlonais são detectados na maioria dos casos, sugerindo que, em geral, a célula progenitora está provavelmente já comissionada com a linhagem mielóide (CULLIGAN, 1992; GERRITSEN, 1992; VAN KAMP, 1992; WEIMAR, 1994; HEANEY, 1999).

A presença de nódulos linfóides na medula óssea de pacientes portadores de SMD pode simplesmente estar relacionada à idade avançada, faixa etária predominante desses pacientes, ou pode ser parte das muitas anormalidades imunológicas descritas nessa condição e, portanto, teria uma natureza reacional. No entanto, pode também representar infiltração focal incipiente por doença linfoproliferativa associada.

Não existem dados na literatura sobre a relação entre a presença de nódulos linfóides medulares e subtipo FAB, grau de citopenias, presença de fibrose medular e evolução da doença. Apesar de opiniões conflitantes com relação à sua incidência, significado clínico e biológico, assim como com relação à associação entre SMD e neoplasias de células B (FLORENSA, 1996), um aumento na proporção de células linfóides e/ou a presença de nódulos linfóides, merecem uma avaliação criteriosa.



OBJETIVOS

- 1- Detecção e caracterização morfológica dos nódulos linfóides na medula óssea de pacientes portadores de síndromes mielodisplásticas com ênfase para o número de agregados, histotopografia, delimitação, composição celular e rede de reticulina.
- 2- Caracterização imunohistoquímica dos nódulos linfóides, utilizando um painel de anticorpos monoclonais constituído por marcadores de células B, T e anticorpo monoclonal anti-bcl-2.
- 3- Análise da relação entre a presença de nódulos linfóides medulares e subtipos FAB, citopenias periféricas, progressão da doença e sobrevida.
- 4- Avaliação de possível associação com doença linfoproliferativa.



MATERIAL E MÉTODOS

PACIENTES

Duzentos e seis pacientes portadores de síndrome mielodisplástica atendidos e acompanhados no Serviço de Hematologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Universidade Federal do Ceará (UFC), no período compreendido entre 1995 e 1999, foram retrospectivamente estudados. O diagnóstico foi baseado no quadro clínico, estudo do sangue periférico e aspirado medular, obedecendo os critérios do grupo FAB (BENNETT, 1982). O subtipo hiperfibrótico foi considerado nos casos em que foram detectadas, no tecido medular, fibras de reticulina espessas e anastomosantes. Foram excluídas deficiências nutricionais (ferro, folato, vitamina B₁₂, piridoxina) pelas dosagens séricas e/ou teste terapêutico. Foram ainda excluídos pacientes com insuficiência hepática e renal, disfunção tireoidiana, ou sorologia positiva para vírus da imunodeficiência humana adquirida, citomegalovírus, hepatite A, B, C. Foram incluídos no estudo aqueles que se submeteram à biópsia de medula óssea por ocasião do diagnóstico. Os prontuários foram revisados e deles retirados os dados clínicos e laboratoriais de interesse para o estudo tais como sexo, idade, achados do hemograma e aspirado medular com reação de Perls, classificação FAB, estudo histológico da medula óssea com avaliação da rede de reticulina e evolução (**Anexo 1**). A anemia foi definida como dosagem de hemoglobina igual ou inferior a 11g/dl, a neutropenia como contagem de neutrófilos inferior a $2,0 \times 10^9/L$ e plaquetopenia como contagem de plaquetas inferior a $150 \times 10^9/L$. Casos com diagnóstico duvidoso foram excluídos do estudo.

ESTUDO MORFOLÓGICO

As biópsias ósseas foram rotineiramente realizadas na crista ilíaca pósterosuperior, sob anestesia local, utilizando a agulha de Jamshidi. O material obtido destinado ao estudo morfológico foi fixado em Zenker/ácido acético glacial na proporção 20:1, por um período máximo de 24 horas, na Unicamp. Esse processo dispensa a descalcificação. Na UFC o fixador utilizado foi o Bouin-Holande (composição: 280 ml de ácido acético, 10g de ácido pícrico, 1300ml de formaldeído a 40% e 4l de água destilada) e a descalcificação foi feita em ácido nítrico a 5% por um período variável de 2 a 12h. As biópsias foram incluídas

em parafina. Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina (HE). Foi feita impregnação argêntica (Gomori) para evidenciar as fibras de reticulina. Os fragmentos assim preparados e corados foram analisados, com especial atenção para a presença de NL e suas características:

- a) número de NL observados em cada corte: único ou múltiplos.
- b) histotopografia: localização dos NL dentro do espaço medular classificando-os em centrais, intertrabeculares, (agregados de localização central, eventualmente tocando a trabécula óssea) e paratrabeculares, (nódulos revestindo a trabécula).
- c) limites: bem ou mal delimitados.
- d) composição celular: polimorfos, se constituídos por uma população predominante de pequenos linfócitos de permeio a plasmócitos, eosinófilos, histiócitos e eventualmente grandes células, e monomorfos.
- e) rede de reticulina: presença ou ausência de espessamento da rede de reticulina no tecido hematopoético.

Os casos com NL foram selecionados para estudo imunohistoquímico.

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Cinquenta e um fragmentos de biópsia óssea foram obtidos nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica (Unicamp) e Departamento de Patologia e Medicina Legal (UFC) para o estudo imunohistoquímico. Apenas os blocos que apresentavam condições satisfatórias para a realização de novos estudos foram considerados. Novos cortes seriados foram feitos. O primeiro e o último corte de cada bloco foram corados pelo HE e revisados por microscopia óptica para garantir amostragem representativa. O estudo imunohistoquímico foi realizado em material incluído em parafina, utilizando-se a técnica do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (HSU, 1981) (**Figura 2**). A reação da imunoperoxidase permite a localização de antígenos celulares através de um anticorpo específico que é evidenciado pela reação da peroxidase.

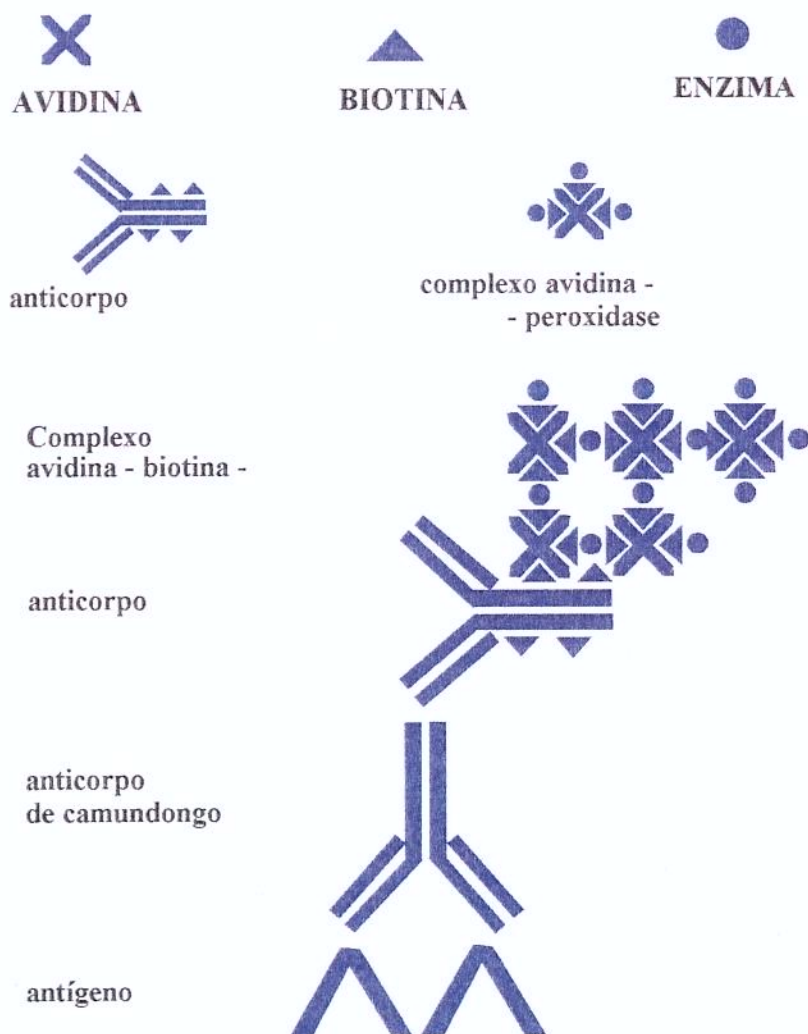


Figura 2 - Método imunoenzimático do complexo avidina – biotina - peroxidase (ABC): um complexo pré-formado de avidina biotina e enzima se liga ao anticorpo secundário conjugado à biotina.

Uma substância geradora de cor é adicionada para reagir com a enzima que se precipita no local da reação. A intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente. Os demais constituintes celulares são contracolorados com o uso da hematoxilina. São utilizados um anticorpo monoclonal primário, específico para o antígeno a ser localizado, um anticorpo secundário conjugado à biotina e capaz de ligar-se ao anticorpo primário e o complexo avidina-biotina-peroxidase. A avidina contém quatro

sítios de ligação com a biotina. Um deles é ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros se ligam ao complexo biotina-peroxidase da solução.

1. ANTICORPOS PRIMÁRIOS

O painel de anticorpos monoclonais selecionado incluiu um marcador pan-B, dois marcadores pan-T e um anti-bcl-2:

a) **CD20** - (DAKO S/A, Glostrup, Dinamarca - cod M755)

Anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo.

Especificidade: o anticorpo reconhece um polipeptídio com peso molecular de 33 kD encontrado na superfície das células B maduras presentes no sangue periférico e tecido linfóide. Reatividade com outros elementos do tecido hematopoético não é comum, sendo por isso considerado um marcador restrito de células B. O anticorpo reage com a maioria dos linfomas de células B e ainda com as células Reed-Sternberg particularmente no subtipo predominância linfocitária da doença de Hodgkin (NORTON, 1987; CHANG, 1996). O epítipo reconhecido pelo anticorpo é resistente à fixação pela formalina.

Diluição: 1:100

b) **CD3** - (DAKO S/A, Glostrup, Dinamarca - cod A452)

Anticorpo policlonal anti-humano produzido em coelho.

Especificidade: o anticorpo reconhece a porção intra-citoplasmática do antígeno CD3 expresso pelas células T. A proteína consiste de cinco cadeias polipeptídicas com peso molecular que varia entre 16 e 28 kD. A detecção do antígeno CD3 provavelmente representa a evidência mais precoce de compromisso com a linhagem T. Nos timócitos corticais o antígeno está

presente predominantemente como um constituinte intra-citoplasmático. Subsequentemente, nos timócitos medulares, é detectado na superfície das células T. É considerado um marcador específico de células T. Reage com células T no timo cortical e medular e nos tecidos linfóides periféricos, na maioria das neoplasias de células T e estados reacionais, em material a fresco ou fixado em formalina e incluído em parafina. Uma digestão enzimática adequada é aconselhável, através do tratamento com uma enzima proteolítica como a tripsina. Diluição: 1:50

c) **CD45RO** - (DAKO S/A, Glostrup, Dinamarca - cod M742)

Anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo.

Especificidade: o anticorpo reconhece especificamente a isoforma de baixo peso molecular do antígeno comum leucocitário CD45 (Weiss, 1993). Essa glicoproteína, de peso molecular 180 kD, é encontrada na maioria dos timócitos e células T maduras ativadas e numa subpopulação de células T em repouso (CD4 e CD8). Células da linhagem mielomonocítica, ou seja granulócitos e monócitos, eventualmente são marcadas pelo anticorpo, enquanto a maioria das células B normais e células "natural killer" são consistentemente negativas (Norton, 1986). O seu uso é compatível com fixadores à base de formalina e o tratamento prévio com enzimas proteolíticas deve ser evitado.

Diluição: 1:100

d) **ANTI-BCL-2** - (DAKO S/A, Glostrup, Dinamarca - cod M 0887)

Anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo.

Especificidade: o anticorpo reconhece a proteína bcl-2, codificada pelo gene envolvido na translocação t(14;18), uma alteração citogenética frequentemente observada nos linfomas foliculares. A expressão aumentada da proteína, no entanto, pode ocorrer em situações onde o rearranjo não é

observado. A proteína bcl-2, de peso molecular 25 kD, está associada à mitocôndria e exerce papel importante na inibição da apoptose. No tecido linfóide normal, o anticorpo reage com pequenos linfócitos B na zona do manto e muitas células dentro de áreas de células T. As células do centro germinativo são em geral negativas. No timo, as células medulares são marcadas enquanto aquelas do córtex são em geral negativas. O anticorpo reage com células neoplásicas de linfomas foliculares, e em alguns casos de doença linfoproliferativa difusa, especialmente em material congelado. Uma menor proporção de células positivas é observada em material incluído em parafina, uma vez que o epítipo não está sempre preservado nesse tipo de material. Um processo de recuperação antigênica, portanto está indicado.

Diluição: 1:40

2. TÉCNICA IMUNOENZIMÁTICA INDIRETA

Cortes de 5µm de espessura foram colocados em lâminas adequadamente tratadas para prevenir deslocamento de material durante o processo (OptiPlus™ Positive-Charged Barrier Slides - (BioGenex). As lâminas foram deixadas em estufa a 37°C por um período mínimo de 12 horas, para melhor adesão dos cortes. Adotando-se a técnica ABC (HSU, 1981) e utilizando-se a técnica do aquecimento em forno de micro-ondas como recurso para recuperação antigênica (SHI, 1991; CATTORETTI, 1993; GOWN, 1993; TAYLOR, 1996), foram realizadas as seguintes etapas:

- ♦ Desparafinização com um banho de xilol a 60°C e duas passagens em xilol à temperatura ambiente para retirar o excesso de parafina.
- ♦ Hidratação em gradiente decrescente de álcool, com passagens em álcool absoluto, a 80% e à 50%, todos em temperatura ambiente.
- ♦ Lavagem em água corrente e em água destilada

- ◆ Bloqueio da peroxidase endógena com banho em solução a 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30% em metanol) por 15 minutos duas vezes à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em água corrente e passagem em água destilada. Incubação em PBS (Phosphate Buffer Saline, Na_2HPO_4 0,01M; NaCl 0,1M, pH 7,6).
- ◆ Digestão enzimática para expor o antígeno potencialmente mascarado durante o processo de fixação com formalina ou outro fixador, quando ocorre formação de ligações químicas aldeídicas. Essas ligações são quebradas pela exposição à pepsina ou outra enzima proteolítica, tornando o antígeno disponível ou acessível para ligação com o anticorpo. Para a digestão enzimática foi utilizada a tripsina (Trypsin - Sigma cod. T4665) 0,10g em 100 ml de solução para tripsina (TRIS HCl 7,6 pH). Incubação das lâminas por 1 min e 30 seg a 37°. Ao fim do processo, lavagem em água corrente, passagem por água destilada e banho em PBS. Dentre os marcadores monoclonais selecionados para esse estudo, apenas o CD3 necessitou de digestão enzimática.
- ◆ Recuperação antigênica levando ao microondas as lâminas submersas em tampão citrato pH6,0. O período de ebulição foi de 30 min para o anti-bcl-2 e duas vezes 4 min para os demais marcadores. Ao fim do processo, repouso em temperatura ambiente por 15 min, seguindo-se lavagem em água corrente, passagem em água destilada e banho em PBS.
- ◆ Exposição do material ao anticorpo primário específico com incubação em câmara úmida por 30 min a 37°C seguido de incubação "overnight" em câmara úmida a 4°C. Retirada do excesso de anticorpo primário, seguindo-se três lavagens em PBS no agitador de cinco minutos cada, à temperatura ambiente.
- ◆ Reação com o anticorpo secundário biotinilado dirigido contra o anticorpo primário - IgA de suíno anti-camundongo, coelho e cabra - (Multi Link - Dakopatts, Dinamarca, cod E 0453, diluição 1:80 em PBS). Incubação em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Lavagem, por três vezes, 5 minutos cada, no agitador em temperatura ambiente.

- ◆ Reação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC - Dakopatts, Dinamarca, cod K 0377, diluição 1:100 em Tris-HCl 0,05M pH 7,6), diluído 30 minutos antes da reação. Incubação em câmara úmida por 40 minutos a 37°C.
 - ◆ Coloração com DAB (3,3 tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina - Sigma cod D5637), cromogênio de cor marrom, impregnado no local onde ocorre a reação. Utilização, para o preparo, de 60 mg de DAB, 100ml de PBS, 500µl de peróxido de hidrogênio a 30% e 1 ml de DMSO (dimetilsulfoxido - Merck 1.02952.1000). Imersão, nessa solução, por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente até a visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes. Lavagem em água corrente e passagem em água destilada.
 - ◆ Contracoloração com hematoxilina de Mayer por um minuto em temperatura ambiente. Passagem em água amoniacal para evidenciar a contracoloração e a seguir água corrente e destilada.
 - ◆ Desidratação em gradiente crescente de álcool (uma vez a 50%, uma vez a 80% e três vezes em álcool absoluto). Passagem em xilol por três vezes.
 - ◆ Montagem das lâminas com resina sintética Entellan (Merck 1.07961.0100)
- A observação dos resultados foi feita em microscópio óptico comum com objetiva de 40x, sendo considerado positiva a marcação de membrana em marrom. O controle negativo da reação de imunohistoquímica foi obtido pela omissão do anticorpo primário. Foi utilizado controle interno.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva dos dados obtidos. Foram utilizados os testes de Mann-Whitney e qui-quadrado (programas WinSTAT e SPSS) para o estudo comparativo entre as características dos pacientes originados das diferentes instituições e para o estudo comparativo entre os dados de pacientes com e sem nódulos linfóides. Para avaliar as associações entre as variáveis estudadas considerou-se o nível de

significância de 5% para definir associações significativas. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para a análise da sobrevida. O efeito de variáveis múltiplas e fatores que influíram na sobrevida dos pacientes estudados foi analisado através do modelo de riscos proporcionais de COX.



RESULTADOS

No período analisado (1995 a 1999), foram detectados 206 pacientes portadores de SMD. Cento e oito pacientes eram acompanhados na Universidade Federal do Ceará (52,4%) e 98 na Universidade Estadual de Campinas (47,6%).

Um estudo comparativo entre as características dos pacientes originários da Universidade Estadual de Campinas (n=98) e Universidade Federal do Ceará (n=108) foi realizado, para avaliar a presença de possíveis variações regionais. Os pacientes foram avaliados com relação à idade, dados do hemograma por ocasião do diagnóstico e classificação FAB, presença de fibrose no tecido hematopoético e sobrevida. Foram observadas diferenças significativas entre as duas populações quando se comparou dosagem de hemoglobina ($p=0,01$) e número absoluto de neutrófilos ($p=0,02$). Pacientes provenientes da UNICAMP tiveram, ao diagnóstico, maior hemoglobina e menor número de neutrófilos, mas não diferiram de forma significativa com relação à idade ($p=0,06$), contagem de plaquetas ($p=0,99$), subtipo FAB ($p=0,60$), presença de fibrose ($p=0,18$) ou sobrevida ($p=0,24$).

Foram estudados 93 pacientes do sexo masculino e 113 casos do sexo feminino (relação M:F = 0,8). A idade mediana foi de 58,5 anos (variação 15 - 89).

De acordo com a classificação FAB, 129 pacientes (62,6%) foram classificados como AR, 29 pacientes (14,1%) como ARSA, 31 pacientes (15,1%) como AREB ou AREB-t, 11 (5,3%) pacientes como LMMC, 5 pacientes (2,4%) como subtipo hiperfibrótico. Em 1 paciente (0,5%) um subtipo FAB não foi definido (não classificável).

Na avaliação morfológica das biópsias ósseas realizadas por ocasião do diagnóstico, a presença de pelo menos um nódulo linfóide (NL) foi detectada em 51 pacientes (24,8%). (**Figura 3**).

Dentre os pacientes com NL 18 (35,3%) eram do sexo masculino e 33 (64,7%) do sexo feminino (relação M:F = 0,54). Quando avaliada a presença de NL em função do sexo, não foi observada uma associação significativa ($p=0,14$). (**Tabela 6**).

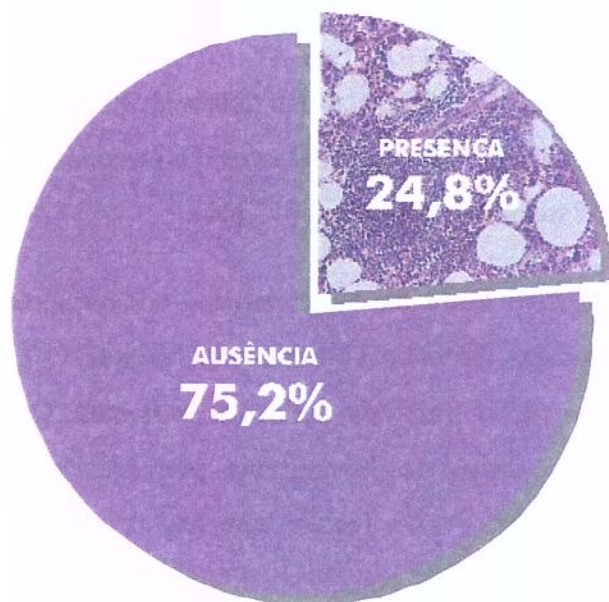


Figura 3 - Percentagem de pacientes com SMD segundo a presença de nódulos linfóides medulares.

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo o sexo em função da presença de nódulos linfóides medulares.

SEXO	NÓDULOS LINFÓIDES		TOTAL
	PRESENTES	AUSENTES	
MASCULINO	18	75	93
FEMININO	33	80	113
TOTAL	51	155	206

Teste qui-quadrado (χ^2): $p=0,14$

A faixa etária variou entre 25 e 88 anos, com mediana de 56 anos, enquanto no grupo sem NL a faixa etária variou entre 15 e 89 anos, com mediana de 60 anos. Não foi observada diferença significativa quando se comparou a faixa etária dos dois grupos ($p=0,31$). (Tabela 7).

No hemograma realizado por ocasião do diagnóstico a anemia foi o achado mais comum (84,0%) nos pacientes com NL. Foram observadas uma citopenia isolada em 16 pacientes (31,4%), bicitopenia em 24 pacientes (47,1%) e pancitopenia em 11 pacientes (21,5%). (**Figura 4**). Quando comparados os dados do hemograma do grupo com e sem NL, observou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas para o parâmetro hemoglobina ($p=0,03$). Pacientes com NL têm, por ocasião do diagnóstico, dosagem de hemoglobina inferior àqueles sem NL (**Tabela 7**).

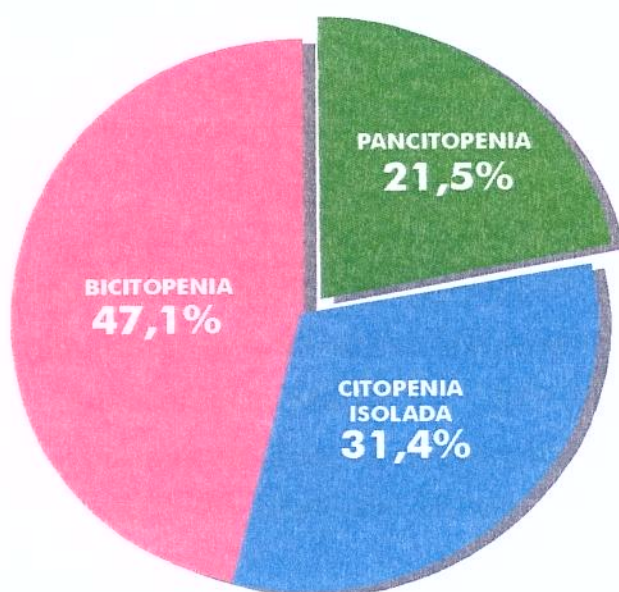


Figura 4 - Percentagem de pacientes com SMD e nódulos linfóides medulares segundo os achados do hemograma

Tabela 7 - Idade e dados de hemograma em pacientes portadores de SMD em função da presença ou ausência de nódulos linfóides medulares

	NÓDULOS LINFÓIDES		p
	PRESENTES	AUSENTES	
	mediana (min-max)	mediana (min-max)	
HEMOGLOBINA (g/dl)	7,35 (3,5 - 14,1)	8,80 (2,2 - 15,9)	0,03
LEUCÓCITOS ($\times 10^9/L$)	3,10 (1,2 - 10,6)	3,60 (1,2 - 23,6)	0,46
NEUTRÓFILOS ($\times 10^9/L$)	1,98 (0,5 - 12,6)	1,55 (0,16 - 22,1)	0,06
PLAQUETAS ($\times 10^9/L$)	107 (4 - 677)	94 (2 - 760)	0,53
IDADE (anos)	56 (25 - 88)	60 (15 - 89)	0,31

Classificando-se os 51 pacientes com NL de acordo com o sistema FAB, observou-se que 30 pacientes pertenciam ao subtipo AR, 5 ao subtipo ARSA, 11 ao subtipo AREB/AREB-t, 1 ao subtipo LMMC, 3 à variante hiperfibrótica e 1 ao subtipo não classificável. Quando analisada a distribuição dos pacientes segundo a classificação FAB em função da presença de NL não foi observada diferença significativa ($p=0,09$) (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Distribuição dos 206 pacientes portadores de SMD segundo a classificação FAB em função da presença de nódulos linfóides

CLASSIFICAÇÃO FAB	PRESENÇA DE NÓDULOS LINFÓIDES	
	Nº DE PACIENTES	%
AR (n=129)	30	23,3
ARSA (n=29)	5	17,2
AREB/AREB-t (n=31)	11	35,5
LMMC (n=11)	1	9,1
HIPERFIBRÓTICA (n=5)	3	60,0
INCLASSIFICÁVEL (n=1)	1	100,0
TOTAL (n=206)	51	24,8

Teste qui-quadrado (χ^2): $p=0,09$

Em 180 casos foi realizada a avaliação do padrão da rede de reticulina. A presença de espessamento no tecido hematopoético foi observada em 63 pacientes (35,0%). Quando avaliada a idade em função da presença de fibrose, observou-se que os pacientes com idade mais avançada apresentam mais espessamento da rede de reticulina ($p=0,05$). A análise dos achados do hemograma, dosagem de hemoglobina, contagem absoluta de neutrófilos e plaquetas, em função da presença de fibrose não mostrou resultados significativos ($p=0,44$, $p=0,77$ e $p=0,43$ respectivamente). A presença de espessamento da rede de reticulina no tecido hematopoético foi observada em 23 dos 45 pacientes com NL avaliados (51,1%) (**Figura 5**).

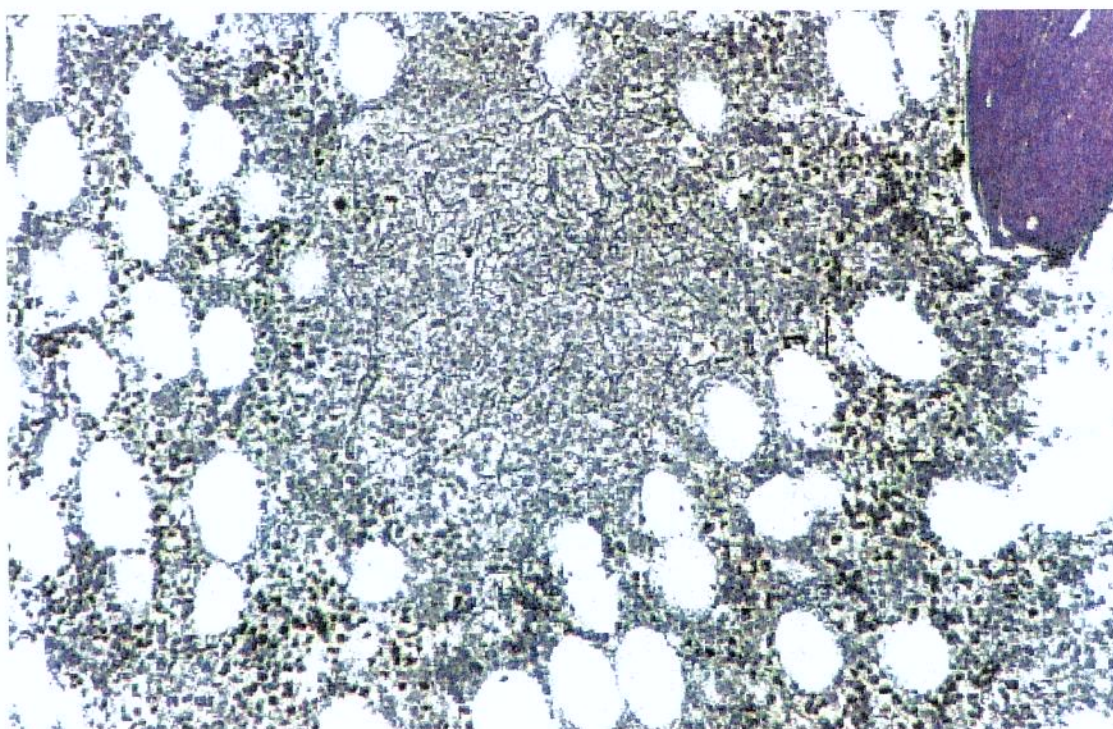


Figura 5 - Corte histológico de medula óssea exibindo nódulo linfóide e espessamento da rede de reticulina. Prata reticulina (x 100)

Uma associação estatisticamente significativa entre a presença de espessamento da rede de reticulina no tecido hematopoético e nódulos linfóides medulares foi observada nos casos avaliados ($p=0,01$). Dos pacientes com nódulos linfóides 23 (51,1%) também apresentavam fibrose, enquanto dentre aqueles sem nódulos a fibrose foi detectada em 40 casos (29,6%). (Tabela 9 e Figura 6).

Tabela 9 - Distribuição dos 180 pacientes com SMD segundo a presença de nódulos linfóides medulares em função da presença de fibrose.

FIBROSE	NÓDULOS LINFÓIDES		TOTAL
	PRESENTE	AUSENTE	
SIM	23 (51,1%)	40 (29,6%)	63
NÃO	22 (48,9%)	95 (70,4%)	117
TOTAL	45 (100%)	135 (100%)	180

Teste qui-quadrado (χ^2): $p=0,01$

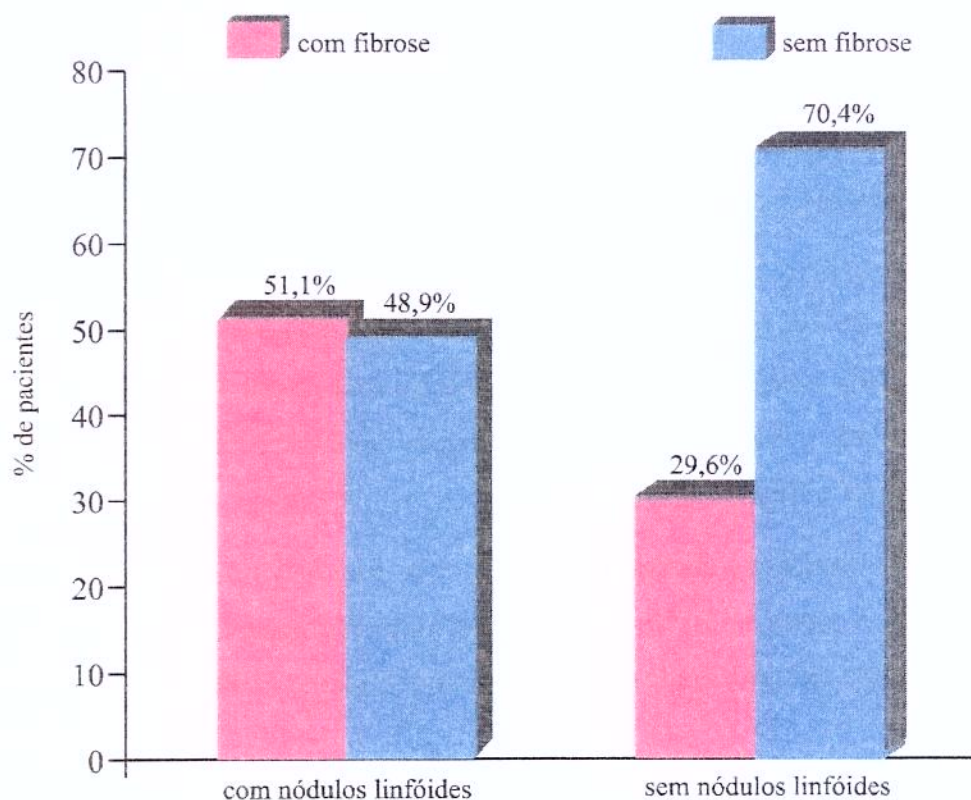


Figura 6 - Percentagem de pacientes portadores de SMD segundo a presença de fibrose no tecido hematopoético em função da presença de nódulos linfóides medulares.

A presença de fibrose medular em pacientes com SMD e nódulos linfóides está representada na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Distribuição dos pacientes com SMD e nódulos linfóides medulares segundo a classificação FAB em função da presença de fibrose

SUBTIPO	PRESENÇA DE FIBROSE
AR (n=28)	14
ARSA (n=3)	1
AREB/AREB-t (n=9)	4
HIPERFIBRÓTICA (n=3)	3
NÃO CLASSIFICÁVEL (n=1)	1
TOTAL* (n=45)	23

*Não está representado na tabela um caso de LMMC porque nele não foi observada fibrose

Nos casos em que mais de uma biópsia óssea foi realizada, os exames subsequentes foram analisados para avaliação da presença e possível evolução no padrão morfológico dos nódulos linfóides. Como não foram evidenciadas diferenças relevantes, os resultados consideram apenas a primeira biópsia realizada.

A análise morfológica dos agregados mostrou nódulos isolados em 22 casos (43,1%) e múltiplos em 29 (56,9%). Com relação à histotopografia no espaço medular, um maior percentual de casos apresentou nódulos em posição central (88,3%), enquanto em 7,8% dos pacientes foi evidenciada uma localização intertrabecular e em 3,9% paratrabecular. (Tabela 11 e Figuras 7, 8 e 9).

Os nódulos linfóides observados tinham, em sua maioria, limites precisos (86,3%). Em apenas 7 casos (13,7%) foram observados agregados de bordas mal delimitadas, estando todos eles localizados na região central medular (Tabela 11 e Figuras 10 e 11).

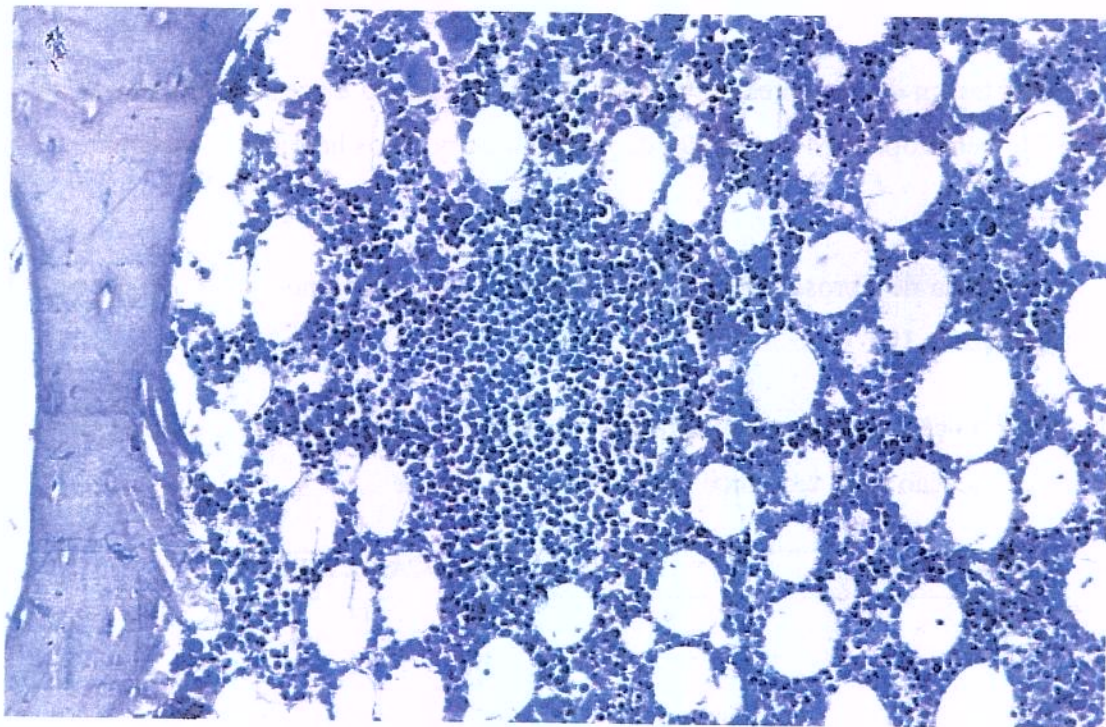


Figura 7 - Corte histológico de medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide de localização central (x100).

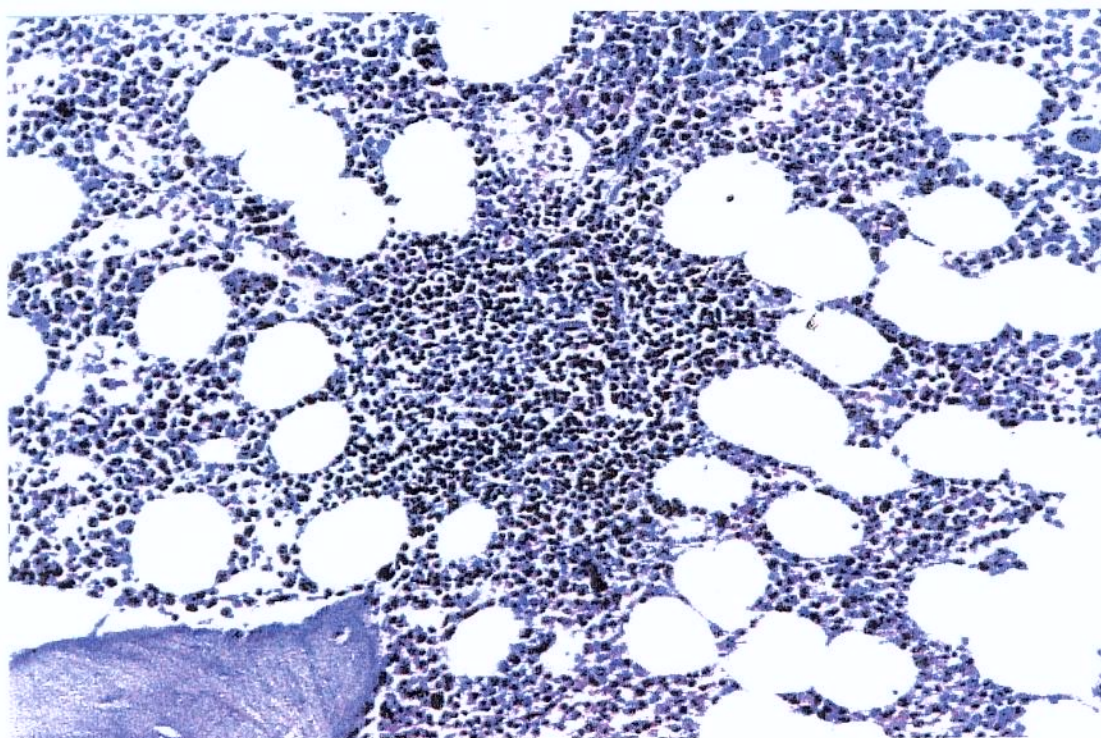


Figura 8 - Corte histológico de medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide de localização intertrabecular. Hematoxilina e eosina (x 100).

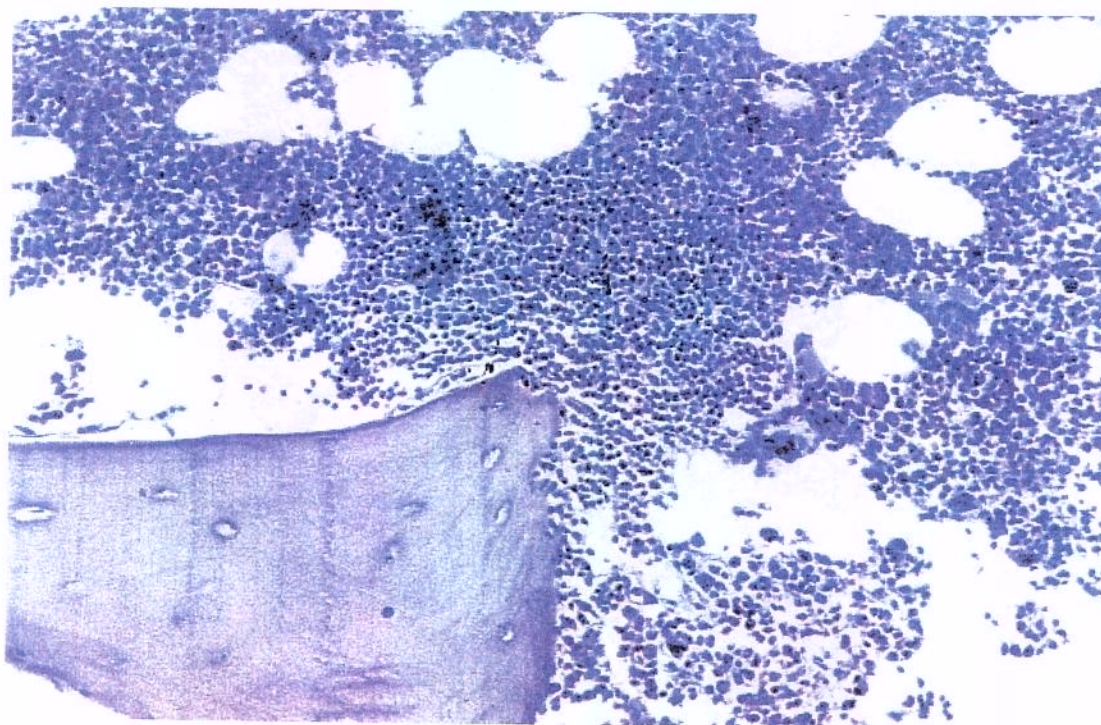


Figura 9 - Corte histológico de medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide de localização paratrabecular. Hematoxilina e eosina (x 100).

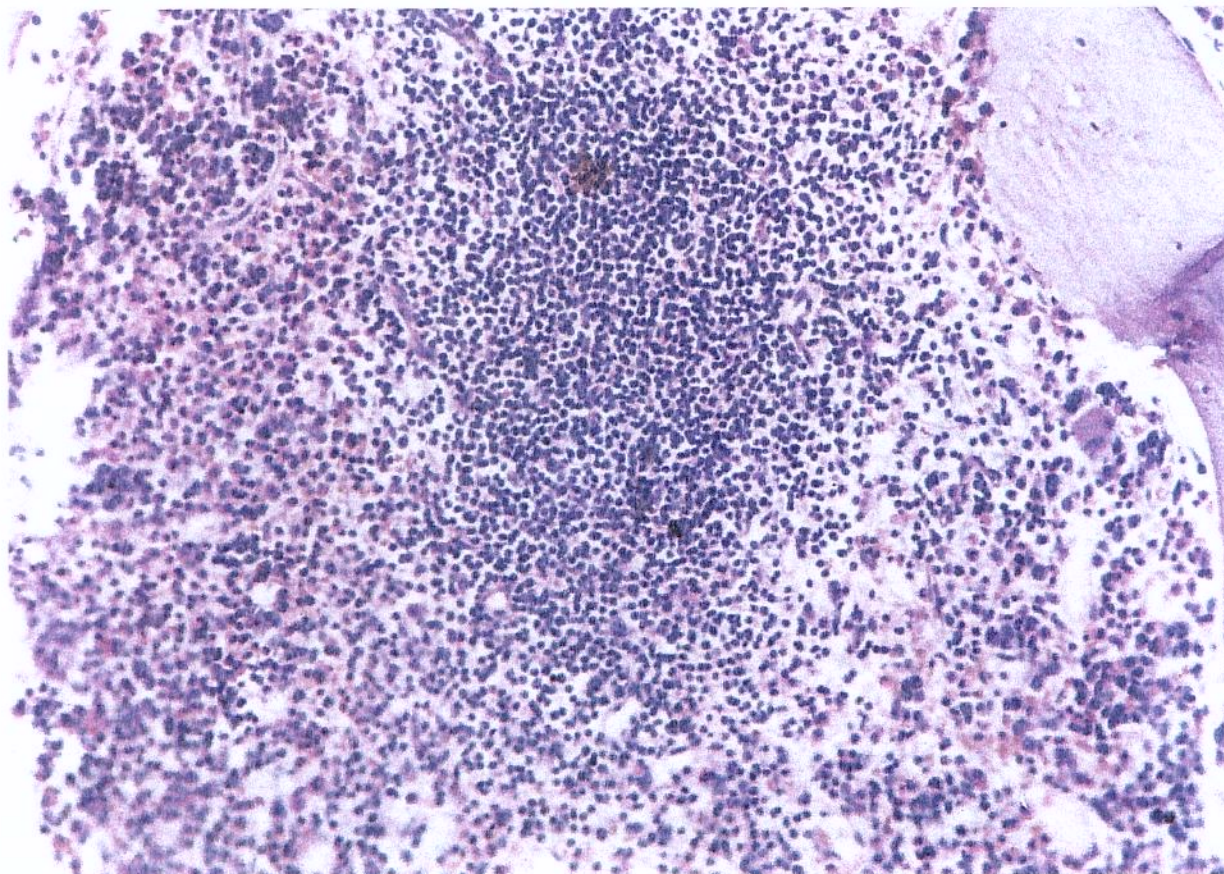


Figura 10 - Corte histológico de medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide de limites precisos. Hematoxilina e eosina (x 100)

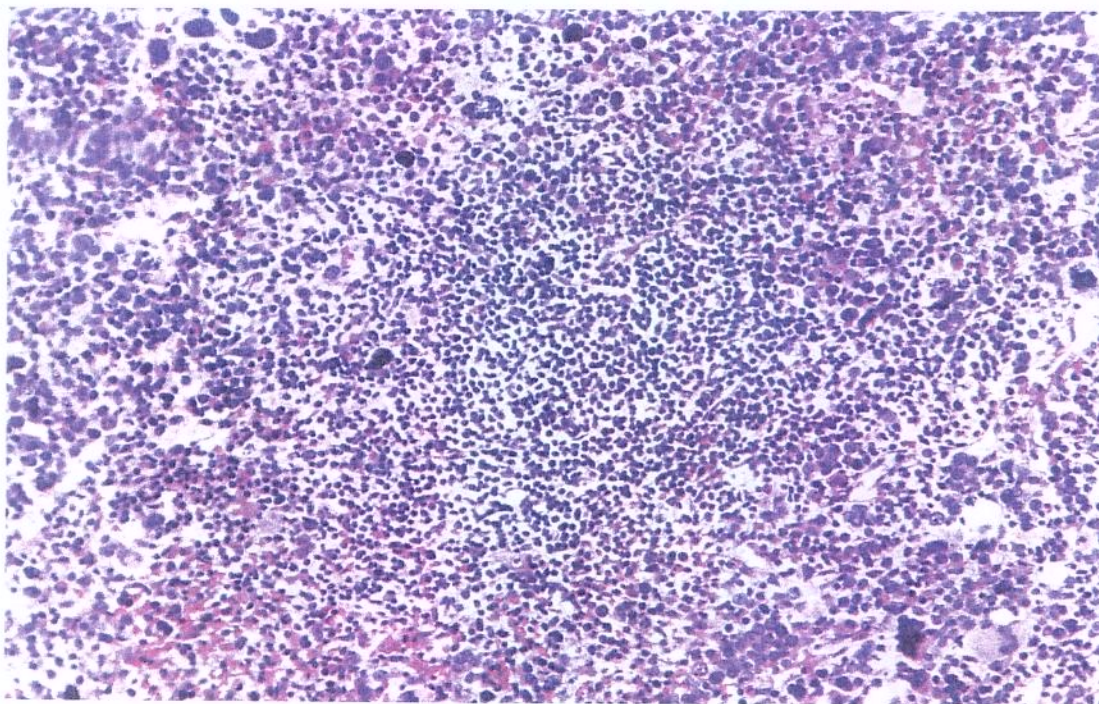


Figura 11 - Corte histológico de medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide de bordas mal delimitadas. Hematoxilina e eosina (x 100).

A caracterização citológica mostrou nódulos de composição celular polimórfica em 48 pacientes (94,1%), formada predominantemente por pequenos linfócitos maduros, ao lado de plasmócitos, células reticulares, eosinófilos e, ocasionalmente, grandes células linfóides. Em apenas 3 casos uma população monomórfica, composta exclusivamente de pequenas células linfocitárias, foi observada (5,9%) (**Tabela 11**)

Tabela 11 - Caracterização histológica dos nódulos linfóides medulares em pacientes portadores de SMD.

NÚMERO	ISOLADOS	22 (43,1%)
	MÚLTIPLOS	29 (56,9%)
LOCALIZAÇÃO	CENTRAL	45 (88,3%)
	INTERTRABECULAR	4 (7,8%)
	PARATRABECULAR	2 (3,9%)
LIMITES	PRECISOS	44 (86,3%)
	IMPRECISOS	7 (13,7%)
COMPOSIÇÃO CELULAR	POLIMÓRFICOS	48 (94,1%)
	MONOMÓRFICOS	3 (5,9%)
FIBROSE MEDULAR* (tecido hematopoético)	PRESENTE	23 (51,1%)
	AUSENTE	22 (48,9%)

*Avaliação em 45 casos

Em nenhum caso foi evidenciado centro germinativo. Em alguns casos foram evidenciados nódulos linfóides associados a vasos (**Figura 12**).

A caracterização imunohistoquímica foi realizada em 25 pacientes. Nos 26 restantes a imunomarcagem não foi avaliada por falta de condições adequadas do material incluído em parafina, pela ausência de nódulos linfóides nos cortes subsequentes ou, ainda, por perda de material durante o processo de recuperação antigênica (**Figura 13**).

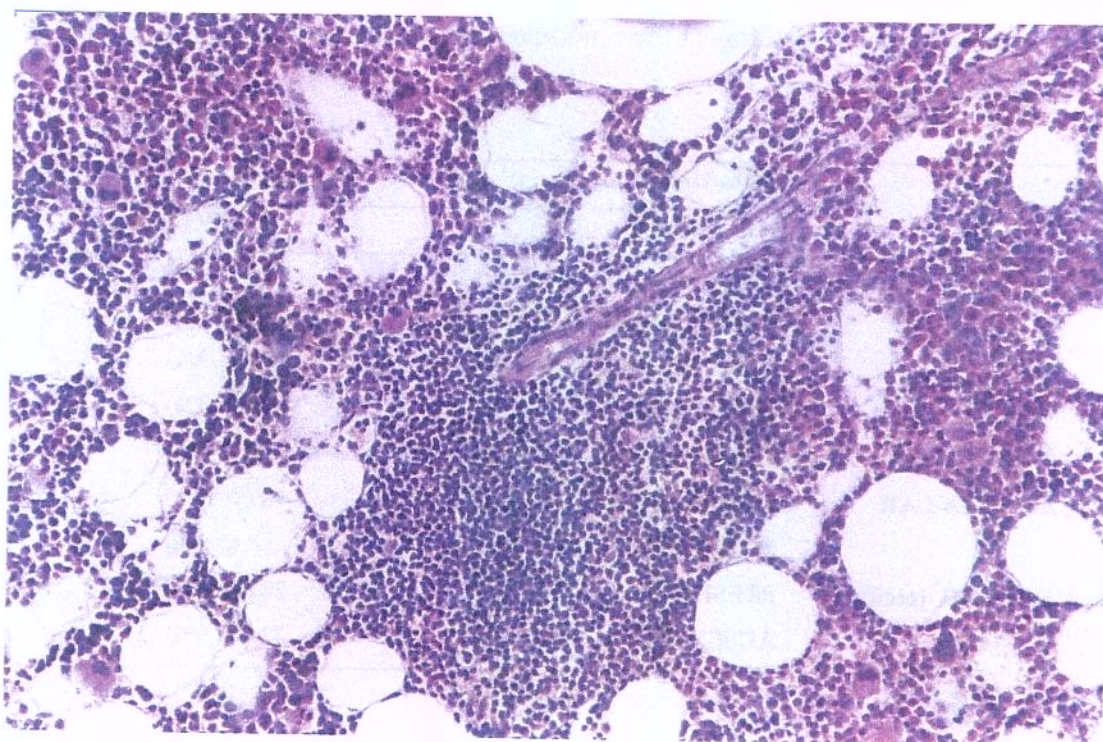


Figura 12 - Cortes histológicos de medula óssea de pacientes portadores de SMD exibindo nódulos linfóides associados a vasos sanguíneos. Hematoxilina e eosina (x 100).

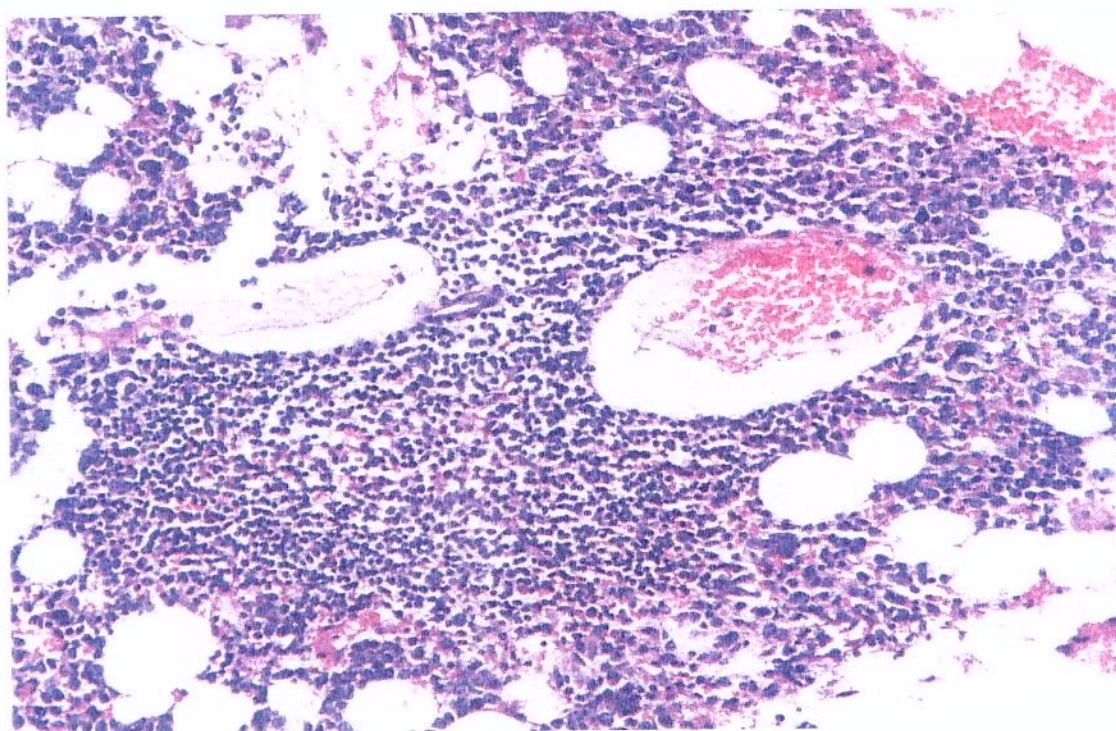
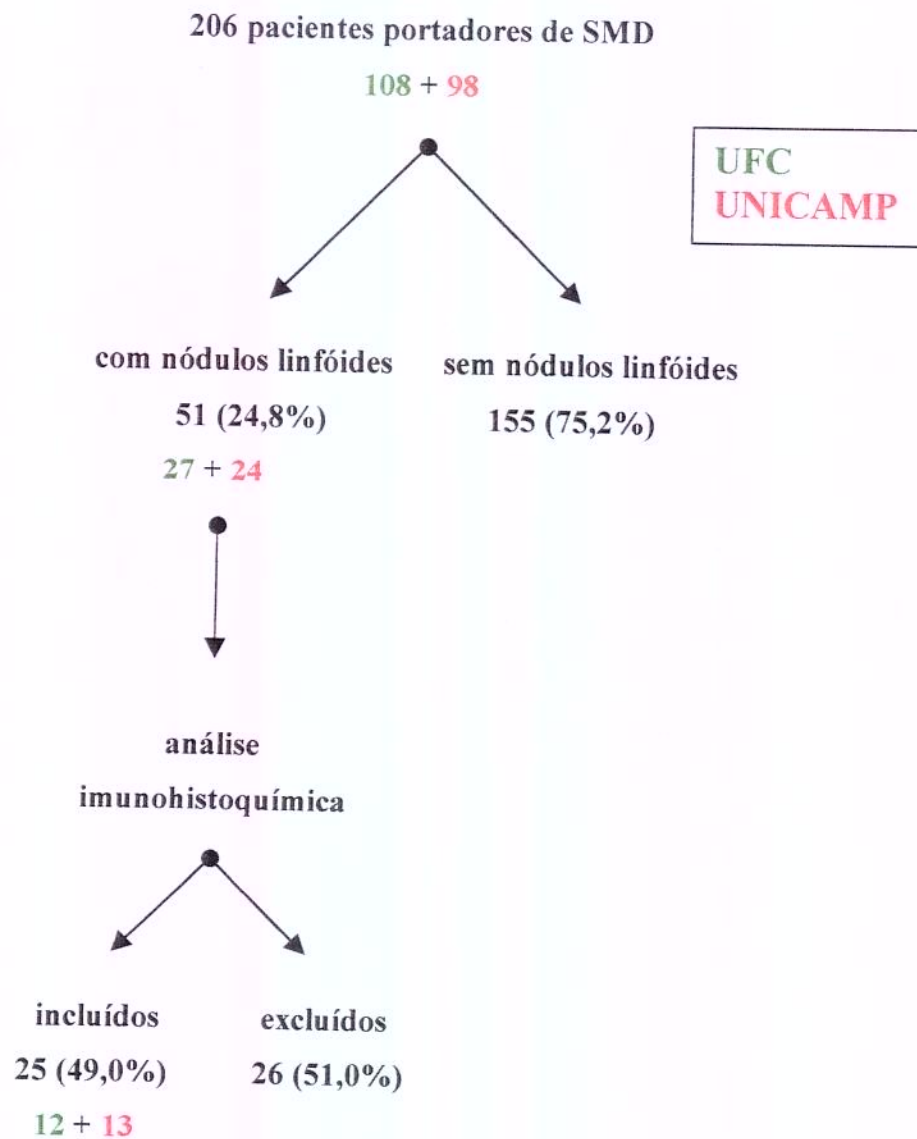
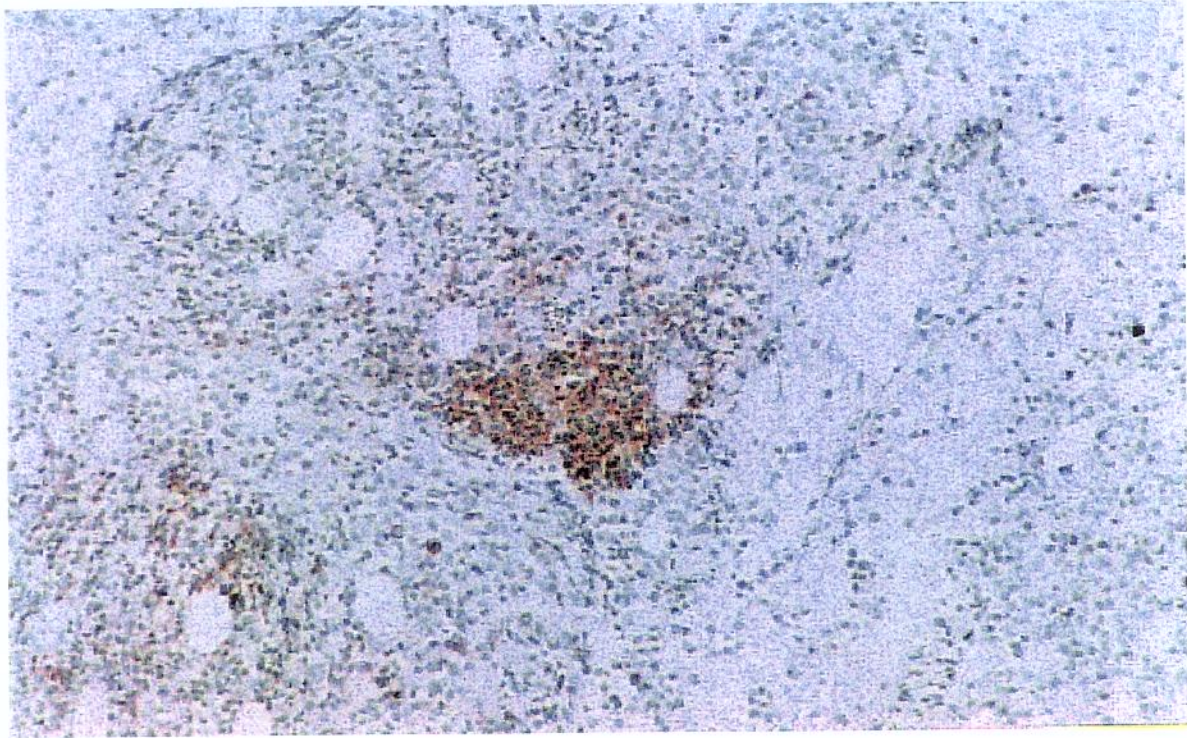


Figura 13 - Desenho do estudo: total de pacientes portadores de SMD avaliados, casos com nódulos linfóides e amostras submetidas à análise imunohistoquímica



Dentre os 25 pacientes analisáveis uma positividade para o anticorpo monoclonal CD20 foi observada em 23 casos (92,0%) exibindo três padrões distintos de marcação: central (9 casos), perinodular (3 casos) e difuso (11 casos). **Figuras 14, 15, 16, 17, 18 e Tabela 12.**



Figuras 14 - Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, **padrão central**. Técnica ABC (x 100).

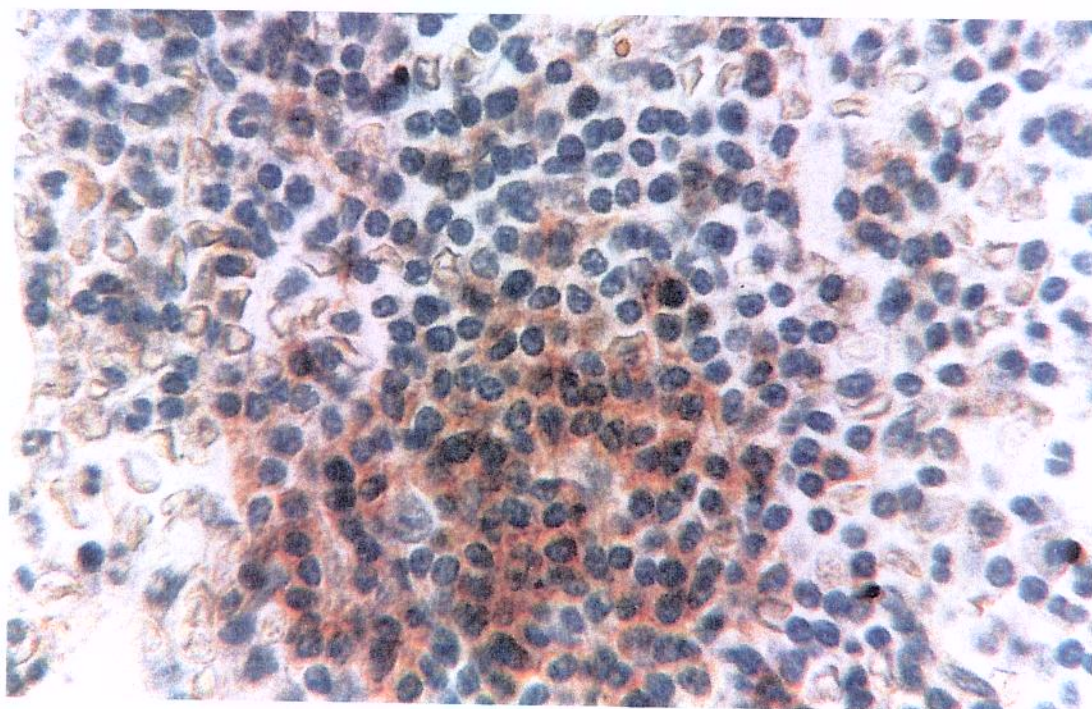


Figura 15 - Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão central. Técnica ABC (x 400).

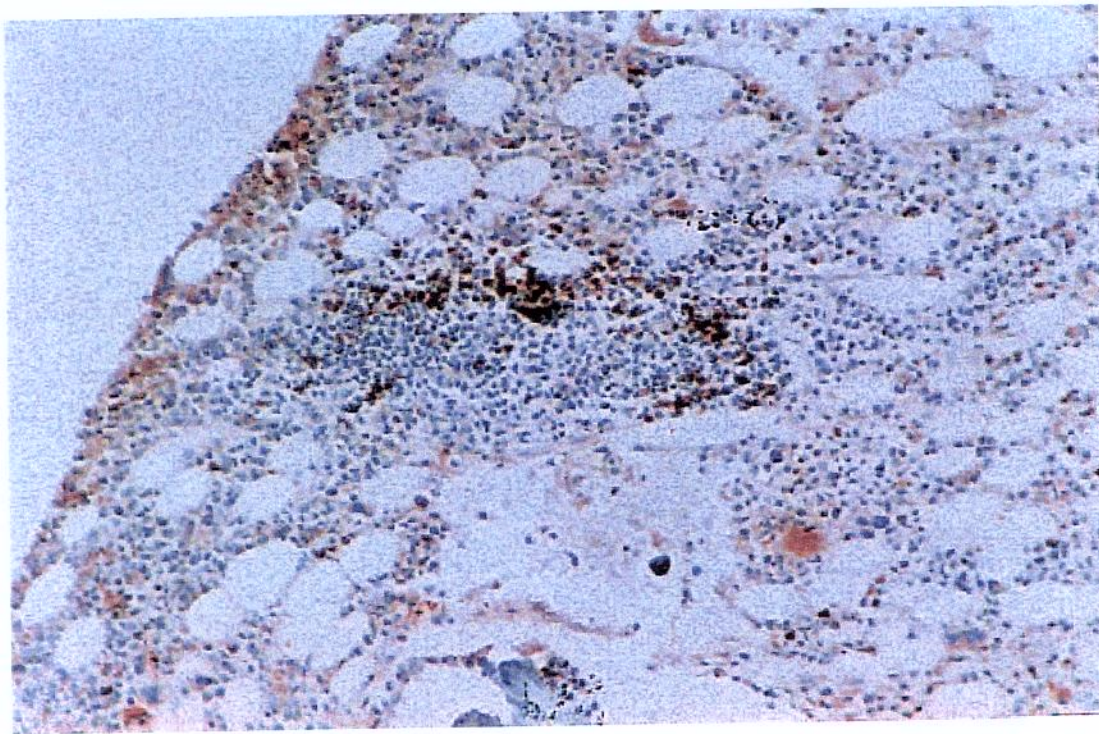


Figura 16 - Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão **perinodular**. Técnica ABC (x 100).

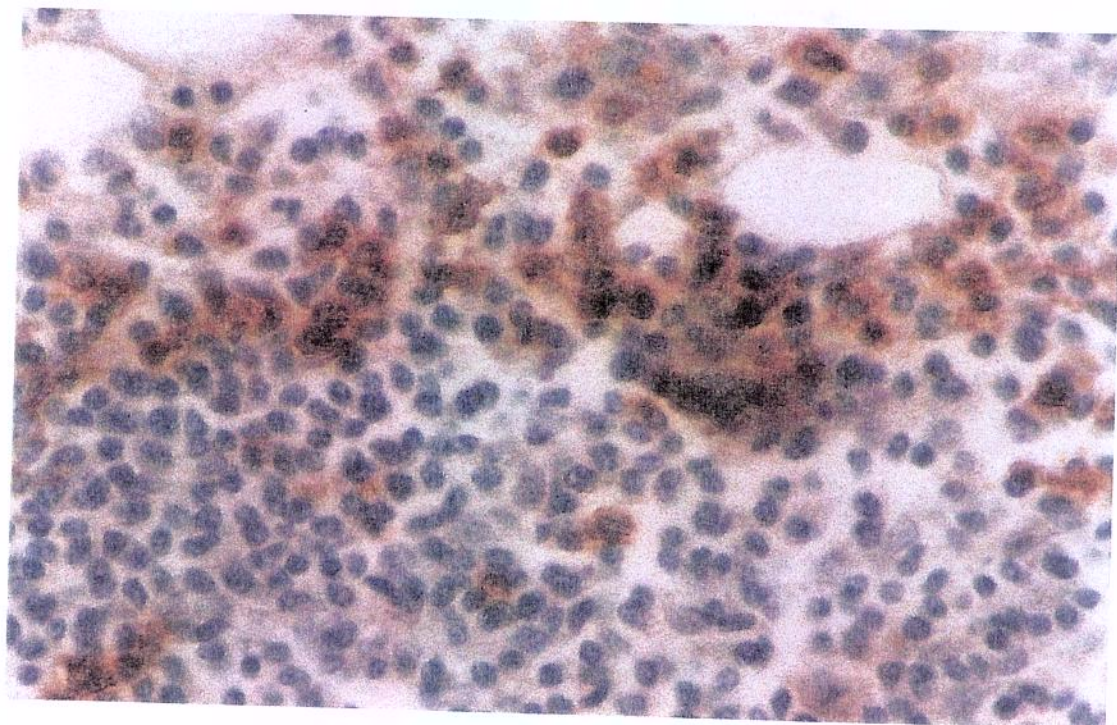


Figura 17 - Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nódulo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão perinodular. Técnica ABC (x 400).

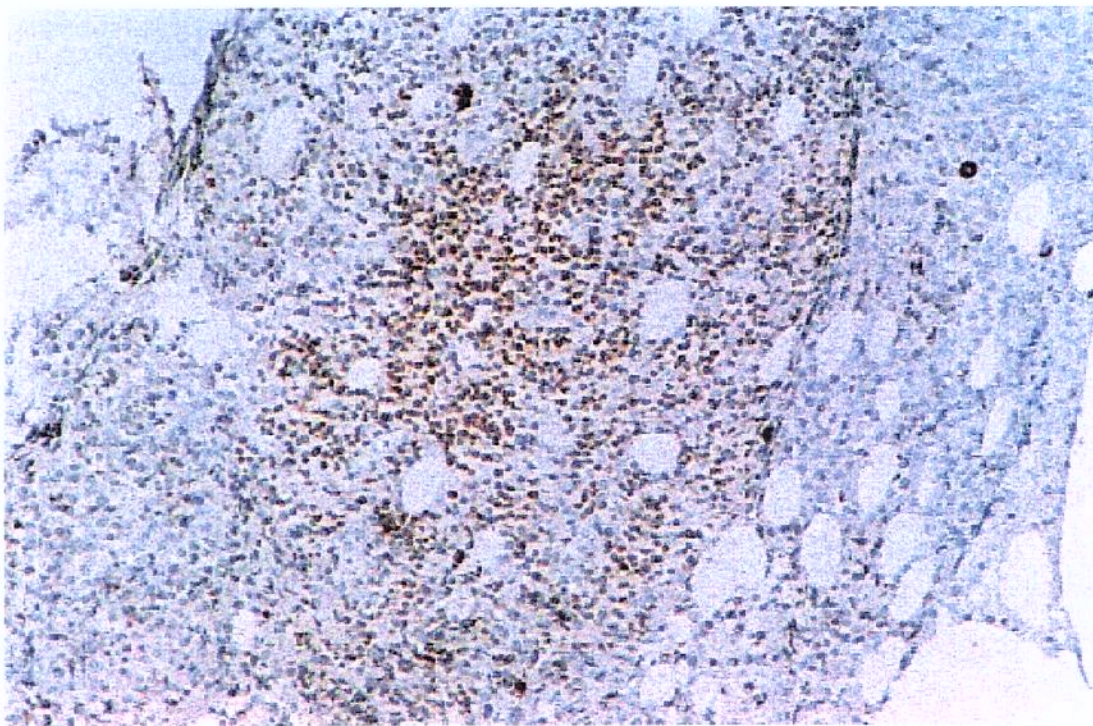


Figura 18 - Imunohistoquímica da medula óssea de paciente portador de SMD exibindo nóculo linfóide com positividade para o marcador CD20, padrão difuso. Técnica ABC (x 100).

Positividade para um dos marcadores T, CD3 e/ou CD45RO foi observada em 12 casos (48,0%) (**Tabela 12**). Dentre eles, 10 exibiram também células CD20 positivas. Coloração inespecífica de fundo não constituiu dificuldade na interpretação dos cortes imunomarcados com CD45RO. Assim, em 15 casos uma marcação para células B (13 casos) ou células T (2 casos) foi evidenciada.

A expressão da proteína bcl-2 foi detectada em apenas 2 pacientes, ambos com nódulos compostos por células B e T (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Classificação FAB e caracterização imunohistoquímica dos nódulos linfóides medulares em 25 pacientes portadores de SMD

CASOS	FAB	CARACTERIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA					
		CD3	CD45RO	CD20			BCL-2
				CENTRAL	PERINODULAR	DIFUSO	
1	AR	+	+	+			-
2	AREB-t	-	-			+	-
3	AREB	-	-		+		-
4	AREB-t	-	-	+			-
5	AR	-	+			+	-
6	AR	-	-		+		-
7	LMMC	+	-			+	+
8	AR	+	-			+	-
9	AR	-	-			+	-
10	HIPER*	+	+			+	-
11	AREB-t	-	+	+			+
12	AR	-	+	+			-
13	NC**	-	-	+			-
14	HIPER*	-	-			+	-
15	AR	+	-				-
16	AR	-	-			+	-
17	HIPER*	-	-		+		-
18	AR	-	-	+			-
19	AR	-	-	+			-
20	AR	-	+	+			-
21	AR	-	-			+	-
22	AR	-	+			+	-
23	AR	-	+			+	-
24	AR	-	+				-
25	ARSA	-	-	+			-

* Hiper: variante hiperfibrótica

**NC: não classificável

O período de acompanhamento dos pacientes com NL variou de 1 a 60 meses com uma média de 21,5 meses (**Tabela 13**). Três pacientes foram acompanhados por apenas um mês. Um deles morreu em decorrência da doença e os dois outros foram perdidos de vista. Em nenhum paciente foi observada qualquer evidência clínica, laboratorial ou radiológica de doença linfoproliferativa durante o período de acompanhamento. Um paciente (caso nº 67), portador de ARSA, com nódulo linfóide de localização paratrabecular foi avaliado por 37 meses sem evidências de linfoma associado.

Tabela 13 - Distribuição dos pacientes com SMD e nódulos linfóides medulares segundo o período de acompanhamento (meses).

PERÍODO DE ACOMPANHAMENTO	NUMERO DE PACIENTES
1 a 12	18 (35,3%)
13 a 24	14(27,5%)
25 a 36	8 (15,7%)
37 a 48	7 (13,7%)
49 a 60	4 (7,8%)
TOTAL	51 (100%)

Dos 51 pacientes com NL, 10 (19,6%) comprovadamente evoluíram para um subtipo mais agressivo da doença e/ou leucemia aguda, enquanto dos 155 pacientes sem NL 29 casos (18,7%) apresentaram essa evolução. Quando comparados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,95$) (**Figura 19 e Tabela 14**).

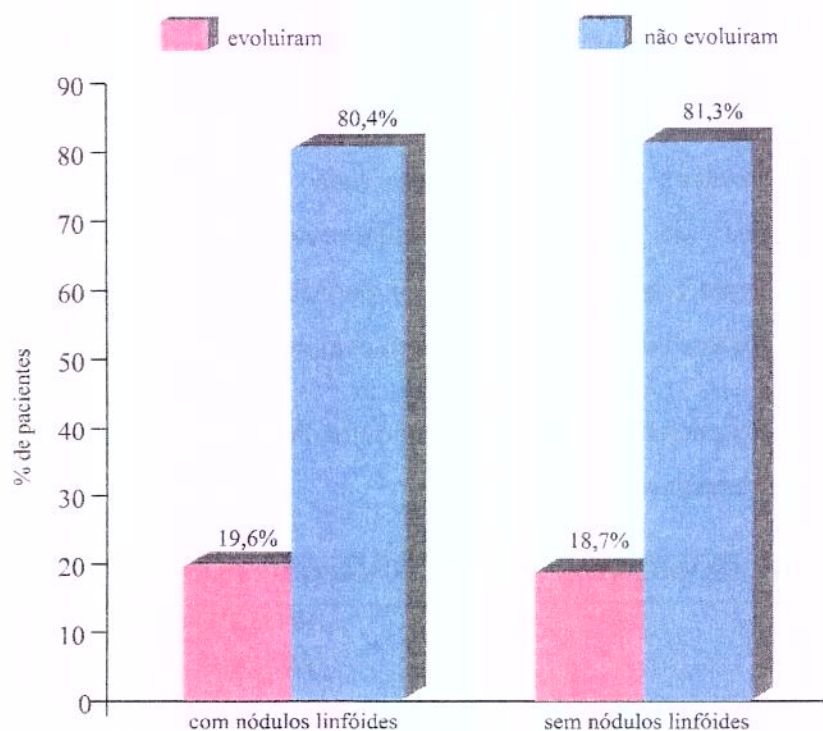


Figura 19 - Percentagem dos pacientes portadores de SMD segundo a evolução da doença em função da presença de nódulos linfóides medulares

Tabela 14 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a evolução da doença em função da presença de nódulos linfóides medulares

EVOLUÇÃO	NÓDULOS LINFÓIDES		TOTAL
	PRESENTES	AUSENTES	
SIM	10 (19,6%)	29 (18,7%)	39
NÃO	41 (80,4%)	126 (81,3%)	167
TOTAL	51 (100%)	155 (100%)	206

Teste qui-quadrado (χ^2): $p=0,95$

Considerando que os subtipos hiperfibrótico e não classificável têm um número muito pequeno de casos para permitir uma avaliação, foi analisado isoladamente o subtipo FAB AREB/AREB-t, onde os nódulos linfóides foram mais frequentes (35,5%). Não se observou diferença significativa com relação à evolução da doença em função da presença ou ausência de NL nesse grupo ($p=0,15$) (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD subtipo AREB/AREB-t segundo a evolução da doença em função da presença de nódulos linfóides medulares

EVOLUÇÃO	NÓDULOS LINFÓIDES		TOTAL
	PRESENÇA	AUSÊNCIA	
SIM	4 (36,4%)	13 (65,0%)	17
NÃO	7 (63,6%)	7 (35,0%)	14
TOTAL	11 (100%)	20 (100%)	31 (100%)

Teste exato de Fisher: $p= 0,15$

A análise da sobrevida global dos 206 pacientes de acordo com o subtipo FAB, utilizando o método de Kaplan-Meier, mostrou diferença significativa ($p<0,01$). Tiveram maior sobrevida os pacientes pertencentes aos subtipos ARSA e AR, quando comparados com os subtipos AREB/AREB-t e LMMC (**Figura 20**). Contrariamente, a presença ou ausência de fibrose no tecido hematopoético não se mostrou um fator importante na sobrevida global ($p=0,07$), embora haja uma tendência para melhor no grupo sem fibrose (**Figura 21**). Quando se comparou os grupos com e sem NL evidenciou-se que a presença de NL não interfere na sobrevida global dos pacientes ($p=0,79$) (**Figura 22**). A avaliação isolada do subgrupo AREB/AREB-t com relação à presença ou ausência de NL também não mostrou diferença estatisticamente significativa com relação à sobrevida global ($p=0,10$) (**Figura 23**).

Na avaliação dos fatores que influíram na sobrevida, utilizando-se a análise de riscos proporcionais de Cox e considerando instituição de origem, idade, dados de hemograma, subtipo FAB, presença de fibrose e NL, a análise univariada revelou

resultados significativos para fibrose no tecido hematopoético ($p=0,10$), dosagem de hemoglobina ($p<0,01$), contagem de plaquetas ($p=0,02$) e subtipo FAB ($p<0,01$). A análise multivariada mostrou que apenas o subtipo FAB e a dosagem de hemoglobina foram fatores independentes para a sobrevida global.

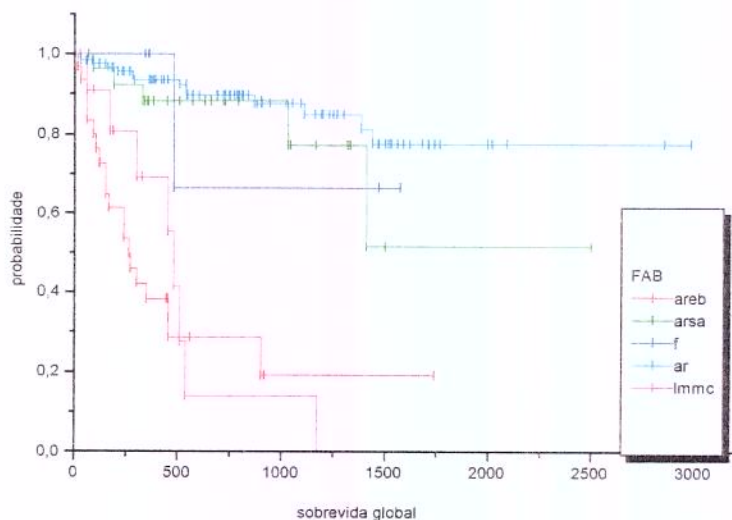


Figura 20 - Curva de sobrevida de 206 pacientes portadores de SMD, segundo o método de Kaplan-Meier, de acordo com os subtipos FAB.

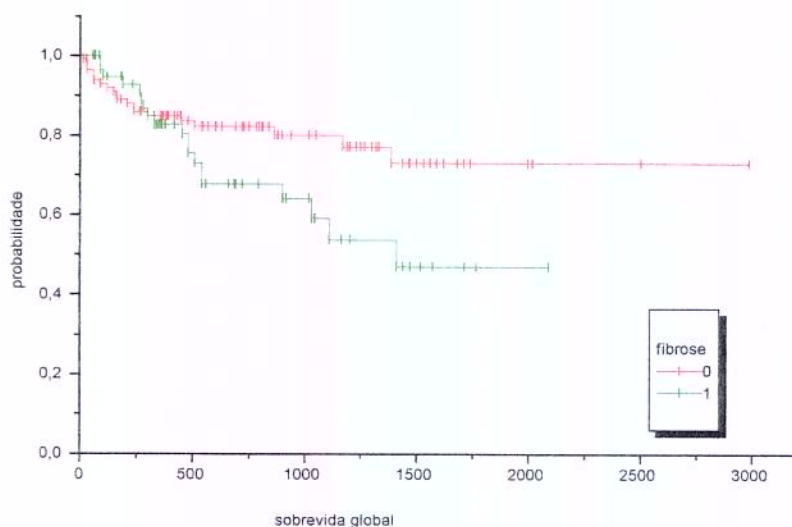


Figura 21 - Curva de sobrevida de 180 pacientes portadores de SMD, segundo o método de Kaplan-Meier, de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de fibrose no tecido hematopoético.

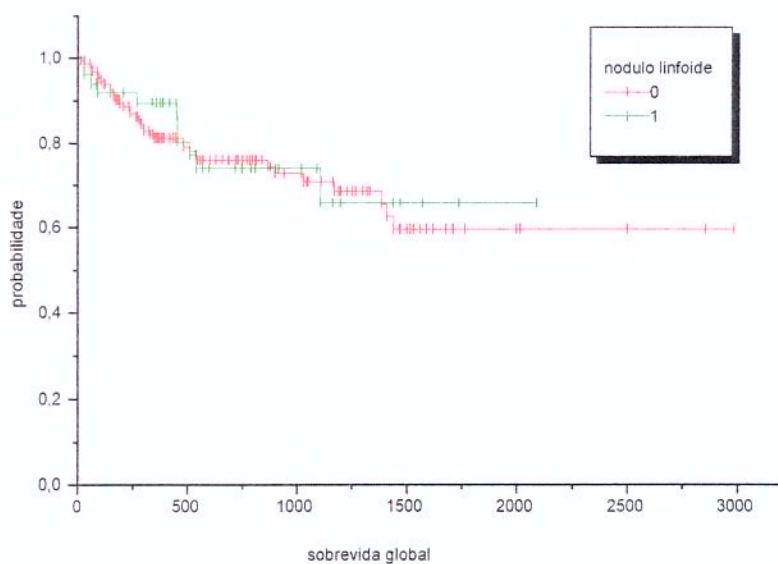


Figura 22 - Curva de sobrevida de 206 pacientes portadores de SMD, segundo o método de Kaplan-Meier, de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de nódulos linfóides medulares.

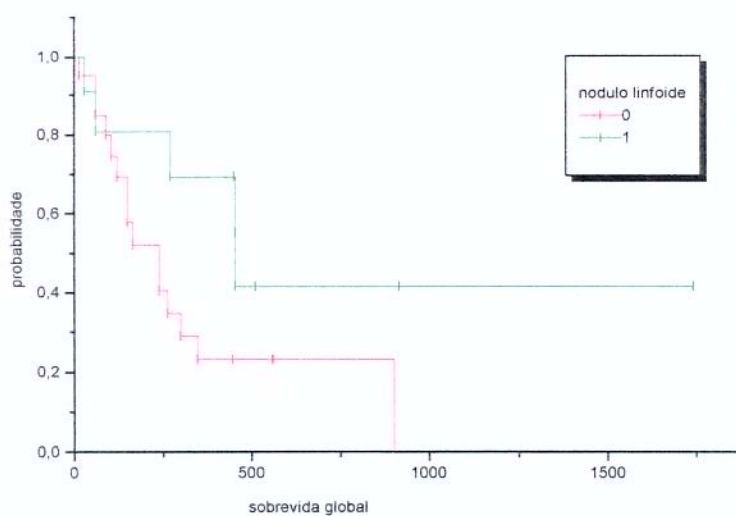


Figura 23 - Curva de sobrevida de 31 pacientes portadores de SMD subtipo AREB/AREB-t, segundo o método de Kaplan-Meier, de acordo com a presença (1) ou ausência (0) de nódulos linfóide medulares.



DISCUSSÃO

Síndromes mielodisplásticas são desordens de natureza clonal, adquiridas, originadas na célula progenitora hematopoética, caracterizadas por alterações morfológicas e funcionais em uma ou mais linhagens celulares da hematopoese, além de graus e combinações variáveis de citopenias periféricas, e risco aumentado de transformação para leucemia aguda. O diagnóstico permanece baseado sobretudo no estudo citomorfológico do aspirado medular (BENNETT, 1982; HARRIS, 2000; BENNETT 2000). O estudo histológico da medula óssea, no entanto, é parte indispensável do processo inicial de investigação e tem sido sistematicamente utilizado, por fornecer dados adicionais de importância no diagnóstico e prognóstico: avaliação da celularidade global, observação da arquitetura medular e suas alterações, como o deslocamento do sítio da granulopoese de sua localização habitual paratrabecular para a região central intertrabecular da medula, detecção do aumento das fibras de reticulina e maior sensibilidade na detecção da displasia megacariocítica (TRICOT, 1984a; TRICOT 1984b; RIOS, 1990; DE WOLF-PEETERS, 1991; BARTL, 1992; KAMPMEIER, 1992; LAMBERTENGHI, 1993; SAAD, 1994; REDDY, 2001).

Foram analisados, nesse grupo, pacientes diagnosticados e acompanhados em instituições terciárias, para onde são encaminhados também pacientes de cidades vizinhas e de outros estados. As diferenças geográficas entre as duas instituições são, potencialmente, um fator de heterogeneidade, uma vez que pressupõe variações na composição étnica e, sobretudo, no risco de exposição a agentes reconhecidos ou potencialmente genotóxicos. Campinas, São Paulo, está localizada numa região intensamente industrializada e, como tal, mais exposta a agentes tóxicos ocupacionais e poluentes ambientais. A análise comparativa dessas duas populações, no entanto, não evidenciou diferenças significativas com relação à distribuição de sexo, idade, grau de insuficiência medular, classificação FAB, presença de fibrose ou sobrevida, o que possibilitou a análise conjunta de dados do grupo.

Uma frequência elevada do subtipo AR foi observada nessa população quando comparada àquela relatada por outros autores (HOAGLAND, 1995; KOUIDES, 1996; AUL, 1998; GERMING, 2000). A inclusão de desordens não clonais, porém, foi minimizada pela adoção de critérios mínimos de diagnóstico (GREENBERG, 1997) e da realização sistemática e padronizada de um protocolo de exclusão para as causas reversíveis reacionais ou não clonais de displasia.

Fragmentos de biópsia óssea obtidos como parte da avaliação inicial de 206 pacientes portadores de SMD foram revisados para a detecção da presença de NL e suas características morfológicas, tais como número, localização no espaço medular, delimitação, composição celular e presença de associação com espessamento da rede de reticulina no tecido hematopoético.

Nódulos linfóides medulares têm sido relatados numa variedade de condições benignas que incluem doenças infecciosas (BAIN, 1998) e sistêmicas (DIEBOLD, 2000), mas também doenças clonais do tecido hematopoético tais como SMD e síndromes mieloproliferativas (CERVANTES, 1988; FRANCO, 1991). As frequências observadas variam entre as diferentes séries estudadas. Brunning e McKenna, num levantamento bibliográfico, relataram uma frequência de NL de 18 a 47% nas biópsias de medula óssea (BRUNNING, 1994).

A frequência de NL aumenta com a idade (NAVONE, 1985). Na mielodisplasia, condição mais frequente em pacientes com idade superior a 50 anos e com frequência crescente com a idade, a incidência relatada de NL varia entre 2,5% a 27,3% (TRICOT, 1984a; NAVONE, 1985; RIOS, 1990; MANGI, 1992; MASCHEK, 1992; FLORENSA, 1996; RAMOS, 1999). A presença de NL foi observada em 24,8% dos casos aqui avaliados, uma frequência elevada considerando a idade média dos pacientes estudados.

Agregados linfóides reacionais podem ainda ser observados, na ausência de infiltração medular, em pacientes portadores de linfoma de células B, T ou doença de Hodgkin. O diagnóstico diferencial mais importante dessas lesões reacionais é o envolvimento medular por doença linfoproliferativa, em especial os linfomas indolentes. Alguns critérios morfológicos têm sido utilizados para distinguir NL benignos e malignos na medula óssea. Nenhum aspecto isolado tem se mostrado eficaz no diagnóstico diferencial e os princípios gerais propostos por Thiele e colaboradores cinco anos depois (THIELE, 1999) não diferem significativamente daqueles propostos por Brunning e colaboradores (BRUNNING, 1994). Agregados reacionais são, em geral, bem delimitados, localizados preferencialmente na região intertrabecular da medula, podendo, eventualmente, tocar a trabécula óssea e, ainda, exibir centro germinativo (BRUNNING, 1994; SALISBURY, 1996; THIELE, 1999; DIEBOLD, 2000).

A infiltração medular por doença linfoproliferativa, notadamente as de curso indolente, assume uma localização preferencial paratrabecular, tem limites imprecisos, composição celular monomórfica e presença de fibrose nas áreas de infiltração pelas células tumorais (BRUNNING, 1994; SALISBURY, 1996; THIELE, 1999; DIEBOLD, 2000).

No presente estudo, a maioria dos nódulos linfóides observados eram múltiplos (56,9%), de composição celular polimórfica (94,1%), localização central (88,3%) e bordas bem definidas (86,3%), o que corresponde às características morfológicas descritas em agregados reacionais (BRUNNING, 1994; THIELE, 1999). Uma distribuição paratrabecular foi evidenciada em 2 casos e em 7 pacientes os agregados exibiam limites imprecisos. Além disso, em alguns casos, nódulos de localização central ocasionalmente tocavam a trabécula. Esse padrão de envolvimento pode representar um estágio inicial de infiltração medular por processo linfoproliferativo, ou ainda, reação ao desarranjo da arquitetura medular por processo inflamatório.

O centro germinativo é um achado morfológico detectado esporadicamente em cortes histológicos de medula óssea, num percentual que se aproxima de 5% de todos os nódulos benignos. Esses casos estão preferencialmente associados a doenças de caráter inflamatório ou desordens auto-imunes (FARHI, 1989). Nos casos aqui analisados, apesar das características morfológicas benignas observadas na maioria dos agregados linfóides, nenhum centro germinativo foi detectado, assumindo os NL, em analogia ao linfonodo, o aspecto morfológico de folículos primários.

A diversidade de técnicas utilizadas e a falta de critérios uniformes para a definição da presença de fibrose medular na SMD dificultam estudos comparativos. O percentual de casos com qualquer grau de fibrose pode alcançar 70%, enquanto é de apenas 1% se apenas a fibrose colagênica é considerada (STEENSMA, 2001). Maschek e colaboradores (MASCHEK, 1992), num estudo de 352 casos de SMD primária, observaram NL em 24% dos pacientes sem fibrose medular associada e em 40% dos pacientes com fibrose. Na série aqui apresentada o espessamento da rede de reticulina no tecido hematopoético foi notado em 51% dos casos com NL, com presença de fibras espessas anastomosantes nos 3 pacientes com o subtipo hiperfibrótico. Essa associação foi significativa e, portanto, a presença de NL na medula óssea desses pacientes pode representar uma reação imunológica em resposta ao desarranjo da arquitetura medular.

O estudo imunofenotípico, seja por imunohistoquímica ou citometria de fluxo, tornou-se parte integrante da rotina de investigação anátomo-patológica da medula óssea (PILERI, 1997). Numerosos estudos têm sido publicados sobre as características imunofenotípicas de populações linfóides normais e reacionais (CLARK, 1986; LOKEN, 1987; THALER, 1989; HORNY, 1989; SHIN, 1992; HORNY, 1993; BLUTH, 1993; O'DONNELL, 1995). Estudos anteriores evidenciaram que as células T são mais numerosas que as células B na medula óssea (CLARK, 1986). Em geral, os agregados linfóides reacionais são compostos por um misto de células B e T. Portanto, um aumento uniforme e significativo de células B no espaço medular sugere infiltração por linfoma de células B, muito embora uma população de células T reacionais possa ser observada de permeio às células linfomatosas (HORNY, 1993; BLUTH, 1993). Por outro lado, um aumento de células T dispersas no espaço medular sugere um estado reacional (HORNY, 1989).

Sendo a distinção entre NL reacionais e neoplásicos, com base unicamente em achados morfológicos, por vezes duvidosa ou inconclusiva, o estudo imunohistoquímico tornou-se complemento indispensável no diagnóstico diferencial, em associação com os critérios morfológicos e o padrão reticular (DOUGLAS, 1999; THIELE, 1999). Apesar da inexistência de um marcador imunológico isolado com valor preditivo para o diagnóstico diferencial, essa análise contribui na definição da composição celular desses agregados e pode tornar evidente o envolvimento medular precoce ou mínimo por doença linfoproliferativa. Além do que, é um recurso de baixo custo, frequentemente disponível e de fácil execução. São fatores limitantes nessa análise, a não detecção dos agregados em novos cortes histológicos seriados ou, ainda, o descolamento dos nódulos, por vezes pequenos e únicos, durante o processo de recuperação antigênica. Nos casos aqui analisados, tais fatores limitantes reduziram o número de casos avaliáveis para 25/51 (49,0%).

Poucos estudos têm objetivado a frequência, a caracterização morfológica ou imunohistoquímica dos NL em pacientes com SMD (NAVONE, 1991; HORNY, 1993; MAGALHÃES, 1997; MONGKONSRITRAGOON, 1998). Horny e colaboradores, num estudo sobre subpopulações linfocitárias na medula óssea normal, estados reacionais e

neoplasias, evidenciaram um aumento de células T em dois casos de SMD e nos estados reacionais quando comparados com controles normais (HORNY, 1993). No presente estudo, nódulos compostos por uma população celular mista de células B e T, ou ainda, compostos por células com marcação T exclusiva totalizaram 48%. Assim como Bluth e colaboradores (BLUTH, 1993), encontramos, em nossa série, composição celular B exclusiva em nódulos com características morfológicas benignas que não apresentaram, após seguimento, qualquer evidência de doença linfoproliferativa. O percentual de positividade para células T, no entanto, foi menor que o esperado, considerando as características morfológicas benignas e a evolução dos casos. É provável que a heterogeneidade no processamento das amostras, com diferentes técnicas de descalcificação e fixação, fatores inerentes de um estudo retrospectivo, sejam responsáveis por um número elevado de resultados falso-negativos nessa amostra.

A positividade para o anticorpo monoclonal CD20, específico para células B e com capacidade de reconhecer células linfóides reacionais ou neoplásicas, exibiu três padrões de marcação: central, perinodular e difuso. É possível, embora ainda não comprovado, que esses diversos padrões representem diferentes estágios intermediários de estimulação e resposta imune.

A expressão de bcl-2 tem sido considerada por alguns autores um achado consistente nos infiltrados por linfomas não-Hodgkin, embora tenha sido também descrita em agregados de natureza benigna. Contrariamente à demonstração da restrição de cadeia leve, a expressão de bcl-2 é facilmente evidenciada em material fixado em formaldeído e incluído em parafina. Sua aplicação no diagnóstico diferencial entre hiperplasia linfóide reacional e linfoma folicular, no entanto, é atualmente questionada (PEZZELLA, 1990; ZUTTER, 1991; BEN-EZRA, 1994; PEZZELLA, 1995; WANG, 1995; VELOSO, 1995; SKALOVÁ, 1997; FAKAN, 1996). No linfonodo, uma correlação significativa entre o diagnóstico histológico, imunomarcação para bcl-2 e clonalidade demonstrada pelo rearranjo de cadeias pesadas por PCR foi evidenciada (WANG, 1995). A marcação forte e uniforme nos linfomas foliculares contrasta com a negatividade observada nos centros germinativos reacionais. Na medula óssea, no entanto, a ausência de centro germinativo em 95% dos NL (FARHI, 1989) torna difícil um paralelo com o tecido nodal, em especial nos

casos reacionais. Contrariamente, nos nódulos neoplásicos, resultados similares quanto à positividade para bcl-2 e intensidade de marcação são observados quando se compara o tecido medular com o gânglio. Em 5 dos nossos casos, em que uma marcação forte e isolada de CD20 foi detectada, não se observou expressão aumentada de bcl-2 ou qualquer evidência clínica de doença linfoproliferativa associada. Na verdade, nos 2 pacientes em que a expressão de bcl-2 foi evidenciada, os nódulos apresentavam uma composição celular heterogênea de células B e T. Limitações técnicas, em especial relacionadas à fixação, podem, eventualmente, prejudicar uma marcação adequada, apesar do processo de recuperação antigênica. Uma desnaturação antigênica parcial pode reduzir o nível da proteína em células normais, sabidamente menor que aquele observado nas células neoplásicas com translocação t(14;18). A ampla expressão de bcl-2 em muitas populações benignas de células B e T, no entanto, constitui um bom controle interno para monitorar a qualidade da reação. É importante ainda considerar que, assim como demonstrado em células plasmáticas, a expressão de bcl-2 é inversamente proporcional à atividade proliferativa, estando elevada nas condições de caráter indolente e diminuída ou ausente nas situações reacionais ou de elevado "turnover" celular (PUTHIER, 1999). Portanto, assim como demonstrado em relatos mais recentes, a expressão de bcl-2 na nossa série não constituiu um critério discriminatório para a definição do caráter benigno ou maligno do agregado linfóide medular (FAKAN, 1996; SKÁLOVÁ, 1997).

Técnicas de biologia molecular são uma abordagem complementar utilizada para o diagnóstico diferencial e baseiam-se na demonstração da restrição clonal da população envolvida, considerando que proliferações neoplásicas são clonais. Métodos utilizados para demonstração da monoclonalidade através da expressão monotípica de imunoglobulinas requerem, em geral, tecido a fresco ou congelado. A evidência do rearranjo de cadeias pesadas de imunoglobulinas ou receptor de células T podem, eventualmente, induzir resultados equívocos (ROCKMAN, 1997). Apesar da alta especificidade, têm limitações de disponibilidade, maior custo e, ainda, um elevado índice de resultados falso-negativos, com sensibilidade em torno de 60% (MAES, 2000; BRINCKMANN, 2000; BEN-EZRA, 2000). A não detecção do caráter clonal não exclui necessariamente o diagnóstico de linfoma. O clone maligno pode representar uma minoria da população celular analisada, abaixo do limiar de detecção de técnicas tais como

Southern Blotting (1 a 3% das células examinadas) (TOREN, 1996; ROCKMAN, 1997). Da mesma maneira, sua presença não constitui evidência inequívoca de malignidade. Algumas condições clonais de caráter benigno ou indolente podem, eventualmente, nunca adquirir o insulto genético-molecular adicional necessário para a transformação maligna (TOREN, 1996). Outras técnicas, menos difundidas e de menor disponibilidade têm sido utilizadas com sucesso para o diagnóstico diferencial (SANGSTER, 1986; SALISBURY, 1996). Em resumo, infiltrados linfóides de natureza incerta devem ser investigados e interpretados com cautela, assumindo a análise morfológica como padrão-ouro mas considerando-se, para garantir uma maior acuracidade diagnóstica, o conjunto de dados clínicos, morfológicos, imunológicos e, sempre que disponível, a análise molecular (CROCKER, 1996). Essa última, pela baixa sensibilidade relatada, tem sido, até então, reservada para casos de difícil avaliação (BEN-EZRA, 2000; BRINCKMANN, 2000; MAES, 2000). É importante ainda, acompanhar a evolução para detectar precocemente um eventual desenvolvimento de processo linfoproliferativo. Nos nossos pacientes, após um seguimento mediano de 21,5 meses, nenhuma evolução para linfoma foi constatada, nem mesmo nos casos onde uma localização paratrabecular sugeria essa evolução. Faulkner e colaboradores relataram que em pacientes submetidos a uma biópsia de medula, o encontro de nódulos linfóides de aspecto benigno precedeu o diagnóstico de linfoma em 22% dos casos, num follow-up de 22 meses (FAULKNER, 1988).

A associação entre doença linfoproliferativa e SMD tem sido considerada por alguns como coincidente. Florensa e colaboradores, num estudo multicêntrico de 1198 pacientes portadores de SMD não tratada observaram a presença de malignidade linfóide associada em 14 casos, ou seja, em aproximadamente 1% (FLORENSA, 1996). Além do que, a transformação de SMD para leucemia linfóide aguda (LLA) é rara (KOUIDES, 1995; ESCUDIER, 1996), um número surpreendentemente baixo, se comparado ao percentual de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) que sofrem essa transformação (HERNANDEZ, 1993; FADERL, 1999).

Algumas características e peculiaridades sugerem um mecanismo imune envolvido na formação de NL na medula óssea de pacientes com SMD. Nestas síndromes, encontramos um amplo espectro de anormalidades imunológicas (MUFTI, 1986;

FELZMANN, 1994; ENRIGHT, 1995; HAMBLIN, 1996; OKAMOTO, 1997; NOVARETTI, 2001; STAHL, 2001). Uma resposta imune alterada é, provavelmente, responsável pela suscetibilidade aumentada às infecções e auto-imunidade. Poucos estudos objetivaram o estudo quantitativo das subpopulações linfocitárias no sangue periférico ou medula óssea em pacientes portadores de SMD. É sabido que os linfócitos B circulantes encontram-se em número absoluto normal mas são funcionalmente imaturos, enquanto a população de células T está, em geral, reduzida, notadamente às custas da subpopulação CD4⁺ e também funcionalmente deficiente (COLOMBAT, 1988; HAMBLIN, 1996). Recentemente Barrett e colaboradores postularam que um mecanismo auto-imune estaria em parte envolvido, via supressão imune mediada por células T, em alguns pacientes com SMD (BARRETT, 2000). O comprometimento, em especial funcional, da linhagem linfóide foi por muitos atribuído ao envolvimento clonal da linhagem linfóide. Entretanto, embora as linhagens granulocítica, eritróide e megacariocítica estejam bem estabelecidas como parte do clone displástico, o envolvimento clonal da linhagem linfóide é ainda controverso. Possivelmente ele ocorre, mas é incomum (CULLIGAN, 1992). Alguns estudos têm implicado o sistema fagocítico mononuclear que, agindo na apresentação do antígeno e secreção de citocinas, têm consequente efeito regulatório nos linfócitos B e produção de anticorpos (HAMBLIN, 1996). Sendo o sistema monocítico/macrofágico sabidamente derivado do clone anormal, pode-se inferir que seja funcionalmente deficiente, o que resultaria numa estimulação imune anormal e persistente, seja pela diminuição do "clearance" de antígenos bacterianos, exacerbação na apresentação do antígeno ou, ainda, secreção inapropriada de citocinas com ação estimulatória na linhagem linfóide. Além do que, a função também alterada dos granulócitos (fagocitose, quimiotaxia e atividade bactericida) pode contribuir para uma resposta imune inapropriada. O resultado é a hiperplasia de células B, com produção anormal de anticorpos, podendo haver hipergamaglobulinemia e produção de auto-anticorpos (NOVARETTI, 2001; STAHL, 2001). A proliferação estimulada e continuada de células B aumenta o número de divisões celulares e, em consequência, o risco de erro genético, o que elevaria a incidência de transformação maligna (HAMBLIN, 1996).

Células "natural killer" (NK) têm origem na medula óssea e são um componente do sistema imune importante na vigilância contra tumores, no controle da resposta linfóide e hematopoese (DELVES, 2000a). É possível que na SMD, uma vez reduzidas em número e/ou com função deficiente, também contribuam para algumas das manifestações imunes observadas, facilitando o aparecimento de uma outra neoplasia.

A presença de plasmocitose policlonal, na ausência de células plasmáticas atípicas ou de grande porte, é útil no diagnóstico do caráter reacional de um agregado. No estudo de Maeda e colaboradores a presença de NL esteve associada à plasmocitose, um achado sabidamente relacionado à resposta imune (MAEDA, 1977). No entanto, não foi detectada, em estudo recente, correlação entre a presença de infiltrados linfóides medulares reacionais e a incidência de alo ou auto-anticorpos (NOVARETTI, 2001).

Navone e colaboradores demonstraram através de análise multivariada que, nos linfomas agressivos não tratados, a ausência de NL reacionais tem impacto negativo na sobrevida global desses pacientes (NAVONE, 1992). Também Navone e colaboradores, num estudo de fatores histopatológicos com implicações prognósticas na transformação leucêmica em pacientes portadores de SMD, observaram a presença de NL em 31% dos pacientes portadores de SMD que não evoluíram para LMA e em apenas 5% do grupo que evoluiu para transformação leucêmica (NAVONE, 1991). Os autores postularam que a presença de NL teria um impacto positivo, provavelmente através de um mecanismo imunológico. Esses achados sugerem o envolvimento de um provável componente imunológico e corroboram a hipótese de que os NL seriam a manifestação da resposta imune à estimulação antigênica crônica. Contrariamente ao estudo de Navone e colaboradores (NAVONE, 1991), nos casos aqui estudados a presença de NL não teve qualquer implicação prognóstica. Apesar de um maior número de nódulos observados no subtipo AREB/AREB-t, sabidamente de pior prognóstico, e, ainda, uma menor dosagem de hemoglobina no grupo com nódulos linfóides, o estudo comparativo entre os grupos com e sem NL não alcançou significância estatística com relação à frequência de progressão da doença ou à sobrevida global ($p=0.79$). A avaliação isolada do subgrupo AREB/AREB-t com relação à presença ou ausência de NL, no entanto, mostra uma tendência para sobrevida menor no grupo sem agregado ($p=0,10$).

A infecção viral subclínica, em especial aquela causada por vírus linfotrópicos, podem induzir a formação de NL. Raza e colaboradores propuseram, em estudos publicados em 1998, que uma agressão viral poderia ser o evento transformador inicial na SMD, com consequente produção anormal de citocinas. Em nenhum desses estudos, no entanto, foram apresentadas evidências inequívocas (RAZA, 1998a; RAZA, 1998b). Os estudos sorológicos para doenças virais (hepatites, citomegalovírus, vírus da imunodeficiência humana adquirida), realizados em nossos pacientes como parte da investigação diagnóstica inicial, foram sempre negativos.

Em resumo, NL nos pacientes portadores de SMD analisados nesse estudo mostraram uma incidência superior àquela esperada para a faixa etária, características morfológicas benignas, características imunofenotípicas heterogêneas, e ausência de associação com sexo, idade, grau de citopenias, classificação FAB, evolução ou sobrevida. Nenhuma evidência de associação com doença linfoproliferativa foi observada no período de acompanhamento. A presença de NL em pacientes com SMD provavelmente representa uma reação ao desarranjo da arquitetura medular e uma resposta à estimulação imune anormal.

Um período de seguimento mais longo, num número maior de pacientes, permitirá a confirmação dos achados aqui apresentados. É importante salientar que, em pacientes portadores de SMD, um aumento no percentual de células linfóides ou, ainda, a presença de NL deve ser cuidadosamente investigada e acompanhada com o objetivo de descartar ou detectar precocemente neoplasia de linhagem linfóide associada.



CONCLUSÕES

- ◆ Nódulos linfóides foram um achado frequente na medula óssea de pacientes portadores de síndromes mielodisplásticas (24,8%). A frequência observada foi superior à esperada considerando a mediana de idade dos pacientes estudados (58,5 anos).
- ◆ A maioria dos nódulos linfóides exibiu características morfológicas benignas.
- ◆ As características imunofenotípicas foram heterogêneas, com positividade para o marcador pan-B em 92,0% dos casos e positividade para um marcador pan-T em 48,0% dos casos.
- ◆ A expressão da proteína bcl-2, observada em dois casos com expressão simultânea de marcadores B e T, não foi critério indicativo de malignidade.
- ◆ A presença de nódulos linfóides não conferiu diferenças significativas para os parâmetros idade, sexo, grau de citopenias, classificação FAB, progressão da doença ou sobrevida.
- ◆ Não foi evidenciada associação com doença linfoproliferativa no período de acompanhamento.
- ◆ Uma associação significativa foi observada entre espessamento da rede de reticulina no tecido hematopoético e presença de nódulos linfóides.
- ◆ A presença de nódulos linfóides em pacientes com SMD provavelmente representa uma reação ao desarranjo da arquitetura medular e uma resposta à estimulação imune anormal.

A presença de nódulos linfóides medulares deve ser investigada e acompanhada para descartar ou detectar precocemente uma neoplasia linfóide associada.



SUMMARY

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal disorders characterised by abnormalities in proliferation and maturation of haemopoietic precursors resulting in cytopenias and a preleukaemic state. Bone marrow lymphoid nodules (LN) are usually considered to be a physiological feature, closely related to age. In patients with MDS their clinical and biological meaning remain obscure. In the present study the presence of LN in bone marrow biopsy was investigated in 206 patients with MDS. The median age was 58.5 years (range 15-89). According to FAB classification, there were 129 RA, 29 RARS, 31 AREB/AREB-t, 11 CMML, 5 hyperfibrotic variants and 1 unclassifiable case. Single or multiple LN were present in 24.8% of the cases. Twenty-five specimens were evaluated with a panel of antibodies reactive on routinely processed, paraffin-embedded trephine biopsies: CD20, CD3, CD45RO and anti-bcl-2. Although most LN were centrally located (88.3%), well circumscribed and polymorphous, some were paratrabeular (3.9%) or ill defined (13.7%). An increase in reticulin fibres was observed in 51.1% of cases. CD20 positive cells were found in 23/25 (92.0%) of the cases in three distinct patterns: strong central, perinodular and faint diffuse. Positivity with CD3 and/or CD45RO was detected in 12/25 (48.0%) of the cases. In 15 patients only B (13 cases) or T cells (2 cases) could be detected whereas in 10 cases a mixture of B and T cells was noted. Bcl-2 expression was positive in only 2 specimens. The incidence of LN in our MDS patients was unexpectedly high considering the median age of patients. The comparison between patients with and without LN did not reveal statistically significant differences concerning age, sex, neutrophil counts, platelets, FAB subtype, disease progression or overall survival. The presence of LN showed a relationship with an increase in reticulin fibres in the haematopoietic tissue ($p=0.01$), and patients with LN exhibited lower haemoglobin values ($p=0.03$). Multivariate survival analysis showed that haemoglobin and FAB subtype were the most significant predictors of survival. Our results show that LN in MDS patients have heterogeneous characteristics. No association with lymphoproliferative disease and no correlation with prognosis were found. These aggregates could be an expression of reactivity to an ongoing persistent and abnormal immune stimulation and are probably related to an altered bone marrow microenvironment.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

1. Abruzzese E, Buss D, Rainer R, Pettenati MJ, Rao PN. Progression of a myelodysplastic syndrome to pre-B acute lymphoblastic leukemia: a case report and cell lineage study. **Ann Hematol** 73: 35-38, 1996.
2. Asano H, Ohashi H, Ichihara M, Kinoshita T, Murate T, Kobayashi M, Saito H, Hotta T. Evidence for nonclonal hematopoietic progenitor cell populations in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. **Blood** 84: 588-594, 1994.
3. Ashton-Key M, Jessup E, Isaacson PG. Immunoglobulin light chain staining in paraffin-embedded tissue using a heat mediated epitope retrieval method. **Histopathology** 29:525-531, 1996.
4. Auger MJ, Nash JRG, Mackie MJ. Marrow involvement with T cell lymphoma initially presenting as abnormal myelopoiesis. **J Clin Pathol** 39: 134-137, 1986.
5. Aul C, Gattermann N, Schneider W. Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndromes. **Leuk Lymphoma** 16:247-262, 1995.
6. Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Haematologica** 83: 71-86, 1998a.
7. Aul C, Germing U, Gattermann N, Minning H. Increasing incidence of myelodysplastic syndromes: real or fictitious? **Leuk Res** 22: 93-100, 1998b.
8. Austyn JM. Dendritic cells. **Curr Opin Hematol** 5: 3-15, 1998.
9. Bain BJ. The bone marrow aspirate of healthy subjects. **Br J Haematol** 94: 206-209, 1996.
10. Bain BJ. Lymphomas and reactive lymphoid lesions in HIV infection. **Blood Reviews** 12: 154-162, 1998.
11. Barrett J, Sauntharajah Y, Molldrem. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? **Sem Hematol** 37:15-29, 2000.

12. Bartl R, Frisch B, Baumgart R. Morphologic classification of the myelodysplastic syndromes (MDS): Combined utilization of bone marrow aspirates and trephine biopsies. **Leuk Res** 16: 15-33, 1992.
13. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, Jager K, Pappenberger R, Hoffmann-Fezer G. Lymphoproliferations in the bone marrow: identification and evolution; classification and staging. **J Clin Pathol** 37: 233-254, 1984.
14. Batinic D, Pavletic Z, Kolevska T, Bogdanic V, Zalud I, Nemet D, Marusic M, Labar B. Lymphocyte subsets in normal human bone marrow harvest for routine clinical transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 4: 229-232, 1989.
15. Ben-Ezra JM, King BE, Harris AC, Todd WM, Kornstein MJ. Staining for Bcl-2 protein helps to distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow biopsies. **Mod Pathol** 7:560-564, 1994.
16. Ben-Ezra J, Hazelgrove K, Ferreira-Gonzalez A, Garrett CT. Can polymerase chain reaction help distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow aspirates? **Arch Pathol Lab Med** 124: 511-515, 2000.
17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton GAD, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol** 51:189-199, 1982.
18. Bennett JM. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. **Int J Hematol** 72:131-133, 2000.
19. Bishop PW. Bone marrow trephine biopsy in lymphoproliferative diseases. **J Clin Pathol** 46:380-383, 1993.
20. Bluth RF, Casey TT, Mccurley TL. Differentiation of reactive from neoplastic small-cell lymphoid aggregates in paraffin-embedded marrow particle preparations using L-26 (CD 20) and UCHL-1 (CD45RO) monoclonal antibodies. **Am J Clin Pathol** 99: 150-156, 1993.

21. Boultonwood J, Fidler C, Kusec R, Rack K, Elliot PJW, Atoyebi O, Chapman R, Oscier DG, Wainscoat JS. Telomere length in myelodysplastic syndromes. **Am J Hematol** 56: 266-271, 1997.
22. Brinckmann R, Kaufmann O, Reinartz B, Dietel M. Specificity of PCR-based clonality analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements for the detection of bone marrow involvement by low-grade B-cell lymphomas. **J Pathol** 190: 55-60, 2000.
23. Brousse N. – Tissus lymphoïdes normaux. In: Solal-Céligny P – **Lymphomes**. France, Éditions Frison-Roche, 1997. p. 126-143.
24. Brunning RD, McKenna RW. Tumors of the bone marrow: lesions simulating lymphoma. In: **Atlas of Tumour Pathology**, 3rd Series, Fascicle 9, Vol. 1, Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1994. p. 409-455.
25. Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT. Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B-cell lymphoma. **Am J Pathol** 129: 415-421, 1987.
26. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MHG, Poggi S, Bifulco C, Key G, D' amato L, Sabattini E, Feudale E, Reynolds F, Gerdes J, Rilke F. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. **J Pathol** 171: 83-98, 1993.
27. Cervantes F, Pereira A, Marti JM, Feliu E, Rozman C. Bone marrow lymphoid nodules in myeloproliferative disorders: association with the nonmyelosclerotic phases of idiopathic myelofibrosis and immunological significance. **Br J Haematol** 70 : 279-282, 1988.
28. Chang KL, Arber DA, Weiss LM. CD20: a review. **Appl Immunohistochem** 4: 1-15, 1996.
29. Chetty R, Echezarreta G, Comley M, Gatter K. Immunohistochemistry in apparently normal bone marrow trephine specimens from patients with nodal follicular lymphoma. **J Clin Pathol** 48:1035-1038,1995.

30. Clark JR, Williams ME, Swerdlow SH. Detection of B- and T cells in paraffin-embedded tissues sections. **Am J Clin Pathol** 93:58-69, 1990.
31. Clark P, Normansell DE, Innes DJ, Hess CH. Lymphocyte subsets in normal bone marrow. **Blood** 67: 1600-1606, 1986.
32. Clark P, Normansell DE. Phenotype analysis of lymphocyte subsets in normal human bone marrow. **Am J Clin Pathol** 94: 632-636, 1990.
33. Colan MG, Bast M, Armitage JO, Weisenburger DD. Bone marrow involvement by non-Hodgkin's lymphoma: the clinical significance and morphologic discordance between the lymph node and bone marrow. **J Clin Oncol** 8: 1163-1172, 1990.
34. Collins RD. Is clonality equivalent to malignancy: specifically, is immunoglobulin gene rearrangement diagnostic of malignant lymphoma? **Hum Pathol** 28: 757-759, 1997.
35. Colombat PH, Renoux M, Lamagnere JP, Renoux G. Immunologic indices in myelodysplastic syndromes. **Cancer** 61: 1075-1081, 1988.
36. Contos MJ, Kornstein MJ, Innes DJ, Ben-Ezra J. The utility of CD 20 and CD 43 in subclassification of low-grade B-cell lymphoma on paraffin sections. **Mod Pathol** 5: 631-633, 1992.
37. Copplestone JA, Mufti GJ, Hamblin, Oscier DG. Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes II. Coexistent lymphoid or plasma cell neoplasms: a report of 20 cases unrelated to chemotherapy. **Br J Haematol** 63: 149-159, 1986.
38. Crocker J. Lymphoid aggregates in bone marrow trephines: new approaches to a continuing problem. **J Pathol** 178: 367-368, 1996.
39. Culligan DJ, Cachia P, Whittaker J, Jacobs A, Padua RA. Clonal lymphocytes are detectable in only some cases of MDS. **Br J Haematol** 81:346-352, 1992.
40. De Martinis BS, Kado NY, de Carvalho LR, Okamoto RA, Gundel LA. Genotoxicity of fractioned organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. **Mutat Res** 446: 83-94, 1999.
41. De Wolf-Peeters C. Bone marrow trephine interpretation: diagnostic utility and potential pitfalls. **Histopathology** 18: 489-493, 1991.

42. Delia D, Aiello A, Soligo D, Fontenella E, Melani C, Pezzella F, Pierotti MA, Porta GD. bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. **Blood** 79: 1291-1298, 1992.
43. Delves PJ, Roitt IM. Advances in immunology: the immune system (first of two parts). **N Engl J Med** 343:37-49, 2000a.
44. Delves PJ, Roitt IM. Advances in immunology: the immune system (second of two parts). **N Engl J Med** 343:108-117, 2000b.
45. Diebold J, Molina T, Camilleri-Broet S, Tourneau A, Audouin J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy. **Histopathology** 37: 199-211, 2000.
46. Douglas VK, Gordon LI, Goolsby CL, White CA, Peterson LC. Lymphoid aggregates in bone marrow mimic residual lymphoma after rituximab therapy for non-Hodgkin lymphoma. **Am J Clin Pathol** 112: 844-853, 1999.
47. Elghetany MT. Hodgkin's disease coexisting with myelodysplastic syndrome prior to therapy: a case report and a review of the association of Hodgkin's disease with stem cell disorders. **Ann Hematol** 75: 231-234, 1997.
48. Elghetany MT. Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Haematologica** 83: 1104-1115, 1998.
49. Enright H, Jacob HS, Vercellotti G, Howe R, Belzer M, Miller W. Paraneoplastic autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes: response to immunosuppressive therapy **Br J Haematol** 91: 403-408, 1995.
50. Escudier SM, Albitar M, Robertson LE, Andreeff M, Pierce S, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia following preleukemic syndromes in adults. **Leukemia** 10: 473-477, 1996.
51. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. **N Engl Med** 341:164-172, 1999.

52. Fakan F, Skálová A, Kuntscherová J. Expression of bcl-2 protein in distinguishing benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow biopsies. **Gen Diagn Pathol** 141: 359-363, 1995/96.
53. Falini B, Martelli MF, Tarallo F, Moir DJ, Cordell JL, Gatter KC, Loret G, Stein H, Mason DY. Immunohistological analysis of human bone marrow trephine biopsies using monoclonal antibodies. **Br J Haematol** 56: 365-386, 1984.
54. Farhi DC. Germinal centers in the bone marrow. **Hematol Pathol** 3:133-136, 1989.
55. Farhi DC. Bone marrow dysplasia: a continuing diagnostic challenge. **Am J Clin Pathol** 98:473-475, 1992.
56. Faulkner-Jones BE, Howie AJ, Boughton BJ, Franklin IM. Lymphoid aggregates in bone marrow: study of eventual outcome. **J Clin Pathol** 41: 768-775, 1988.
57. Felzmann T, Gisslinger H, Ludwig H. Immunological findings in patients with myelodysplastic syndrome. **Leuk Lymphoma** 15: 201-208, 1994.
58. Fenaux P, Preudhomme C. Anomalies moléculaires et clonalité dans les syndromes myélodysplasiques. **Path Biol** 45: 556-560, 1997.
59. Fernández-Ferrero S, Ramos F. Dyshaemopoietic bone marrow features in healthy subjects are related to age. **Leuk Res** 25: 187-189, 2001.
60. Ferrara F, Vecchio LD, Antonolfi I, Mele G, Rametta V, Cimino R. Chronic lymphocytic leukemia coexisting with chronic myelomonocytic leukemia. **Haematologica** 77: 171-173, 1992.
61. Florensa L, Vallespi T, Woessner S, Domingo A, Crespo N, Rozman M, Aguilar JL, Irriguible D, Zarco A, Milla F, Feliu E. Incidence and characteristics of lymphoid malignancies in untreated myelodysplastic syndromes. **Leuk Lymphoma** 23: 609-612, 1996.

62. Franco V, Florena AM, Aragona F, Campesi G. Immunohistochemical evaluation of bone marrow lymphoid nodules in chronic myeloproliferative disorders. **Virchows Archiv A Pathol Anat** 419: 261-266, 1991.
63. Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. **Cancer Res** 39:3119-3128, 1979.
64. Gala JL, Chenut F, Hong KBT, Rodhain J, Camby P, Philippe M, Scheiff JM. A panel of antibodies for the immunostaining of Bouin's fixed bone marrow trephine biopsies. **J Clin Pathol** 50:521-524, 1997.
65. Gallagher A, Darley RL, Padua R. The molecular basis of myelodysplastic syndromes. **Haematologica** 82: 191-204, 1997.
66. Gardais J. Dyshaemopoiesis in adults: a practical classification for diagnosis and management. **Leuk Res** 24: 641-651, 2000.
67. Gaulard P, d'Agay M-F, Peuchmaur M, Brousse N, Gisselbrecht C, Solal-Celigny P, Diebold J, Mason DY. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. **Am J Pathol** 140:1089-1095, 1992.
68. Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke RA. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non-Hodgkin's lymphomas. **Am J Clin Pathol** 102:825-834, 1994.
69. Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. **Leuk Res** 24: 983-992, 2000.
70. Gerritsen WR, Donohue J, Bauman J, Jhanwar SC, Kernan NA, Castro-Malaspina H, O'Reilly RJ, Bourhis JH. Clonal analysis of myelodysplastic syndrome: monosomy 7 is expressed in the myeloid lineage, but not in the lymphoid lineages detected by fluorescent in situ hybridization. **Blood** 80: 217-224, 1992.

71. Gown AM, de Wever N, Battifora H. Microwave - based antigenic unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. **Appl Immunohistochem** 1: 256-266, 1993.
72. Greenberg BR, Miller C, Cardiff RD, Mackenzie MR, Walling P. Concurrent development of preleukaemic, lymphoproliferative and plasma cell disorders. **Br J Haematol** 53: 125-133, 1983.
73. Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood** 89:2079-2088, 1997.
74. Greenberg PL. Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. **Leuk Res** 22:1123-1136, 1998.
75. Greenberg PL. Implications of the pathogenetic and prognostic features for management of myelodysplastic syndromes. **The Lancet** 357:1059-1060, 2001.
76. Hamblin TJ. Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Sem Hematol** 33: 150-162, 1996.
77. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. **Histopathology** 36: 69-87, 2000.
78. Hashimoto M, Hashimoto N. The occurrence of lymph nodules in human bone marrow, with particular reference to their number. **Kyushu J Med Sci** 14: 343-354, 1963.
79. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. **N Engl J Med** 340: 1649-1660, 1999.

80. Henrique R, Achten R, Maes B, Verhoef G, De Wolf-Peeters C. Guidelines for subtyping small B-cell lymphomas in bone marrow biopsies. **Virchows Arch** 435: 549-558, 1999.
81. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d' Agay MF, Briere J, Lavignac C, Fillet G, Salles G, Marolleau JP, Diebold J, Reyes F, Gaulard P. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood** 87: 265-272, 1996.
82. Hernández JM, Sánchez I, González, Orfao A, González-Sarmiento R, San Miguel JF. Acute lymphoid leukemias following either a previous chronic myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: phenotypic and genomic differences. **Am J Hematol** 43: 256-258, 1993.
83. Hoagland HC. Myelodysplastic syndromes (preleukemia) syndromes: the bone marrow factory failure problem. **Mayo Clin Proc** 70: 673-677, 1995.
84. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci** 88: 6961-6965, 1991.
85. Hofmann WK, Ottmann OG, Ganser A, Hoelzer D. Myelodysplastic syndromes: clinical features. **Semin Hematol** 33:117-185, 1996.
86. Horny HP, Engst U, Walz RS, Kaiserling E. *In situ* immunophenotyping of lymphocytes in human bone marrow: an immunohistochemical study. **Br J Haematol** 71: 313-321, 1989.
87. Horny HP, Wehrmann M, Griesser H, Tiemann M, Bultmann B, Kaiserling E. Investigation of bone marrow lymphocytes subsets in normal, reactive, and neoplastic states using paraffin-embedded biopsy specimens. **Am J Clin Pathol** 99: 142-149, 1993.

88. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem** 29:577-580, 1981.
89. Jaju RJ, Jones M, Boulton J, Kelly S, Mason DY, Wainscoat JS, Kearney L. Combined immunophenotyping and FISH identifies the involvement of B-cells in 5q- syndrome. **Genes Chromosomes Cancer** 29:276-280, 2000.
90. Jacobs A. Genetic abnormalities in myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 56: 1-6, 1991.
91. Jakovleva K, Everaus H. Some aspects of morphological and dysplastic changes of the bone marrow in malignant lymphoma. **Acta Haematol** 100: 142-146, 1998.
92. Janssen JW, Buschle M, Layton M, Drexler HG, Lyons J, van den Berghe H, Heimpel H, Kubanek B, Kleihauer E, Mufti GJ, Bartram CR. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. **Blood** 73: 248-254, 1989.
93. Kamel OW. Unraveling the mystery of the lymphoid follicle. **Am J Pathol** 155: 681-682, 1999.
94. Kamp HV, Fibbe WE, Jansen RPM, Keur MVD, Graaff ED, Willemze R, Landegent JE. Clonal involvement of granulocytes and monocytes, but not of T and B lymphocytes and natural killer cells in patients with myelodysplasia: analysis by x-linked restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction of the phosphoglycerate kinase gene. **Blood** 80: 1774-1780, 1992.
95. Kampmeier P, Anastasi J, Vardiman JW. Issues in the pathology of the myelodysplastic syndromes. **Hematol Oncol Clin North Am** 6: 501-522, 1992.
96. Karp JE. Molecular pathogenesis and targets for therapy in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-related leukemias. **Curr Opin Oncol** 10: 3-9, 1998.

97. Kitagawa M, Kamiyama R, Takemura T, Kasuga T. Bone marrow analysis of the myelodysplastic syndromes: histological and immunohistochemical features related to the evolution to overt leukemia. **Virchows Archiv B Cell Pathol** 57: 47-53, 1989.
98. Kluin-Nelemans JC, van Wering ER, van't Veer MB, van der Schoot CE, Adriaansen HJ, van der Burgh FJ, Gratama JW. Pitfalls in the immunophenotyping of leukaemia and leukaemic lymphomas: survey of 9 years of quality control in The Netherlands. **Br J Haematol** 95: 692-699, 1996.
99. Knowles DM. Immunophenotypic and immunogenotypic approaches useful in distinguishing benign and malignant lymphoid proliferations. **Sem Oncol** 20:583-610, 1993.
100. Kondo E, Nakamura S, Onoue H, Matsuo Y, Yoshino T, Aoki H, Hayashi K, Minowada J, Nomura S, Akagi T. Detection of bcl-2 protein and bcl-2 messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Blood** 80: 2044-2051, 1992.
101. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **Blood** 4: 879-886, 1992.
102. Kouides PA, Bennett JM. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their variants. **Sem Hematol** 33: 95-110, 1996.
103. Kouides PA, Bennett JM. Transformation of chronic myelomonocytic leukemia to acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature of lymphoblastic transformation of myelodysplastic syndrome. **Am J Hematol** 49: 157-162, 1995.
104. Kristensen JS, Hokland P. Monoclonal antibody ratios in malignant myeloid diseases: diagnostic and prognostic use in myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol** 74: 270-276, 1990.

105. Kubic VL, Brunning RD. Immunohistochemical evaluation of neoplasms in bone marrow biopsies using monoclonal antibodies reactive in paraffin-embedded tissue. **Mod Pathol** 2: 618-629, 1989.
106. Lambertenghi-Deliliers G, Annaloro C, Oriani A, Soligo D, Pozzoli E, Polli EE. Prognostic relevance of histological findings on bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes **Ann Hematol** 66: 85-91, 1993.
107. Lambertenghi-Deliliers G, Annaloro C, Soligo D, Oriani A, Pozzoli E, Quirici N, Luksch R, Polli EE. Incidence and histological features of bone marrow involvement in malignant lymphomas. **Ann Hematol** 65: 61-65, 1992.
108. Lambertenghi-Deliliers G, Annaloro C, Soligo D, Oriani A. The diagnostic and prognostic value of bone marrow immunostaining in myelodysplastic syndromes. **Leuk Lymphoma** 28:231-239, 1998.
109. Laroche M, Ludot I, Brousset P, Mazières B. Osteoporosis with lymphoid nodules and hematopoietic marrow hyperplasia. **Clin Exp Rheumatol** 17: 457-460, 1999.
110. List AF, Garewal HS, Sandberg AA. The myelodysplastic syndromes: biology and implications for management. **J Clin Oncol** 8: 1424-1441, 1990.
111. List AF, Jacobs A. Biology and pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. **Sem Oncol** 19: 14-24, 1992
112. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II-Normal B lymphocyte development. **Blood** 70: 1316-1324, 1987.
113. Lorand-Metze I, Arruda VR, Vassallo J. Differential diagnosis between HIV-related marrow abnormalities and primary myelodysplasia. **Pathol Res Pract** 187: 719, 1991.
114. Maeda K, Hyun BH, Rebeck JW. Lymphoid follicles in bone marrow aspirates. **Am J Clin Pathol** 67: 41-48, 1977.

115. Maes B, Achten R, Demunter A, Peeters B, Verhoef G, De Wolf-Peeters C. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry and molecular analysis. **J Clin Pathol** 53: 835-840, 2000.
116. Magalhães SMM, Rocha F° FD, Duarte FB, Ponte LP, Holanda RARR. Nódulos linfóides na medula óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplástica - relato de três casos. **J Bras Patol** 33: 126-132, 1997.
117. Magalhães SMM. Síndromes mielodisplásticas – caracterização morfológica e imunohistoquímica quanto à expressão da proteína p53. Fortaleza, 1997. (Dissertação – Mestrado – Universidade Federal do Ceará).
118. Makinodan T, Kay MMB. Age influence on the immune system. **Adv Immunol** 29: 287-330, 1980.
119. Mangi MH, Mufti GJ. Primary myelodysplastic syndromes: diagnostic and prognostic significance of immunohistochemical assessment of bone marrow biopsies. **Blood** 79: 198-205, 1992.
120. Manoharan A, Catovsky D, Clein P, Traub NE, Costello C, O'Brien M, Boralessa H, Galton DAG. Simultaneous or spontaneous occurrence of lympho- and myeloproliferative disorders: a report of four cases. **Br J Haematol** 48: 111-116, 1981.
121. Maschek H, Gergii A, Kaloutsi V, Werner M, Bandekar K, Kressel MG, Choritz H, Freund M, Hufnagl D. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a retrospective study of 352 patients. **Eur J Hematol** 48: 208-214, 1992.
122. McKenna RW, Hernandez J A. Bone marrow in malignant lymphoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 2: 617-635, 1988.
123. Mijovic A, Mufti GJ. The myelodysplastic syndromes: towards a functional classification. **Blood Reviews** 12: 73-83, 1998.

124. Moir DJ, GhoshAK, Abdulaziz Z, Knight PM, Mason DY. Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies. **Br J Haematol** 55: 395-410, 1983.
125. Mongkonsritragoon W, Letendre L, Li CY. Multiple lymphoid nodules in bone marrow have the same clonality as underlying myelodysplastic syndrome recognized with fluorescent in situ hybridization technique. **Am J Hematol** 59: 252-257, 1998.
126. Mufti GJ, Figs A, Hamblin TJ, Oscier DG, Copplestone JA. Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes I. serum immunoglobulins and autoantibodies. **Br J Haematol** 63: 143-147, 1986.
127. Navone R, Pich A, Fiammotto M, Magnani C. Bone marrow histopathology and prognosis in malignant lymphomas. **Tumori** 78: 176-180, 1992.
128. Navone R, Ranco V, Pich A. Evoluzione in leucemia acuta di displasie emopoietiche: fattori istopatologici prognostici in una casistica di biopsie osteomidollari. **Pathologica** 83: 55-63, 1991.
129. Navone R, Valpreda M, Pich A. Lymphoid nodules and nodular lymphoid hyperplasia in bone marrow biopsies. **Acta Haemat** 74: 19-22, 1985.
130. Ngan BY, Picker LJ, Medeiros LJ, Warnke RA. Immunophenotypic diagnosis of non-Hodgkin lymphoma in paraffin sections. Co-expression of L60 (Leu-22) and L26 antigens correlates with malignant histologic findings. **Am J Clin Pathol** 91:579-583, 1989.
131. Nisse C, Haglenoer JM, Grandbastien B, Preudhomme C, Fontaine B, Brillet JM, Lejeune R, Fenaux P. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. **Br J Haematol** 112:927-935, 2001.

132. Norton AJ, Ramsay AD, Smith SH, Beverley PCL, Isaacson PG. Monoclonal antibody (UCHL1) that recognises normal and neoplastic T cells in routinely fixed tissues. **J Clin Pathol** 39: 399-405, 1986.
133. Norton AJ, Isaacson PG. Monoclonal antibody L26: an antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely fixed and paraffin wax embedded tissues. **J Clin Pathol** 40: 1405-1412, 1987.
134. Novaretti MC, Sopelete CR, Velloso ER, Rosa MF, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Immunohematological findings in myelodysplastic syndrome. **Acta Haematol** 105:1-6, 2001.
135. Nunez G, Hockenbery D, McDonnell TJ, Sorensen CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. **Nature** 353: 71-73, 1991.
136. O'Donnell LR, Alder SL, Balis UJ, Perkins SL, Kjeldsberg CR. Immunohistochemical reference ranges for B lymphocytes in bone marrow biopsy paraffin sections. **Am J Clin Pathol** 104:517-523, 1995.
137. Okamoto T, Okada M, Mori A, Saheki K, Takatsuka H, Wada H, Tamura A, Fujimori Y, Takemoto Y, Kanamaru A, Kakishita E. Correlation between immunological abnormalities and prognosis in myelodysplastic syndrome patients. **Int_J Hematol** 66: 345-351, 1997.
138. Park DJ, Koeffler HP. Therapy-related myelodysplastic syndromes. **Semin Hematol** 33:256-273, 1996.
139. Parker JE, Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol** 101:220-230, 1998.
140. Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologists? **Histopathology** 26: 89-93, 1995.

141. Pezzella F, Jones M, Ralfkiaer E, Ersboll J, Gatter KC, Mason DY. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. **Br J Cancer** 65:87-89, 1992.
142. Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Pulford KAF, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogen protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. **Am J Pathol** 137: 225-232, 1990.
143. Perkins SL, Kjeldsberg CR. Immunophenotyping of lymphomas and leukemias in paraffin-embedded tissues. **Am J Clin Pathol** 99: 362-373, 1993.
144. Picker LJ, Weiss LM, Medeiros LJ, Wood GS, Warnke RA. Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. **Am J Pathol** 128: 181-201, 1987.
145. Pileri AS, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Sabattini E, Briskomatis A, Santini D, Leone O, Piccaluga PP, Leoncini L, Falini B. Immunohistochemistry of bone marrow biopsy. **Leuk Lymphoma** 26: 69-75, 1997.
146. Pizzolo G, Chilosi M, Cetto GL, Fiore-Donati L, Janossy G. Immuno-histological analysis of bone marrow involvement in lymphoproliferative disorders. **Br J Haematol** 50: 95-100, 1982.
147. Puthier D, Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Robillard N, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M. Differential expression of bcl-2 in human plasma cell disorders according to proliferation status and malignancy. **Leukemia** 13: 289-294, 1999.
148. Ramos F, Fernandez-Ferrero S, Suarez D, Barbon M, Rodrigues JÁ, Gil S. Myelodysplastic syndrome: a search for minimal diagnostic criteria. **Leuk Res** 23:283-290, 1999.
149. Raskind WH, Tirumali N, Jacobson R, Singer J, Fialkow PJ. Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. **Blood** 63: 1318-1323, 1984.

150. Raza A, Mundle S, Shetty V, Choppa H, Span L, Parcharidou A, Dar S, Venugopal P, Borok R, Gezer S, Showel J, Loew J, Robin E, Rifkin S, Alston D, Hernandez B, Shah R, Kaizer H, Gregory S. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. **Int J Hematol** 63: 265-278, 1996a.
151. Raza A, Mundle S, Shetty V, Choppa H, Span L, Parcharidou A, Dar S, Venugopal P, Borok R, Gezer S, Showel J, Loew J, Robin E, Rifkin S, Alston D, Hernandez B, Shah R, Kaizer H, Gregory S, Preisler H. A paradigm shift in myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 10: 1648-1652, 1996b.
152. Raza A. Hypothesis: myelodysplastic syndromes may have a viral etiology. **Int J Hematol** 68: 245-256, 1998a.
153. Raza A. Initial transforming event in myelodysplastic syndromes may be viral: case for cytomegalovirus. **Med Oncol** 15: 165-173, 1998b.
154. Reddy VV. Topics in bone marrow biopsy pathology: role of marrow topography in myelodysplastic syndromes and evaluation of post-treatment and post-bone marrow transplant biopsies. **Ann Diagn Pathol** 5:110-120, 2001.
155. Rego EM, Garcia AB, Viana SR, RP Falcão. Age-related changes of lymphocyte subsets in normal bone marrow biopsies. **Cytometry** 34:22-29, 1998.
156. Reizenstein P, Ost A. What is MDS? Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndrome in clinical practice. **Leuk Res** 16: 1-11, 1992.
157. Reza S, Dar S, Andric T, Qawi H, Mundle S, Shetty V, Venugopal P Ali I, Lisak L Raza A . Biologic characteristics of 164 patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk Lymphoma** 33: 281-287, 1999.
158. Rios A, Cañizo MC, Sanz MA, Vallespi T, Sanz G, Torrabadella M, Gomis F, Ruiz C, San Miguel JF. Bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes: morphological characterization and contribution to the study of prognostic factors. **Br J Haematol** 75: 26-33, 1990.

159. Rockman SP. Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. **Leukemia**, 11: 852-862, 1997.
160. Rosati S, Mick R, Xu F, Le Beau MM, Larson R, Vardiman RW. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia: further characterization of an "unclassifiable" myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 10: 20-26. 1996.
161. Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. **Leukemia** 14: 2-8, 2000.
162. Rosenthal NS, Farhi DC. Bone marrow findings in connective tissue disease. **Am J Clin Pathol** 92: 650-654, 1989.
163. Rupniewska ZM, Rolinski J, Siedlecki JA Myelodysplastic syndrome associated with clonal proliferation of B lymphocytes. **Kliniki Haematologii AM Lulinie** 24: 57-64, 1993.
164. Rywlin AM, Ortega RS, Dominguez CJ. Lymphoid nodules of bone marrow: normal and abnormal. **Blood** 43: 389-400, 1974.
165. Saad STO, Vassallo J, Arruda VA, Lorand-Metze I. The role of bone marrow study in diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndrome. **Pathologica** 86: 47-51, 1994.
166. Saba HI. Myelodysplastic syndromes in the elderly. **Cancer Control** 8:79-102, 2001.
167. Salisbury JR, Deverell MH, Cookson MJ. Three - dimensional reconstruction of benign lymphoid aggregates in bone marrow trephines. **J Pathol** 178: 447-450, 1996.
168. Salisbury LR, Deverell MH, Seaton JM, Cookson MJ. Three-dimensional reconstruction of non-Hodgkin's lymphoma in bone marrow trephines. **J Pathol** 181: 451-454, 1997.

169. Sangster G, Crocker J, Nar P, Leyland MJ. Benign and malignant (B cell) focal lymphoid aggregates in bone marrow trephines shown by means of an immunogold-silver technique. **J Clin Pathol** 39: 453-457, 1986.
170. Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T. Etiopathogeny, prognosis and therapy of myelodysplastic syndromes. **Hematol Cell Ther** 39:277-294, 1997.
171. Sasi Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Fujii H, Kashima K, Taniwaki M. Genotype of glutathione S-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. **Leuk Res** 23:975-981, 1999.
172. Schlesinger M, Silverman LR, Jiang JD, Yagi MJ, Holland JF, Bekesi JG. Analysis of myeloid and lymphoid markers on the surface and in the cytoplasm of mononuclear bone marrow cells in patients with myelodysplastic syndrome. **J Clin Lab Immunol** 48: 149-166, 1996.
173. Schmid C, Isaacson PG. Bone marrow trephine biopsy in lymphoproliferative disease. **J Clin Pathol** 45: 745-750, 1992.
174. Schulze R, Schlimok G, Renner D. Coincidence of primary myelodysplatic syndrome and non-Hodgkin lymphoma. **Clin Investig** 70: 1082-1084, 1992.
175. Schwonzen M, Pohl C, Steinmetz T, Wickramanayake PD, Thiele J, Diehl V. Bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma: increased diagnostic sensitivity by combination of immunocytology, cytomorphology and trephine histology. **Br J Haematol** 81: 362-369, 1992.
176. Segal GH, Stoler MH, Fishleder AJ, Tubbs RR. Reliable and cost-effective paraffin section immunohistology of lymphoproliferative disorders. **Am J Surg Pathol** 15: 1034-1041, 1991.
177. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J Histochem Cytochem** 39: 741-748, 1991.

178. Shin SS, Sheibani K, Kezirian J, Nademanee A, Forman SJ, Lee SK, Winberg CD. Immunoarchitecture of normal human bone marrow. **Hum Pathol** 23:686-694, 1992.
179. Skalova A, Fakan F. Bcl-2 does not help to distinguish benign from malignant lymphoid nodules in bone marrow biopsy specimens. **J Clin Pathol** 50: 87-88, 1997.
180. Stahl D, Egerer G, Goldschmidt H, Sibrowski W, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Altered self-reactive antibody repertoires are a general feature of patients with myelodysplastic syndrome. **J Autoimmun** 16:77-86, 2001.
181. Steensma DP, Hanson CA, Letendre L, Tefferi A. Myelodysplasia with fibrosis: a distinct entity? **Leuk Res** 25:829-838, 2001.
182. Sylvester LS, Nowell PC, Bonner H, Moreau L, Moore JS. Concurrent diagnosis of chronic lymphocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. **Leuk Res** 21: 619-621, 1997.
183. Tarlinton D. Germinal centers: form and function. **Cur Opin Immunol** 10: 245-251, 1998.
184. Taylor CR, Shi SR, Cote RJ. Antigen retrieval for immunohistochemistry - status and need for greater standardization. **Appl Immunohistochem** 4: 144-166, 1996.
185. Thaler J, Dietze O, Denz H, Demuth R, Nachbaur D, Stauder R, Huber H. Bone marrow diagnosis in lymphoproliferative disorders: comparison of results obtained from conventional histomorphology and immunohistology. **Histopathology** 18:495-504, 1991.
186. Thaler J, Greil R, Dietze O, Huber H. Immunohistology for quantification of normal bone marrow lymphocyte subsets. **Br J Haematol** 73: 576-577, 1989.

187. Thiele J, Zirbes TK, Kvasnicka HM, Fischer R. Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma - a practical guideline. **J Clin Pathol** 52: 294-300, 1999.
188. Tooze JA, Marsh JCW, Gordon-Smith EC. Clonal evolution of aplastic anaemia to myelodysplasia/acute myeloid leukaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Leuk Lymphoma** 33:231-241, 1999.
189. Toren A, Ben-Bassat I, Rechavi G. The gray zone between malignant and reactive processes in lymphoproliferative diseases. **Acta Haematol** 96: 120-125, 1996.
190. Tricot G, De Wolf-Peeters C, Hendrickx B, Verwilghen RL. Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes: I. Histological findings in myelodysplastic syndromes and comparison with bone marrow smears. **Br J Haematol** 57: 423-430, 1984a.
191. 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. **Br J Haematol** 58: 217-225, 1984b.
192. Tuzuner N, Cox C, Rowe JM, Watrois D, Bennett JM. Hypocellular myelodysplastic syndrome (MDS): new proposals. **Br J Haematol** 91:612-617, 1995.
193. Uematsu M, Ochi H, Yukihiro U, Hakamata Y, Yokode M, Yoshida Y, Kita T. Coexistent myelodysplastic syndrome and non-Hodkin lymphoma. Report of a case and review of the literature. **Int J Hematol** 62: 45-51, 1995.
194. Van der Valk P, Mullink H, Huijgens PC, Tadema TM, Vos W, Meijer CJLM. Immunohistochemistry in bone marrow diagnosis. Value of a panel of monoclonal antibodies on routinely processed bone marrow biopsies. **Am J Surg Pathol** 13: 97-106, 1989.
195. Vassallo J. Hematopatologia-aspectos gerais. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J, editores. Manual de Imunohistoquímica. São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Patologia p.127-132, 1999.

196. Veloso JD, Rezuze WN, Cartun RW, Abernathy EC, Pastuszak WT. Immunohistochemical distinction of follicular lymphoma from follicular hyperplasia in formalin-fixed tissues using monoclonal antibodies MT2 and bcl-2. **Appl Immunohistochem** 3: 153-159, 1995.
197. Wang T, Lasota J, Hanau CA, Miettinen M. Bcl-2 oncoprotein is widespread in lymphoid tissue and lymphomas but its differential expression in benign versus malignant follicles and monocytoid B-cell proliferations is of diagnostic value. **APMIS** 103: 655-662, 1995.
198. Weimar IS, Bourhis JH, De Gast GC, Gerritsen WR. Clonality in myelodysplastic syndromes. **Leuk Lymphoma** 13: 215-221, 1994.
199. Weiss LM, Arber DA, Chang KL. CD45. **Appl Immunohistochem** 1: 166-181, 1993.
200. Wells DA, Hall MC, Shulman HM, Loken MR. Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias. **Leukemia** 12: 2015-2023, 1998.
201. Werner M, Kaloutsi V, Walter K, Buhr T, Bernhards J, Georgii A. Immunohistochemical examination of routinely processed bone marrow biopsies. **Path Res Pract** 188: 707-713, 1992.
202. West RR, Stafford DA, Farrow A, Jacobs A. Occupational and environmental exposures and myelodysplasia: a case-control study. **Leuk Res** 19:127-139, 1995.
203. Williamson PJ, Kruger AR, Reynolds PJ, Hamblin TJ, Oscier DG. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol** 87:743-745, 1994.
204. Wu GQ, Sharp JG, Wu G, Vose J, Greiner TC, Chan WC. The detection of minimal lymphoma by molecular and combined culture-molecular methods. **Br J Haematol** 99: 873-881, 1997.
205. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl-2 family and cell death. **Blood** 88: 386-401, 1996.

206. Yoshida Y, Mufti GJ. Apoptosis and its significance in MDS: controversies revisited. **Leuk Res** 23: 777-785, 1999.
207. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ. Immunolocalization of the bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. **Blood** 78: 1062-1068, 1991.



ANEXOS

ANEXO 1 - SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS

PROTOCOLO

1. PRONTUÁRIO Nº: _____ FICHA Nº _____
NOME: _____
IDADE: _____ SEXO: _____ COR: _____ EST. CIVIL: _____
PROCEDÊNCIA: _____ PROFISSÃO: _____
ENDEREÇO: _____
2. EXPOSIÇÃO A AGENTES MUTAGÊNICOS: ☐ SIM ☐ NÃO
ESPECIFICAR: _____
3. PRIMEIROS SINTOMAS: _____
(QUEIXA PRINCIPAL RELACIONADA À SÍNDROME ANÊMICA, SIND. INFECCIOSA,
SIND. PURPÚRICA OU OUTROS)
4. DATA DOS PRIMEIROS SINTOMAS: _____
(ATÉ O DIAGNÓSTICO EM MESES)
5. EXAME FÍSICO:

☐ PALIDEZ	☐ GÂNGLIOS _____
☐ FEBRE	☐ FÍGADO _____ cm
☐ MANIF. HEMORRÁGICAS	☐ BAÇO _____ cm
☐ PERDA PONDERAL	☐ OUTROS _____
6. EXAMES LABORATORIAIS:
HEMOGRAMA INICIAL EM: ____/____/____
GV: ____ HTC: ____ % HB: ____ g/dl VCM: ____ fl
MORFOLOGIA: ☐ ANISOCITOSE ☐ POIQUILOCITOSE
☐ MICROCITOSE ☐ MACROCITOSE
☐ HIPOCROMIA ☐ PONT. BASOFILO
☐ HOWELL JOLLY ☐ OUTROS

LEUCÓCITOS: _____ / L
MB _____ PRO _____ MIE _____ BAST _____ SEG _____ EO _____
BAS _____ LI _____ MO _____ ERITROBLASTOS/100: _____
OBS: _____

PLAQUETAS: _____ /L RETICULÓCITOS: _____ /L
FERRO SÉRICO: _____ mg/dl C.L.L.F.: _____ mg/dl I.S.T.: _____ %
TRANSFERRINA: _____ mg/dl

MIELOGRAMA

CELULARIDADE: [] NORMO [] HIPER [] HIPO [] NÃO AVALIADA
RELAÇÃO MIELÓIDE/ERITRÓIDE: _____:_____

CELULARIDADE ESPECÍFICA:

LINHAGEM	NORMO	HIPO	HIPER	PREJUDICADA
S.E.	[]	[]	[]	[]
S.G.	[]	[]	[]	[]
S.M.	[]	[]	[]	[]

DISPOESES (+ a ++++):

SÉRIE ERITRÓIDE: [] SÉRIE GRAN.: [] SÉRIE MEGA: []

BLASTOS: _____ % AUER: _____

PERLS: _____

CITOQUÍMICA: _____

CITOGENÉTICA: _____

BIÓPSIA ÓSSEA (1ª) EM ____/____/____

CELULARIDADE ESTIMADA: _____

ALIP: _____ FIBROSE: _____

DESCRIÇÃO: _____

IMUNOHISTOQUÍMICA: _____

TAP: ____ % ____ seg. TTPA: ____ seg. COOMBS DIRETO: _____

URÉIA: ____ mg/dl CREATININA: ____ mg/dl TGO: ____ mg/dl TGP: ____ mg/dl

BILIRRUBINAS T: ____ mg/dl D: ____ mg/dl I: ____ mg/dl LDH: _____

T3: _____ T4: _____ TSH: _____

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS: _____

FAN: _____ CEL. LE.: _____ F.R.: _____ HBsAg: _____

ANTI-HCV: _____ HIV: _____ HTLV 1 e 2 : _____

DOS. B₁₂: _____ DOS. AC. FÓLICO: _____ HAM: _____

7. CLASSIFICAÇÃO: ☐ AR ☐ ARSA ☐ AREB ☐ AREB-t ☐ LMMC

ASSOCIAÇÃO COM MIELOFIBROSE: _____

8. EVOLUÇÃO PARA FORMAS MAIS AGRESSIVAS:

☐ SIM

☐ NÃO

9. TRANSFORMAÇÃO PARA LEUCEMIA AGUDA:

☐ SIM

☐ NÃO

TEMPO DE EVOLUÇÃO PARA LEUCOSE AGUDA: _____

(DA PRIMEIRA CONSULTA AO DIAGNÓSTICO DE LEUCOSE AGUDA)

10. PERÍODO DE AVALIAÇÃO: _____

(DA PRIMEIRA CONSULTA À ÚLTIMA NOTÍCIA)

11. ÚLTIMA NOTÍCIA: DATA: ____/____/____

ESTADO CLÍNICO: _____

☐ ÓBITO EM : ____/____/____

☐ SEM NOTÍCIA

☐ OUTROS: _____

12. OBSERVAÇÃO: _____

ANEXO 2 - Relação dos 206 pacientes portadores de SMD de acordo com suas características clínicas e laboratoriais, classificação FAB, seguimento, achados histopatológicos e origem.

paciente	idade	sexo	hb	n abs	plaq	sg	sit	FAB	nod linf	lma	fibr	origem
1	37	m	8.4	1.03	63	559	0	areb	0	0	1	1
2	47	f	5.4	2.95	62	2499	0	arsa	0	0	0	1
3	52	f	5.9	2.44	184	1572	0	f	1	0	1	1
4	55	f	12.1	1.7	181	93	0	ar	0	0	0	1
5	81	f	7.8	1.39	194	68	0	arsa	0	0		1
6	48	m	13.4	3.65	90	1529	0	ar	0	0	0	1
7	89	f	10.6		94	1516	0	ar	0	0	1	1
8	52	m	5.7	0.41	22	1589	0	ar	0	0	0	1
9	55	m	5.4	0.68	119	281	1	ar	0	0	1	1
10	50	f	5	3.83	345	1712	0	ar	0	0	1	1
11	49	m	8.8	1.94	109	104	1	areb	0	1	1	1
12	30	m	7.5	1.11	23	1466	0	ar	0	0	0	1
13	88	m	7.2	1.99	83	30	0	areb	1	0	0	1
14	27	m	10.4	1.37	16	2	0	ar	0	0	0	1
15	81	f	9.8	3.5	227	1162	0	ar	0	0	1	1
16	57	f	11.1	3.89	106	366	0	ar	0	0	0	1
17	82	f	7.8	1.39	194	68	0	arsa	0	0	1	1
18	61	m	10.9	0.56	51	165	1	areb	0	1	0	1
19	61	f	9.2	0.92	39	1385	1	ar	0	0	0	1
20	86	m	11	1.35	25	28	0	ar	0	0	0	1
21	46	f	6.8	1.17	103	30	1	ar	1	0	0	1
22	36	m	11.8	1.23	12	163	1	ar	0	1	0	1
23	71	f	12	1.26	68	904	0	ar	1	0	1	1
24	63	f	7.8	2.44	147	360	0	f	1	0	1	1
25	45	f	13.3	1.67	28	2090	0	ar	1	0	1	1
26	15	f	12.8	1.68	284	812	0	ar	0	0	0	1
27	59	f	11.5	7.74	588	454	1	areb	1	0	1	1
28	73	m	6.8	0.72	239	1092	0	ar	1	0		1
29	72	m	6.5	1.08	180	2984	0	ar	0	0	0	1
30	68	f	6.7	3.17	27	173	1	lmmc	0	0		1
31	29	m	6.5	1.08	180	2018	0	ar	0	0	0	1
32	62	f	12.9	1.48	233	784	0	ar	0	0	0	1
33	37	f	15.3	1.46	117	1190	0	ar	0	0	0	1
34	49	f	14.8	1.08	228	1299	0	ar	0	0	0	1
35	74	f	9.5	1.68	270	1043	0	arsa	0	0	1	1
36	44	f	5.9		200	747	0	ar	1	0		1
37	53	m	15.6		151	365	0	ar	0	0	1	1
38	52	f	8.2	4.94	6	365	0	ar	0	0		1
39	41	m	7.8	1.51	36	866	1	ar	0	0	0	1
40	16	m	13.3	1.85	45	1998	0	ar	0	0	0	1
41	74	m	6.1	0.25	28	360	0	ar	0	0	0	1
42	40	m	6.1	1.08	54	1107	1	ar	1	1	1	1
43	24	m	6.4	3.64	460	434	0	ar	0	0	0	1
44	84	m	9.8	10.6	202	92	0	lmmc	0	0		1
45	59	f	15.9	0.9	130	603	0	ar	0	0	0	1
46	54	m	13.9	0.68	244	371	0	ar	0	0	0	1
47	52	f	8.8	3.36	33	30	1	areb	1	1	0	1

ANEXO 2 - Relação dos 206 pacientes portadores de SMD de acordo com suas características clínicas e laboratoriais, classificação FAB, seguimento, achados histopatológicos e origem.

paciente	idade	sexo	hb	n abs	plaq	sg	sit	FAB	nod linf	lma	fibr	origem
48	26	m	8.7		254	189	0	ar	0	0		1
49	48	f	8.8	1.83	4	794	0	ar	0	0	0	1
50	50	m	7.3	1.65	62	916	0	areb	1	0	1	1
51	41	f	12.4	1.29	298	941	0	ar	0	0	0	1
52	58	f	9.1	2.29	39	537	1	lmmc	0	1		1
53	83	f	7.9	2.04	258	1332	0	arsa	0	0	0	1
54	48	m	11.5	1.57	26	353	0	arsa	0	1	1	1
55	72	m	11.6	1.25	108	63	0	ar	0	0	0	1
56	56	m	5.9	1.19	120	791	0	arsa	1	0		1
57	55	f	12	1.15	25	600	0		1	0	0	1
58	42	m	7.8	1.23	58	288	1	ar	0	0		1
59	28	m	13.4	1.29	151	546	0	ar	0	0	0	1
60	29	f	10.6	0.88	158	539	0	ar	1	0	0	1
61	68	m	13.6	1.33	131	266	0	ar	0	0	0	1
62	25	f	12.5	1.77	172	934	0	ar	1	0	0	1
63	66	m	5.2	1.3	226	879	0	ar	0	0	0	1
64	58	f	6	1.96	17	1251	0	ar	0	0	0	1
65	28	f	11.4	1.3	242	394	0	ar	0	0	0	1
66	26	f	9.3	1.5	35	729	0	ar	0	0	0	1
67	62	m	8.4	3.63	226	1164	0	arsa	1	0		1
68	60	f	6.9	3.3	86	793	0	ar	1	1	1	1
69	58	f	7.2	3	120	1740	0	ar	1	0	0	2
70	63	m	14.1	4.92	138	450	1	lmmc	1	1	0	2
71	59	f	6.9	5.33	677	810	0	ar	1	0	0	2
72	76	f	9.1	1.35	309	1470	0	f	1	0	1	2
73	48	m	4.9	1.92	37	270	1	areb	1	1	1	2
74	68	f	10.3	2.03	30	420	0	ar	1	0	0	2
75	40	f	6.4	1.38	184	450	0	ar	1	0	0	2
76	79	f	7.5	4.11	352	720	0	ar	1	0	1	2
77	49	f	9.2	2.2	144	1020	0		1	0	1	2
78	85	m	6.2	2.17	150	510	1	ar	1	0	1	2
79	51	f	8.9	3.65	280	750	0	ar	1	0	0	2
80	48	f	3.5	0.74	70	1020	0	ar	1	0	1	2
81	74	m	8.8	2.91	73	510	0	areb	1	0	1	2
82	58	f	9.7	3.08	4	270	0	ar	1	0	1	2
83	34	f	5.9	3.82	14	1200	0	ar	1	0	0	2
84	73	m	7.1	1.77	120	1740	0	areb	1	0	0	2
85	49	m	8.2	4.06	175	570	0	arsa	1	0	0	2
86	36	f	5.6	2.85	285	390	0	ar	1	0	0	2
87	71	m	6.1	5.54	42	90	0	ar	1	1	1	2
88	48	f	12.2	1.9	111	150	0	ar	1	0	0	2
89	57	m	6.2	4.35	175	1440	0	ar	1	0	1	2
90	52	f	7.8	6.23	84	60	1	areb	1	0	0	2
91	65	m	6.6	12.6	127	90	0	ar	1	0	0	2
92	41	f	7.8	0.05	88	450	0	areb	1	1	0	2
93	68	m	7.4	0.39	40	90	1	ar	1	1	1	2
94	55	m	6.2	0.78	23	540	1	ar	1	1	1	2

ANEXO 2 - Relação dos 206 pacientes portadores de SMD de acordo com suas características clínicas e laboratoriais, classificação FAB, seguimento, achados histopatológicos e origem.

paciente	idade	sexo	hb	n abs	plaq	sg	sit	FAB	nod linf	lma	fibr	origem
95	45	f	6.5	0.66	17	210	0	ar	1	0	1	2
96	58	f	8.3	2.65	181	1560	0	ar	0	0	1	2
97	55	m	5.2	22.1	393	480	1	lmmc	0	0	1	2
98	51	f	11.1	0.66	139	540	0	ar	0	0	0	2
99	56	m	2.2	2.85	60	60	0	ar	0	0	0	2
100	31	m	9.4	0.56	9	840	0	ar	0	0	0	2
101	65	m	5.1	4.09	315	1710	0	ar	0	0	0	2
102	60	f	10.8	0.44	158	1500	0	ar	0	0	0	2
103	65	m	8.5	0.84	15	1050	0	ar	0	0	0	2
104	61	m	13.1	1.33	175	810	0	ar	0	0	0	2
105	85	m	9.6	2.25	149	630	1	arsa	0	0	0	2
106	78	m	11.2	4.5	41	240	0	ar	0	0	0	2
107	76	m	10.6	0.44	32	420	0	ar	0	0	0	2
108	75	m	13.1	5.04	19	180	0	arsa	0	0	1	2
109	72	m	5.1	0.6	67	330	1	arsa	0	1	1	2
110	70	m	6.9	1.79	88	570	0	ar	0	0	0	2
111	75	m	13.4	0.7	61	900	0	arsa	0	0	0	2
112	85	m	8.7	5.35	49	360	0	ar	0	0	0	2
113	89	m	8.1	2.01	441	660	0	arsa	0	0	1	2
114	55	m	11	1.73	220	1200	0	ar	0	0	1	2
115	60	m	9.2	2.07	135	1560	0	ar	0	0	0	2
116	29	m	5.2	2.61	405	90	0	arsa	0	0	0	2
117	62	f	10.6	1.71	146	180	0	ar	0	0	0	2
118	54	f	10.1	2.29	164	1620	0	ar	0	0	0	2
119	82	m	8.1	2.66	760	480	1	f	0	1	1	2
120	35	f	11.4	1.4	150	900	0	ar	0	0	0	2
121	33	m	12.9	0.6	134	60	1	areb	0	1		2
122	50	f	7.1	0.65	111	540	1	ar	0	1	1	2
123	38	f	3.1	0.6	12	1020	0	ar	0	0	0	2
124	75	f	5.2	0.2	19	150	1	areb	0	0	0	2
125	66	f	5.1	1.06	14	900	0	ar	0	0	0	2
126	43	f	8.3	0.41	12	510	0	ar	0	0	1	2
127	57	f	9.2	0.96	150	210	1	ar	0	1	0	2
128	66	f	9.8	4.04	110	1230	0	ar	0	0	0	2
129	77	f	6.1	3.11	315	690	0	ar	0	0		2
130	76	f	7.9	1.57	119	180	0	ar	0	0	0	2
131	69	f	10.9	1.61	25	750	0	ar	0	0	0	2
132	61	f	10.7	2.38	256	900	0	ar	0	0	0	2
133	66	f	7.6	1.88	190	360	0	ar	0	0	0	2
134	39	f	6.9	3.2	164	510	0	ar	0	0	1	2
135	75	f	6.5	0.5	5	60	1	lmmc	0	1	0	2
136	46	f	4.6	0.62	35	900	0	ar	0	0	1	2
137	45	f	12.1	3.53	51	210	0	ar	0	0	0	2
138	82	f	8.7	2.16	255	480	0	ar	0	0	0	2
139	72	f	5.7	0.5	26	60	0	ar	0	0	0	2
140	71	f	7.4	2.54	250	60	0	ar	0	0	0	2
141	64	m	3.3	7.6	93	300	1	lmmc	0	1	1	2

ANEXO 2 - Relação dos 206 pacientes portadores de SMD de acordo com suas características clínicas e laboratoriais, classificação FAB, seguimento, achados histopatológicos e origem.

paciente	idade	sexo	hb	n abs	plaq	sg	sit	FAB	nod	linf	lma	fibr	origem
142	70	f	10.1	2.89	37	510	0	arsa	0	0	0	0	2
143	74	f	6.5	1.22	4	1680	0	ar	0	0	0	0	2
144	46	f	11.3	0.86	295	1110	0	ar	0	0	0	0	2
145	54	f	9.1	1.08	270	60	0	ar	0	0	0	1	2
146	64	f	11.6	2.4	199	720	0	ar	0	0	0	0	2
147	69	f	10.3	1.58	88	270	0	ar	0	0	0	0	2
148	69	f	8.3	2.4	58	180	0	ar	0	0	0	1	2
149	67	f	11.1	4.67	31	690	0	ar	0	0	0	1	2
150	67	f	8.9	4.88	461	690	0	ar	0	0	0	0	2
151	74	f	11.1	1.16	77	1320	0	arsa	0	0	0	0	2
152	22	m	7.6	0.33	9	240	1	areb	0	1	1	0	2
153	21	m	6.1	4.48	16	120	1	areb	0	1	1	0	2
154	58	f	5.6	1.72	14	90	1	areb	0	1	1	1	2
155	63	m	7.1	3.86	230	1170	1	lmmc	0	1	1	0	2
156	82	f	9.3	1.2	341	1410	1	arsa	0	1	1	1	2
157	20	f	8.5	0.83	111	1440	1	ar	0	1	1	0	2
158	54	m	7.8	0.78	18	270	0	ar	0	0	0	0	2
159	69	m	7.5	1.6	78	720	0	arsa	0	0	0	0	2
160	21	m	9.7	0.3	2	150	1	areb	0	0	0	0	2
161	57	m	5.8	1.82	24	90	0	areb	0	0	0	0	2
162	35	m	6.7	0.4	4	120	0	ar	0	0	0	0	2
163	45	m	8.2	1.3	43	90	1	arsa	0	1	1	0	2
164	32	f	10.1	7.84	41	510	0	ar	0	0	0	0	2
165	60	f	3.9	2.2	9	60	1	areb	0	1	1	0	2
166	41	f	7.9	4.78	197	1440	0	ar	0	0	0	0	2
167	52	f	6.8	1.93	169	1500	0	arsa	0	0	0	0	2
168	73	f	5.3	4.23	135	1470	0	ar	0	0	0	0	2
169	78	f	6.1	0.5	89	420	0	ar	0	0	0	1	2
170	71	f	8.1	14.3	23	510	1	lmmc	0	1	1	0	2
171	69	m	9.9	1.31	55	300	1	areb	0	1	1	0	2
172	82	m	4.8	2.01	230	210	0	ar	0	0	0	0	2
173	62	m	5.5	4.53	30	30	1	ar	0	0	0	0	2
174	65	m	7.9	0.5	11	900	1	areb	0	1	1	1	2
175	31	m	7.2	0.8	9	240	1	areb	0	1	1	0	2
176	73	m	9.1	2	98	330	0	arsa	0	0	0	0	2
177	57	m	12	0.78	164	686	0	ar	0	0	0	1	1
178	76	f	10.3	0.78	73	188	0	lmmc	0	0	0	1	1
179	25	f	5.9	0.26	40	1267	0	ar	0	0	0	0	1
180	72	m	6.4	0.16	74	1030	1	arsa	0	1	1	1	1
181	35	m	8.8	0.4	18	264	1	areb	0	0	0	1	1
182	78	f	10.5	2.93	160	384	0	arsa	0	0	0	0	1
183	50	f	5.7		325	728	0	arsa	0	0	0	0	1
184	41	f	12.4	1.29	298	773	0	ar	0	0	0	0	1
185	72	m	6.9	0.6	37	14	1	areb	0	1	1	0	1
186	59	m	4.5	0.94	75	191	1	arsa	0	1	1	1	1
187	61	f	4.8		196	358	0	arsa	0	0	0	0	1
188	60	f	6.9	3.06	417	455	1	areb	1	1	1	0	1

ANEXO 2 - Relação dos 206 pacientes portadores de SMD de acordo com suas características clínicas e laboratoriais, classificação FAB, seguimento, achados histopatológicos e origem.

paciente	idade	sexo	hb	n abs	plaq	sg	sit	FAB	nod linf	lma	fibr	origem
189	61	m	11	0.78	91	378	0	ar	1	0	1	1
190	73	m	13.8	3.11	200	1766	0	ar	0	0	1	1
191	58	f	8.9	1.87	90	347	1	areb	0	0		1
192	76	f	11.3	2.08	58	325	0	lmmc	0	0		1
193	66	m	9.5	9.52	131	447	0	areb	0	0		1
194	55	f	8.7	2.09	101	2856	0	ar	0	0		1
195	63	m	10.8	0.63	34	560	0	areb	0	1		1
196	81	f	6.9	1.65	24	61	0	areb	1	0		1
197	48	f	8.9	0.42	8	121	0	areb	0	1		1
198	70	m	8.7	1.54	32	343	0	f	0	0	1	1
199	71	m	10.9	2.81	170	56	0	ar	0	0	1	1
200	39	m	13.5	1.41	253	122	0	ar	0	0	1	1
201	50	m	12.1	0.17	76	63	0	ar	0	0	1	1
202	80	f	12.9	1.8	75	233	0	ar	0	0	1	1
203	59	m	2.9	3.3	155	86	0	ar	0	0	1	1
204	40	f	8.7	0.42	18	339	0	arsa	1	0	1	1
205	65	f	9	0.84	40	85	0	ar	1	0	1	1
206	30	f	7.8	1.2	187	448	0	arsa	1	0	0	1

Idade: em anos; sexo: m - masculino, f - feminino; hb: hemoglobina (g/dl); n abs: neutrófilos absolutos ($\times 10^9/L$); plaq: plaquetas ($\times 10^9/L$); sg: sobrevida global (dias); sit: situação (0: vivo, 1: morto); FAB: classificação; nod linf: nódulos linfóides (0: ausente, 1: presente); lma: evolução da doença (0: não, 1: sim); fibr: fibrose (0: ausente, 1: presente); origem: 1 - Unicamp, 2 - UFC