



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

MARIA MIRELE DA SILVA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA DISPLASIA MEGACARIOCÍTICA EM PACIENTES
CITOPÊNICOS: FOCO NAS FORMAS HIPOLOBULADAS E MONOLOBULADAS**

FORTALEZA

2018

MARIA MIRELE DA SILVA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA DISPLASIA MEGACARIOCÍTICA EM PACIENTES
CITOPÊNICOS: FOCO NAS FORMAS HIPOLOBULADAS E MONLOBULADAS**

Tese apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581a Silva Ribeiro, Maria Mirele da.

Avaliação da displasia megacariocítica em pacientes citopênicos : foco nas formas hipolobuladas e monolobuladas / Maria Mirele da Silva Ribeiro. – 2018.
94 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho.

1. Síndromes mielodisplásicas. 2. Megacariócitos. 3. Citopenia. 4. Displasia. I. Título.

CDD 610

MARIA MIRELE DA SILVA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA DISPLASIA MEGACARIOCÍTICA EM PACIENTES CITOPÊNICOS:
FOCO NAS FORMAS HIPOLOBULADAS E MONOLOBULADAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Defesa em: 31 / 08 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silva Maria Meira Magalhães (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Júnior

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

*À Deus,
Aos meus pais e irmãos,
À minha filha Rebeca.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por sempre proporcionar a realização dos meus sonhos, o mestrado era um deles!

Aos **meus pais** que sempre investiram no meu conhecimento e me ensinaram que na simplicidade da vida podemos alcançar nossos objetivos.

Aos **meus irmãos** que sempre me apoiam e estão sempre torcendo com minhas vitórias.

À minha filha **Rebeca** que é minha razão de viver.

Ao meu namorado **Eduardo** por sua compreensão e imensa ajuda no momento final do mestrado.

À **Dra Silvia Magalhães**, por ter me dado a oportunidade de participar desse grupo e usufruir desse momento único, pelo conhecimento compartilhado e principalmente por sua experiência profissional e humana.

Ao **Dr Ronald Feitosa**, por toda sua dedicação ao laboratório e sua disponibilidade e incentivo contribuindo de maneira indispensável para meu trabalho.

Ao **Dr Dário Rocha**, por sua contribuição de forma relevante na minha pesquisa. Um exemplo de simplicidade diante de um imenso conhecimento. Obrigada por seu apoio e disponibilidade sempre que necessário.

Ao **Dr Howard Lopes**, por seu profissionalismo e sua dedicação de forma inexprimível nessa reta final do meu trabalho. Obrigada por seu imenso apoio.

A cada um que compõe **Laboratório de Citogenômica do Câncer**, em especial:

À amiga **Marília**, por ter compartilhado seu conhecimento e facilitado a parte técnica do meu estudo, mas principalmente por sua disponibilidade pessoal.

À amiga **Anacélia**, pela sua amizade, por seu imenso apoio e influência na realização desse mestrado. Obrigada amiga, por compartilhar dos momentos de dificuldade também, mas demonstrando sempre determinação.

À amiga **Priscila**, que se fez presente em um momento crucial para finalização do meu mestrado. Obrigada por sua disponibilidade, contribuição na estatística e principalmente pela sua amizade.

À amiga **Weslayne** que sempre esteve disponível para me ajudar e principalmente me apoiar nas ausências do trabalho.

À todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, principalmente à Ivone e Rita, por sua dedicação aos alunos.

À **Dra Luciana Arruda** do Lab Patus, que demonstrou um imenso profissionalismo e presteza.

Ao profissional **Brazil Viana** por seu imenso apoio profissional.

Ao **Dr Paulo Goberlânio de Barros Silva** por sua dedicação na realização dos testes e sua imensa contribuição científica.

A **Dra Ana Paula Negreiros Nunes Alves** por sua solicitude e profissionalismo

Ao **Dr Carlos Gustavo Hirth** que auxiliou na realização e análise de alguns testes.

À **Dra Maria do Perpétuo Socorro** por disponibilizar o laboratório.

“Uma vez que aceitamos nossos limites, vamos além deles”

(Albert Einstein)

RESUMO

Citopenias são problemas comuns na prática clínica, muitas vezes detectadas acidentalmente em pacientes assintomáticos ou sem doença previamente conhecida. As displasias são alterações de maturação das células hematopoéticas incluindo alterações morfológicas das linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica. As mielodisplasias podem estar presentes em pacientes com doenças clonais ou não-clonais. O diagnóstico da SMD baseia-se na morfologia e detecção de alterações displásticas. Em relação às displasias megacariocíticas as anormalidades mais comuns nas malignidades mielóides são os micromegacariócitos, as formas hipolobuladas, hiperlobuladas com núcleo hiper Cromático e múltiplos núcleos amplamente separados. Objetivos: (a) Avaliar a displasia megacariocítica em pacientes citopênicos com foco nos micromegacariócitos e formas hipo e monolobuladas. (b) Analisar as possíveis associações entre os achados histopatológicos, imunohistoquímicos (p53, CD34 e CD61) e de citogenética molecular (FISH para 5q e 17p) com as características clínicas dos pacientes agrupados em doenças clonais e não clonais. Métodos: 44 pacientes adultos com alterações displásticas megacariocíticas foram incluídos no estudo, estratificados em grupo clonal e não-clonal, e foram analisados através da técnica de citogenética molecular e imunohistoquímica. Resultados: Na técnica de IHQ, todos os pacientes apresentaram resultado positivo para CD61. Imunoreatividade para proteína p53 foi observada em 4 (9,1%) pacientes e para CD34 em 5 (11,4%) pacientes do grupo clonal. Na análise da FISH, foi observada amplificação do gene *TP53* em 3 (12%) pacientes e em nenhum dos casos se observou a deleção 5q. Discussão e conclusões: A reprodutibilidade na detecção de dismegacariopose foi comparável aos dados da literatura, demonstrando que a avaliação de displasia megacariocítica (micromegacariócitos e formas mono/hipolobuladas) em pacientes citopênicos mostrou pouca utilidade no diagnóstico diferencial entre doença clonal e não-clonal. A IHQ para CD34 e p53 foi positiva apenas em pacientes com diagnóstico confirmado de SMD. A FISH para as sondas 5q31.2 e 17p13.1 não agregou valor complementar à citogenética clássica nos casos estudados e foi de valor limitado para a avaliação diagnóstica de pacientes com citopenias e dismegacariopose.

Palavras-chaves: Citopenia, Síndromes Mielodisplásicas, Megacariócitos, Imunohistoquímica, Displasia, FISH.

ABSTRACT

Cytopenias are common problems in clinical practice, often detected accidentally in asymptomatic patients or without previously known disease. Dysplasias are alterations in the maturation of hematopoietic cells including morphological alterations in the erythroid, granulocytic and megakaryocytic lineages. Myelodysplasias may be present in patients with clonal or nonclonal diseases. The diagnosis of MDS is based on the morphology and detection of dysplastic changes. In relation to megakaryocytic dysplasias, the most common abnormalities in myeloid malignancies are micromegakaryocytes, hypolobular, hyperlobulated forms with a hyperchromatic nucleus, and multiple widely separated nuclei. **Objectives:** To evaluate megakaryocytic dysplasia in cytopenic patients with a focus on micromegakaryocytes and hypo and monolobular forms. (b) Analyze the possible associations between the histopathological, immunohistochemical (p53, CD34 and CD61) and molecular cytogenetic findings (FISH for 5q and 17p) with the clinical characteristics of patients grouped into clonal and nonclonal diseases. **Patients and methods:** 44 adult patients with megakaryocytic dysplastic alterations were included in the study, stratified into clonal and nonclonal groups, and analyzed using molecular cytogenetics and immunohistochemistry. **Results:** In the immunohistochemistry technique, all the patients presented a positive result for CD61. Immunoreactivity for p53 protein was observed in 4 patients (9.1%) and CD34 with increased expression was evidenced in 5 (11.4%) patients. In the FISH analysis, the gene amplification was observed for the evaluation of the TP53 gene in 3 (12%) patients and for the evaluation of del (5q) none of the analyzed cases showed alterations in the results. **Discussion and conclusions:** The reproducibility in the detection of dysmegacariopoese was comparable to the literature data, showing that the evaluation of megakaryocytic dysplasia (micromegacaryocytes and mono / hypolobular forms) in patients with cytopenias showed a little utility in the differential diagnosis between clonal and nonclonal disease. Immunohistochemistry for CD34 and p53 was positive only in patients with confirmed diagnosis of MDS. Among the complementary tests used, the FISH for the probes 5q31.2 and 17p13.1 did not add complementary values to the classical cytogenetics in the cases evaluated and this data were with limited value for to set up in the diagnostic of patients with cytopenias and dysmegacariopoese.

Key-words: Cytopenic, Myelodysplastic Syndromes, Megakaryocytes, Immunohistochemistry, Dysplasia, FISH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Etapas da patogênese da SMD	23
Figura 02	Fluxograma do diagnóstico da SMD	27
Figura 03	Alterações displásticas em megacariócitos na SMD com deleção isolada 5q	31
Figura 04	Representação esquemática do procedimento da IHQ	38
Figura 05	Representação esquemática do procedimento da FISH	41
Figura 06	Representação das marcações da sonda utilizada para o cromossomo 17 (FISH)	42
Figura 07	Representação das marcações da sonda utilizada para o cromossomo 5 (FISH)	43
Figura 08	Estratificação dos grupos clonal e não-clonal	46
Figura 09	Fotomicrografia de células positivas para CD61 (presença de células megacariocíticas, imuno-histoquímica, x40)	58
Figura 10	Fotomicrografia de células positivas para CD34 (aumento de células precursoras e da vasculatura, imuno-histoquímica, x40)	59
Figura 11	Fotomicrografia de células positivas para a proteína p53 (marcação nuclear escura, imuno-histoquímica, x40)	60
Figura 12	Fotomicrografia de microscópio de fluorescência marcando região alvo 5q31.2 e controle do cromossomo 5	61
Figura 13	Fotomicrografia de microscópio de fluorescência marcando região alvo do gene TP53	64
Figura 14	FISH dos casos alterados para o gene TP53	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Definição dos tipos e descrição das características morfológicas das displasias nas linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica	16
Tabela 02	Classificação da SMD pela OMS 2016	28
Tabela 03	Variáveis do IPSS-R	29
Tabela 04	Caracterização dos pacientes nos grupos clonal e não-clonal	47
Tabela 05	Caracterização e dados laboratoriais dos pacientes dos grupos clonal e não-clonal	51
Tabela 06	Caracterização das displasias no mielograma e biópsia óssea	56
Tabela 07	Caracterização dos pacientes em relação ao número de displasias	57
Tabela 08	Resultados da FISH para o gene 5q e TP53	62
Tabela 09	Alterações cromossômicas na FISH para del 5q e TP53	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ANC	Contagem Absoluta de Neutrófilos
AR	Anemia Refratária
AREB	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
AREB- <i>t</i>	Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação
ARSA	Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
BO	Biópsia óssea
CRDM	Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens
CRDU	Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem
DAPI	<i>4",6-diamidino-2-phenylindone-dihydrochloride</i>
DAB	3,3 diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FAB	Franco-Americano-Britânica
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
Hb	Hemoglobina
IC	Intervalo de confiança
IDUS	Displasia Idiopática de significado indeterminado
IHQ	Imunohistoquímica
IPSS	<i>International Prognostic Score System</i>
IPSS-R	<i>Revised International Prognostic Score System</i>
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
MO	Medula Óssea
NR	Neutropenia Refratária
NRBC	Hemácias nucleadas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Primeira consulta
SA	Sideroblastos em anel
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMDh	SMD hipocelular
SMD/SMP	Síndromes Mielodisplásicas/ Mieloproliferativas
SMD-DU	SMD com Displasia em Única Linhagem
SMD-DM	SMD com Displasia em Múltiplas Linhagens
SMD-SA	SMD com Sideroblastos em Anel
SMD-SA-DU	SMD-SA com Displasia em Única Linhagem
SMD-SA-DM	SMD- SA com Displasia em Múltiplas Linhagens
SMD-EB	SMD com Excesso de Blastos
SMD-EB1	SMD com Excesso de Blastos 1
SMD-EB2	SMD com Excesso de Blastos 2
SP	Sangue periférico
SF3B1	<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>
TAM	Mielopoeese Anormal Transitória
TR	Trombocitopenia Refratária
UN	Última notícia
VAF	Frequência da variante alélica
WPSS	<i>WHO classification-based Prognostic Scoring System</i>

ÍNDICE

1. Introdução	13
1.1 Citopenias	13
1.2 Mielodisplasias: Conceitos gerais	13
1.3 Mielodisplasia em doenças não clonais	19
1.4 Mielodisplasia em doenças clonais	20
1.5 Gene TP53	31
2. Justificativa	33
3. Objetivos	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4. Material e Métodos	35
4.1 Casuística	35
4.2 Aspectos éticos	35
4.3 Critérios de inclusão	35
4.4 Critérios de exclusão	35
4.5 Coleta e processamento das amostras	36
4.6 Imunohistoquímica	36
4.7 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	39
4.8 Variáveis Analisadas	44
4.9 Análises Estatística	45
5. Resultados	46
5.1 Análises por Imunohistoquímica (IHQ)	58
5.1.1 Marcação para CD61	58
5.1.2 Marcação para CD34	58
5.1.3 Marcação para p53	59
5.2 FISH	61
5.2.1 Avaliação da região 5q31.2 por FISH	61
5.2.2 Avaliação do gene TP53 por FISH	63
6. Discussão	69
7. Conclusões	74
8. Referências	75
Apêndice A – Descrição clínica dos pacientes do grupo clonal	86
Apêndice B – Descrição clínica doa pacientes do grupo não-clonal-	87
Apêndice C - Termo de consentimento Livre e Esclarecido do Paciente	88
Anexo – Aprovação do Comitê de Ética	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. CITOPENIAS

Citopenias são problemas comuns na prática clínica, muitas vezes detectadas acidentalmente em pacientes assintomáticos ou sem doença previamente conhecida. As manifestações clínicas são variáveis, em função da gravidade das alterações.

São considerados valores para a definição da anemia aqueles sugeridos pela OMS, que estabelece Hb < 12,0g/dL para mulheres e < 13,0g/dL para homens. A neutropenia é definida pela contagem de neutrófilos inferior a 1.800/mm³ e a plaquetopenia definida pela contagem inferior a 150.000/mm³.

A associação de quaisquer duas citopenias é denominada bicitopenia e a presença de três citopenias, pancitopenia.

O diagnóstico diferencial pode ser difícil. Uma causa deve ser sempre identificada através de um protocolo sistemático de avaliação, incluindo a investigação de deficiências nutricionais, doenças inflamatórias / infecciosas crônicas, doenças metabólicas, auto-imunes, efeito de drogas e doenças hematológicas (ROHRIG *et al.*, 2018). A avaliação da medula óssea é por vezes necessária, através do mielograma, análise citogenética e biópsia óssea.

1.2. MIELODISPLASIAS: CONCEITOS GERAIS

As displasias são distúrbios de maturação das células hematopoéticas incluindo alterações morfológicas das linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica (LIANG *et al.*, 2017). O termo mielodisplasia é utilizado para as células mielóides (granulócitos, eritrócitos e plaquetas) e seus precursores no sangue e na medula óssea (SHAVER *et al.*, 2017).

A mielodisplasia pode ser evidenciada nas neoplasias mielodisplásicas/ mieloproliferativas (SMD/NMP), neoplasias mieloproliferativas (NMP), leucemia mielóide aguda (LMA) e na Síndrome Mielodisplásica (SMD) (SHAVER *et al.*, 2017). Devido às dificuldades na caracterização das displasias e o caráter subjetivo da análise, é recomendada a contagem de pelo menos 200 células em cada linhagem, e avaliação de pelo menos 30 megacariócitos (GOASGUEN *et al.*, 2016). São consideradas relevantes as alterações que se observam em pelo menos 10% da população celular em determinada linhagem. Esse percentual de alteração

displástica pode ser observado em indivíduos saudáveis (sem citopenias), numa condição que se denominou de IDUS (*idiopathic dysplasia of undetermined significance* - displasia idiopática de causa indeterminada), em condições reativas e em casos de citopenias não clonais (VALENT *et al.*, 2009; VALENT *et al.*, 2011) (SEMENT *et al.*, 2013; FONT *et al.*, 2013, SHAVER *et al.*, 2017).

Resumidamente, a diseritropoese é caracterizada por irregularidades na maturação de precursores eritróides, incluindo multinucleação, pontes internucleares, condensação de cromatina anormal, cariorréxis e assincronismo de maturação entre o núcleo e citoplasma (KAWAI *et al.*, 2016). Alterações citoplasmáticas, incluindo sideroblastos em anel e aumento de vacúolos, também podem ser vistas (SHAVER *et al.*, 2017) (Tabela 1).

Quanto à disgranulopose, algumas das alterações incluem pseudo Pelger-Huet, neutrófilos hipersegmentados, neutrófilos com citoplasma hipogranular e neutrófilos binucleados (MATSUDA *et al.*, 2008). Na análise da biópsia óssea pode ser detectada a localização anormal de precursores imaturos (ALIP) na região central da medula óssea (TRICOT *et al.*, 1984).

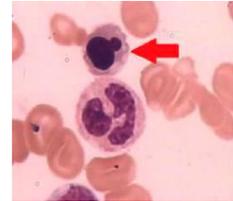
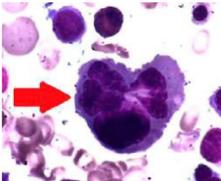
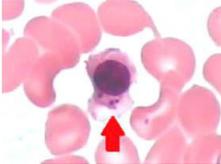
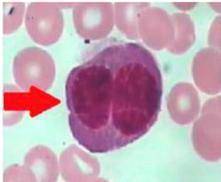
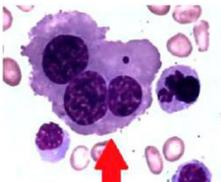
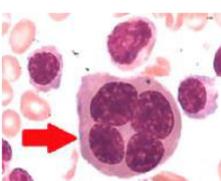
Em relação à outras células hematopoéticas, os megacariócitos maduros são células gigantes em tamanho (50 - 100µm) que possuem citoplasma finamente granular e um núcleo com múltiplos lóbulos conectados com fios de cromatina. Essa multilobulação característica dos megacariócitos ocorre pelo processo de endomitose, na qual múltiplos ciclos de replicação do DNA ocorrem sem divisão citosólica. Os megacariócitos residem, normalmente, individualmente, adjacentes aos sinusóides da medula óssea, com cerca de 2 a 4 células por campo de grande aumento (x400), à análise da biópsia óssea (JAWAD *et al.*, 2016)

Quanto à dismegacariopose podem ser observados micromegacariócitos, megacariócitos hipolobulados, megacariócitos monolobulados, megacariócitos multinucleados. O micromegacariócito é geralmente uma célula diplóide mononuclear, com um tamanho semelhante ao núcleo de um mieloblasto ou promielócito, tendo um tamanho inferior a 30µm de diâmetro. Alguns micromegacariócitos são células tetraplóides binucleadas (GOASGUEN *et al.*, 2016). Os micromegacariócitos podem ser imaturos com citoplasma basofílico escasso ou maduro, com citoplasma abundante que contém muitos grânulos (GOASGUEN *et al.*, 2016). Além disso, essas células podem aparecer como pequenos núcleos hipercromáticos com filamentos de citoplasma fragmentando-se em plaquetas

(GOASGUEN *et al.*, 2016). Os megacariócitos hipolobulados são células com um tamanho normal com um núcleo que é menos lobulado do que o esperado para seu tamanho (GOASGUEN *et al.*, 2016). Na Tabela 1 estão descritas as principais alterações morfológicas de cada linhagem.

Parmentier e colaboradores (2012) relataram que existe menor concordância para displasia nas linhagens eritróides e megacariocíticas do que nos precursores granulocíticos. Essa variação na análise das displasias pode estar relacionada com a avaliação morfológica e também com a qualidade da amostra, principalmente em relação ao aspirado medular (SHAVER *et al.*, 2017). Matsuda e colaboradores (2018) também analisaram a concordância das displasias entre diferentes observadores. Sasada e colaboradores (2018) reportaram no seu estudo que existe variação quando são avaliadas as características displásticas.

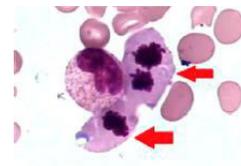
Tabela 1: Definição dos tipos e descrição das características morfológicas das displasias nas linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica.

TIPO DE DISPLASIA	DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA	
LINHAGEM ERITRÓIDE		
“Budding” nuclear	Pelo menos um “brotamento” na periferia nuclear e com tamanho <1/4 do núcleo	
Irregularidade nuclear	Núcleo com forma irregular	
Corpúsculo de Howell Jolly	Presença de inclusão no citoplasma de eritrócitos maduros ou eritroblastos	
Núcleo em pétala	Forma do núcleo em pétala (≥ 3 lobulações)	
Binuclearidade	Dois núcleos são separados, suas formas e tamanhos são semelhantes	
Trinuclearidade	Três núcleos são separados, suas formas e tamanhos são semelhantes	
Multinuclearidade	Mais de 3 núcleos no citoplasma, apresentam-se distintamente separados	
Ponte internuclear	Uma ponte entre dois núcleos separados, pode aparecer na mesma célula ou dois corpos celulares adjacentes	

Alterações megaloblásticas A célula é maior que o normal, cromatina nuclear fina e esparsa. Pelo menos 1,5 vezes maior que os eritrócitos policromáticos ou ortocromáticos



Divisão anormal Os núcleos são assimetricamente divididos

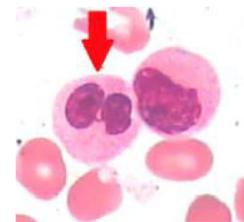


Assimetria nuclear Dois núcleos de tamanhos distintos, sendo o menor deles com pelo menos 1/2 do maior



LINHAGEM GRANULOCÍTICA

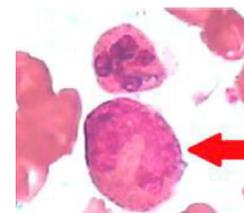
Pseudo Pelger-Huet Dois núcleos elípticos idênticos ligados por uma espessa ponte de cromatina. A cromatina é igual a do neutrófilo maduro e o citoplasma é maduro



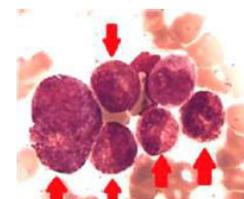
Granulócito binucleado Dois núcleos separados sem ponte de cromatina



Alterações megaloblásticas Célula maior que o normal e a cromatina nuclear fina

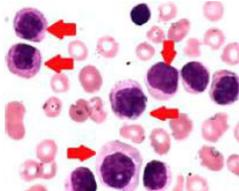
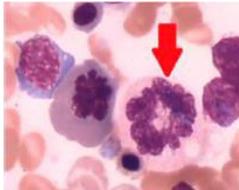
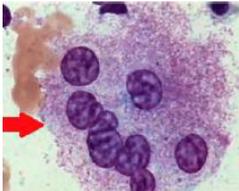
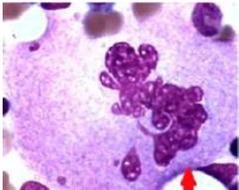


Hipergranulose Um grande número de pequenas partículas densas escuras distribuídas uniformemente no citoplasma.



Hipogranulose Ausência de grânulos neutrofílicos ou basofílicos, apresentando-se como núcleo segmentado maduro



Núcleo em anel	Núcleo em forma de anel com citoplasma normal.	
Hipossegmentação	Hipossegmentação e condensação da cromatina	
Célula com hipersegmentação	Célula maior do que granulócito maduro, com hipersegmentação (>5 lóbulos)	
LINHAGEM MEGACARIOCÍTICA		
Megacariócito hipolobulado	Tamanho da célula > 30 µm. Apenas um núcleo redondo ou oval no citoplasma	
Micromegacariócito	Tamanho da célula inferior à 30 µm. Apenas um núcleo redondo ou oval no citoplasma.	
Megacariócitos multinucleados	Mais de três núcleos redondos separados	
Megacariócito hipersegmentado	Núcleo hipersegmentado	

Fonte: Adaptado de Liang *et al* (2017)

1.3. MIELODISPLASIA EM DOENÇAS NÃO CLONAIS

As alterações morfológicas podem estar presentes em pacientes com doenças não neoplásicas (SHAVER *et al.*,2017), incluindo anemia diseritropoética congênita (IOLASCON *et al.*,2012), deficiência de vitamina B12, folato e cobre (AITELLI,2004; HUFF *et al.*,2007; SIBLEY, 2009), infecções crônicas e viroses (MAGALHAES, 2006), exposições a alguns tipos de drogas (TAEGTMEYER *et al.*,2005; WANG *et al.*,2011) e toxinas (REZUKE *et al.*,1991; BUDDE,1989), incluindo uso excessivo de álcool (MICHOT *et al.*,1987), desordens inflamatórias e autoimunes, como o lúpus (VOULGARELIS *et al.*,2006; OLNES *et al.*,2011), púrpura idiopática trombocitopênica (DEKA *et al.*, 2013) e linfocitose hemofagocítica (XU *et al.*; 2016). Além disso, alterações de maturação são observadas em resposta à terapia com fatores de crescimento (SCHMITZ *et al.*, 1994; MEYERSON *et al.*,1998).

Della Porta e colaboradores (2015) realizaram revisão sistemática de alterações displásticas em 1150 pacientes com ou sem citopenias para definir critérios morfológicos mínimos de displasia. Em pacientes com citopenia não-clonal foi observada diseritropoese >10% em 69% dos casos. Múltiplas anormalidades citológicas foram observadas em 40% dos casos. A disgranulopose >10% foi reportada em 22% dos casos. Múltiplas anormalidades citológicas foram observadas em 20% dos casos. Dismegacariopose foi detectada em 24%. Múltiplas anormalidades citológicas foram observadas em 25% dos casos. Nenhuma associação significativa entre anormalidades morfológicas megacariocíticas e condições clínicas específicas foi encontrada. (DELLA PORTA *et al.*, 2015). As displasias na linhagem megacariocítica foram detectadas em pacientes com citopenias não-clonais e em alguns pacientes não citopênicos do grupo controle, conferindo baixa especificidade de diversas alterações displásticas que dificultam a diferenciação entre doença clonal e outras desordens não-clonais (CAZZOLA *et al.*, 2011; SENENT *et al.*, 2013; GOASGUEN *et al.*,2014). A detecção de megacariócitos não lobulados ou monolobulados em pacientes sem neoplasia mieloide é descrita. Em contrapartida, alterações como a presença de micromegacariócitos e megacariócitos multinucleados está fortemente associada com neoplasias hematológicas, incluindo a SMD (GOASGUEN *et al.*, 2016).

1.4. MIELODISPLASIA EM DOENÇAS CLONAIS

Alterações de maturação podem ser evidenciadas em várias neoplasias mieloides clonais: mielodisplásticas/ mieloproliferativas (SMD/NMP), neoplasias mieloproliferativas (NMP), leucemia mielóide aguda (LMA) e na síndrome mielodisplástica (SMD), onde sua detecção, num percentual superior a 10%, é considerada requisito importante para suspeição e diagnóstico (SHAVER *et al.*, 2017).

As síndromes mielodisplásticas são um grupo heterogêneo de desordens clonais da célula tronco hematopoética caracterizado por hematopoese ineficaz, citopenias periféricas e um aumento do risco de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA) (SWERDLOW *et al.*, 2008). A presença de citopenias em combinação com a medula óssea normocelular ou hiperclular e o achado de displasia em pelo menos uma linhagem celular caracterizam esse grupo de doenças (BENNET *et al.*, 1982; JAFFE *et al.*, 2001; SWERDLOW *et al.*, 2008; TEFFERI *et al.*, 2009; GARCIA, 2014).

É mais frequente no sexo masculino (MA *et al.*, 2007), exceto no subtipo de SMD associado com a deleção 5q, mais comum em mulheres (VAN DER BERGHE *et al.*, 1997; NEUKIRCHEN *et al.*, 2011). A incidência é crescente com a idade, sendo esse o fator de risco isolado mais importante para o desenvolvimento da doença (XIE *et al.*, 2014). Aproximadamente 75% dos pacientes com SMD têm idade superior a 60 anos ao diagnóstico (GREENBERG *et al.*, 1997; GREENBERG *et al.*, 2012). Num estudo recente de pacientes latino-americanos a média de idade ao diagnóstico foi de 69 anos, a mesma observada no estudo que deu origem ao IPSS (GREENBERG *et al.*, 1997) e não muito diferente da média de 71 anos da população avaliada para o IPSS R (GREENBERG *et al.*, 2012; BELLI *et al.*, 2015).

Em países asiáticos os pacientes são mais jovens ao diagnóstico, com média de idade de 59 anos na China (LV *et al.*, 2011), 60 anos no Japão (OGUMA *et al.*, 1995) e 58 anos na Coreia (PARK *et al.*, 2008). As causas para as diferenças regionais são ainda motivo de controvérsia (PAYDAS, 2006), incluindo fatores genéticos ou diferenças étnicas, ocupacionais e estilo de vida (KUENDGEN *et al.*, 2007, LV *et al.*, 2011, SRIDHARAN, *et al.*, 2014). No Brasil, país de dimensões continentais, com diferentes características culturais, étnicas e econômicas, ainda são pouco conhecidas a incidência e as características clínicas dos pacientes com SMD. Além da grande heterogeneidade, são fatores importantes a não inclusão de

casos em registros de base populacional, a dificuldade de acesso aos centros especializados e a avaliação incompleta de muitos pacientes com citopenias (MAGALHAES *et al.*, 2004; MAGALHAES *et al.*, 2010; MAGALHAES *et al.*, 2013).

A SMD é dita secundária quando decorrente da exposição a agentes quimioterápicos (PEDERSEN BJERGAARD *et al.*, 1991), especialmente de agentes alquilantes e análogos de purina (MCLAUGHLIN *et al.*, 2005) e radioterapia (IWANAGA *et al.*, 2011; CARDIS *et al.*, 2005). Casos de SMD secundária se associam, em geral, a cariótipo complexo e têm curso mais agressivo e pior prognóstico (ADES *et al.*, 2014). Exposição a agentes ocupacionais e/ou ambientais como tabagismo (NISSE *et al.*, 2001) e exposição ao benzeno e seus derivados são consideradas fatores de risco para a doença (SEKERES, 2010).

A SMD tem patogênese complexa que envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas que interferem na regulação da proliferação e diferenciação celulares e apoptose, além de desregulação imune, perfil aberrante de citocinas, alteração de micro-ambiente medular e disfunção de telômeros. Seu desenvolvimento é um processo que envolve múltiplas etapas (SHALLIS *et al.*, 2018) (Figura 1). Sucessivas alterações genéticas potencialmente levam à instabilidade genômica, expansão clonal e evolução para LMA.

Com o advento das técnicas moleculares de última geração, observou-se que 90% dos casos de SMD, apresentam pelo menos uma mutação. Mutações somáticas recorrentes envolvendo o *splicing* do DNA, a metilação, fatores de transcrição, reparo de DNA e outros elementos de sinalização são detectadas na SMD (Figura 1).

Desde então, as bases genética e molecular e seu papel no diagnóstico, prognóstico (novos modelos de estratificação de risco) e impacto terapêutico têm sido amplamente investigadas (BEJAR, 2015; ZAHID, 2016; TEFFERI, 2018). A revisão da classificação da OMS já inclui aspectos moleculares (a presença de mutação do *SF3B1*) e recomendação para a pesquisa da mutação/expressão do p53 (ARBER *et al.*, 2016).

Mecanismos epigenéticos são capazes de alterar a expressão gênica sem induzir mudanças estruturais na sequência do DNA. A hipermetilação pode induzir, de forma reversível, o silenciamento de genes importantes envolvidos no controle do ciclo celular, como os genes supressores de tumor. Diferentemente das mutações, as alterações epigenéticas são reversíveis, o que abre perspectivas para o

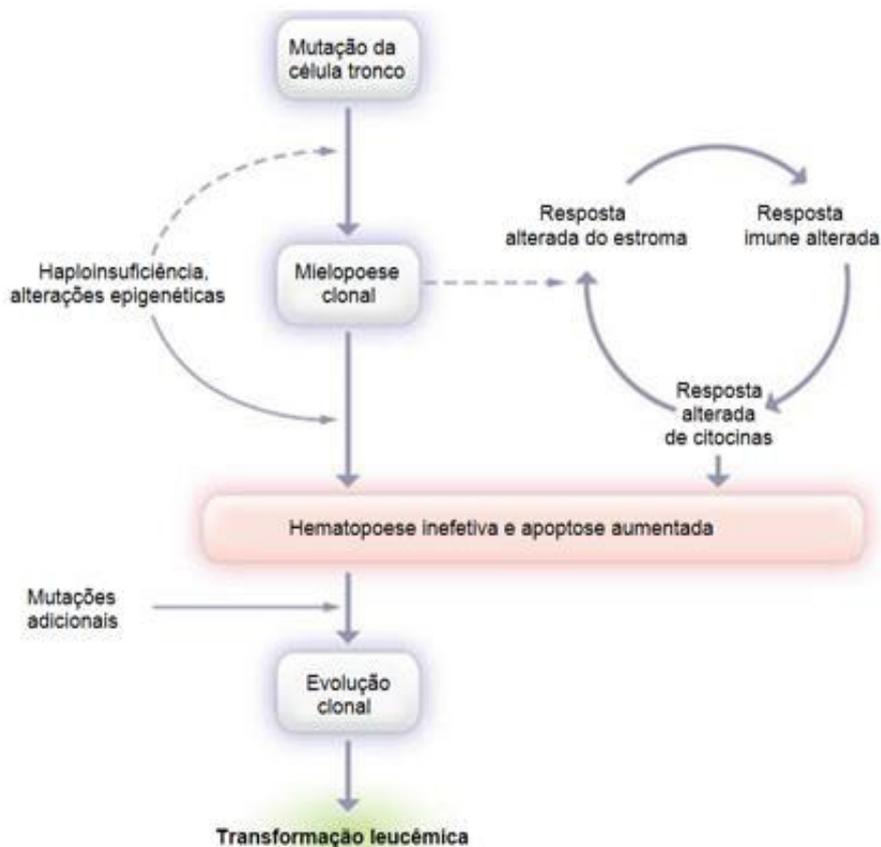
tratamento isolado ou combinado com outras drogas (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011).

Alterações nos mecanismos imunológicos, com conseqüente distúrbios no perfil de citocinas secretadas são observadas o que leva a um importante aumento na produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 e INF- γ , por parte dos fibroblastos e macrófagos. Elas promovem a expansão clonal de células T, elevando o índice de apoptose, com proliferação e aumento da citotoxicidade (BOETTCHER *et al.*, 2014; SCHURCH *et al.*, 2014; SALLMAN *et al.*, 2016). Citocinas pró-inflamatórias estão caracteristicamente elevadas nos pacientes portadores de SMD e se relacionam, como em outras neoplasias mielóides, com a iniciação, progressão e pior sobrevida (CRAVER *et al.*, 2018).

Alterações no microambiente foram demonstradas como capazes de induzir SMD, contrariando o conhecimento prévio de que a doença se iniciaria exclusivamente a partir de múltiplas lesões na célula tronco hematopoética (Figura 3). A interação da célula com seu nicho é cada vez mais estudada e reconhecida como um sistema dinâmico necessário para a homeostase e que pode, eventualmente, ser alvo de novas modalidades terapêuticas (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011) (Figura 1).

O diagnóstico da SMD inclui anamnese, exame físico, estudo do sangue periférico, do aspirado de medula, da biópsia óssea e análise citogenética (STEENSMA *et al.*, 2012; MAGALHÃES, 2006) como descrita na Figura 2. Devido à possibilidade de displasias e citopenias de causas reacionais e não clonais, o diagnóstico deve ser sempre criterioso e de exclusão (MAGALHÃES, 2006). Devem ser excluídas assim, as deficiências nutricionais (ferro, vitamina B12 e ácido fólico), efeitos de medicação (antimetabólitos, como metotrexato etc), efeitos do uso excessivo de álcool, as citopenias imuno-mediadas, os distúrbios hormonais, as disfunções metabólicas por insuficiência hepática ou renal e as infecções crônicas como hepatites B e C e HIV (STEENSMA *et al.*, 2015, MAGALHAES, 2006).

Figura 1: Etapas da patogênese da SMD.



Fonte: Adaptado de Tefferi et al, 2009.

O diagnóstico da SMD tem base morfológica e é baseado na avaliação quantitativa e qualitativa do sangue periférico e medula óssea. A presença de pelo menos uma citopenia persistente (pelo menos seis meses) e inexplicada em indivíduo idoso deve sugerir o diagnóstico de SMD. São consideradas citopenias periféricas: a hemoglobina <12g/dL para mulheres e <13g/dL para homens, plaquetas <150 x 10⁹/L e contagem absoluta de neutrófilos < 1.8 x 10⁹/L (GREENBERG *et al.*,2016).

O exame citológico da medula óssea inclui a análise de alterações displásticas em pelo menos 10% de uma ou mais linhagens hematopoéticas, a contagem de blastos, critério importante sobretudo quando os percentuais variam entre 5 e 19% e a coloração para o ferro medular para detecção e quantificação de sideroblastos em anel (MALCOVATTI *et al.*, 2013).

Em seu estudo sobre as características da displasia na medula óssea e sua efetividade para o diagnóstico da SMD, Liang e colaboradores (2017) sugeriram que quatro alterações morfológicas têm maior especificidade para o diagnóstico de SMD,

a saber, eritroblastos com núcleo em forma de pétala e pontes internucleares, precursores granulocíticos com alteração pseudo-Pelger-Huet e presença de pequenos megacariócitos mononucleares. Entretanto vale salientar que nenhum achado é considerado patognomônico e na ausência de excesso de blastos, é mandatória a exclusão de condições não clonais e o seguimento de um protocolo de exclusão (MAGALHÃES, 2006).

Segundo a OMS a displasia megacariocítica é caracterizada por micromegacariócitos, megacariócitos de todos os tamanhos com núcleos não lobulados e formas com múltiplos núcleos amplamente separados, essas últimas, de especificidade limitada para SMD (SWERDLOW *et al.*, 2017).

A presença de micromegacariócitos, portanto, tem valor diagnóstico importante, uma vez que sua detecção sugere associação com neoplasia hematológica, particularmente SMD (XIONG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2009). Como podem ser facilmente confundidos com pequenos linfócitos a sua análise por imunohistoquímica com marcadores específicos é recomendada e tem alta reprodutibilidade (GERMING *et al.*, 2012).

As formas hipolobuladas, descritas anteriormente, podem ser vistas na medula óssea normal, em citopenias não clonais, mas em maior número em pacientes com SMD, incluindo a deleção isolada 5q (GOASGUEN *et al.*, 2016).

A análise da biópsia óssea fornece dados sobre celularidade, arquitetura, distribuição e localização de componentes celulares, grau de fibrose sendo ideal para a análise morfológica dos megacariócitos e detecção de micromegacariócitos nesse caso, portanto, complementar e muito importante para o diagnóstico da SMD (ORAZI *et al.*, 2007; STEENSMA, 2015).

O estudo imunohistoquímico está indicado para identificação de populações celulares e proteínas de interesse. Um painel de marcadores comumente utilizados no diagnóstico de SMD inclui CD34, p53 e CD61.

A utilização do anticorpo anti-CD34 na imunohistoquímica permite a identificação, enumeração e confirmação do acúmulo de blastos (DELLA PORTA *et al.*, 2009), sendo extremamente útil em casos de punção branca por fibrose ou hipocelularidade na medula óssea (SONG *et al.*, 2015; MALCOVATTI *et al.*, 2013). O anticorpo anti CD34 auxilia na distinção entre SMD hipocelular, anemia aplástica e LMA hipocelular (MALCOVATTI *et al.*, 2013). Esse marcador é expresso em células progenitoras hematopoéticas e em células endoteliais permitindo a avaliação da

angiogênese, em geral aumentada em pacientes com SMD (CHA *et al.*,2014; HORNY *et al.*,2007).

Como marcador de células blásticas, tem importante impacto prognóstico, em especial quando da formação de *clusters*. Na SMD, a presença de grupamentos anormais de precursores imaturos (ALIP), assim como a positividade $\geq 5\%$ de células CD34+ e ainda a formação de grupamentos (*clusters*) de células CD34+ têm impacto significativo nos subgrupos de baixo risco e risco intermediário, em especial na sobrevida e progressão para LMA (XIONG *et al.*, 2017).

Os megacariócitos expressam em sua superfície CD41/ CD61 e/ou CD42b e CD42a (RABELLINO *et al.*, 1981; KANZ,*et al.*,1988). O CD61 (anticorpo monoclonal contra a glicoproteína IIIa) se liga à glicoproteína III plaquetária que é sintetizada desde uma fase precoce de diferenciação dos precursores megacariocíticos (OHSHIMA *et al.*,1995).

A marcação pelo CD61 em material de biópsia óssea tem importância fundamental na identificação de micromegacariócitos, considerando a dificuldade na análise que se observa quando se utiliza apenas a coloração Hematoxilina-Eosina.

A análise do cariótipo de pacientes com SMD auxilia no diagnóstico, prognóstico, classificação, acompanhamento evolutivo e escolha terapêutica, sendo portanto, também considerada mandatória (Figura 2) (MALCOVATI *et al.*, 2013). Pelo menos uma alteração é detectada em cerca de 50% dos casos de SMD primária, ao diagnóstico e entre 80% e 90% das SMD secundárias. Além de valor diagnóstico, as alterações citogenéticas têm importante impacto no prognóstico, na decisão terapêutica e no seguimento (evolução clonal) (VISCONTE *et al.*, 2014).

São consideradas alterações citogenéticas recorrentes aquelas que comprometem os cromossomos 5, 7, 8, 11, 13, 17, 20, 21 e Y. São frequentemente observadas a deleção do braço longo do cromossomo 5 (5q-), trissomia do 8 (+8), monossomia do cromossomo 7 (-7), deleção do braço longo dos cromossomos 11 (11q-), 20 (20q-) e 7 (7q-) (VISCONTE *et al.*, 2014). A presença de mais de três alterações caracteriza um cariótipo complexo (VISCONTE *et al.*, 2014).

A citogenética convencional é considerada o padrão-ouro para a detecção de anormalidades cromossômicas na SMD. A FISH (hibridização *in situ* por fluorescência), em associação com técnica da banda G, pode aumentar a frequência de detecção da deleção 5(q) e ser importante marcador de resposta terapêutica e progressão da doença (MALCOVATI *et al.*, 2013) (Figura 2).

Quando não é possível realizar a análise citogenética convencional devido à ausência de metáfases, a realização da técnica molecular de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) pode ser utilizada para a detecção de anormalidades cromossômicas em células em intérfase (MALCOVATI *et al.*, 2013). A FISH tem sua importância clínica na detecção de clones escondidos não visualizados pela citogenética convencional, que pode estar envolvido na progressão da leucemia aguda, e em outras abordagens mais sensíveis na qual poderia ser requerida para detecção de lesões ocultas (PINHEIRO RF, 2009).

A citometria de fluxo permite a contagem de blastos (células CD34+) e a verificação das características de maturação dos precursores, permitindo detectar a expressão anômala de marcadores imunofenotípicos como possíveis indicadores de displasia em uma determinada linhagem (ZINI *et al.*, 2017). É reservada para casos de diagnóstico difícil (Figura 2).

Cerca de 90% dos pacientes com SMD apresentam lesões genéticas e/ou moleculares (HAFERLACH *et al.*, 2014). Dentre as recentes análises genéticas, estão as novas plataformas, como análise do perfil de expressão gênica (*gene expression profiling*), polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*) e sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*) (HAFERLACH *et al.*, 2014). A presença de anormalidades moleculares como mutações somáticas tem grande potencial de aprimorar não apenas os recursos diagnósticos como também têm forte impacto prognóstico.

Figura 2: Fluxograma do diagnóstico da SMD.

ABORDAGEM DIAGNÓSTICA PARA SMD		
Ferramenta diagnóstica	Valor do Diagnóstico	Prioridade
Esfregaço do sangue periférico	- Avaliação de displasia em uma ou mais linhagens celulares - Enumeração de blastos	Mandatório
Aspirado da medula óssea	- Avaliação de displasia em uma ou mais linhagens celulares hematopoéticas - Enumeração de blastos - Enumeração de sideroblastos em anel	Mandatório
Biópsia da medula óssea	- Avaliação da celularidade, células CD34+ e fibrose	Mandatório
Análise citogenética	- Detecção de anormalidades cromossômicas que podem permitir um diagnóstico conclusivo e avaliação prognóstica	Mandatório
FISH	- Detecção de anormalidades cromossômicas na interfase após falha na citogenética clássica	Recomendado
Citometria de fluxo: imunofenotipagem*	- Detecção de anormalidades em células eritróides, mielóides imaturas, granulócitos, monócitos imaturos e linfóides maduros.	Recomendado
SNP Array	- Detecção de defeitos cromossômicos de alta resolução em combinação com citogenética na metáfase.	Sugerido
Análise de mutações de genes	- Detecção de mutações somáticas que podem ser conclusivas no diagnóstico e também confiáveis na avaliação do prognóstico.	Sugerido

Fonte: Adaptado de Malcovati et al, 2013

A atual classificação da OMS para a SMD, publicada em 2016, inclui dados de genética molecular associados à morfologia e citogenética. Foram alteradas as terminologias “anemia refratária” e “citopenia refratária” para “síndrome mielodisplásica” e os casos de SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA) foram subdivididos com displasia em única linhagem (SMD-SA-DU) e displasia em múltipla linhagem (SMD-SA-DM) (ARBER *et al.*, 2016; SWERDLOW *et al.*, 2017). A presença de mutação do gene SF3B1 (*splicing factor 3B subunit 1*) pode definir o subgrupo mesmo na ausência de percentual de sideroblastos em anel maior ou igual a 15% (ARBER *et al.*, 2016). Apesar dos avanços, o diagnóstico diferencial da SMD com causas reacionais de citopenia e displasia na medula óssea continua um desafio. A Tabela 2 demonstra os critérios de classificação da SMD pela OMS 2016.

Tabela 2: Classificação da SMD pela OMS 2016.

Subtipo	SP	MO
SMD com displasia em única linhagem (SMD-DU)	Uni ou Bicitopenia; $\leq 1\%$ de blastos	Displasia em 1 linhagem; 5% de sideroblastos em anel**; $\leq 5\%$ blastos
SMD com displasia em múltiplas linhagens (SMD-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%$ de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de sideroblastos em anel**; $\leq 5\%$ blastos
SMD com Sideroblastos em anel (SMD-SA)		
SMD-SA com displasia em única linhagem (SMD-SA-DU)	Uni ou Bicitopenia; $\leq 1\%$ de blastos;	Displasia em 1 linhagem; $\geq 15\%$ ou $\geq 5\%$ de sideroblastos em anel**; $\leq 5\%$ blastos
SMD-SA com displasia em múltiplas linhagens (SMD-SA-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%$ de blastos;	Displasia em 2 ou 3 linhagens; $\geq 15\%$ ou $\geq 5\%$ de sideroblastos em anel**; $\leq 5\%$ blastos
SMD com excesso de blastos (SMD-EB)		
SMD com excesso de blastos 1 (SMD-EB1)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0, 1, 2 ou 3 linhagens; 5-9% blastos
SMD com excesso de blastos 2 (SMD-EB2)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0, 1, 2 ou 3 linhagens. 10-19% blastos
SMD inclassificável (SMD -i)		
SMD-i com 1% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%$ blastos*	Displasia em 1 ou mais linhagens; $\leq 5\%$ blastos
SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia	Citopenia em 3 linhagens; $\leq 1\%$ de blastos	Displasia em 1 linhagem; $\leq 5\%$ blastos
SMD-i baseada em alterações citogenéticas	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%$ blastos	Ausência de displasias; $\leq 15\%$ de sideroblastos em anel; $\leq 5\%$ blastos
SMD com del(5q) isolada	Uni ou Bicitopenia; $\leq 1\%$ de blastos;	Displasia em 1 ou mais linhagens; $\leq 5\%$ blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)/-7

*1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas. ** Na presença de mutação do gene *SF3B1*.

Fonte: Adaptado de Arber *et al* (2016).

O IPSS (*International Prognosis Scoring System*), revisado por Greenberg e colaboradores em 2012, teve como principal objetivo estimar a taxa de sobrevivência e evolução para leucemia aguda dos pacientes com SMD de forma mais criteriosa (GREENBERG *et al.*, 2012). O IPSS-R engloba 5 variáveis prognósticas: citogenética, percentual de blastos, intensidade de citopenias, a saber, hemoglobina (Hb), plaquetas e contagem absoluta de neutrófilos (ANC). De acordo com essa proposta revisada o risco pode ser classificado em muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto (GREENBERG *et al.*, 2012) (Tabela 3).

Tabela 3: Variáveis do IPSS-R.

Variável	Valor dos escores						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
Blastos na MO	≤2%	-	>2-<5%	-	5-10%	>10%	-
Cariótipo*	Muito bom	-	Bom	-	Intermediário	Ruim	Muito ruim
Hemoglobina (g/dL)	≥10	-	8 – 10	<8	-	-	-
Plaquetas (x10³/mm³)	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
Neutrófilos (x10³/mm³)	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-
	Estratificação de risco						
	Muito baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito alto		
Escores	≤1.5	>1.5 – 3	>3 - 4.5	>4.5-6	>6		
Sobrevivência (anos)	8.8	5.3	3.0	1.6	0.8		
Média de tempo de evolução para LMA, 25%, ano	-	10.8	3.2	1.4	0.73		

* Cariótipo: Muito bom = -Y, del(11q); Bom = normal, del(5q), del(12q), del(20q), duplo - incluindo o del(5q); Intermediário = del(7q), +8, +19, i(17q), outras anormalidades simples ou duplas; Ruim = complexos (3 anormalidades), -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duplos incluindo o -7/del(7q); Muito ruim = complexos (>3 anormalidades)

Fonte: Adaptado de Greenberg *et al* (2012)

A deleção (5q) é a única alteração citogenética que define um subtipo específico de SMD, com características fenotípicas clínicas bem definidas e prognóstico favorável (ARBBER *et al.*, 2016). Recentemente foi demonstrado que a adição de mais uma anormalidade citogenética, desde que não envolva o cromossomo 7, monossomia 7 ou del(7q), não agrega efeito adverso ao prognóstico

(MALLO *et al.*, 2011). Cerca de 45% dos pacientes com del(5q) têm uma ou mais alterações cromossômicas adicionais.

Em pacientes com síndrome 5q- a região deletada, 5q33.1, contém os genes *SPARC* e *RPS14* (EBERT *et al.*, 2008). A deleção da região mais centromérica, 5q31.2, é associada à SMD com deleção 5q isolada que contém os genes *CTNNA1*, *EGR1*, *CDC25C* e outros (PELLAGATTI *et al.*, 2007; GRAUBERT *et al.*, 2009).

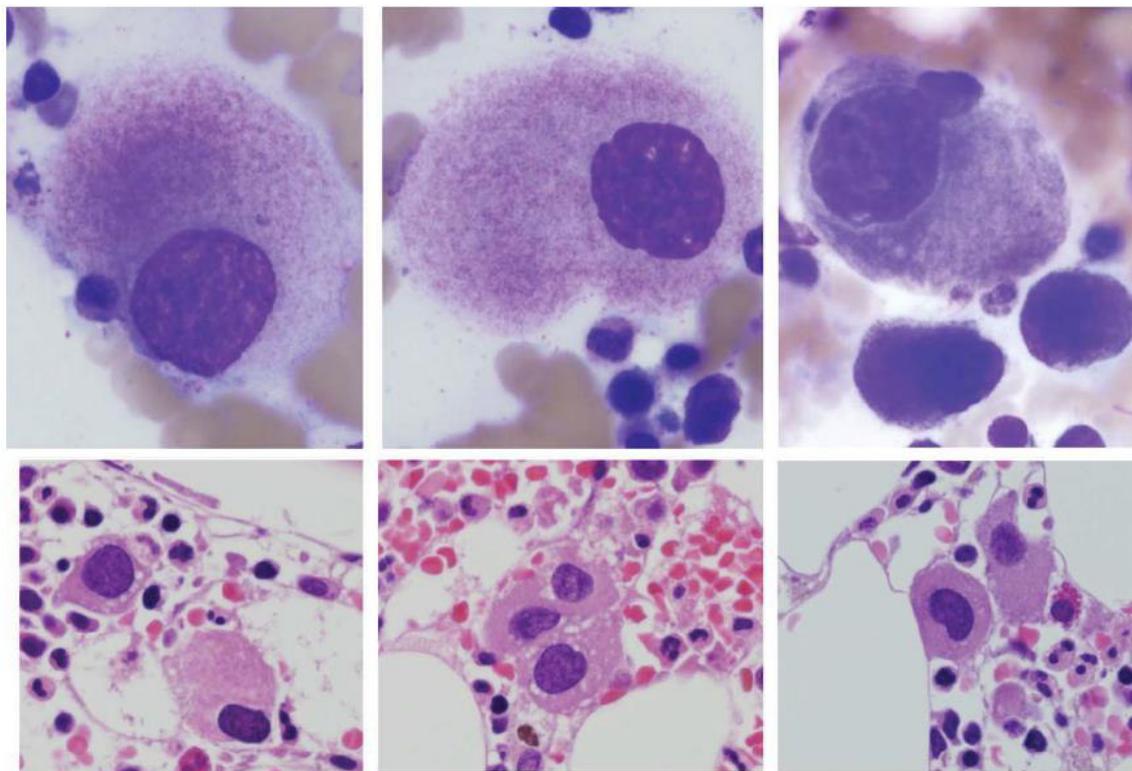
Em situações de citogenética convencional não disponível ou de resultado inadequado, a FISH pode auxiliar na decisão terapêutica como nos casos de pacientes com deleção 5q direcionando o tratamento com lenalidomida, e também na avaliação de prognóstico desfavorável em pacientes com anormalidade do cromossomo 7 (LIST *et al.*, 2006; CHERIAN; BAGG, 2006; HE *et al.*, 2016; GREENBERG *et al.*, 1997). Na prática clínica, a deleção 5q pode ser detectada pela FISH utilizando uma sonda fluorescente marcada que reconhece o locus 5q31 (*EGR1*) (MALLO *et al.*, 2008).

Como na SMD são comuns as alterações no cromossomo 5, a FISH pode ser indicada em casos em que essas anormalidades não são visualizadas na citogenética clássica, podendo fornecer informações adicionais auxiliando no diagnóstico, avaliação do prognóstico e na terapia do paciente (MALLO *et al.*, 2008; BEJAR *et al.*, 2011; KETTERLING *et al.*, 2001).

Vários genes recentemente localizados na região comumente deletada têm sido implicados na patogênese da doença (PELLAGATTI *et al.*, 2015). A haploinsuficiência do gene ribossomal *RPS14* tem sido implicada com as alterações eritróides. A perda do microRNA miR-145 e miR-146a está associada à trombocitose frequentemente observada. Um mecanismo dependente de p53 está envolvido na fisiopatologia dessa doença.

Os pacientes com deleção 5q isolada são, em geral, mulheres idosas, com anemia macrocítica, uma a duas citopenias, displasias em uma a três linhagens e contagem de blastos na medula inferior a 5%. São comuns os micromegacariócitos, considerados como as alterações morfológicas mais específicas de SMD, e as formas hipolobulados / monolobulados (VAN DER BERGHE *et al.*, 1974; BOULTWOOD *et al.*, 1994; GIAGOUNIDIS *et al.*, 2004; BOULTWOOD *et al.*, 2010), de acordo com a representação da Figura 3. O prognóstico é bom e a evolução para LMA ocorre em menos de 10% dos casos.

Figura 3: Alterações displásticas em megacariocitos na SMD com deleção isolada 5q



Fonte: Adaptado de Naresh (2010).

1.5. GENE TP53

O gene *TP53* está localizado no cromossomo 17p13.1 funcionando como guardião do genoma humano (ISOBE *et al.*, 1986; LEVINE *et al.*, 1997) A alteração nesse gene supressor tumoral é a alteração genética mais comum no câncer humano como perdas alélicas, mutações pontuais ou rearranjos estruturais (VOLGELSTEIN, 1994).

A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear expressa em baixos níveis nas células normais que desempenha um papel importante na transição das células através do ciclo celular. É reguladora chave da homeostase desempenhando uma função central na supressão tumoral através da interação com uma variedade de proteínas envolvidas na regulação da transcrição, no reparo do DNA, regulação do ciclo celular, apoptose e resposta inflamatória (MCGRAW *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

Bejar e colaboradores, identificaram as mutações nos genes *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* e *ASXL1* e demonstraram seu valor prognóstico independente do

IPSS. A presença de mutação do gene *TP53* está associada a cariótipo complexo, menor resposta ao tratamento e pior prognóstico (BEJAR *et al.*, 2011; JADERSTEN, 2011; SAFT *et al.*, 2014)

No estudo de 318 pacientes portadores de SMD a incidência global de mutação do *TP53* foi de 9,4%, sendo 8,1% na SMD primária e 27,3% na SMD-s/LMA (KULASEKARARAJ, 2013). Em dois diferentes estudos a incidência de mutação no gene p53 no subgrupo de baixo risco com del(5q) isolada foi de 19% e 18% (KULASEKARARAJ, 2013; JADERSTEN, 2011). Nesses casos, esteve associada a um maior risco de progressão e falha de resposta à terapia com lenalidomida. A frequência dessa mutação em casos de deleção 5q no contexto de um cariótipo complexo foi de 72% (KULASEKARARAJ, 2013).

Na revisão recente da classificação da OMS, é recomendada a pesquisa da mutação do gene *TP53* em pacientes com deleção isolada 5q para a identificação de subgrupos de pacientes com prognóstico adverso (ARBBER, 2016).

Associação significativa entre a mutação do *TP53* e a expressão aumentada da proteína p53 ($\geq 1\%$) por imunohistoquímica foi demonstrada em vários estudos, validando essa técnica para essa avaliação (SAFT *et al.*, 2014). McGraw e colaboradores (2016) evidenciaram uma correlação positiva direta entre o escore da IHQ e a frequência da variante alélica (VAF) do *TP53*, concluindo também que a imunohistoquímica pode ser usada como ferramenta para detecção de mutações do *TP53* em SMD.

2. JUSTIFICATIVA

Citopenias são problemas comuns na prática clínica. Nesse estudo avaliamos pacientes com uma ou mais citopenias com foco na displasia megacariocítica, incluindo a análise imuno-histoquímica e de citogenética molecular, além do protocolo de investigação sistemática do diagnóstico diferencial.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a displasia megacariocítica em pacientes citopênicos com foco nos micromegacariócitos e formas hipo e monolobuladas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar os prontuários dos pacientes em que uma alteração megacariocítica foi observada para coleta dos dados clínicos de interesse;
- Revisar as lâminas de biópsia óssea para avaliação de reprodutibilidade das alterações megacariocíticas;
- Analisar a imunexpressão de p53, CD34 e CD61;
- Analisar a presença das alterações nos cromossomos 5q e 17p através da realização da FISH;
- Analisar as possíveis associações entre os achados histopatológicos, imunohistoquímicos e de citogenética molecular com as características clínicas dos pacientes agrupados em doenças clonais e não clonais

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo do tipo transversal retrospectivo que incluiu 44 pacientes adultos com alterações displásticas na série megacariocítica (micromegacariócitos, megacariócitos mono ou hipolobulados) observadas ao exame citológico ou histológico da medula óssea.

Todos os pacientes foram acompanhados no período de janeiro de 2016 a julho de 2017 no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), sendo atendidos inicialmente com suspeita de SMD e sendo encaminhados para conduta clínica de diagnóstico diferencial.

4.2. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) através do sistema Plataforma Brasil (Número do processo: 1.640.337) (ANEXO A).

Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Foram incluídos pacientes adultos, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a dezoito anos, em investigação por uma ou mais citopenias, com alteração displástica na série megacariocítica (micromegacariócitos, megacariócitos mono ou hipolobulados).

4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com infecção, etilistas, tabagistas, com doença renal crônica ou com doenças auto-imunes.
- Pacientes sem material disponível ou adequado para revisão e para novas análises.

4.5. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os dados clínicos de interesse foram coletados nos prontuários do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

O material de biópsia óssea (bloco e lâminas) realizada ao diagnóstico foi obtido no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, após autorização escrita do paciente, para revisão e posterior realização da técnica de imunohistoquímica.

O material de citogenética clássica foi obtido no Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, para realização da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência.

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Nesse estudo, avaliamos a confirmação de micromegacariócitos pela marcação de CD61 por IHQ, o perfil de aumento de células precursoras (blastos) e da vasculatura, pela marcação de CD34 e o perfil da expressão aumentada da proteína p53 tanto em amostras de biópsias da medula óssea de pacientes com doenças clonais e não-clonais.

Para a determinação de CD61, CD34 e p53 através da técnica de IHQ foi utilizado bloco de parafina de material de biópsia óssea, armazenado no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Essas amostras são fixadas em Bouin, descalcificadas em ácido clorídrico e embebidas em parafina.

Foi realizado inicialmente um corte do material da medula óssea de 4µm em lâmina silanizada. A técnica de imunohistoquímica foi iniciada com um processo de desparafinização realizando uma incubação de 60 minutos a 70°C e logo após três banhos de 5 minutos no xilol. Após esse procedimento, realizou-se a reidratação através de 3 banhos (3 minutos) em série alcoólica decrescente (álcool 90%, 85%, 70%) e depois feita imersão em água corrente.

A qualidade da marcação depende de três principais fatores além da qualidade dos anticorpos: fase pré-analítica, recuperação antigênica de epítopos e sensibilidade do sistema de detecção.

A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 95°C durante 45 minutos, utilizando citrato de sódio (pH 6). Após essa etapa as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e foram realizadas duas lavagens com solução tampão fosfato (PBS) durante 5 minutos (Figura 4)

O bloqueio da peroxidase endógena foi executado deixando as lâminas no banho com peróxido de hidrogênio a 3% (diluído em PBS 0,1M) durante 30 minutos e depois as lâminas foram lavadas com PBS (2 lavagens com 5 minutos).

Os anticorpos primários utilizados em cada lâmina foram CD34 SpringBio® (AC MONO DE COELHO CLONE QBEND/10 – DIL 1:200), p53 Monoclonal SpringBio® (AC MONO DE COELHO CLONE SPM514 – DIL 1:100), CD61 Roche® (AC MONO DE CAM CLONE Y2/51 – DIL 1:200). Após colocar o anticorpo primário, as lâminas foram incubadas e colocadas na geladeira *overnight*. Seguindo esse período de incubação foi realizada lavagem com PBS e inserido o anticorpo secundário (Histofine, Nicherei®) à base de um polímero biotinizado por 30 minutos.

Foi então realizada nova lavagem com PBS e iniciada a etapa de revelação com DAB (3,3 diaminobenzidina) durante 05 (cinco) minutos, após o que foi utilizada água destilada para parar a reação (Figura 4).

Para finalização, foi realizada contra-coloração com hematoxilina de Harris por 10 segundos, seguido de imersão em água, desidratação em série alcóolica crescente (70%, 90%, 100%), diafanização em xilol e montagem com lamínulas de vidro e Enthellam®.

A análise das lâminas foi realizada juntamente com um hematopatologista experiente, utilizando como critério para cada marcador:

- CD34 positivo: aumento de células precursoras e da vasculatura. Importante mencionar que o aumento de células precursoras, ocorre quando se visualiza microagregados dessas células no interstício.

Quanto à intensidade da marcação pode ser classificada em:

1. Moderada: ++
2. Intensa: +++

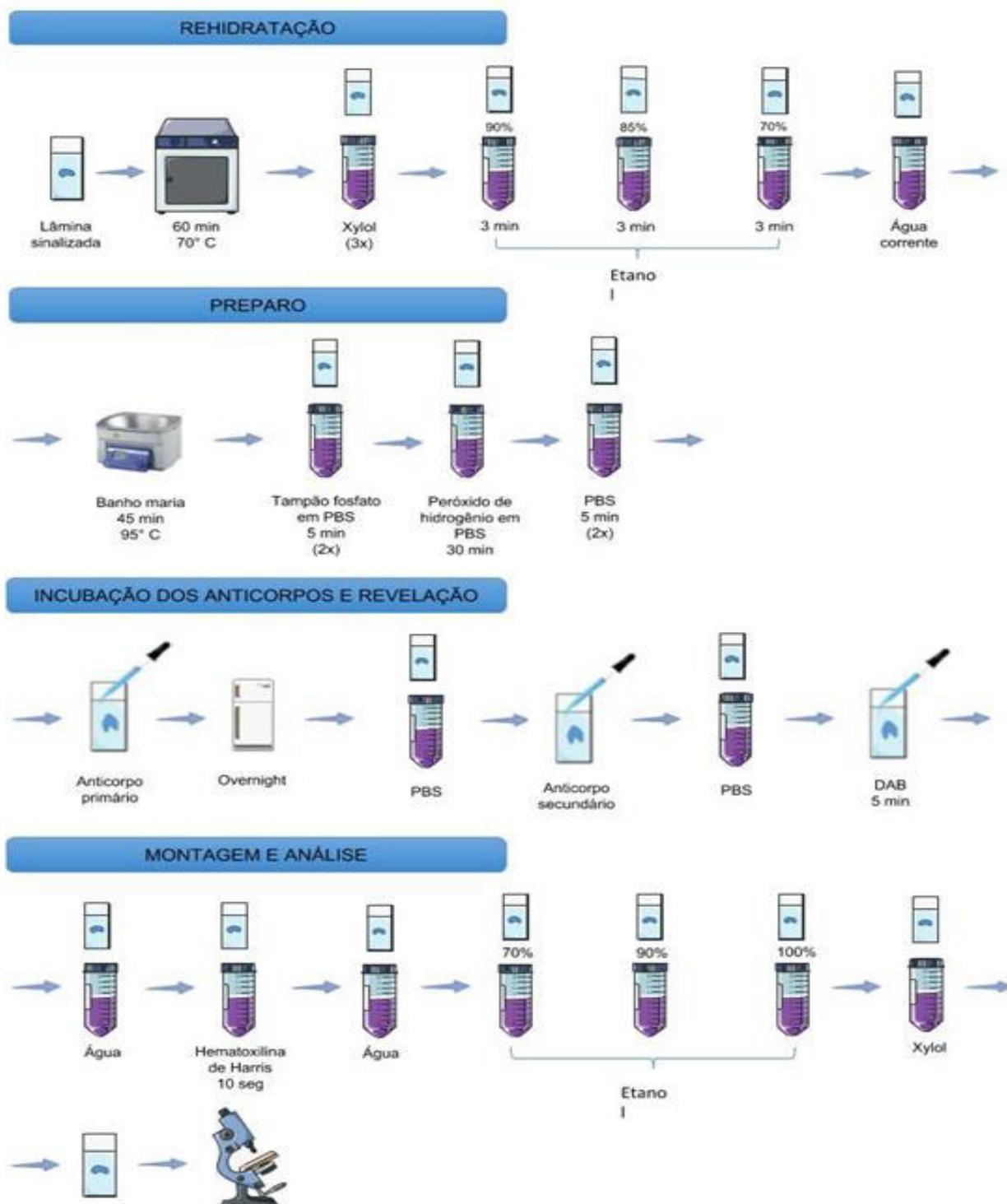
- CD34 negativo: ausência de aumento de células precursoras e da vasculatura
- P53 positivo: presença de marcação nuclear forte

Quanto ao percentual de células marcadas pode ser classificada em:

- i. 1%
- ii. 2%
- iii. 4%

- P53 negativo: não houve marcação nuclear significativa
- CD61 positivo: na presença de micromegacariócitos e megacariócitos hipolobulados.

Figura 4: Representação esquemática do procedimento da IHQ.



4.7 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

Nesta pesquisa, buscamos investigar a presença de alterações nos cromossomos 5 e 17, tanto em amostras de medula óssea de pacientes clonais e não clonais, a fim de identificar uma possível associação destes marcadores moleculares com a presença de displasia megacariocítica.

Para a avaliação da mutação do gene *TP53* e análise da deleção 5 (-5q) através da análise da FISH foi utilizado material obtido de cultura de células da medula óssea, fixado em solução Carnoy. Utilizou-se sondas *TP53* (LPH 017-S) para região 17p13 do cromossomo 17 e a sonda del (5q) (LPH 024-S) para a região 5q31.2, seguindo-se as instruções do fabricante.

As lâminas foram preparadas com 24h de antecedência. O material, fixado em solução de Carnoy e mantido a -20°C, foi retirado do freezer e deixado em temperatura ambiente. Posteriormente, a lâmina foi marcada com caneta de ponta de diamante e gotejada nessa região a amostra. Então, deixou-se secar ao ar ambiente. Quando necessário, foi realizada nova lavagem com solução fixadora de Carnoy para limpeza do material.

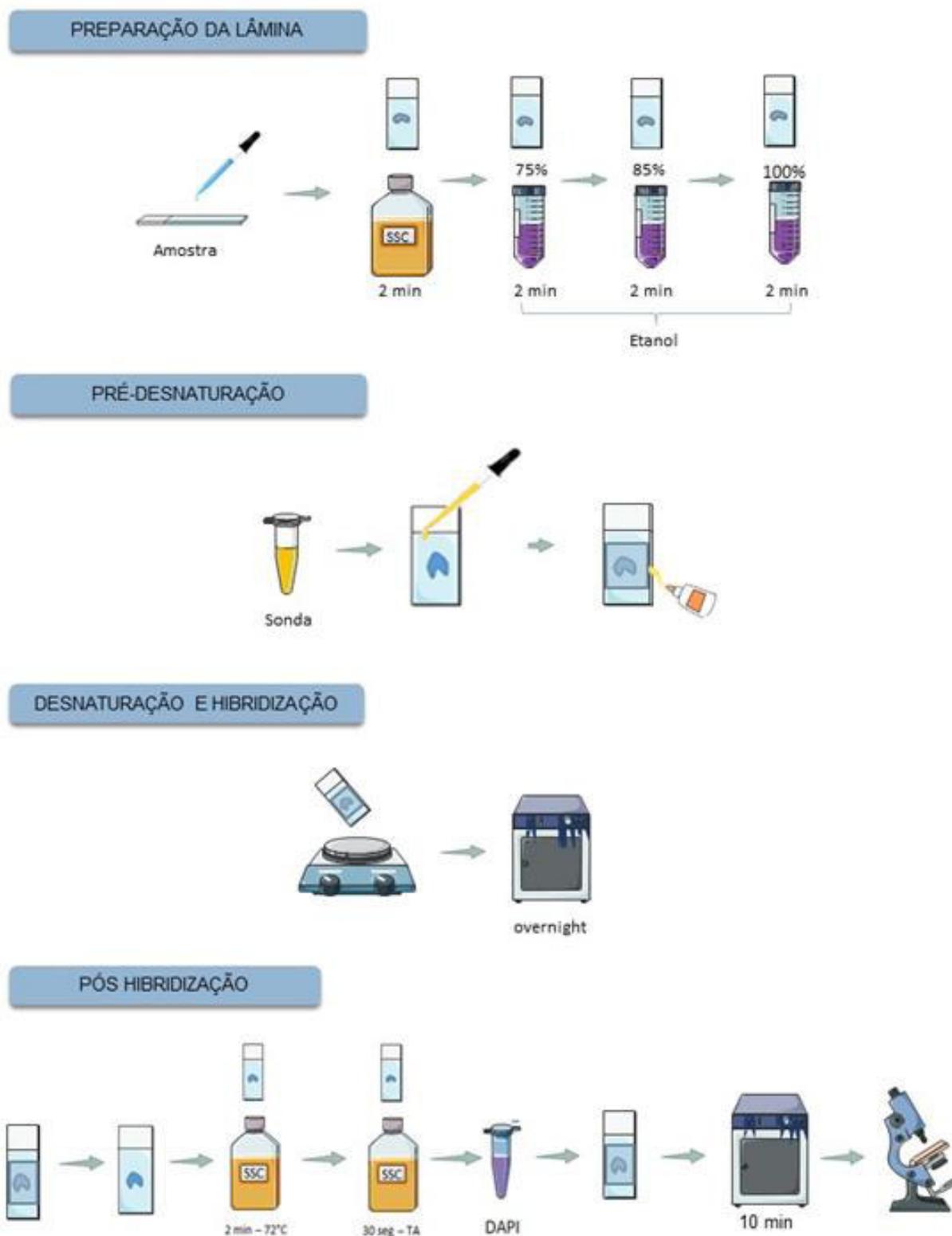
Após a confecção das lâminas, a celularidade do material foi verificada em microscópio óptico, tendo o cuidado com a concentração da amostra para que as células não formassem grumos, o que prejudicaria a análise dos sinais fluorescentes.

Em seguida, as lâminas foram submersas em solução SSC 2X por 2 minutos, foram desidratadas em etanol a 70%, 80% e 100% e então deixou-se secar à temperatura ambiente. A partir desse momento, seguiu-se o processo de desnaturação, no qual foi realizado no “escuro” para evitar perda de fluorescência da sonda. As sondas foram removidas do freezer -20°C e deixadas à temperatura ambiente, em seguida foram uniformizadas utilizando o *speed*. Posteriormente, foi adicionado 3 µL da sonda na região marcada da lâmina, que foi coberta por uma lamínula e selada com cola. A lâmina foi então aquecida, em placa aquecedora, por 2 minutos à 75°C, desnaturando a sonda e o DNA contido na amostra, simultaneamente. Em seguida, as lâminas foram transferidas para câmara úmida escura e incubadas a 37°C, por 12 horas, para que ocorresse a hibridização.

Após a hibridização da sonda com o DNA, as lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas em solução de SSC 0,4X (pH 7.0) à 72°C (+/-1°C), por dois minutos. Depois essas lâminas foram lavadas com outra solução de SSC 2X

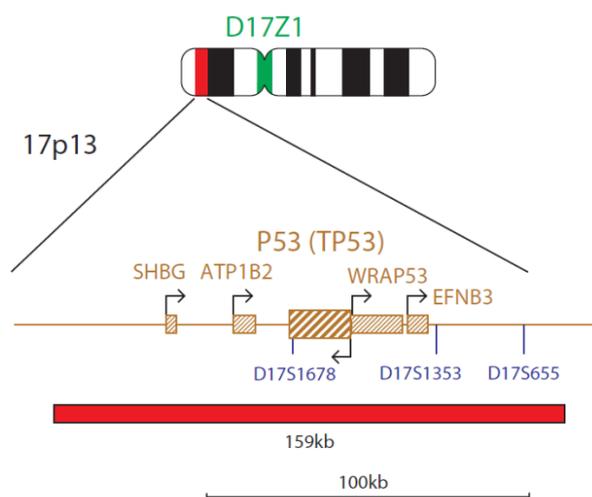
contendo 0,05% de Tween-20, por 30 segundos. Após secagem das lâminas à temperatura ambiente, foi adicionado 10 µL de contra-corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindone-dihydrochloride). As lâminas foram cobertas com lamínula, seladas com esmalte e incubadas no escuro por 10 minutos. A representação esquemática da metodologia utilizada na FISH encontra-se na figura 5.

A análise das lâminas foi feita em microscópio de epifluorescência da marca OLYMPUS BX51 – FL-II com os seguintes filtros: verde (FITC), vermelho (Texas Red), azul (DAPI) e triplo para visualização dos sinais e da célula. Este microscópio é acoplado a um sistema de captura de imagem (CYTOVISION). Um mínimo de 200 células por amostra foi avaliado por três investigadores independentes. Na presença de discrepância, os resultados foram analisados, combinados e calculada a média. Apenas os sinais não sobrepostos com núcleos aparentemente intactos foram contados de acordo com especificação do fabricante.

Figura 5: Representação esquemática do procedimento da FISH.

A sonda para detecção do p53 (CYTOCELL[®]) liga-se a duas regiões do cromossomo 17: região do centrômero do cromossomo 17p11.1-q11.1 incluindo o marcador D17Z1 (sinal verde) e a região P53 - 17p13.1 incluindo o marcador D17S655 (sinal vermelho). O sinal verde serve como controle para o cromossomo 17. A representação da sonda de detecção do p53 está representada na figura 6.

Figura 6: Representação das marcações da sonda utilizada para o cromossomo 17 (FISH).

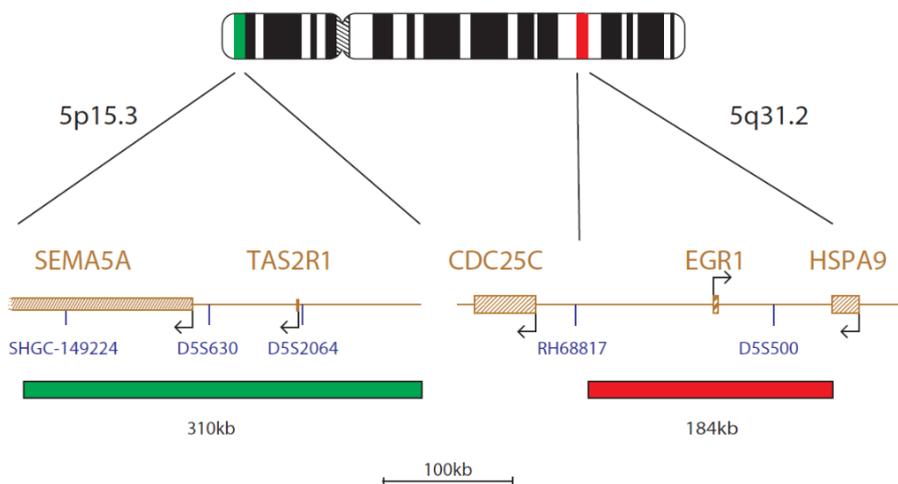


A visualização das células foi dividida em:

- 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes = normal
- 1 sinal vermelho e 2 sinais verdes = deleção
- 3 ou mais sinais vermelhos e 2 sinais verdes = amplificação
- 3 ou mais sinais vermelhos e 3 ou mais sinais verdes = polissomia
- 1 sinal vermelho e 1 sinal verde = monossomia
- Ausência de sinal = falha de hibridização

A sonda para detecção da deleção 5q (CYTOCELL[®]) liga-se a duas regiões do cromossomo 5: região do controle da *probe* 5p15.31 incluindo o marcador D5S630 (sinal verde) e a região EGR1 com 5q31.2 incluindo os marcadores D5S1701 e D5S500 (sinal vermelho). A representação da probe de detecção da deleção 5q está representada na figura 7.

Figura 7: Representação das marcações da sonda utilizada para o cromossomo 5 (FISH)



A visualização das células foi dividida em:

- 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes = normal
- 1 sinal vermelho e 2 sinais verdes = deleção
- 3 ou mais sinais vermelhos e 2 sinais verdes = amplificação
- 3 ou mais sinais vermelhos e 3 ou mais sinais verdes = polissomia
- 1 sinal vermelho e 1 sinal verde = monossomia
- Ausência de sinal = falha de hibridização

Foram aplicados critérios rigorosos de avaliação de sinal da FISH para evitar superestimação da hiperdiploidia, o que pode resultar de fatores celulares ou de técnica (EASTMOND, 1995). O ponto de corte para o reconhecimento de um caso afetado por polissomia, monossomia, amplificação e deleção do gene *TP53* e 5q foi de 5% (CUNEO, 1997, PINHEIRO *et al*, 2009).

4.8. Variáveis Analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram subdivididas:

- Grupo: Clonal e não-clonal; sendo considerada clonal casos em que uma alteração cromossômica foi detectada em pelo menos 2 metáfases.
- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (categorizada de acordo com IPSS-R): < 60 anos e ≥ 60 anos;
- Diseritropoiese: sim e não;
- Disgranulopoiese: sim e não;
- Dismegacariopoiese: sim e não;
- Presença de micromegacariócitos: sim e não;
- Presença de megacariócitos monolobulados: sim e não;
- Presença de megacariócitos hipolobulados: sim e não;
- Presença de formas combinadas (micromegacariócitos e hipolobulados ou micromegacariócitos e monolobulados ou hipolobulados e monolobulados): sim e não
- Percentual de blastos (IPSS-R): ≤ 2%, >2% -<5%, 5%-10% e >10%;
- Percentual de blastos: <5%, ≥ 5%;
- Celularidade da medula óssea: hipocelular, normocelular e hiperclular;
- Fibrose na medula óssea: SIM (MF2 e MF3) e NÃO (MF0 e MF1) de acordo com Thielli e colaboradores (2005);
- Cariótipo:
Quanto à alteração: normal e alterado
Cariótipo alterado: normal, 1 alteração; 2 alterações e Complexo (≥3 alterações)
- Diagnóstico do paciente: Doença clonal ou não-clonal
- Prognóstico dos pacientes com SMD (IPSS-R): muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Classificação dos valores de hemoglobina (IPSS-R): ≥10g/dL, 8-<10g/dL e <8g/dL;
- Contagem de neutrófilos (IPSS-R): ≥800/mm³ e <800/mm³;
- Contagem de plaquetas (IPSS-R): ≥100.000/mm³, >50.000 < 100.000/mm³ e ≤50.000/ mm³;

- Classificação dos valores de hemoglobina (valores de diagnóstico): feminino (<12g/dL) e masculino (<13g/dL)
- Contagem de neutrófilos (valores de diagnóstico): $\geq 1.800/\text{mm}^3$ e $< 1.800/\text{mm}^3$;
- Contagem de plaquetas (valores de diagnóstico): $\geq 150.000/\text{mm}^3$, $< 100.000/\text{mm}^3$
- Número de citopenias (IPSS-R): 1, 2 e 3 citopenias;
- Número de citopenias (valores padrões laboratoriais): 1, 2 e 3 citopenias;
- Tempo de seguimento: _____ meses (PC – UN) Primeira consulta e última notícia.

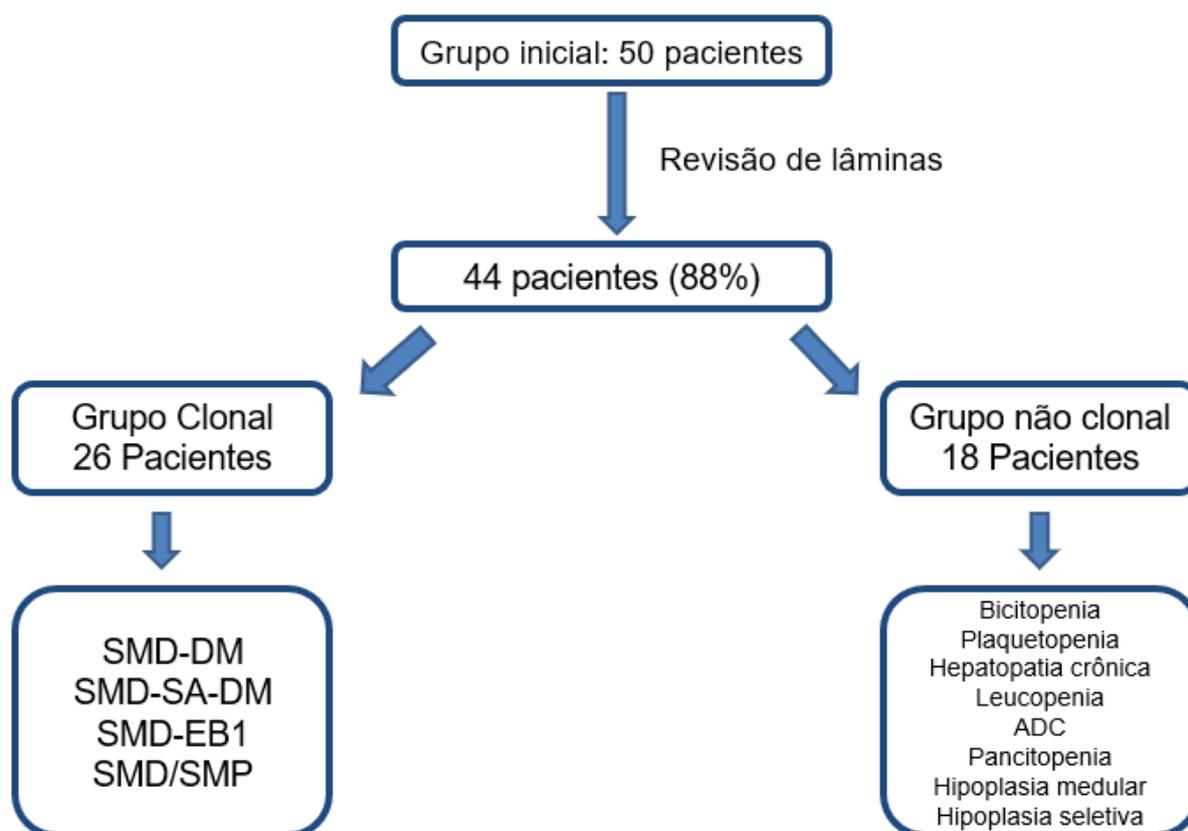
4.9. Análises Estatística

As diferenças entre as frequências dos casos estratificados por cada variável clínica avaliada, frente aos grupos não-clonal e clonal foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher. A razão de chances (Odds ratios - OR), seguida do intervalo de confiança (95%) foi calculada pela análise de Regressão Logística Multinomial (RLM). As variáveis contínuas foram submetidas à análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. As médias foram comparadas através do teste Mann-Whitney (não paramétrico). O nível de significância foi fixado em $p \text{ value} < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do Programa IBM SPSS Statistics® 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5. Resultados

Dos 50 pacientes avaliados, em 44 a presença de alguma dismegacariopose foi confirmada por hematopatologista experiente (88%). O grupo de pacientes foi estratificado em dois subgrupos: grupo não-clonal e grupo clonal (Figura 8). O grupo não-clonal foi composto de 18 pacientes sendo 5 com hepatopatia crônica, 1 com anemia da doença crônica (ADC), 4 com bicitopenia, 2 com leucopenia, 3 com plaquetopenia, 1 com pancitopenia, 1 com hipoplasia medular e 1 com hipoplasia seletiva (Tabela 4).

Figura 8: Estratificação dos grupos clonal e não-clonal



Legenda: SMD = síndrome mielodisplástica; SMD-DM = SMD com displasia em múltiplas linhagens; SMD-SA-DM = SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens; SMD-EB1 = SMD com excesso de blastos; SMD/NMP = Síndrome mielodisplásticas/ mieloproliferativas; ADC = anemia da doença crônica.

De acordo com a classificação OMS (ARBER et al., 2016), no grupo clonal, foram incluídos 17 (65,4%) casos com SMD-DM, 6 (23,1%) com SMD-SA-DM, 1 (3,9%) com SMD-EB1 e 2 (7,6%) com SMD/NMP (Tabela 4). Dos 26 pacientes, apenas 3 (12%) apresentaram alguma progressão da doença e 1 paciente não foi relatada progressão devido ao óbito (Tabela 4). Baseando-se no IPSS-R (GRENBERG et al., 2012), analisando a estratificação de risco dos pacientes do grupo clonal, apenas 3 casos foram classificados como intermediário, 6 pacientes como muito baixo risco e 6 como baixo risco (Tabela 4). Para 9 pacientes do grupo clonal a classificação de risco não foi possível pela não disponibilidade de análise citogenética. Além disto, dois pacientes classificados como SMD/SMP, inclusos no grupo clonal, não possuem classificação quanto ao risco de evolução da doença. Dos 44 pacientes estudados, um diagnóstico definitivo foi encontrado em 77,3%, num tempo médio de avaliação de 55 meses.

Tabela 4: Caracterização dos pacientes nos grupos clonal e não-clonal

Variáveis	n (%)
CLASSIFICAÇÃO GRUPO NÃO-CLONAL	
Hepatopatia crônica	5 (27,8%)
Anemia da doença crônica	1 (5,5%)
Bicitopenia	4 (22,3%)
Leucopenia	2 (11,2)
Plaquetopenia	3 (16,7%)
Pancitopenia	1 (5,5%)
Hipoplasia medular	1 (5,5%)
Hipoplasia seletiva	1 (5,5%)
CLASSIFICAÇÃO GRUPO CLONAL (OMS 2016)	
SMD-DM	17 (65,4%)
SMD-SA-DM	6 (23,1%)
SMD-EB1	1 (3,9%)
SMD/NMP	2 (7,6%)
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO CATEGORIZADA (IPSS-R)*	
Muito baixo + baixo	12 (50%)
Intermediário + alto + muito alto	3 (12,5%)
PROGRESSÃO DA SMD**	
Sim	3 (12%)
Não	22(88%)

*9 pacientes não foram classificados quanto ao IPSS-R devido ao cariótipo não disponível (ausência de metáfases). 2 pacientes SMD/SMP não são classificados quanto ao risco.

**1 paciente não foi relatada progressão da doença porque paciente veio à óbito em período inferior a 6 meses da primeira consulta.

Legenda: SMD = síndrome mielodisplástica; SMD-DM = SMD com displasia em múltiplas linhagens; SMD-SA-DM = SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens; SMD-EB1 = SMD com excesso de blastos 1; SMD/NMP = Síndrome mielodisplásticas/ mieloproliferativas; ADC = anemia da doença crônica.

Na tabela 5 são descritos os achados clínico-laboratoriais dos pacientes avaliados neste estudo, estratificados por grupo clonal e não clonal. Dentre os 44 pacientes incluídos no estudo, 24 (54,5%) foram do sexo feminino e 20 (45,5%) do sexo masculino. No grupo não-clonal houve predomínio de pacientes do sexo feminino (72,2%) e no grupo clonal apresentou predomínio de casos do sexo masculino (57,7%). Não se observou associação entre o gênero e os grupos não-clonal e clonal ($p=0,06$) (Tabela 5).

Com relação à idade, no grupo total, a média foi de 70 anos e a mediana 73 anos (variação 46 - 93) com uma predominância de pacientes com idade ≥ 60 anos (70,5%) (Tabela 5). Na estratificação dos pacientes entre não-clonal e clonal, em relação à idade, observou-se uma incidência maior de casos de pacientes com idade ≥ 60 anos dentro do grupo clonal (22/84,6%) (Tabela 5). Por outro lado, pacientes com idade < 60 anos corresponderam à 50% dos casos de pacientes do grupo não-clonal. A interação entre idade e grupos foi significativa ($\chi^2 = 6,123$; $p=0,02$) (Tabela 5). Através do teste RLM foi identificado que pacientes com idade ≥ 60 anos tem um aumento de chances significativa de serem do grupo clonal (OR=5,500; $p=0,018$; 95%IC=1,343-22,532) (Tabela 5).

Quanto à variável Hb (OMS), foi verificada uma predominância de pacientes com anemia, independentemente do sexo do paciente (29/65,9%) (Tabela 5). Na estratificação dos pacientes entre não-clonal e clonal, em relação à anemia, observou-se uma incidência maior de casos de pacientes com anemia dentro do grupo clonal (21/80,8%) (Tabela 5). Por outro lado, pacientes sem anemia corresponderam à 55,5% dos casos de pacientes não-clonal (Tabela 5). A interação entre anemia (valores de diagnóstico) e grupos foi significativa ($\chi^2 = 10,095$; $p=0,002$). Através do teste de RLM, foi identificado que pacientes com anemia tem maior razão de chances de serem do grupo clonal (OR=8,4; $p=0,003$; 95%IC=2,108-33,476) (Tabela 5).

Quanto aos achados no sangue periférico, de acordo com IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), foi observado predomínio de pacientes com Hb >10 g/dL em todos os grupos, seja no total de pacientes (29/65,9%), no grupo não-clonal (15/83,3%) e no grupo clonal (14/53,8%). A associação entre os grupos clonal e não clonal em relação à hemoglobina (IPSS-R) não foi significativa ($p=0,14$) (Tabela 5).

Analisando os dados de neutrófilos (OMS), 27 pacientes (61,4%) do grupo total tiveram contagem de neutrófilos $\geq 1.800/\text{mm}^3$ (Tabela 5). O grupo não-clonal e

clonal apresentaram maior número de pacientes com contagem de neutrófilos $\geq 1.800/\text{mm}^3$ (72,2% e 53,8%, respectivamente) (Tabela 5). A associação entre os grupos não-clonal e clonal em relação à neutropenia (valores de diagnóstico) não foi significativa ($p=0,34$) (Tabela 5).

Com relação à contagem de neutrófilos, de acordo com IPSS-R (GREENBERG *et al.*, 2012), 39 pacientes (88,6%) do total de casos avaliados tiveram contagem de neutrófilos $\geq 800/\text{mm}^3$. No grupo não-clonal todos os indivíduos apresentaram contagem de neutrófilos acima do valor de referência. No grupo clonal, houve predomínio de contagem de neutrófilos $\geq 800/\text{mm}^3$ (80,8%). A associação entre os grupos não-clonal e clonal em relação à neutropenia (IPSS-R) não foi significativa ($p=0,06$) (Tabela 5).

Analisando a plaquetopenia (OMS) no grupo total 28 (63,6%) indivíduos apresentaram resultados abaixo de $150.000/\text{mm}^3$. A contagem dessa variável $<150.000/\text{mm}^3$ foi predominante nos grupos não-clonal (72,3%) e clonal (57,7%). Não foi observada associação significativa entre os grupos em relação à contagem de plaquetas ($p=0,36$) (Tabela 5).

A contagem de plaquetas (IPSS-R) no grupo total foi igual ou superior a $100.000/\text{mm}^3$ em um total de 24 pacientes (54,5%) (Tabela 5). Quanto ao grupo não clonal, 50,0% dos pacientes apresentaram contagem entre $50.000/\text{mm}^3$ e $100.000/\text{mm}^3$ (Tabela 5). No grupo clonal, 65,4% dos pacientes apresentaram contagem superior a $100.000/\text{mm}^3$ (Tabela 5). Não foi observada associação significativa entre os grupos em relação à plaquetopenia ($p=0,21$) (Tabela 5).

Em relação ao número de citopenias (OMS), observou-se um predomínio de pacientes que apresentaram somente uma citopenia no grupo não-clonal. Contudo, no grupo clonal, foi observado que 61,5% dos pacientes apresentam maior número de citopenias (2 ou 3) (Tabela 5). Em relação ao número de citopenias (IPSS-R), para ambos os grupos houve predomínio de 1 citopenia (94,5% e 73,1%, respectivamente para o grupo não clonal e clonal (Tabela 5). Porém, considerando a referência do IPSS-R ou os valores de diagnóstico, não foram observadas associações significantes entre o número de citopenias e os grupos avaliados ($p>0,05$) (Tabela 5).

Dos achados do mielograma (MO), apenas 41 pacientes foram considerados pois em 3 casos (grupo não-clonal) a análise citológica da medula não estava disponível. Quanto à porcentagem de blastos, 97,5% dos casos apresentavam

blastos <5%. No grupo não-clonal, todos os pacientes apresentavam contagem de blastos inferior a 5%. Semelhantemente ao grupo não-clonal, o grupo clonal mostrou que 96,2% dos casos tiveram contagem de blastos <5% (Tabela 5). Não houve associação significativa entre os grupos em relação à contagem de blastos ($p=1,00$) (Tabela 5).

Um achado importante foi identificado no alto percentual de casos com ferro medular diminuído na casuística avaliada (44,7%) (Tabela 5). Na estratificação por grupo, o grupo não-clonal mostrou 53,3% de pacientes com ferro medular normal. Na análise do grupo clonal, houve predomínio de casos tanto com ferro medular aumentando quanto diminuído (43,5%) (Tabela 5). A interação entre ferro medular e grupos foi significativa ($\chi^2=12,253$; $p=0,002$). Através do teste RLM foi identificado que pacientes com valores de ferro medular normal tem um aumento de chances significativo de serem do grupo não-clonal (OR=1,72; $p=0,00$; 95%IC=3.34-8.90).

Ainda acerca dos achados do mielograma, dentre o total de pacientes, houve um predomínio de 65,9% casos com ausência de sideroblastos em anel. No grupo não-clonal, 93,4% dos pacientes também não apresentaram sideroblastos em anel. Já no grupo clonal, 7 (30,4%) pacientes apresentaram sideroblastos acima de 15%. Não se observou associação entre o percentual de sideroblastos em anel e os grupos não-clonal e clonal ($p=0,23$) (Tabela 5).

Frente a análise histológica, 53,7% dos casos avaliados apresentaram celularidade da medula óssea do tipo hiperclonal. No grupo não-clonal, não houve diferença quanto ao tipo de celularidade (33,3% de pacientes para cada tipo de celularidade). Já no grupo clonal, houve predomínio de pacientes com medula hiperclonal (61,5%). Não foi observada associação significativa entre os grupos em relação à celularidade da medula ($p=0,11$) (Tabela 5).

Ainda avaliando-se a análise histológica, quanto à presença de fibrose medular, verificou-se que 89,6% dos pacientes apresentaram medula com ausência de fibrose. Tanto no grupo não-clonal como no grupo clonal, a maioria dos pacientes não apresentaram fibrose medular (85,8% e 93,4%, respectivamente para o grupo não-clonal e clonal). Não houve associação significativa entre os grupos em relação à fibrose medular ($p=0,57$) (Tabela 5).

As variáveis de displasias foram categorizadas de acordo com o exame realizado, se mielograma (MO) ou por biópsia óssea (BO). Inicialmente, frente as displasias identificadas no MO, verificou-se que 15 (36,5%) pacientes apresentaram

diseritropese, 9 (22%) foram diagnosticados com disgranulopese e 18 (43,9%) casos apresentaram dismegacariopese. Destaca-se que 17(41,5%) pacientes não apresentaram alterações displásticas ao MO (Tabela 6).

Tabela 5: Caracterização e dados laboratoriais dos pacientes dos grupos clonal e não-clonal.

Variáveis	Clonal n (%)	Não-clonal n (%)	p*
SEXO			
Feminino	11 (42,3%)	13 (72,2%)	0,06
Masculino	15 (57,7%)	5 (27,8%)	
IDADE			
< 60	4 (15,4%)	9 (50%)	0,02
≥ 60	22 (84,6%)	9 (50%)	
HEMOGLOBINA (g/dL) OMS			
Anemia (<12 (M) ou <13 (H))	21 (80,8%)	8 (44,5%)	<0,01
Não-anemia (≥12 (M) ou ≥13 (H))	5 (19,2%)	10 (55,5%)	
HEMOGLOBINA (g/dL) IPSS-R			
< 8	6 (23,1%)	2 (11,1%)	0,14
8 - < 10	6 (23,1%)	1 (5,6%)	
≥ 10	14 (53,8%)	15 (83,3%)	
NEUTRÓFILOS (/mm³) OMS			
<1.800	12 (46,2%)	5 (27,8%)	0,34
≥1.800	14 (53,8%)	13 (72,2%)	
NEUTRÓFILOS (/mm³) IPSS-R			
< 800	5 (19,2%)	0 (0%)	0,06
≥ 800	21 (80,8%)	18 (100%)	
PLAQUETAS (x10³/mm³) OMS			
< 150	15 (57,7)	13(72,3%)	0,36
≥ 150	11 (42,3)	5 (27,7%)	
PLAQUETAS (x10³/mm³) IPSS-R			
< 50	2 (7,7%)	2 (11,1%)	0,21
50 - < 100	7 (26,9%)	9 (50%)	
≥ 100	17 (65,4%)	7 (38,9%)	
Nº DE CITOPENIAS (OMS)			
1 citopenia	10 (38,5%)	12 (66,7%)	0,06
2 ou 3 citopenias	16 (61,5%)	6 (33,3%)	
Nº DE CITOPENIAS (IPSS-R)			
1 citopenia	19 (73,1%)	17 (94,5%)	0,11
2 ou 3 citopenias	7 (26,9%)	1 (5,5%)	
BLASTOS **			
< 5%	25 (96,2%)	15 (100%)	1,00
≥ 5%	1 (3,8%)	0 (0%)	

FERRO MEDULAR** ***			
Diminuído	10 (43,5%)	7 (46,7%)	
Normal	3 (13,0%)	8 (53,3%)	<0,01
Aumentado	10 (43,5%)	0 (0%)	
SIDEROBLASTOS EM ANEL ***			
< 15%	1 (4,4%)	1 (6,6%)	
≥ 15%	7 (30,4%)	0 (0%)	0,23
Ausência	15 (65,2%)	14 (93,4%)	
CELULARIDADE			
Hipocelular	3 (11,5%)	6 (33,3%)	
Normocelular	7 (27,0%)	6 (33,3%)	0,11
Hiper celular	16 (61,5%)	6 (33,3%)	
FIBROSE MEDULAR****			
Sim	1 (6,6%)	2 (14,2%)	
Não	14 (93,4%)	12 (85,8%)	0,57

*Teste de Qui Quadrado. Valores significantes em negrito quando $p < 0,05$

**3 pacientes sem mielograma disponível, no grupo não-clonal

*** 3 pacientes com mielograma, contudo sem dados sobre ferro medular ou sideroblastos em anel, no grupo clonal

**** 11 pacientes do grupo clonal e 4 pacientes do grupo não-clonal não possuem dados de fibrose na biópsia óssea.

Legenda: M = mulheres, H = Homens

No grupo não clonal, observou-se predomínio de ausência de alterações displásticas no MO (69,3%), 13,3% apresentavam diseritropoese, 6,7% com disgranulopoese e 46,7% das amostras apresentaram dismegacariopoese através do mielograma. No grupo clonal, 50% dos pacientes apresentaram diseritropoese no MO, 30,8% das amostras com disgranulopoese e 42,3% com dismegacariopoese através da análise do aspirado medular (Tabela 6).

Na análise dos pacientes entre os grupos não-clonal e clonal em comparação à diseritropoese no mielograma observou-se uma incidência maior de pacientes com essa displasia dentro do grupo clonal (13/50%). A interação entre diseritropoese no MO e os grupos foi significativa ($\chi^2=5,512$; $p=0,04$). Através do teste RLM, foi identificado que pacientes com diseritropoese no MO tem um aumento de chances significativa de serem do grupo clonal (OR=6,50; $p=0,029$, 95%IC=1,217-34,719) (Tabela 6).

Não houve associações significativas entre os grupos não-clonal e clonal em relação à presença de disgranulopoese ($p=0,11$) e dismegacariopoese ($p=1,00$) no MO.

Em relação aos tipos de alterações megacariocíticas identificadas no MO, dentre o total de pacientes, 5 (12,2%) eram somente micromegacariócitos e 6 (14,6%) apenas megacariócitos hipolobulados. Em dois pacientes foram descritos simultaneamente micromegacariócitos/formas hipolobulados e em um caso, micromegacariócitos/formas monolobulados, sendo um total de 7,31% de formas combinadas (alterações associadas). Em 4 pacientes foram descritos dimegacariopose no mielograma, mas não foi mencionado a alteração específica. A descrição foi realizada baseando-se em 41 resultados, pois 3 casos apresentaram mielograma não indisponíveis.

Caracterizando os tipos de alterações megacariocíticas analisadas no MO, para o grupo não-clonal, 20% das amostras apresentaram micromegacariócitos, 20% apresentaram megacariócitos hipolobulados, 60% dos pacientes não possuíam alterações megacariocíticas, e em 3 pacientes o mielograma não estava indisponível (Tabela 6).

Os tipos de alterações megacariocíticas no MO para o grupo clonal, foram correspondentes à 7,7% das amostras com micromegacariócitos, 11,5% com megacariócitos hipolobulados, 11,5% com alterações com alterações associadas (formas combinadas) e 69,3% dos pacientes não possuíam alterações megacariocíticas através da análise do aspirado medular (Tabela 6).

Não houve associação significativa entre os diferentes tipos de alterações megacariocíticas no MO e os grupos clonal e não-clonal ($p > 0,05$). (Tabela 6)

Quanto às displasias na BO, foi visualizado diseritropose em 26 (59,1%) pacientes, disgranulopose em 3 (6,81%) e em todos os casos dismegacariopose (critério de inclusão para o estudo). No grupo não-clonal, 33,3% apresentavam displasia na linhagem eritróide, não foi observada disgranulopose em nenhum paciente. No grupo clonal, verificando as alterações displásticas na análise da BO, 76,9% apresentaram diseritropose e 11,5% apresentaram alteração displástica na linhagem granulocítica (Tabela 6).

Quanto à diseritropose na BO e os grupos não-clonal e clonal verificou-se uma frequência maior de casos de pacientes com essa displasia dentro do grupo clonal (20/76,9%). A interação entre diseritropose na BO e grupos foi significativa ($\chi^2=8,36$; $p=0,006$). O teste RLM identificou que pacientes com diseritropose na BO tem maior razão de chances de serem do grupo clonal (OR=6,667; $p=0,005$, 95%IC=1,748-25,433) (Tabela 6).

Não se observaram associações significativas entre os grupos não-clonal e clonal em relação à disgranulopoese na BO ($p=0,23$), assim como na dismegacariopoese na BO ($p=1,00$) (Tabela 6).

Em relação aos tipos de alterações megacariocíticas identificadas na BO no grupo total, 38,6% apresentaram micromegacariócitos, 34,1% formas hipolobulados/monolobulados e 27,3% apresentaram formas combinadas. Verificando os tipos de alterações megacariocíticas analisadas na BO para o grupo não-clonal, 22,3% das amostras apresentaram micromegacariócitos, 44,4% apresentaram megacariócitos hipolobulados/monolobulados e 33,3% apresentaram formas combinadas. Analisando os tipos de alterações megacariocíticas analisadas na BO para o grupo clonal, 50% das amostras apresentaram micromegacariócitos, 26,9% apresentaram megacariócitos hipolobulados/monolobulados e 23,1% apresentaram formas combinadas. Não houve associação significativa entre os diferentes tipos de alterações megacariocíticas (quando analisadas como formas isoladas ou combinadas) na BO e os grupos clonal e não clonal ($p>0,05$). (Tabela 6).

Através de outra classificação de estratificação dos tipos de alterações megacariocíticas na BO, realizando análise das formas displásticas em grupos para micromegacariócitos, formas hipolobuladas e formas monolobuladas, ou seja, sem a classificação de formas combinadas sendo que essa alteração quando presente foi classificada em dois grupos simultaneamente. Quanto ao tipo de alteração de formas hipolobuladas na BO e os grupos não-clonal e clonal verificou-se maior incidência de casos com megacariócitos hipolobulados dentro do grupo não-clonal (14/77,7%). Os pacientes com formas hipolobuladas na BO correspondem à 42,3% dos casos do grupo clonal. A interação entre megacariócitos hipolobulados na BO e grupos foi significativa ($\chi^2=5,454$; $p=0,03$). O teste RLM identificou que pacientes com megacariócitos hipolobulados na BO tem maior razão de chances de serem do grupo não-clonal (OR= 4,773; $p=0,024$, 95%IC=1,229-18,53). Não houve associação significativa entre a alteração de micromegacariócitos e os grupos não-clonal e clonal ($p=0,53$). Não houve associação significativa entre a alteração de megacariócitos monolobulados e os grupos não-clonal e clonal ($p=0,23$). (Essa análise não está representada na tabela).

Após a análise das displasias no mielograma e BO distintamente, foi realizada a análise dos tipos de alterações megacariocíticas no MO e BO concomitantemente, evidenciando a determinação da alteração megacariocítica no diagnóstico final do

paciente. Na estratificação dos pacientes entre o grupo não-clonal e clonal em relação à diseritropoese (MO/BO) observou-se uma incidência maior dentro do grupo clonal (24/92,3%). A interação entre essa variável e grupos foi significativa ($\chi^2=17,05$; $p=0,001$). Através do teste RLM foi identificado que pacientes com diseritropoese (MO/BO) tem maior aumento de razão de chances de serem clonal (OR=24, $p=0,000$, 95%IC=4,19-137). Quanto à disgranulopose (MO/BO), na estratificação dos pacientes entre os grupos em relação essa variável observou-se maior incidência dentro do grupo clonal (11/42,3%). A interação entre disgranulopose (MO/BO) e grupos foi significativa ($\chi^2=7,24$; $p=0,014$). Através do teste RLM foi verificado que pacientes com disgranulopose (MO/BO) tem um aumento de razão de chances significativa de serem clonal (OR=12,46, $p=0,022$, 95%IC=1,43-108,2).

Ainda na análise das alterações no MO e BO ao mesmo tempo, observaram-se no casuística do estudo, 14 (31,8%) pacientes com micromegacariócitos, 13 (29,6%) com megacariócitos hipolobulados/ monolobulados e 17 (38,6%) com formas combinadas. No grupo não-clonal, em relação ao tipo de alteração megacariocítica (MO/BO), 22,2% possuem micromegacariócitos, 38,9% possuem megacariócitos hipolobulados/ monolobulados e 38,9% possuem formas combinadas. No grupo clonal, em relação ao tipo de alteração megacariocítica (MO/BO), 38,4% possuem micromegacariócitos, 23,2% possuem megacariócitos hipolobulados/ monolobulados e 38,4% possuem formas combinadas. Não houve associação significativa entre os diferentes tipos de alterações megacariocíticas (MO/BO) e os grupos clonal e não clonal ($p=0,43$) (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização das displasias no mielograma e biópsia óssea.

DISPLASIAS MO			
Displasias	Clonal**	Não-clonal*** ****	p*
Diseritropoese			
Sim	13 (50,0%)	2 (13,3%)	0,04
Não	13 (50,0%)	13 (86,7%)	
Disgranulopoese			
Sim	8 (30,8%)	1 (6,7%)	0,11
Não	18 (69,2%)	14 (93,3%)	
Dismegacariopoese			
Sim	11 (42,3%)	7 (46,7%)	1,00
Não	15 (57,7%)	8 (53,3%)	
• Micromegacariócitos			0,33
Sim	2 (7,7%)	3 (20%)	
Não	24 (92,3%)	12 (80%)	
• Megacariócitos hipo/monolobulados			1,00
Sim	3 (11,5%)	3 (20%)	
Não	23 (88,5%)	12 (80%)	
• Formas combinadas			0,28
Sim	3 (11,5%)	0	
Não	23 (88,5%)	15 (100%)	
Ausência de alterações	18 (69,3%)	9 (60%)	
DISPLASIAS BO			
Displasias	Clonal	Não-clonal	p*
Diseritropoese			
Sim	20 (76,9%)	6 (33,3%)	< 0,01
Não	6 (23,1%)	12 (66,7%)	
Disgranulopoese			
Sim	3 (11,5%)	0 (0%)	0,23
Não	23 (88,5%)	18 (100%)	
Dismegacariopoese			
Sim	26 (100%)	18 (100%)	-
Não	0 (0%)	0 (0%)	
• Micromegacariócitos			1,00
Sim	13 (50%)	4 (22,3%)	
Não	13 (50%)	14 (77,7%)	
• Megacariócitos hipo/monolobulados			0,06
Sim	7 (26,9%)	8 (44,4%)	
Não	19 (73,1%)	10 (55,6%)	
• Formas combinadas			0,11
Sim	6 (23,1%)	6 (33,3%)	
Não	23 (76,9%)	12 (66,7%)	

DISPLASIAS BO/MO			
Displasias	Clonal	Não-clonal	p*
Diseritropoese			
Sim	24 (92,3%)	6 (33,3%)	< 0,01
Não	2 (7,7%)	12 (66,7%)	
Disgranulopoese			
Sim	11 (42,3%)	1 (5,6%)	0,01
Não	15 (57,7%)	17 (94,4%)	
Dismegacariopoese			
Sim	26 (100%)	18 (100%)	-
Não	0 (0%)	0 (0%)	
• Micromegacariócitos			
Sim	10 (38,4%)	4 (22,2%)	0,33
Não	16 (61,6%)	14 (77,8%)	
• Megacariócitos hipo/ mono			
Sim	6 (23,2%)	7 (38,9%)	0,32
Não	20 (76,8%)	11 (61,1%)	
• Formas combinadas			
Sim	10 (38,4%)	7 (38,9%)	1,00
Não	16 (61,6%)	11 (61,1%)	

*Teste de Qui Quadrado. Valores significantes em negrito quando $p < 0,05$

**9 pacientes do grupo clonal não apresentaram displasia no MO

***3 resultados de mielograma não disponível

****8 pacientes do grupo não-clonal não apresentaram displasia no MO

Legenda: MO = mielograma, BO = biópsia óssea

Quanto ao número de displasias (1,2 ou 3 displasias) e os grupos, no grupo total observou-se maior prevalência de pacientes com 2 displasias (18/ 40,9%). Na estratificação dos pacientes entre não-clonal e clonal em relação ao número de displasias observou-se uma incidência maior de casos de pacientes com múltiplas (2 ou 3) displasias dentro do grupo clonal (24/92,3%). Por outro lado, pacientes com displasia megacariocítica isolada (1 displasia) correspondem à 66,6% dos casos de pacientes não-clonal. A interação entre número de displasias e grupos foi significativa ($\chi^2 = 14,387$; $p=0,000$). O teste RLM identificou que pacientes com múltiplas displasias tem maior razão de chances de serem do grupo clonal (OR=15,3; $p=0,001$; 95%IC=3,24-72,36) (Tabela 7).

Tabela 7: Caracterização dos pacientes em relação ao número de displasias

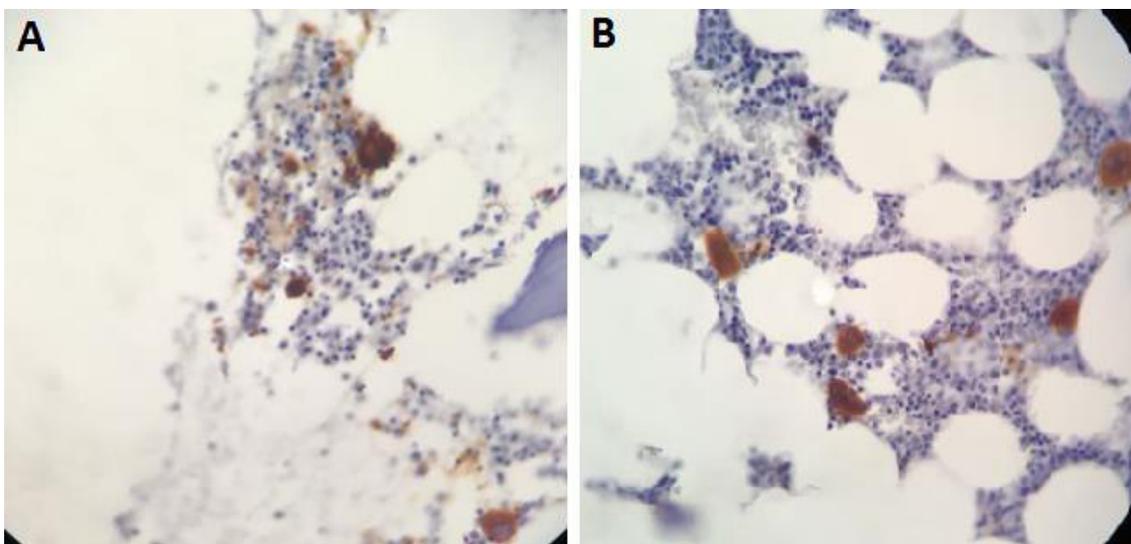
NÚMERO DE DISPLASIAS	SMD	NÃO-SMD	TOTAL
Displasia megacariocítica isolada (1)	2 (7,7%)	12 (66,6%)	14 (31,8%)
Displasia megacariocítica + 1 displasia (2)	13 (50%)	5 (27,8%)	18 (40,9%)
Displasia megacariocítica + 2 displasias (3)	11 (42,3%)	1 (5,6%)	12 (27,2%)

5.1 Análises por Imunohistoquímica (IHQ)

5.1.1 Marcação para CD61

A IHQ para o anticorpo CD61 teve como objetivo melhor identificação e caracterização das alterações megacariocíticas marcando micromegacariócitos e megacariócitos hipolobulados/monolobulados. No nosso estudo, todos os pacientes apresentaram a marcação positiva para CD61, confirmando a presença de micromegacariócitos na BO. A figura 9 ilustra células megacariocíticas marcadas com CD61.

Figura 9: Fotomicrografia de células positivas para CD61 (presença de células megacariocíticas, imuno-histoquímica, X40)..

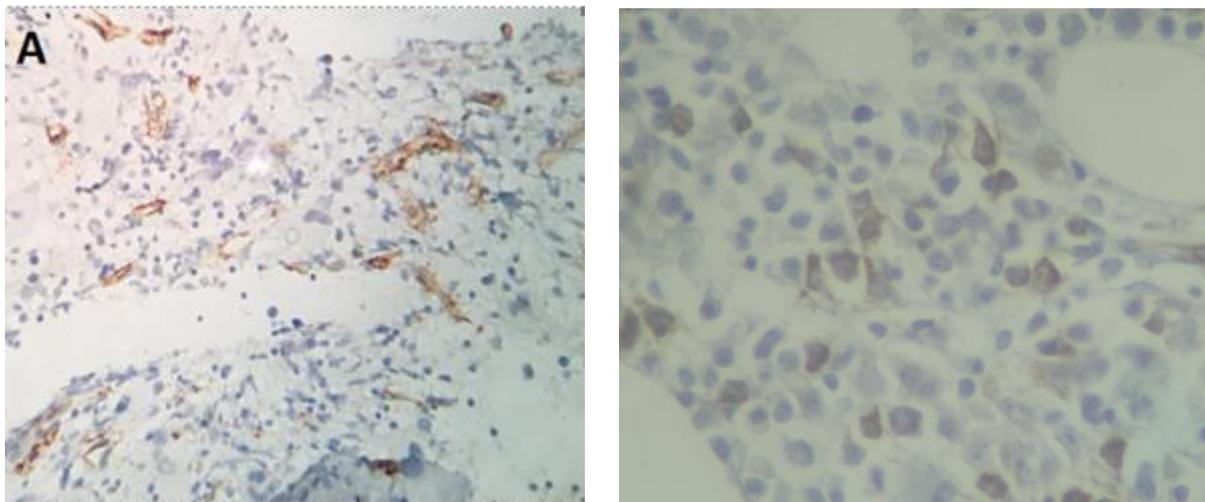


A e B: Reação positiva para CD61 evidenciando a presença de micromegacariócitos e megacariócitos hipolobulados

5.1.2 Marcação para CD34

Em relação à análise com o anticorpo CD34 (Figura 10), sua expressão aumentada foi evidenciada no grupo clonal nos casos 1 (SMD-DM), 12 (SMD-AS-DM), 18 (SMD-SA-DM), 19 (SMD/SMP), e 20 (SMD-SA-DM). Nenhum caso de paciente do grupo não clonal apresentou expressão aumentada de CD34. Um achado interessante é observado no fato de que os pacientes do grupo clonal com positividade para a marcação de CD34 não foram associados à progressão da doença durante o período médio de seguimento de 38 meses.

Figura 10: Fotomicrografia de células positivas para CD34 (aumento de células precursoras e da vasculatura, imuno-histoquímica, x40).

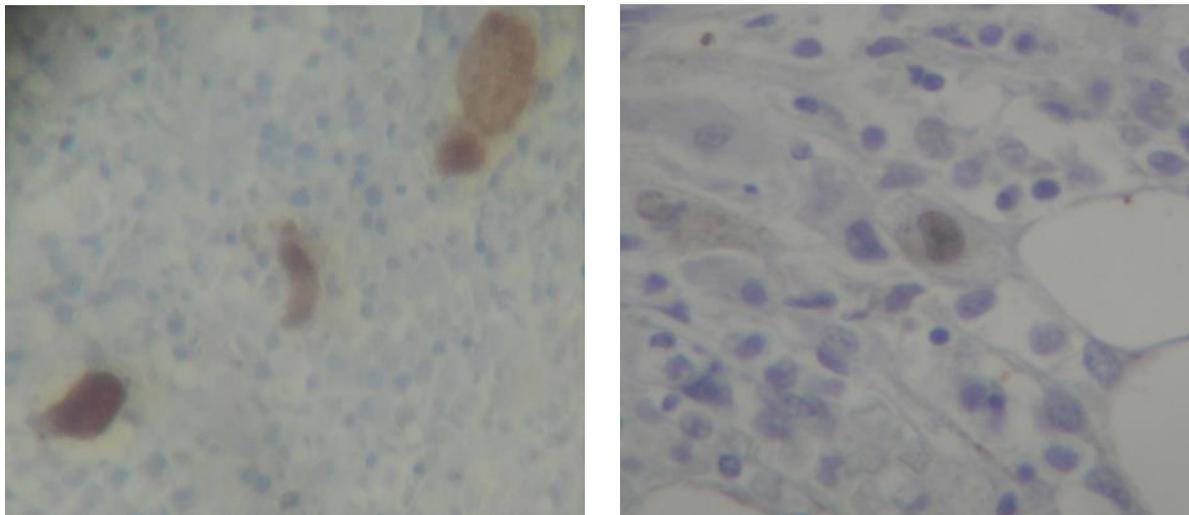


A e B: Reação positiva para CD 34 indicando aumento de células precursoras e da vasculatura.

5.1.3 Marcação para p53

A imunoreatividade para proteína p53 foi observada em 4 pacientes (9,1%) do grupo clonal, com índice de positividade que variou de 1% a 4%. A expressão aumentada da proteína p53 foi observada nos casos 12 (SMD-SA-DM), 20 (SMD-SA-DM), 27 (SMD-SA-DM) e 43 (SMD/SMP). Dos pacientes com SMD que apresentaram imunoreatividade da proteína p53, somente um paciente foi estratificado pelo IPSS-R como baixo risco. Os demais, por não possuírem análise citogenética (ausência de metáfases), não foram classificados. Nenhuma progressão da doença foi observada nos três casos com expressão aumentada de p53 após um tempo médio de seguimento de 75 meses. Não foi detectada imunoexpressão de p53 nos pacientes do grupo não-clonal. A figura 11 representa resultados de reação nuclear positiva para a proteína p53.

Figura 11: Fotomicrografia de células positivas para a proteína p53 (marcação nuclear escura, imuno-histoquímica, X40).



Somente em dois casos, descritos a seguir, foi observada expressão aumentada de todos os marcadores avaliados (CD61, CD34 e p53).

CASO 12

Paciente do sexo feminino, 56 anos, com diagnóstico de SMD-SA-DM, subtipo de baixo risco pelo IPSS-R ao diagnóstico. A biópsia óssea apresentou medula hiper celular com displasia megacariocítica (formas monolobuladas). Durante o tempo de seguimento, aproximadamente 6 anos, não apresentou progressão da doença.

CASO 20

Paciente do sexo masculino, com óbito em 2015, com diagnóstico de SMD-SA-DM. Não tinha cariótipo disponível. A biópsia óssea apresentou medula hiper celular com diseritropoese e alteração megacariocítica (formas hopolobuladas/monolobuladas). O tempo de seguimento foi inferior a 12 meses, quando foi comunicado seu óbito.

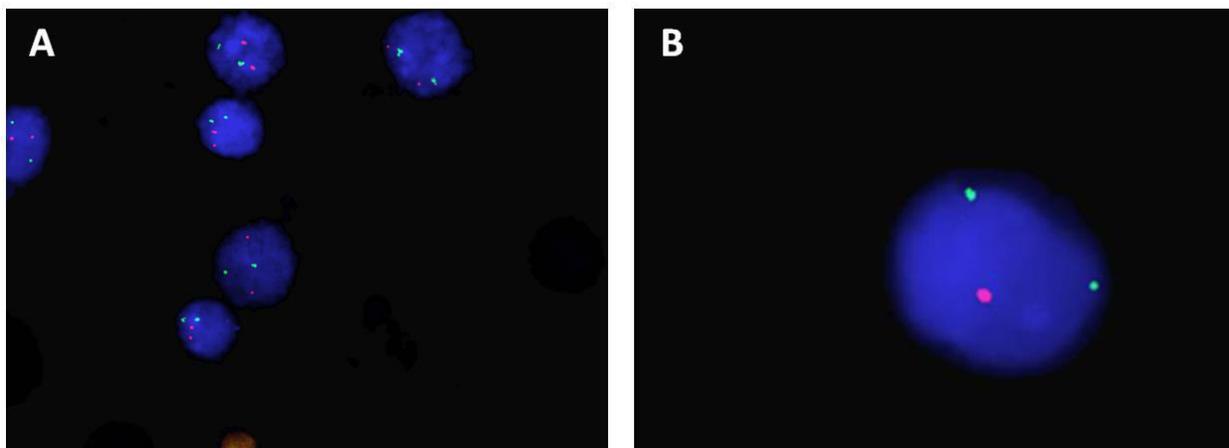
5.2 FISH

Foi realizada a técnica da FISH para análise da região 5q3.2 e do gene *TP53* de 44 amostras de medula óssea. Em algumas amostras não foi possível a sua realização por motivos técnicos (contaminação, não hibridização ou baixo número de intérfases). Portanto, para estudo da região 5q foram analisados 30 (68%) amostras e para alteração do gene p53 foram analisados 25 (57%) casos. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

5.2.1 Avaliação da região 5q31.2 por FISH

Durante a análise da FISH com objetivo de avaliar a del(5q), nenhum dos casos analisados mostrou resultado alterado. No entanto, foi possível observar alguns clones com deleção da região 5q31.2 (Tabela 9), mas que não alcançaram o valor de corte determinado (5%) para confirmar a alteração, em 21 pacientes. Em apenas 9 casos nenhuma alteração foi observada. Na Figura 12 estão demonstradas uma célula normal e outra com a presença da deleção da região 5q31.2.

Figura 12: Fotomicrografia de microscópio de fluorescência marcando região alvo 5q31.2 e controle do cromossomo 5.



A. Caso 4: intérfases com padrão normal de hibridização, mostrando dois sinais controles (verdes) e dois sinais da região alvo 5q31.2 (vermelhos). **B.** Caso 33: intérfase com deleção da região 5q31.2 (somente uma marcação em vermelho) e dois sinais da região controle (marcação verde).

Tabela 8: Resultados da FISH para o gene 5q e TP53

ID do paciente	Grupo	Cariótipo	FISH (5q)	FISH (TP53)
1	Clonal	Ausência	Normal	Alterado
2	Clonal	46, XY[18]	NR	NR
3	Não-clonal	46, XY[12]	NR	NR
4	Não-clonal	Ausência	Normal	Normal
5	Não-clonal	46, XY[13]	NR	NR
6	Não-clonal	Ausência	Normal	Normal
7	Não-clonal	46, XX[10]	Normal	Normal
8	Clonal	46, XX[9]	Normal	NR
9	Clonal	**	NR	NR
10	Não-clonal	46, XY[16]	Normal	Alterado
11	Não-clonal	47, XX, +mar{10}/46, XX[10]	Normal	NR
12	Clonal	46, XY[11]	NR	NR
13	Clonal	46, XY[5]	Normal	Normal
14	Não-clonal	Ausência	Normal	NR
15	Não-clonal	Ausência	Normal	Normal
16	Clonal	46, XX[14]	NR	NR
17	Clonal	46, XY[3]	Normal	Normal
18	Clonal	Ausência	Normal	Normal
19	Clonal	Ausência	Normal	Normal
20	Clonal	Ausência	NR	NR
21	Não-clonal	46, XY[10]	Normal	Normal
22	Não-clonal	Ausência	Normal	NR
23	Clonal	Ausência	Normal	NR
24	Não-clonal	Ausência	NR	NR
25	Não-clonal	Ausência	NR	Normal
26	Clonal	Ausência	Normal	Normal
27	Clonal	Ausência	NR	NR
28	Clonal	46, XX[10]	NR	NR
29	Clonal	46, XX[10]	Normal	Normal
30	Clonal	46, XX[10]	Normal	Normal
31	Clonal	Ausência	NR	NR
32	Não-clonal	46, XX[10]	Normal	Normal
33	Não-clonal	46, XX[10]	Normal	Normal
34	Clonal	***	NR	NR
35	Não-clonal	Ausência	Normal	Alterado
36	Não-clonal	46, XX[10]	Normal	Normal
37	Clonal	46, XY[10]	Normal	Normal
38	Clonal	Ausência	Normal	Normal
39	Não-clonal	Ausência	Normal	NR
40	Clonal	****	Normal	Normal
41	Clonal	46, XY[10]	Normal	Normal
42	Clonal	*****	NR	NR
43	Clonal	46, XX[12]	Normal	Normal
44	Clonal	Ausência	Normal	Normal

*NR: não realizada

** 46, XY, add(5)(p14)del(7)(q32)[2]/46,XY,del(7)(q32)[3]/46,XY[15]

*** 46, XX, del(11)(q23)[8]/46, XX[12]

**** 47, XX, t(4,11)(q27;q32)+mar[4]/46 XX [16]

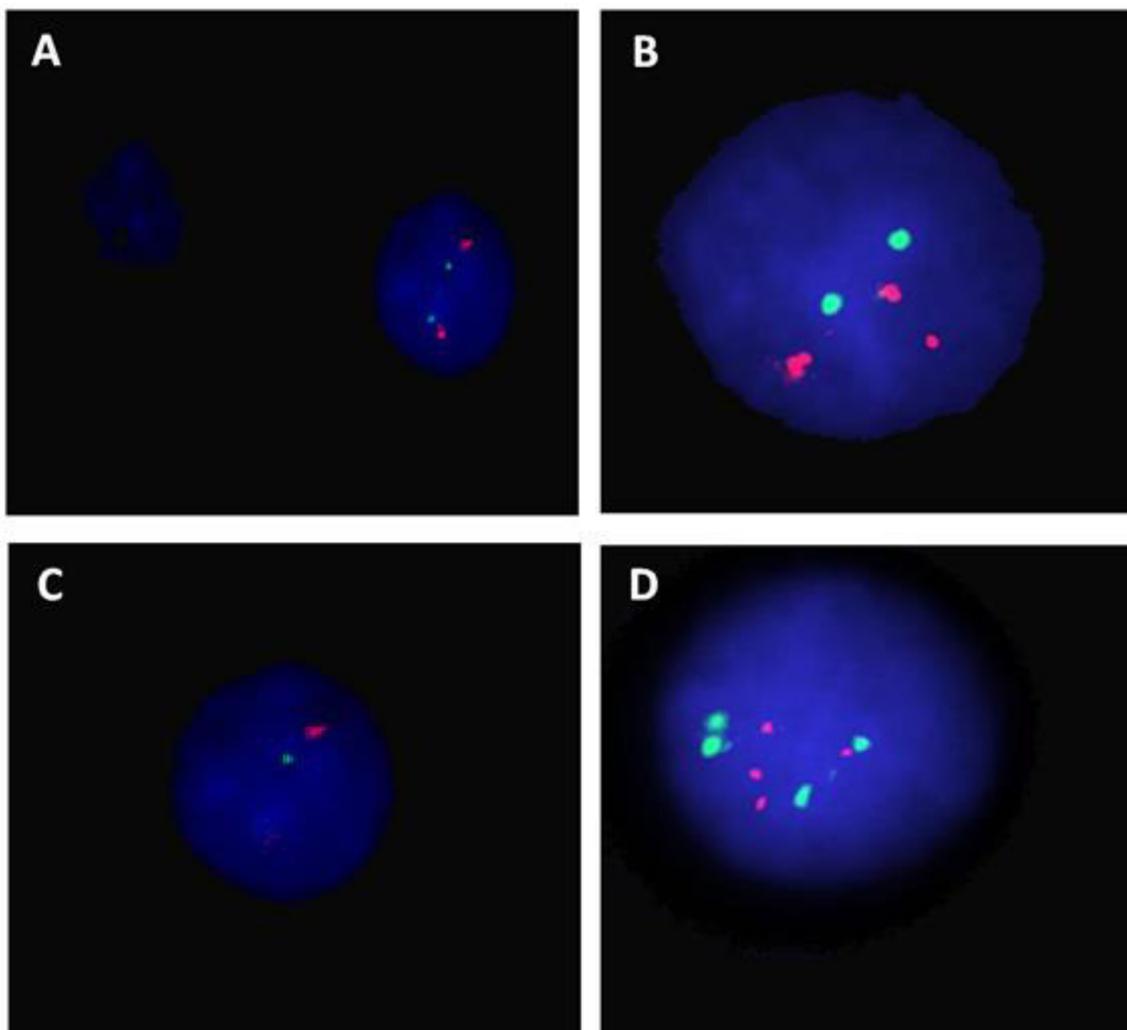
***** 46, XY, add(12)(q24.33)[2]/46 XY, del(17)(q23)[3]/46,XY[10]

5.2.2 Avaliação do gene *TP53* por FISH

Na avaliação do gene *TP53* foi observado padrão normal em 22 (88%) casos. Em 3 (12%) pacientes foi observada amplificação do gene. Esses casos estão descritos abaixo. A sonda utilizada liga-se a duas regiões do cromossomo 17, sendo os sinais verdes referentes à região centromérica (controle da sonda) e os sinais vermelhos à região P53-17p13.1.

Além disso, em alguns casos foi possível observar a presença de clones alterados sem, no entanto, ultrapassar o valor de corte determinado (5%) para caracterizar a alteração do gene *TP53* ou do cromossomo 17. Nesses casos verificaram-se as seguintes alterações: 10 (40%) apresentaram clones somente com amplificação, 1 (4%) paciente somente com polissomia, 10 (40%) com amplificação e polissomia simultaneamente e 1 (4%) paciente apresentou clones com monossomia e amplificação simultaneamente. Esses dados estão apresentados na Tabela 9 e algumas imagens demonstradas na Figura 13.

Figura 13: Fotomicrografia de microscópio de fluorescência marcando região alvo do gene *TP53*.



A. Caso 04: intérfases apresentando o padrão normal de hibridização, mostrando dois sinais controles (marcação verde) referentes à região centromérica e dois sinais da região alvo P53-17p13.1 (marcação vermelha). B. Caso 07: intérfase apresentando amplificação da região p53 (três sinais vermelhos) e dois sinais da região controle (marcação verde). C. Caso 29: intérfases apresentando monossomia do cromossomo 17 (somente um sinal verde e um sinal vermelho). D. Caso 30: intérfases apresentando polissomia (quatro sinais vermelhos e quatro sinais verdes).

RELATO DE CASOS:**CASO 1**

Paciente do sexo masculino, 86 anos, com diagnóstico SMD-DM apresentou ao hemograma Hb de 8.1g/dL, neutrófilos de 2.529/mm³ e plaquetas de 122.100/mm³. Mielograma sem alterações displásticas, com 3% de blastos. A citogenética por banda G não foi realizada por ausência de metáfases. À biópsia óssea, medula óssea era hiperclular, com presença diseritropoese, disgranulopoese e megacariócitos hipolobulados. Ausência de fibrose. A FISH para o gene p53 mostrou a presença de amplificação em 10,5% dos clones (Figura 14-A). Não se observou evolução da doença no período de seguimento (17m).

CASO 10

Paciente do sexo masculino, 45 anos, com diagnóstico inconclusivo de plaquetopenia. O hemograma evidenciou HB de 14.4 g/dL, neutrófilos de 3.745/mm³ e plaquetas de 59.150/mm³. Mielograma com alterações displásticas nas três linhagens com 2,4% de blastos. O estudo citogenético mostrou cariótipo normal, 46,XY[16]. À biópsia óssea observou-se medula hipocelular, diseritropoese e presença de micromegacariócitos. Ausência de fibrose. A FISH para o gene p53 revelou a presença de amplificação em 15,5% dos clones além de 4 células com polissomia (Figura 14-B). Paciente com tempo de seguimento de 54 meses.

CASO 35

Paciente do sexo feminino, 51 anos, com diagnóstico inconclusivo de leucopenia. O hemograma revelou Hb de 12.4 g/dL, neutrófilos de 2.028/mm³ e plaquetas de 138.000/mm³. Mielograma com dismegacariopoese, com blastos ≤2%. A citogenética por banda G, não foi realizada por ausência de metáfases. A BO evidenciou medula normocelular, presença de megacariócitos hipolobulados e ausência de fibrose. A FISH para o gene p53 mostrou presença de amplificação em 8% dos clones (Figura 14-C). Paciente com tempo de seguimento de 128 meses.

Tabela 09: Alterações cromossômicas na FISH para del 5q e TP53

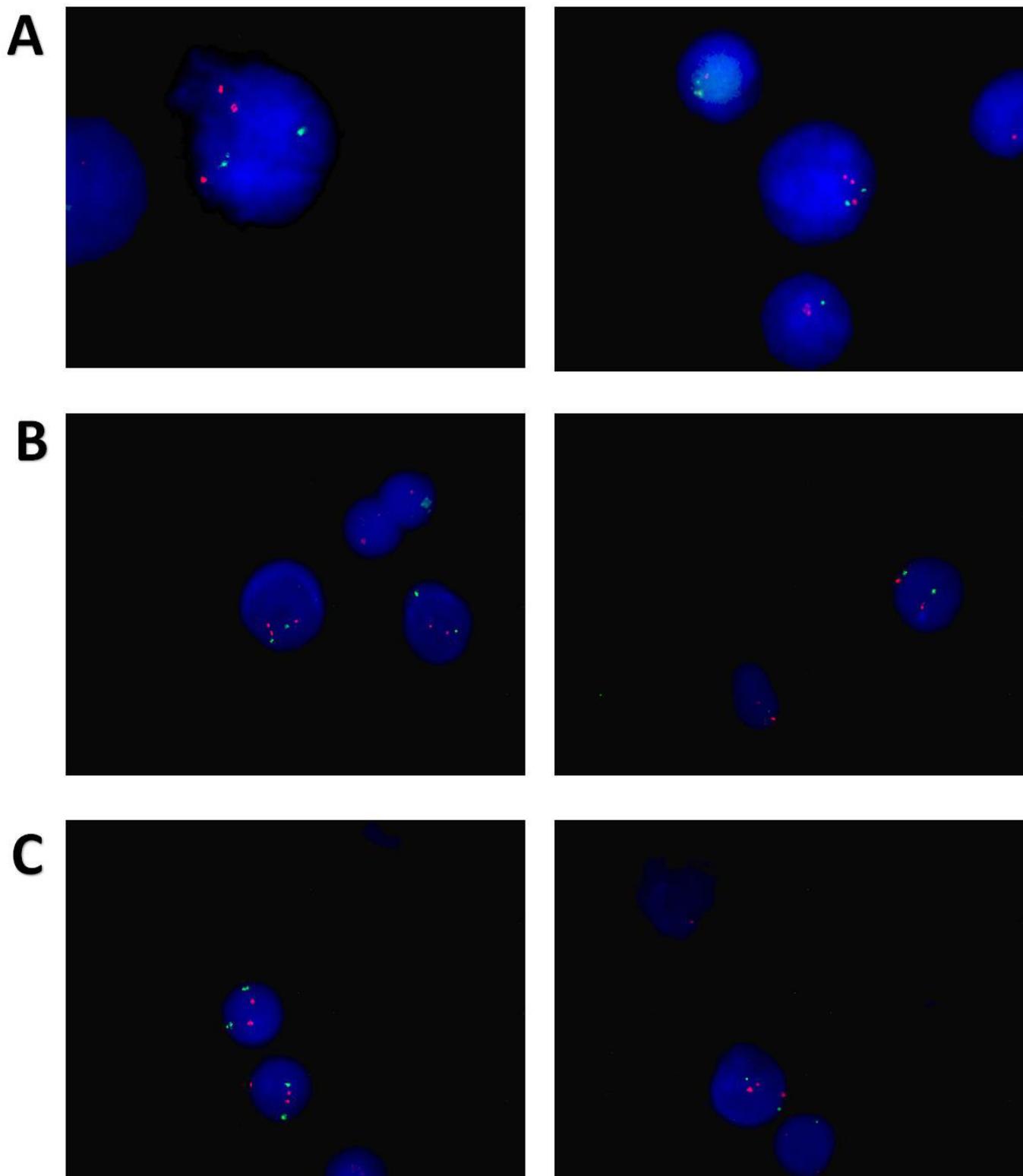
Paciente	Grupo	Marcação FISH (5q31.2)					Marcação FISH (TP53)				
		Normal	Deleção	Monossomia	Amplificação	Polissomia	Normal	Deleção	Monossomia	Amplificação	Polissomia
											
1	Clonal	200	0	0	0	0	179	0	0	21	0
4	Não-clonal	199	1	0	0	0	196	0	0	4	0
6	Não-clonal	197	2	1	0	0	191	0	0	3	6
7	Não-clonal	198	2	0	0	0	195	0	0	5	0
8	Clonal	99*	1	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR
10	Não-clonal	199	1	0	0	0	165	0	0	31	4
11	Não-clonal	199	1	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR
13	Clonal	200	0	0	0	0	194	0	0	3	3
14	Não-clonal	198	2	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR
15	Não-clonal	199	1	0	0	0	195	0	0	4	1
17	Clonal	198	2	0	0	0	198	0	0	2	0
18	Clonal	196	4	0	0	0	196	0	0	2	2
19	Clonal	195	5	0	0	0	192	0	0	3	5
21	Não-clonal	200	0	0	0	0	197	0	0	2	1
22	Não-clonal	200	0	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR
23	Clonal	197	3	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR
26	Clonal	166*	0	0	0	0	197	0	0	3	0
29	Clonal	200	0	0	0	0	196	0	1	3	0
30	Clonal	196	4	0	0	0	196	0	0	1	3
32	Não-clonal	200	0	0	0	0	199	0	0	1	0
33	Não-clonal	143*	5	0	0	0	194	2	0	2	2
35	Não-clonal	199	1	0	0	0	184	0	0	16	0

36	Não-clonal	196	4	0	0	0	198	0	0	2	0
37	Clonal	195	5	0	0	0	196	0	0	4	0
38	Clonal	65*	1	0	0	0	71*	0	0	2	0
39	Não-clonal	199	1	0	0	0	NR	NR	NR	NR	NR
40	Clonal	200	0	0	0	0	198	0	0	2	0
41	Clonal	197	3	0	0	0	197	0	0	0	3
43	Clonal	196	4	0	0	0	197	0	0	2	1
44	Clonal	200	0	0	0	0	198	0	0	1	1

Contagem de menos de 200 células

NR: não realizada

Figura 14: FISH dos casos alterados para o gene TP53.



Amplificação do caso 1 (A), caso 10 (B) e caso 35 (C): imagens mostrando 3 marcações vermelhas referente a região alvo e 2 marcações em verde referente ao controle.

6. DISCUSSÃO

Dos 50 pacientes com alguma citopenia inicialmente incluídos, em 44 foi confirmada a presença de alterações displásticas megacariocíticas, a saber, micromegacariócitos, formas mono e hipolobuladas, demonstrando uma reprodutibilidade de 88%. Esse dado está de acordo com os achados de Sasada e colaboradores (2018) que demonstraram um percentual de concordância geral de 80%. Matsuda e colaboradores (2018) reportaram uma reprodutibilidade de 86,6%, 89,1% e 95% para as linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica, respectivamente. Valores semelhantes foram relatados por Della Porta e colaboradores (2015), na análise da displasia megacariocítica (92%).

Dos 44 pacientes estudados, um diagnóstico definitivo foi encontrado em 77,3%, num tempo médio de avaliação de 55 meses. O grupo foi constituído principalmente por pacientes idosos, com média de idade de 70 anos, em que se observam, com maior frequência, múltiplas comorbidades e polifarmácia, além de uma maior prevalência de doenças onco-hematológicas (ROHRIG *et al.*, 2018). Vale ressaltar que todos os casos foram encaminhados por serviços de atenção primária para um centro de atenção terciária para investigação de uma ou mais citopenias, em ambulatório especializado de Hematologia. Assim, foram diagnosticados 26 casos de doenças clonais (59,1%) e 18 casos de alterações não clonais (40,9%). Os pacientes que apresentaram alguma citopenia e não tiveram um diagnóstico de certeza estabelecido, continuam em investigação.

A SMD é considerada a doença onco-hematológica mais comum em indivíduos idosos e sua frequência aumenta com a idade. Na verdade, a idade é considerada o fator de risco isolado mais comum para essa doença (SEKERES *et al.*, 2010). Assim, no grupo de doenças clonais (n=26) todos os casos são de SMD (92,3%) e SMD/NMP (7,7%). A maioria desses pacientes tinha idade ≥ 60 anos (84%) e pertenciam ao sexo masculino, achados que confirmam os dados de outros estudos de populações brasileiras (MAGALHÃES, 2013; BELLI *et al.*, 2015). Uma variação geográfica é reconhecida e sabe-se que pacientes de centros americanos e europeus têm média de idade >70 anos (NEUKIRCHEN *et al.*, 2011)

Quanto à classificação dos pacientes portadores de SMD segundo a OMS de 2016, houve um predomínio de pacientes do subgrupo SMD-DM (65,4%), seguido por SMD-SA-DM (23,1%). Em muitas casuísticas, esse é o subgrupo mais prevalente, seja no Brasil (MAGALHÃES, 2013), América Latina (BELLI *et al.*, 2015)

ou em grandes estudos multicêntricos (NEUKIRCHEN *et al.*, 2011; HASSE *et al.*, 2008).

Dentre os pacientes com análise citogenética disponível, ainda que com menos de vinte metáfases analisadas, um cariótipo normal foi observado em 20 pacientes (45,5%), 75% do grupo clonal (com SMD) e 88% do grupo não clonal. Em cerca de 45 a 50% dos casos de SMD não se observam alterações cromossômicas recorrentes pela análise da citogenética clássica (HAASE *et al.*, 2008; SHANZ *et al.*, 2012). Nesse estudo, um percentual mais elevado de cariótipo normal foi observado, indicando um maior número de casos de mais baixo risco.

Quanto à estratificação de risco pelo IPSS-R, 80% dos pacientes com citogenética disponível foram incluídos nos grupos de muito baixo e baixo risco, percentual superior àquele relatado por Greenberg e colaboradores (2012) no estudo multicêntrico de 7.012 pacientes que deu origem ao IPSS-R (57%). Em apenas um paciente se observou excesso de blastos (>5%), indicador bem estabelecido de mau prognóstico.

As citopenias são requisitos fundamentais para o diagnóstico de SMD. Esses pacientes têm anemia em cerca de 80% dos casos (ZINI *et al.*, 2017; HASSERJIAN *et al.*, 2018). A anemia, nesse estudo, foi significativamente mais freqüente nos pacientes portadores de SMD. Com relação ao número de citopenias, observou-se uma tendência para um maior percentual de duas ou três citopenias no grupo de doença clonal. Utilizando-se os valores de referência do IPSS-R para avaliar um possível impacto da intensidade da citopenia em ambos os grupos, observou-se que, apesar de o grupo de doenças não clonais apresentar maioria de casos (83,3%) com Hb \geq 10g/dL, essa diferença não alcançou significância estatística.

A celularidade da medula óssea na SMD é usualmente normo ou hiperclular como um menor percentual de pacientes apresentando medula hipocelular (10 a 15%) (ZINI *et al.*, 2017; MASCHEC *et al.*, 1993; HUAN *et al.*, 2008; SLOAND *et al.*, 2009). Nessa série de casos, uma medula normo ou hiperclular foi observada em 88,5%, de acordo, portanto, com os relatos em geral. De interesse, não houve predominância de um determinado padrão de celularidade no grupo não clonal.

Cerca de 10% a 20% dos pacientes com SMD tem algum grau de fibrose da medula óssea (graus 2 ou 3) que, sabidamente se associa a displasia em múltiplas linhagens, dependência de transfusão e mau prognóstico (DELLA PORTA *et al.*, 2011). Nesse estudo, em apenas um paciente do grupo SMD, se observou fibrose

(6,6%) e, nesse caso, como era de se esperar a evolução foi rápida, com óbito em menos de um ano após o diagnóstico. Curiosamente, em dois casos de doenças não-clonais foi detectada fibrose medular. Rocha Filho e colaboradores, em trabalho publicado em 2010, mostraram caso de calazar associado à fibrose medular que reverteu após tratamento.

Alterações de maturação das células hematopoéticas não são exclusivas de doenças neoplásicas. Podem ser vistas em desordens hematológicas não neoplásicas, condições reativas e também em indivíduos saudáveis (SHAVER *et al.*, 2017). A assim chamada mielodisplasia secundária resulta de um processo benigno e/ou reacional e muitas vezes reversível (ZEIDAN *et al.*, 2013; SHALLIS *et al.*, 2018). No estudo atual, no grupo não-clonal foram verificados 4 pacientes com micromegacariócitos, 7 com megacariócitos hipolobulados e 7 com formas combinadas. Não houve predominância de uma alteração, todas sendo detectadas em proporções equivalentes em ambos os grupos, à exceção das formas hipolobuladas, significativamente mais freqüentes no grupo de doenças não clonais, fato já mencionado por outros autores (GOASGUEN *et al.*, 2016). De interesse, a presença de micromegacariócitos, considerada uma alteração específica para SMD, foi observada em 4 pacientes portadores de doença não clonais, que não desenvolveram a SMD após um tempo médio de 55 m de seguimento.

Interessantemente, o tipo de displasia na SMD nem sempre corresponde ao tipo de citopenia que se observa. Nos casos aqui estudados, em que a presença de algum tipo de dismegacariopose foi critério de inclusão, apenas 57,7% dos pacientes apresentaram número de plaquetas menor que $150.000/\text{mm}^3$. Della Porta e colaboradores (2015) entretanto, observaram, na análise de 306 pacientes portadores de SMD observaram dismegacariopose em 49% e uma associação significativa com plaquetopenia (88%).

Outras displasias foram observadas em ambos os grupos. Entretanto, como se era de esperar, o grupo com SMD apresentou um freqüência significativamente maior de duas ou mais linhagens com alterações displásticas.

A avaliação das alterações displásticas varia em função da técnica utilizada, se por aspirado ou biópsia óssea. Teoricamente a análise citológica se presta melhor para a detecção de diseritropose e disgranulopose, enquanto as alterações megacariocíticas são melhor avaliadas em cortes histológicos. Nessa série de casos, a diseritropose foi mais relatada na biópsia óssea (61,4% *versus*

33,5%), provavelmente pela análise complementar de alterações arquiteturais tais como a presença de ninhos eritróides com mais de 10 células. A disgranulopoese foi mais detectada no aspirado (22% *versus* 6,8%). E, finalmente, a dismegacariopoese, presente em 100% das biópsias (critério de inclusão) foi evidenciada apenas em 43,9% dos aspirados.

Apenas em pacientes do grupo de doenças clonais (19,2%) foi observada positividade na avaliação do marcador CD34. Embora esse aumento corresponda a excesso de células blásticas, critério bem estabelecido de mau prognóstico, nenhum desses casos apresentou evolução da doença no período de seguimento.

Sabe-se que mutações no gene *TP53* são observadas principalmente em pacientes portadores de SMD de mais alto risco e se associam com elevado percentual de blastos e cariótipo complexo (BEJAR *et al.*, 2011). Nos casos aqui analisados, a expressão nuclear da proteína p53, foi observada apenas em casos de doenças clonais (3 SMD e 1 SMD/NMP), demonstrando uma desregulação deste marcador nas doenças clonais, em comparação as doenças não-clonais. Contudo, um dos casos com aumento de expressão do p53 (caso 12) foi diagnosticado como SMD de baixo risco (SMD-SA-DM). Porém, mesmo entendendo-se que a expressão aumentada de p53 é um marcador de pior prognóstico, nenhum caso avaliado no presente estudo apresentou progressão da doença para LMA. Destaca-se que esses pacientes, quando analisados por citogenética molecular, não apresentaram mutação do *TP53*. Neste ponto, hipotetizamos que o aumento de expressão do p53 tecidual demonstra que o gene *TP53* também está ativo (a nível de mRNA) como resposta gênica ao processo de instabilidade genômica ocasionada pelo acúmulo de danos genéticos identificados nos pacientes com doença clonal. Este achado reenfaz o papel da proteína p53 como marcador de doença clonal e de pior prognóstico de evolução clínica do paciente.

Em apenas um paciente do grupo SMD se detectou a amplificação do gene *TP53* pela FISH. Os outros dois casos, pacientes com idade <60 anos (45 e 51 anos), de doença não clonal, em que essa alteração foi observada, tem diagnóstico inconclusivo e permanecem em seguimento.

De acordo com a classificação da OMS para tumores hematopoéticos, incluindo sua mais recente versão (SWERDLOW *et al.*, 2017) a deleção isolada 5q é caracterizada pela presença de micromegacariócitos e formas hipolobuladas ou não lobuladas. Em nenhum dos casos aqui estudados, todos com essas alterações

displásticas, se observou, através da realização da FISH para região 5q31.2, qualquer resultado alterado. Esse achado também foi observado por Feng e colaboradores (2016) em seu estudo sobre classificação sistemática da displasia megacariocítica e seu impacto no prognóstico de pacientes com SMD. Assim, formas hipolobuladas foram também encontradas em outros tipos de SMD e, além disso, em doenças não clonais.

Em resumo, um protocolo sistemático de avaliação de pacientes citopênicos é importante para seu diagnóstico diferencial. Possíveis condições reacionais, não clonais, devem sempre ser cuidadosamente consideradas antes de se fazer um diagnóstico de SMD, particularmente quando a displasia é limitada a uma única linhagem. Pacientes com SMD mostraram maior intensidade de anemia e maior frequência de duas ou três citopenias, duas ou três linhagens com displasia (>10%).

Alterações displásticas na série megacariocítica foram observadas igualmente em ambos os grupos, com exceção das formas hipolobuladas, mais frequentes nas causas não clonais.

Os testes complementares utilizados, FISH e IHQ, foram de utilidade limitada no diagnóstico diferencial das citopenias. O impacto da alteração do p53, seja por IHQ, seja pela amplificação pela FISH, requer seguimento em mais longo prazo.

7. CONCLUSÕES

- A reprodutibilidade na detecção de dismegacariopose foi comparável aos dados da literatura
- A avaliação de displasia megacariocítica (micromegacariócitos e formas mono/hipolobuladas) em pacientes citopênicos mostrou pouca utilidade no diagnóstico diferencial
- Pacientes com SMD mostraram maior intensidade de anemia e maior frequência de duas ou três citopenias, duas ou três linhagens com displasia (>10%)
- Dentre os testes complementares utilizados, IHQ para CD34 e p53 foram positivos apenas em pacientes com diagnóstico confirmado de SMD
- Dentre os testes complementares utilizados, a FISH para as sondas 5q31.2 e 17p13.1, não agregou valor complementar à citogenética clássica nos casos estudados e foram de valor limitado para a avaliação diagnóstica de pacientes com citopenias e dismegacariopose.

8. REFERÊNCIAS

- ADES L, ITZYKSON R, FENAUX P, *et al.* Myelodysplastic syndromes. **Lancet.** 2014;383: 2239-52.
- ARBER D, ORAZI A, HASSERJIAN R, *et al.* The 2016 revision to the world health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood.** 2016;127: 2391–2405.
- AITELLI C, WASSON L. Pernicious anemia: presentations mimicking acute leukemia. **South J Med.** 2004;97(3):295-297.
- BEJAR R, STEVENSON K, ABDEL-WAHAB O, *et al.* Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med.** 2011; 364:2496–2506.
- BEJAR R, LEVINE R, EBERT B. Unraveling the molecular pathophysiological of myelodysplastic syndrome. **J Clin Oncol.** 2011;29(5): 504-515
- BELLI CB, *et al.* Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **Am. J. Hematol.** 2015;90(10):851-858.
- BERNASCONI P, CAVIGLIANO PM, Boni M, *et al.* Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? a study of 57 patients. **LIS** 2003;17: 2107-2112
- BOETTCHER S, GEROSA RC, RADPOUR R, *et al.* Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. **Blood** 2014;124:1393-1403.
- BOUTWOOD J, LEWIS S, WAINCOAST JS. The 5q syndrome. **Blood.** 1994; 84; 3253-60.
- BUDDE R, SCHAEFER HE. Smokers dysmyelopoiesis bone marrow alterations associated with cigarette smoking. **Pathol Res Pract.** 1989; 185(3): 347-350.
- CAZZOLA M, DELLA PORTA MG, TRAVAGLINO E, *et al.* Classification and prognostic evaluation of myelodysplastic syndromes. **Semin Oncol.** 2011;38: 627-634.

- CHA CH, PARK CJ, CHI HS, *et al.* CD34 and p53 Immunohistochemical stains differentiate hypocellular myelodysplastic syndrome (hMDS) from Aplastic Anemia and a CD34 immunohistochemical stain provides useful survival information for hMDS. **Ann Lab Med.** 2014;34(6):426-432.
- CRAVER BM, ALAOUI KE, SCHERBER RM, *et al.* The critical role of inflammation in the pathogenesis and progression of myeloid malignances. **Cancers** 2018;10(4):104.
- CARDIS E, VRIJHEID M, BLETTNER M, *et al.* Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. **BMJ.** 2005; 331:77.
- DELLA PORTA MG, LUCA ML, STRIPP C, *et al.* Risk stratification based on both disease status and extra hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. **Haematologica.** 2011;96(3):4410449.
- DELLA PORTA MG, TRAVAGLINO E, BOVERI E, *et al.* Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 2015; 29 (1): 66-75.
- DELLA PORTA MG, MALCOVATI L, BOVERI E, *et al.* Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol.** 2009;27:754-62.
- DEKA L, GUPTA S, GUPTA R, *et al.* Morphometric evaluation of megakaryocytes in bone marrow aspirates of immune-mediated thrombocytopenic purpura. **Platelets** 2013;24(2):113-117.
- EBERT B, PRETZ J, BOSCO J, *et al.* Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. **Nature** 2008;451:335-9.
- FENG G, GALE RP, CUI W, *et al.* A systematic classification of megakaryocytic dysplasia and its impact on prognosis for patients with myelodysplastic syndromes. **Experimental Hematology & Oncology** 2016;5:12.
- FONT P, LOSCERTALES J, BENAVENTE C, *et al.* Interobserver variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. **Ann Hematol.** 2013;92(1):19-24.
- GARCIA-MANERO G. Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol.** 2014;89:97–108.

- GERMING U, STRUPP C, GIAGOUNIDIS A, *et al.* Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Düsseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. **Leuk Res.** 2012;355:727-34.
- GOASGUEN J, BENNETT J, BAIN B, *et al.* Proposal for refining the definition of disgranulopoiesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Leuk Res.** 2014;38:447-53.
- GOASGUEN JE, BENNETT JM, BAIN BJ, *et al.* Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: difficulties in the assessment of dysplasia. **Leuk Res.** 2016;45:75-81.
- GRAUBERT T, PAYTON M, SHAO J, *et al.* Integrated genomic analysis implicates haploinsufficiency of multiple chromosome 5q31.2 genes in de novo myelodysplastic syndromes pathogenesis. **Plos One** 2009;4(2):e4583.
- GREENBERG P, COX C, LEBEAU MM, *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood.**1997;89:2079-2088.
- GREENBERG P, TUECHLER H, SCHANZ J, *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood** 2012;120:2454–2465.
- GREENBERG P, SCHANZ J, SANZ G, *et al.* Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. **Blood** 2016;128(16):2096-2097
- HASSERJIAN R. Myelodysplastic Syndrome Updated. Pathobiology 2018.
- HAASSE D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol.** 2008;87:515-526.
- HORNY H, SOTLAR K, VALENT P. Diagnostic values of histology and immunohistochemistry in myelodysplastic syndromes. **Leuk Res** 2007;31:1609-1616.
- HUFF JD, KEUNG VK, THAKURI M, *et al.* Copper deficiency causes reversible myelodysplasia. **Am J Hematol** 2007;82(7):625-630.
- IOLASCON A, ESPOSITO MR, RUSSO R , *et al.* Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. **Haematologica** 2012;97(12):1786-1794.

- ISOBE M, EMANUEL BS, GIVOL D, *et al.* Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature** 1986;320:84 -85.
- IWANAGA M, HSU WL, SODA M, *et al.* Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: a retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. **J Clin Oncol.** 2011;29(4):428-434.
- JADERSTEN M, SAFT L, SMITH A, *et al.* TP53 mutations in low risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. **J Clin Oncol.** 2011;29(15):1971-9.
- JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, *et al.* World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **Lyon:** IARC Press; 2001:352.
- JAWAD M, GO R, REICHARD K, *et al.* Increased multinucleated megacaryocytes as an isolated finding in bone marrow. **Am J Clin Pathol** 2016;146:561-566.
- KAWAI N, MATSUDA A, JINNAI I, *et al.* Proposal of criteria for dyserythropoiesis in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. **Int J Hematol** 2016;103:227-33.
- KUENDGEN A, MATSUDA A, GERMING U. Differences in epidemiology of MDS between Western and Eastern countries: Ethnic differences or environmental influence? **Leuk Res** 2007;31:103–104.
- KULASEKARARAJ AG, SMITH AE, MIAN SA, *et al.* TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. **Br J Haematol.** 2013;160:660–672.
- LEVINE AJ. P53, The cellular gatekeeper for growth and Division. **Cell.** 1997;88:323-331.
- LIANG C, LI J, CHENG J, CHEN S, *et al.* Characteristics of bone marrow cell dysplasia and its effectiveness in diagnosing myelodysplastic syndrome. **Hematology.** 2017;23(2):65-76.
- LIU D, CHEN Z, XUE Y, *et al.* The significance of bone marrow cell morphology and its correlation with cytogenetic features in the diagnosis of MDS-RA patients. **Leuk Res.**2009;33:1029–1038.

- LV L, LIN G, GAO X, *et al.* Case-control study of risk factors of myelodysplastic syndromes according to World Health Organization classification in a Chinese population. **Am J Hematol.** 2011;86:163–169.
- MA X, DOES M, RAZA A, *et al.* Myelodysplastic syndromes incidence and survival in the United States. **Cancer.**2007;109:1536-1542.
- MAGALHAES SMM, VASSALO J. Síndromes mielodisplásticas e mielodisplásticas/ mieloproliferativas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2009;31(4):267-272.
- MAGALHAES SMM, HEREDIA F, FERNANDES L, *et al.* Beyond race-related disparities: is myelodysplastic syndrome the same everywhere? **Leukemia & Lymphoma.** 2013; 54(7): 1564-1566.
- MAGALHAES SMM, MADEIRA TS, BITTENCOURT R, *et al.* Epidemiological and clinicopathological data from the Brazilian registry of patients with myelodysplastic syndromes and comparative analysis between different geographic areas. **Blood.** 2010;116(21):785-786.
- MAGALHAES SMM, METZE IL. Síndromes Mielodisplásticas – protocolo de exclusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2004; 26: 263-67.
- MAGALHAES SMM. Síndromes Mielodisplásticas – diagnóstico de exclusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter** 2006;28(3):175-177.
- MATSUDA A, JINNAI I, MYZAKAVI Y, *et al.* Proposals for a gradingsystem for diagnostic accuracy of myelodysplastic syndrome. **Clin Leuk** 2008;2(2):102-106.
- MALCOVATTI L, LINDENBERG EH, BROWEN D, *et al.* Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European Leukemia Net. **Blood.** 2013; 122(17): 2943–2964.
- MALLO M, CERVERA J.,SHANZ J., *et al.* Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. **Leukemia.** 2011;25,110-120.
- MATSUDA A, KAWABATA H, TOHYAMA KAORU, *et al.* Interobserver concordance of assessments of dysplasia and blast counts for the diagnosis of patients with cytopenia: from the Japanese central review study. **Leuk Res.** 2018;74:137-143.
- MCLAUGHLIN, P, ESTEY, E, GLASSMAN A, *et al.* Myelodysplasia and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma with fludarabine,

mitoxantrone, and dexamethasone (FND) plus rituximab and interferon alpha. **Blood**. 2005; 105:4573-4575.

- MCGRAW K, ZHANG L, ROLLISON D, *et al.*. The relationship of TP53 R72P polymorphism to disease outcome and TP53 mutation in myelodysplastic syndromes. **Blood Cancer J**. 2015;5:291.
- MCGRAW K, NGUYEN J, KOMROKJI R *et al.* Immunohistochemical pattern of p53 is a measure of TP53 mutation burden and adverse clinical outcome in myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leucemia. **Haematologica**. 2016;101(8):320-3.
- MEYERSON HF, FARHI DC, ROSENTHAL NS. Transient increase in blasts mimicking acute leukemia and progressing myelodysplasia in patients receiving growth factor. **Am J Clin Pathol**.1998;109(6):675-681.
- MICHOT F, GUT J. Alcohol-induced bone marrow damage. A bone marrow study in alcohol-dependent individuals. **Acta Haematol**. 1987;78(4):252-257.
- NEUKIRCHEN J, SCHOONEN WM, STRUPP C, *et al.* Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. **Leuk Res** 2011; 35: 1591-96.
- NISSE C, HAGUENOER JM, GRANDBASTIEN B, *et al.* Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. **Br J Haematol** 2001; 112: 927 – 35.
- OGUMA S, YOSHIDA, Y, UCHINO H, *et al.* Clinical characteristics of Japanese patients with primary myelodysplastic syndromes: A cooperative study based on 838 cases. Anemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare. **Leuk Res** 1995; 19:219–225.
- OLNES MJ, SLOAND EM. Targeting immune dysregulation in myelodysplastic syndromes. **Jama** 2011;305(8):814-819
- ORAZI A. Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leucemia, myelodysplastic syndrome and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. **Pathobiology** 2007;74:97-114.
- OHSHIMA K, KIKUSHI M, TAKESHITA. A megakaryocyte analysis of the bone marrow in patients with myelodysplastic syndrome, myeloproliferative disorder and allied disorders. **J Pathol**. 1995;177:181-189.

- PARMENTIER S., SCHETELIGJ, LORENZ K. Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. **Haematologica** 2012;97:723-30.
- PARK MJ, KIM, HJ, KIM SH, *et al.* Is International Prognostic Scoring System (IPSS) still standard in predicting prognosis in patients with myelodysplastic syndrome? External validation of the WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) and comparison with IPSS. **Eur J Haematol.** 2008;81:364–373.
- PAYDAS S. Young age MDS: differences between Western and Eastern countries. **Leuk Res.** 2006;30:362.
- PEDERSEN BJERGAARD J., DAUGAARD G, HANSEN SW, *et al.* Increased risk of myelodysplasia and leukaemia after etoposide, cisplatin, and bleomycin for germ-cell tumours. **Lancet.** 1991; 338: 359–363.
- PELLAGATTI A, JADERSTEN M, FORSBLOM AM, *et al.* Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007;104(27):11406-11.
- PINHEIRO RF, CHAUFAILLE MLLF. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndromes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 2009;42:1110-1112.
- RABELLINO EM, LEVENE RB, LEUNG LL, *et al.* Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes. **J Exp Med.** 1981;154:88-100.
- ROHRIG G, BECKER I, PAPPAS K, *et al.* Analysis of cytopenia in geriatric patients. **Z Gerontol Geriatr.** 2018;51: 231-236.
- ROCHA FD, FERREIRA FV, MENDES FO, *et al.* Bone marrow fibrosis (pseudo-myelofibrosis) in human kala-azar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2000;33(4):363-366.
- SAFT L, KARIMI M, GHADERI *et al.* P53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower risk myelodysplastic syndromes with del 5q. **Haematologica** 2014; 99(6):1041-9.

- SALLMAN DA, CLUZEAU T, LIST A, *et al.* Unraveling the Pathogenesis of MDS: the NLR3 inflammasome and pyroptosis drive the MDS phenotype. **Front Oncology** 2016; 6:151.
- SASADA S, YAMANTO H, MATSUDA H, *et al.* Inter-observer variance and the need for standardization in the morphological. **Leuk Res** 2018.
- SCHMITZ LL, MCCLURE JS, LITZ CE, *et al.* Morphologic and quantitative changes in blood and marrow cells following growth factor therapy. **Am J Clin Pathol.** 1994;101(1):67-75.
- SCHANZ J, TUCHLER H, SOLE F, *et al.* New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes and olioblastic AML following MDS derived from an international database merge. **J Clin Oncol.** 2012;30(8):820-829.
- SCHURCH CM, RIETHER C, OCHSENBEIN AF. Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. **Cell Stem Cell** 2014;14:460-472.
- STEENSMA DP. Dysplasia has a differential diagnosis: distinguishing genuine myelodysplastic syndromes (MDS) from mimics, imitators, copycats and impostors. **Curr Hematol Malig Rep** 2012;7(4): 310-320.
- STEENSMA DP. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clin Proc.** 2015; 90(7):969-983
- SEKERES MA. The Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **Hematol Oncol Am**, 2010; 24(2):287-294.
- SENENT L., ARENILLAS L., LUNO E, *et al.* Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. **Haematologica.** 2013;98(4):568 – 575.
- SHAVER AC, SEEGMILLER AC. Nuances of morphology in Myelodysplastic diseases in the age of molecular diagnostics. **Curr Hematol Malig Rep.** 2017;12(5):448-454.
- SHALLIS RM, XU ML, PODOLTSEV NA *et al.* Be careful of the masquerades: differentiating secondary myelodysplasia from myelodysplastic syndromes in clinical practice. **Anal of Hematology.** 2018;97(12):2333-2343.

- SHALLIS RM, AHMAD R, ZEIDAN AM. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol.** 2018;101(3):260-271.
- SHIH AH, CHUNG SS, DOLEZAL EK, *et al.* Mutational analysis of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leucemia. **Haematologica.** 2013;98:908-912.
- SIBLEY A, MADDOX AM. Myelodysplasia and cooperdeficiency: induced by denture paste. **Am J Hematol.** 2009;84(9):612
- SOUSSI T, WIMAN KG. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. **Cancer Cell.** 2007; 12: 303–312.
- SRIDHARAN A, JAIN, R, BACHHUBER MA, *et al.* Epidemiologic study of myelodysplastic syndromes in a multiethnic, inner city cohort. **Exp Hematol Oncol** 2014;3:22
- SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC **International Agency for Research on Cancer** 2008, p.2008.
- SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition. **Lyon,** International Agency for Research on Cancer, 2017.
- TAEGTMEYER AB, HALIL O, BELL AD, *et al.* Neutrophil dysplasia (acquired pseudo-Pelger anomaly) caused by ganciclovir. **Transplantation** 2005;80(1):127-130.
- TEFFERI A, VARDIMAN JW. Myelodysplastic Syndromes. **N Engl J Med** 2009;361:1872–1885.
- TEFFERI A, GANGAT N, MUDIREDDY M, *et al.* Mayo alliance prognostic model for myelodysplastic syndromes: integration of genetic and clinical information. **Mayo Clin Proc.** 2018;6196(18):30312-4.
- TRICOT G, DE WOLF-PEETERS C, VLIETINCK R, *et al.* Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes: prognostic value of abnormal localization of immature precursors in MDS. **Br J Haematol** 1984; 58:217-25.

- VALENT P, HORNY HP. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. **Eur J Clin Investig**. 2009;39:548–53.
- VALENT P, JAGER E, MITTERBAUER-HOHENDANNER G, *et al*. Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, followup, and prognosis. **Am J Cancer Res**. 2011;1:531–41.
- VAN DER BERGHE H, MICHAUX L. 5q-, twenty-five years later: a synopsis. **Cancer genet Cytogenet**. 1997;94(1): 1-7
- VINCI G, TABILIO A, DESCHAMPS J, *et al*. Immunological study of in vitro maturation of human megakaryocytes. **Br J Haematol**. 1984;56:589-605.
- VISCONTE C, *et al*. Molecular Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes. **Translational Medicine**. 2014;8(4):19-30.
- VOGELSTEIN, B. Clinical implication of basic research: cancer therapy meets p53. **N. Engl. J. Med**. 1994; 331: 49–50.
- VOULGARELIS M, GIANNOULI S, TASIDOU A, *et al*. Bone marrow histological findings in systemic lupus erythematosus with hematological abnormalities: a clinicopathological study. **Am J Hematol**. 2006;81(8):590-597.
- WANG E, BOSWELL E, SIDDIQI I. Pseudo Pelger Huet anomaly induced by medications: a clinicopathologic study in comparison with myelodysplastic syndrome related pseudo Pelger Huet anomaly. **Am J Clin Pathol** 2011;135(2):291-303.
- XIE M, LU C, WANG J, *et al*. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. **Nat Med**. 2014;20(12):1472-1478.
- XIONG B, TANG ZH, ZOU P, *et al*. Dysplasia features of myelodysplastic syndrome in ethnically Chinese people. **Acta Haematol**. 2014;131:126-32.
- XIONG B, NIE Y, TANG Z, *et al*. Prognostic evaluation of ALIP and CD34 immunostaining in IPSS-R subgroups of myelodysplastic syndromes. **Pathology** 2017;49(5):526-533.
- ZAHID MF, PATNAIK MM, GANGAT N., *et al*. Insight into the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes: targets for novel therapy. **Eur J Haematol**. 2016; 97:313-20.

- ZEIDAN AM, FALTAS B, DOUGLAS SMITH B et al. Myelodysplastic syndromes: what do hospitalists need to know? **J Hosp Med** 2013;8(6):351-357. .
- ZINI G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndrome. **Ann Lab Med** 2017;37:465-474.
- ZHANG L, MCGRAW KL, SALLMAN DA *et al.* The role of p53 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leucemia: molecular aspects and clinical implications. **Leuk Lymphoma** 2017;58(8):1777-1780.

ANEXOS

Apêndice A: Descrição clínica dos pacientes do grupo clonal

ID do Paciente	Idade	Sexo	Cariótipo	Diagnóstico	Progressão	IPSS R	Tempo de seguimento (meses)
1	86	M	Ausência de metáfases	SMD-DM	Não	-	17
2	81	M	46, XY [18]	SMD-DM	Não	Baixo risco	24
8	74	F	46, XX [9]	SMD-DM	Não	Muito baixo risco	120
9	74	M	46, XY, add(5)(p14), del(7)(q32)[2]/46,XY, del(7)(q32)[3]/46,XY[15]	SMD-DM	Não	Intermediário	11
12	56	F	46, XX [11]	SMD-SA-DM	Não	Baixo risco	79
13	72	M	46,XY [5]	SMD-DM	Não	Baixo risco	57
16	81	F	46,XX [14]	SMD-DM	Não	Muito baixo risco	50
17	81	M	46, XY [3]	SMD-DM	Não	Muito Baixo risco	79
18	77	M	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	Não	-	18
19	60	F	Ausência de metáfases	SMD/SMP	Não	-	30
20	62	M	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	Não	-	6
23	63	M	Ausência de metáfases	SMD-DM	Sim	-	40
26	78	M	Ausência de metáfases	SMD-DM	Não	-	27
27	91	M	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	Não	-	74
28	92	F	46, XX[10]	SMD-DM	Não	Baixo risco	37
29	49	F	46, XX[10]	SMD-DM	Não	Muito Baixo risco	136
30	54	F	46, XX[10]	SMD-DM	Não	Baixo risco	92
31	88	F	Ausência de metáfases	SMD-DM	Sim	-	40
34	56	F	46,XX, del(11)(q23)[8]/46, XX[12]	SMD -DM	Não	Muito baixo risco	77
37	73	M	46, XY [10]	SMD-DM	Não	Muito baixo risco	54
38	79	F	Ausência de metáfases	SMD-DM	Não	-	60
40	88	F	47,XX, t(4,11)(q27;q32) +mar[4]/ 46 XX [16]	SMD-DM	Não	Baixo risco	129
41	78	M	46, XY[10]	SMD-EB I	Não	Intermediário	19
42	72	M	46,XY,add(12)(q24.33)[2]/46 XY.del(17)(q23)[3]/46,XY[10]	SMD-SA-DM	Não	Intermediário	36
43	81	F	46, XX[12]	SMD/SMP	Sim	-	113
44	72	M	Ausência de metáfases	SMD-SA-DM	Não	-	16

Apêndice B: Descrição clínica dos pacientes do grupo não-clonal

ID do paciente	Idade	Sexo	Cariótipo	Diagnóstico	Tempo de seguimento (em meses)
3	86	M	46, XY [12]	Hipoplasia medular	57
4	75	M	Ausência de metáfases	Hipoplasia medular	36
5	59	M	46, XY [13]	Hepatopatia crônica	61
6	55	F	Ausência de metáfases	Hepatopatia crônica	15
7	76	F	46, XX[10]	Bicitopenia	72
10	46	M	46, XY [16]	Plaquetopenia	55
11	76	F	47, XX, +mar {10}/ 46, XX[10]	Plaquetopenia	55
14	58	F	Ausência de metáfases	Leucopenia	114
15	76	F	Ausência de metáfases	Hepatopatia crônica	57
21	49	M	46, XY[10]	Hipoplasia seletiva	22
22	58	M	Ausência de metáfases	Hepatopatia crônica	39
24	73	F	Ausência de metáfases	Bicitopenia	95
25	78	F	Ausência de metáfases	Pancitopenia	41
32	72	F	46, XX[10]	Anemia da Doença Crônica	22
33	59	F	46, XX[10]	Bicitopenia	24
35	50	F	Ausência de metáfases	Leucopenia	130
36	70	F	46, XX[10]	Plaquetopenia	65
39	45	F	Ausência de metáfases	Hepatopatia crônica	45

APÊNDICE C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada “**DISPLASIA MEGACARIOCÍTICA: UMA ANÁLISE POR IMUNOHISTOQUÍMICA E POR CITOGENÉTICA MOLECULAR**”, que tem como objetivo principal realizar uma série de exames laboratoriais em pacientes adultos com Síndrome Mielodisplásica, com presença de megacariócitos mono, micro ou hipolobulados atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – HUWC.

Para tanto, é necessário que a Senhor (a) autorize a revisão de lâmina da sua biópsia óssea e a execução dos testes de imunohistoquímica e citogenética molecular para que seja realizada a pesquisa. Em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães, no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC à Rua Capitão Francisco Pedro, 1290, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE. Fone: (85)-3366 8623.

A sua participação na pesquisa é voluntária e consciente. Ao participar da pesquisa, não ficará exposto(a) a nenhum risco, podendo desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com a pesquisadora. Certo e ciente dos detalhes acima descritos e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura de quem obteve o termo

ANEXO: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: SÍNDROME MIELODISPLÁSICA COM DELEÇÃO 5q- UMA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E POR CITOGENÉTICA MOLECULAR

Pesquisador: Maria Mirele da Silva Ribeiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56825716.2.0000.5045

Instituição Proponente: Hospital Universitário Walter Cantídio/ Universidade Federal do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.730.872

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado em Ciências médicas/UFC, orientado pela Professora Sílvia Magalhães. As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas que acometem, sobretudo, adultos com idade superior a 60 anos. A análise do cariótipo de pacientes com SMD auxilia no diagnóstico, prognóstico, classificação, acompanhamento evolutivo e escolha terapêutica. As anormalidades mais frequentemente observadas incluem a deleção do braço longo do cromossomo 5 (5q-), trissomia do 8 (+8), monossomia do cromossomo 7 (-7), deleção do braço longo dos cromossomos 11 (11q-), 20 (20q-), 7(7q-) e deleção do braço curto do cromossomo 12 (12p-). A hibridização in situ por fluorescência (FISH) é um método citogenético molecular que usa sondas de DNA complementares ao cromossomo ou à região cromossômica que se deseja estudar. Como é mais sensível que a citogenética clássica, o FISH tem sido utilizado para o acompanhamento dos pacientes com SMD, permitindo tanto a monitoração de expansão do clone neoplásico quanto a detecção precoce de recidivas após o tratamento. Porém, FISH e citogenética não são métodos excludentes e quando associados podem aumentar a detecção de alterações. O estudo será do tipo transversal retrospectivo com a finalidade de investigar laboratorialmente os pacientes de baixo risco, com alteração megacariocítica e citogenética convencional não disponível por ausência de metáfase ou

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8613

Fax: (85)3281-4961

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC



Continuação do Parecer: 1.730.872

com menos de 20 metáfases analisadas através da técnica de citogenética molecular, hibridização in situ com fluorescência (FISH) para deleção 5q-. Os critérios de inclusão dos participantes são os seguintes: pacientes adultos, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a dezoito anos, e com diagnóstico definitivo de SMD. Pacientes portadores de SMD, com citogenética convencional não disponível por ausência de metáfase ou com menos de 20 metáfases analisadas com alteração megacariocítica. Nesse projeto será realizada inicialmente revisão da lâmina de todas as biópsias ósseas selecionadas para avaliação e confirmação da presença de alterações megacariocíticas hipolobuladas, micro e mono. A amostra será de 40 indivíduos e o financiamento próprio.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL:

Avaliar pacientes portadores de SMD de baixo risco com presença de megacariócitos mono, micro ou hipolobulados sem análise citogenética clássica adequada e analisar o valor preditivo dessa alteração para a deleção

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar revisão de lâmina de todos os pacientes em que foi relatada a presença de megacariócitos mono, micro ou hipolobulados;
- Realizar imunohistoquímica com os anticorpos monoclonais CD34, CD41, CD61 e p53 para detecção de uma proteína específica através da reação antígeno anticorpo;
- Avaliar a contribuição da citogenética molecular, nomeadamente da hibridação in situ com fluorescência em interfases através da realização de FISH para as sondas 5q e 17p, na detecção de anomalias cromossômicas em doentes com citogenética convencional não disponível ou com menos de 20 metáfases avaliadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora descreve como mínimo o risco de participação na pesquisa e este risco se relaciona ao constrangimento ou desconforto na avaliação dos resultados de exames.

Descreve que não há benefícios diretos ao participante, mas que as informações fornecidas trará como benefícios uma melhor compreensão da síndrome mielodisplásica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e exequível.

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8613

Fax: (85)3281-4961

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC**



Continuação do Parecer: 1.730.872

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados e adequados: Termo fiel depositário (material não biológico); Orçamento; Declaração de concordância corrigida; Folha de rosto corrigida; Currículos dos pesquisadores; Termo fiel depositário; Cronograma.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as pendências postas por este CEP/HUWC, o projeto pode ser iniciado.

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deverá apresentar relatório após o término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_551395.pdf	28/07/2016 15:17:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODECONSENTIMENTOLIVREESCLARECIDO.pdf	28/07/2016 15:17:16	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	decracaodeconcordanciadospesquisadores.pdf	02/06/2016 05:13:09	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados.pdf	25/03/2016 19:28:25	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	declaracao_de_concordancia.pdf	29/02/2016 10:51:58	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	Termodecompromissoutilizacaodosdados.pdf	29/02/2016 10:50:06	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	Curriculo_Orientadora.pdf	29/02/2016 10:42:39	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_correta.pdf	29/02/2016 10:23:11	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	05/01/2016 00:01:32	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Maria_Mirele_da_Silva_Ribeiro.pdf	05/01/2016 00:01:07	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	TermosdeFielDepositario_MaterialBiologico.JPG	04/01/2016 23:51:16	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	TermodeFielDepositario.pdf	04/01/2016 23:44:53	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 Fax: (85)3281-4961 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO - HUWC /
UFC



Continuação do Parecer: 1.730.872

Outros	ROTEIRODECOLETADEADADOS.pdf	04/01/2016 23:38:47	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	CartadeAnuencia.jpg	04/01/2016 23:36:56	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoplatformaBrasil.pdf	04/01/2016 23:30:37	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	04/01/2016 23:28:34	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito
Outros	cartadeapresentacao.pdf	04/01/2016 23:25:32	Maria Mirele da Silva Ribeiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 16 de Setembro de 2016

Assinado por:

Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8613

Fax: (85)3281-4961

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br