

Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Medicina Clínica

COD. ACERVO: 30 846

R 13841726/05 16/06/05 BCS

SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS

caracterização morfológica e
imunohistoquímica quanto à
expressão da proteína p53.

Silvia Maria Meira Magalhães

T 616.99419

M1692

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de
Mestrado em Medicina Clínica do Departamento de
Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em Medicina Clínica.

Fortaleza

1997



**Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Medicina Clínica**

SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS
caracterização morfológica e imunohistoquímica quanto à
expressão da proteína p53.

Silvia Maria Meira Magalhães

**Dissertação submetida à Coordenação do Curso de
Mestrado em Medicina Clínica do Departamento de
Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Medicina Clínica.**

Orientador: Prof. Dr. José Murilo de Carvalho Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho

**Fortaleza
1997**



M188s

Magalhães, Sílvia Maria Meira

Síndromes mielodisplásticas: caracterização morfológica e imunohistoquímica quanto à expressão da proteína p53. Sílvia Maria Meira Magalhães. – Fortaleza, 1997.

100 f. : il

Orientador: Prof. Dr. José Murilo de Carvalho Martins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará: Departamento de Medicina Clínica.

1. Síndromes mielodisplásticas. 2. Proteína p53.

I. Título.

CDD: 616.994.19

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, do Departamento de Medicina Clínica, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica.

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof. Dr. José Murilo de Carvalho Martins
Universidade Federal do Ceará
Orientador

.....
Profª Drª Irene Lorand-Metze
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

.....
Profª Drª Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará

.....
Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira
Universidade Federal do Ceará



A realização deste trabalho contou com o apoio da Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa – FUNCAP e do Laboratório de Técnicas Especiais Cito e Histopatológicas do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará – LABTECH

Ao meu pai,

Gerardo Assunção Magalhães, em vida médico e professor desta universidade, meu ideal de retidão e seriedade.

À minha mãe,

Yara Meira Magalhães, meu ideal de serenidade e amor incondicional.

À minha família,

Carlos, Aline, Andréia e Cecília,
meu bem maior.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Murilo de Carvalho Martins
Ao Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho
À Prof^a. Dra. Maria Helena Pitombeira
Ao Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida
Ao Dr. Ormando Rodrigues Campos
À Dr^a Clara Maria Bastos Eloy da Costa
À Dr^a. Francisca Vânia Barreto Aguiar Ferreira Gomes
À Dr^a. Maria José Bento da Universidade do Porto, Portugal
À Prof^a. Rosa Maria Salani Mota
À Larissa Pereira da Ponte
Ao Marcelo João Amadei
À Ângela Maria Meira Magalhães
À Zoya Dias Ribeiro
À Norma de Carvalho Linhares e demais funcionários da Biblioteca de Ciências da Saúde
Ao João Carlos Silva e demais funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal
À Jeovany, Leda, Célia, Viviane, Telma, Francisca, Edval e todos os funcionários do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
À Ivone Mary Fontenele de Souza
À Maria do Carmo Santos Nogueira
Aos coordenadores do Mestrado em Medicina Clínica
Aos meus companheiros de mestrado
Aos meus amigos de todas as horas.

Sumário

| | |
|--|------|
| Lista de abreviaturas | viii |
| Lista de figuras | x |
| Lista de tabelas | xii |
| Resumo | xiv |
| Summary | xv |
| Introdução | 1 |
| ciclo celular | 1 |
| p53 | 2 |
| síndromes mielodisplásticas | 6 |
| Objetivos | 11 |
| Material e métodos | 12 |
| pacientes | 12 |
| estudo morfológico | 13 |
| estudo imunohistoquímico | 13 |
| anticorpos monoclonais | 13 |
| técnica imunoenzimática indireta | 14 |
| análise e interpretação dos resultados | 16 |
| Análise estatística | 17 |
| Resultados | 18 |
| Discussão | 48 |
| Conclusões | 57 |
| Anexos | 58 |
| Anexo 1 | 59 |
| Anexo 2 | 63 |
| Anexo 3 | 64 |
| Referências bibliográficas | 65 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--------------------|--|
| G0: | Fase de repouso do ciclo celular |
| G1: | Fase de entrada no ciclo celular |
| G2: | Fase do ciclo celular entre o final da síntese e o início da mitose |
| S: | Fase de síntese do ciclo celular |
| M: | Fase de mitose do ciclo celular |
| p53: | Proteína de 53 Kd codificada pelo gene supressor de tumor p53 localizado no braço curto do cromossomo 17 |
| SMD: | Síndromes mielodisplásticas |
| AR: | Anemia refratária |
| ARSA: | Anemia refratária com sideroblastos em anel |
| AREB: | Anemia refratária com excesso de blastos |
| AREB-t: | Anemia refratária com excesso de blastos em transformação |
| LMMC: | Leucemia mielomonocítica crônica |
| DNA: | Ácido desoxiribonucléico |
| BSA: | Solução de albumina bovina |
| HE: | Coloração por hematoxilina e eosina |
| TBS: | Solução salina tamponada à base de Tris (hidroximetil - aminometano) |
| RNA: | Ácido ribonucléico |
| mdm ₂ : | Oncogene localizado no braço longo do cromossomo 12 ("murine double minute") |
| SMD-s: | Síndromes mielodisplásticas secundárias |
| FAB: | Grupo cooperativo franco-americano-britânico |
| ALIP: | Localização anormal de precursores imaturos |
| 5q-: | Deleção do braço longo do cromossomo 5 |
| -7: | Deleção do cromossomo 7 |

17p-: Deleção do braço curto do cromossomo 17

G-6-PD: Glicose - 6 - fosfato desidrogenase

ras: Grupo de oncogenes que codificam proteína de 21 Kd

fms: Oncogene localizado no braço longo do cromossomo 5

HIV: Vírus da imunodeficiência humana adquirida

APAAP: Complexo fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina

NaOH: Hidróxido de sódio

LMA: Leucemia mielóide aguda

HPV: Papiloma vírus humano

M - CSF: Fator estimulador de colônias monocítico/macrofágico

Lista de Figuras

| | | |
|-----------------|--|----|
| FIGURA 1 | - Ciclo celular | 1 |
| FIGURA 2 | - Distribuição segundo a faixa etária | 18 |
| FIGURA 3 | - Distribuição segundo a exposição prévia a agentes mutagênicos | 19 |
| FIGURA 4 | - Distribuição segundo os sinais e sintomas | 20 |
| FIGURA 5 | - Distribuição segundo os dados do hemograma | 20 |
| FIGURA 6 | - Distribuição segundo a classificação FAB | 21 |
| FIGURA 7 | - Distribuição segundo os grupos prognósticos | 21 |
| FIGURA 8 | - Distribuição segundo os escores de Bournemouth em função dos grupos prognósticos | 23 |
| FIGURA 9 | - Distribuição segundo o período de acompanhamento | 24 |
| FIGURA 10 | - Distribuição segundo a evolução | 25 |
| FIGURA 11 | - Distribuição segundo a celularidade medular | 26 |
| FIGURA 12 | - Distribuição segundo a presença de dispoeses | 26 |
| FIGURA 13 | - Distribuição segundo a dispoese | 27 |
| FIGURAS 14 e 15 | - Corte histológico de medula óssea exibindo dismegacariopose | 28 |
| FIGURA 16 | - Distribuição segundo o número de linhagens celulares com dispoese | 29 |
| FIGURAS 17 e 18 | - Corte histológico de medula óssea exibindo espessamento da rede de reticulina | 30 |
| FIGURA 19 | - Distribuição segundo a presença de fibrose | 31 |
| FIGURA 20 | - Distribuição segundo a presença de fibrose em função da presença de dismegacariopose | 32 |
| FIGURAS 21 e 22 | - Corte histológico de medula óssea exibindo ALIP | 33 |
| FIGURA 23 | - Distribuição segundo a presença de ALIP | 34 |

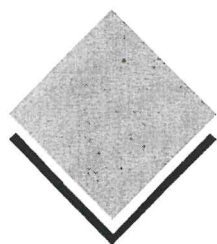
| | | |
|-----------------|---|-------|
| FIGURA 24 | - Distribuição segundo a presença de ALIP em função dos escores de Bournemouth | 35 |
| FIGURA 25 | - Distribuição segundo a presença de nódulos linfóides . | 36 |
| FIGURAS 26 a 29 | - Cortes histológicos de medula óssea exibindo nódulos linfóides | 37-38 |
| FIGURA 30 | - Distribuição segundo a presença de fibrose em função da presença de nódulos linfóides | 39 |
| FIGURA 31 | - Distribuição segundo a presença de nódulos linfóides em função da faixa etária | 40 |
| FIGURA 32 | - Distribuição segundo a presença da expressão aumentada da proteína p53 | 41 |
| FIGURAS 33 e 34 | - Cortes histológicos de medula óssea exibindo positividade para o marcador anti-p53 | 41-42 |
| FIGURA 35 | - Distribuição segundo a presença de expressão aumentada de p53 em função da faixa etária | 42 |
| FIGURA 36 | - Distribuição segundo a presença de expressão aumentada de p53 em função dos grupos prognósticos | 45 |
| FIGURA 37 | - Distribuição segundo a presença de expressão aumentada de p53 em função dos escores de Bournemouth | 46 |
| FIGURA 38 | - Distribuição dos pacientes segundo a evolução em função da expressão aumentada de p53 | 47 |

Lista de Tabelas

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 1 | - Distribuição segundo a presença de sinais e sintomas | 19 |
| TABELA 2 | - Distribuição segundo os escores de Bournemouth | 22 |
| TABELA 3 | - Distribuição segundo os escores de Bournemouth em função dos grupos prognósticos | 22 |
| TABELA 4 | - Distribuição segundo o período de acompanhamento | 24 |
| TABELA 5 | - Pacientes com evolução para subtipo mais agressivo da doença e/ ou LMA de acordo com idade, classificação FAB e tipo de evolução | 25 |
| TABELA 6 | - Distribuição segundo a dispoese | 27 |
| TABELA 7 | - Distribuição segundo o número de linhagens celulares com dispoese | 29 |
| TABELA 8 | - Distribuição segundo a classificação FAB em função da presença de fibrose | 31 |
| TABELA 9 | - Distribuição segundo a presença de fibrose em função da presença de dismegacariopoese | 32 |
| TABELA 10 | - Distribuição segundo a classificação FAB em função da presença de ALIP | 34 |
| TABELA 11 | - Distribuição segundo a presença de ALIP em função dos escores de Bournemouth | 35 |
| TABELA 12 | - Distribuição segundo a classificação FAB em função da presença de nódulos linfóides | 36 |
| TABELA 13 | - Distribuição segundo a presença de fibrose em função da presença de nódulos linfóides | 39 |
| TABELA 14 | - Distribuição segundo a presença de nódulos linfóides em função da faixa etária | 40 |
| TABELA 15 | - Pacientes com expressão aumentada da proteína p53 de acordo com sexo, idade, subtipo FAB, características morfológicas e tipo de evolução | 43 |

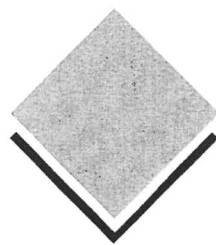
| | |
|--|----|
| TABELAS 16 e 17- Distribuição segundo a classificação FAB em função da expressão aumentada da proteína p53 | 44 |
| TABELA 18 - Distribuição segundo a expressão aumentada de p53 em função dos grupos prognósticos | 45 |
| TABELA 19 - Distribuição segundo a evolução em função da presença de expressão aumentada de p53 | 46 |
| TABELA 20 - Frequência de nódulos linfóides na medula óssea segundo vários autores | 51 |
| TABELA 21 - Frequência de alteração no gene p53 e/ou sua expressão segundo vários autores | 53 |

Resumo



O gene supressor de tumor p53 é a alteração genética isolada mais comum em todos os tipos de câncer e, portanto, tem sido frequentemente implicado na patogênese de muitos tumores humanos. O objetivo deste estudo foi a análise retrospectiva das características morfológicas e a avaliação da expressão da proteína p53 por imunohistoquímica em biópsia de medula óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplástica (SMD) previamente diagnosticados. Quarenta e três fragmentos de biópsia óssea, obtidos de trinta e três pacientes, foram retrospectivamente analisados e os achados relacionados entre si e com parâmetros clínico-laboratoriais. Na avaliação morfológica, o maior percentual de pacientes (78,8%) possuía medula óssea hipercelular, enquanto 9,1% apresentavam medula normocelular e 12,1% hipocelular. A dismegacariopoesse foi a alteração displástica mais frequentemente observada, presente em 72,7% dos casos. A localização anormal de precursores imaturos e o aumento da rede de reticulina foram detectados em 39,4% e 34,4% dos pacientes, respectivamente. A frequência de nódulos linfóides (27,3%) foi superior à de outros autores. Não foi observada relação entre a presença de nódulos linfóides e a faixa etária mas, foi demonstrada uma associação significativa com o espessamento das fibras de reticulina. A expressão nuclear aumentada da proteína p53 foi evidenciada em 15,2% dos casos e em nenhum dos controles. Todos os cinco pacientes com positividade para p53 evoluíram para uma forma mais agressiva da doença e/ou leucemia aguda, o que possibilitou uma associação estatisticamente significativa entre expressão aumentada da proteína e progressão da doença. Os resultados não permitem uma conclusão sobre a participação da mutação do gene p53 na gênese da mielodisplasia. No entanto, uma vez presente, a mutação possivelmente confere vantagem seletiva de proliferação ao clone mutante, sendo portanto útil para prever a evolução da doença. Síndromes mielodisplásticas são heterogêneas não apenas quanto ao fenótipo mas também com relação às bases moleculares envolvidas na sua gênese e progressão. Estudos com um maior número de casos e mais detalhados são necessários para uma melhor compreensão desses mecanismos moleculares, o que pode possibilitar um tratamento mais específico e eficaz dos portadores de síndrome mielodisplástica.

Summary



The p53 gene is currently thought to be a tumor suppressor gene, and its alterations have been suggested to be involved in the pathogenesis of several human malignancies.

The purpose of the present study was the evaluation of histological findings and the immunohistochemical study of p53 expression on bone marrow biopsy from thirty-three patients in which a myelodysplastic syndrome (MDS) was diagnosed. Forty-three bone marrow biopsies were retrospectively reviewed, and relationship among the different histological parameters as well as clinicopathological correlations were looked for.

Histological analysis showed in 78,8% of cases a hypercellular, in 12,1% a hypocellular and in 9,1% a normocellular bone marrow. Dysmegakaryopoiesis was the most prominent abnormality of the hematopoietic series, detected in 72,7% of cases. Abnormal localization of immature precursors occurred in 39,4% of patients and increase in reticulin fibers occurred in 34,4%. The frequency of lymphoid nodules in our cases (27.3%) was higher than that reported by others with no relationship with age, but significantly related to thickening of the reticulin network. Nuclear accumulation of p53 protein was found in 15,2% of the cases whereas control subjects were uniformly negative for p53 protein. All the five MDS cases that exhibited positive p53 reaction had some kind of disease progression, namely a more advanced FAB subtype and/or acute leukemia. A p53 immunoreactivity was therefore significantly related to biological aggressiveness and progression of the disease.

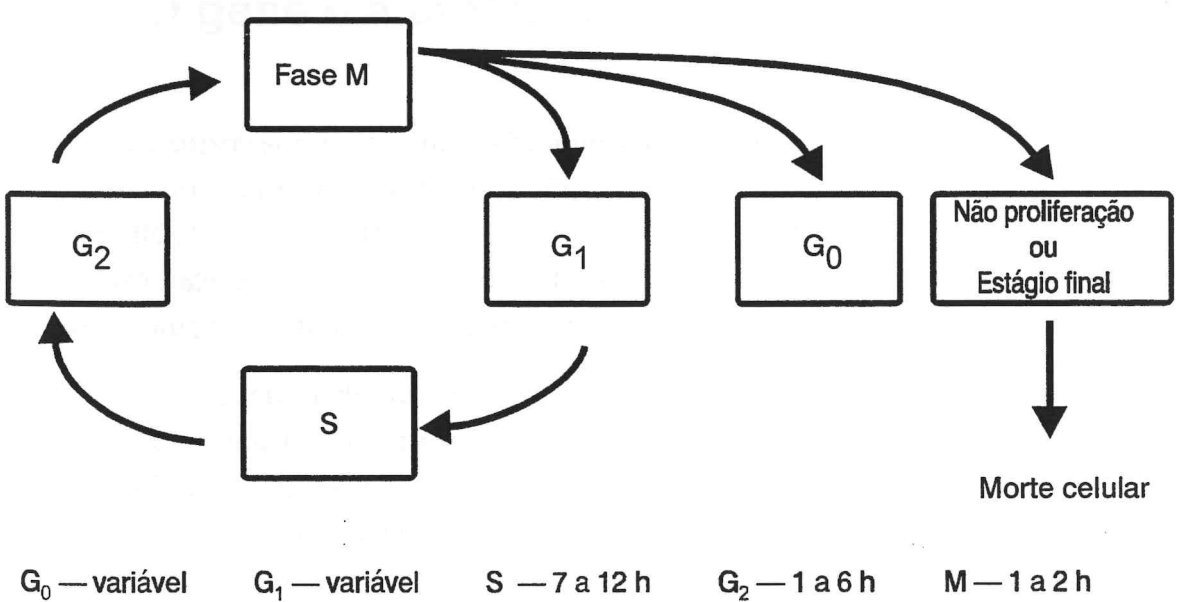
The results suggest that p53 mutations may contribute, albeit rarely, to the development of MDS and, once present, may confer a growth advantage to myeloid cells and therefore is useful for predicting the evolution. MDS is heterogeneous not only in its phenotype but also in the molecular mechanism of its genesis and progression. More extended and detailed study is necessary to understand the molecular basis of MDS development. The major aim is a more specific and effective treatment of these patients.

Introdução

Ciclo Celular

O ciclo celular compreende essencialmente a interfase, uma fase de intensa atividade biossintética durante a qual a célula duplica seu número de cromossomos e a divisão, fase final e microscopicamente visível de uma alteração básica que ocorreu a nível molecular durante a intérfase. Está esquematicamente dividido em quatro intervalos sucessivos: G₁, S, G₂ e M (mitose). G₁, do termo inglês “first gap”, é um período de duração variável que transcorre entre o final da mitose e o início da síntese de DNA. A síntese do DNA e a duplicação do genoma acontecem durante a fase S, que é seguida de um período G₂, do termo inglês “second gap”, de aparente inatividade que antecede a próxima mitose. Durante o período G₂ a célula possui o dobro (4c) da quantidade de DNA presente na célula diplóide original (2c). Depois da mitose(M) as células entram novamente no período G₁ e possuem um conteúdo de DNA equivalente a 2c (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo Celular

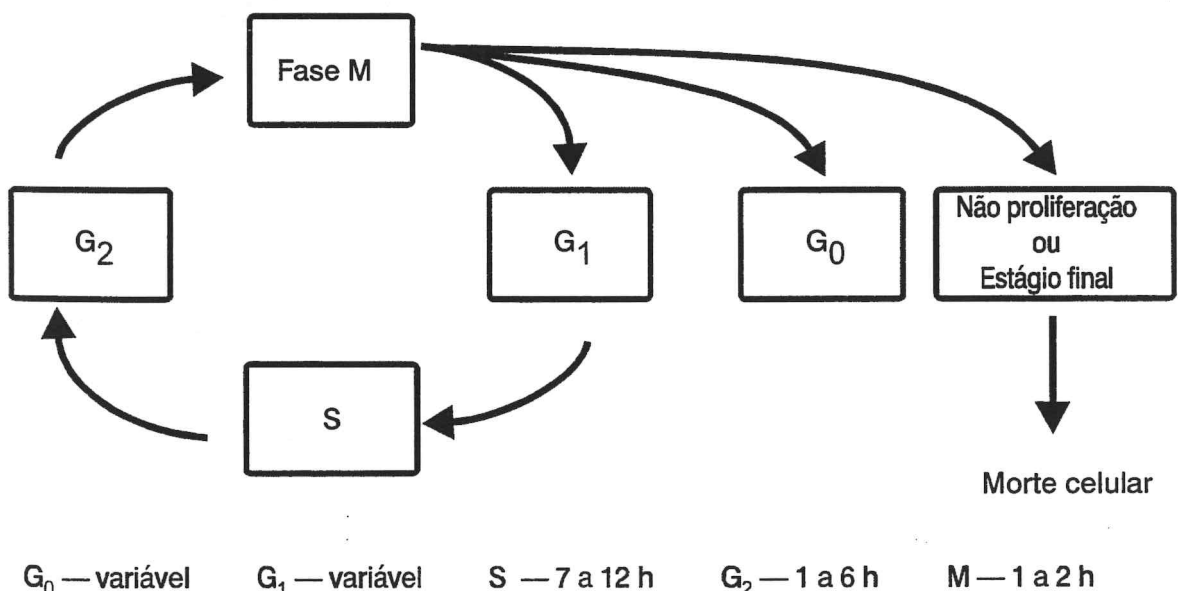


Introdução

Ciclo Celular

O ciclo celular compreende essencialmente a interfase, uma fase de intensa atividade biossintética durante a qual a célula duplica seu número de cromossomos e a divisão, fase final e microscopicamente visível de uma alteração básica que ocorreu a nível molecular durante a intérfase. Está esquematicamente dividido em quatro intervalos sucessivos: G₁, S, G₂ e M (mitose). G₁, do termo inglês "first gap", é um período de duração variável que transcorre entre o final da mitose e o início da síntese de DNA. A síntese do DNA e a duplicação do genoma acontecem durante a fase S, que é seguida de um período G₂, do termo inglês "second gap", de aparente inatividade que antecede a próxima mitose. Durante o período G₂ a célula possui o dobro (4c) da quantidade de DNA presente na célula diplóide original (2c). Depois da mitose(M) as células entram novamente no período G₁ e possuem um conteúdo de DNA equivalente a 2c (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo Celular



Existe ainda uma fase Go, na qual a célula está em repouso, mas pode, quando adequadamente estimulada, entrar em ciclo celular (BASERGA, 1990). Portanto, num determinado tecido, existem uma população de células em ciclo e uma outra fora do ciclo celular. A duração de cada uma das fases do ciclo celular sofre variação considerável no mesmo e em diferentes tecidos, sejam normais ou neoplásicos.

Os mecanismos regulatórios do ciclo celular nas células eucarióticas envolvem proteínas cujo nível e atividade atuam direta ou indiretamente no controle da proliferação celular. O controle negativo da progressão do ciclo celular é exercido durante o desenvolvimento, diferenciação, senilidade e morte celular, além de ter um papel importante na prevenção da tumorigênese (HARTWELL, 1994).

Células são capazes de retardar a progressão dentro do ciclo celular em resposta a danos causados por processos celulares intrínsecos ou eventos extrínsecos não programados através de pontos de controle ("checkpoints"). Muitos desses pontos existem dentro do ciclo celular com o objetivo principal de manter a integridade do genoma, garantindo a fidelidade do processo de divisão celular, à medida que não libera para proliferação células com genoma instável.

Pontos de controle na transição G1-S controlam a entrada da célula na fase de síntese (S), protegendo-a da replicação do DNA alterado. A perda ou anormalidades de genes envolvidos na transição G1-S potencialmente conduzem à instabilidade genômica, com sobrevida inapropriada de células geneticamente alteradas e possível evolução para um fenótipo maligno. Poucos genes que controlam a transição G2-M foram identificados em humanos.

p53 – O gene e a proteína

Genes supressores de tumor são aqueles cujos alelos normais funcionam para prevenir ou suprimir a tumorigênese (SAGER, 1989; MARSHALL, 1991; WEINBERG, 1991; HOLLINGSWORTH, 1991; KNUDSON, 1993). São, portanto, barreiras fisiológicas contra a expansão clonal e a mutabilidade genômica, sendo sua perda de função ou inativação potencialmente oncogênica.

O gene supressor de tumor p53 é composto por 20 kilobases (kb), contém 11 exons e está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17 p 13.1) (LAMB, 1986; ISOBE, 1986). Codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons composta de 393 aminoácidos, que foi primeiramente identificada em cultura de células de roedores transformadas pelo vírus simiesco SV 40 (LANE, 1979), quando foi classificada como antígeno tumoral. Posteriormente, foi considerado um oncogene ativador de proliferação celular, pela sua cooperação com o oncogene *ras* na transformação de fibroblastos

de camundongo (PARADA, 1984). Pertence atualmente à categoria dos genes supressores de tumor por atuar, na sua forma fisiológica ("wild-type"-wt), através da regulação negativa do ciclo celular. Quando sofre mutação ou inativação funcional adquire habilidade de transformação (FINLAY, 1989; HINDS, 1989).

A proteína p53 está esquematicamente dividida em regiões ou domínios funcionais (LEVINE, 1991). A porção NH₂-terminal (N-terminal) é composta pelos primeiros 75 aminoácidos e é similar aos fatores de transcrição. É importante para a habilidade de regular a transcrição de um grupo de genes efetores da transição G1-S do ciclo celular. A região central da molécula constitui o seu sítio de ligação ao DNA e é de importância na determinação da conformação adequada às suas funções normais. A porção carboxil-terminal (C-terminal) é o domínio que permite a oligomerização ou tetramerização, necessária e responsável pela alta afinidade da ligação específica ao DNA. Contém ainda uma sequência de localização nuclear, que responde pelo seu direcionamento intracelular (GREENBLATT, 1994).

Em células normais, a proteína p53 se encontra na forma de agregados de baixo peso molecular e sua concentração é mantida em baixos níveis através de proteólise, com uma meia-vida de 20 a 30 minutos. Sua função é o controle da proliferação celular normal, o que requer localização nuclear (SHAULSKY, 1991) e ligação sequência-específica ao DNA. É, portanto, um componente importante da resposta celular à injúria ao DNA, agindo como o guardião do genoma (LANE, 1992), monitorizando a sua integridade. Quando uma injúria ao DNA ocorre, seja de forma espontânea, como o dano oxidativo causado pelos radicais livres gerados pelos processos biológicos, seja induzida por agentes genotóxicos físicos ou químicos, a proteína se acumula e retarda o ciclo celular, através do bloqueio da transição da fase G1 para a fase S (MARX, 1993), fornecendo tempo adicional para o seu reparo e atuando como ponto de controle ("checkpoint"). Ainda como resposta ao dano ao DNA, quando falha o mecanismo de reparo, é um agente indutor de apoptose (YONISH, 1991; LANE, 1993), impedindo assim a propagação ou replicação de células com lesões mutagênicas que contribuem ou são potencialmente oncogênicas, minimizando as chances de transformação celular e garantindo a estabilidade genômica (KASTAN, 1991a; HARTWELL, 1992). Células da pele humana normal, quando expostas à radiação ultra-violeta, um agente sabidamente envolvido na carcinogênese cutânea, apresentam acúmulo rápido e progressivo de p53 na epiderme (HALL, 1993), numa demonstração da atuação do p53 em resposta ao dano ao DNA, consistente com sua função de gene supressor de tumor.

A função biológica da proteína p53 é exercida através da regulação da transcrição, seu principal mecanismo molecular (FIELDS, 1990; VOGELSTEIN, 1992b). Como fator de transcrição, atua diretamente ou através de um complexo com outras proteínas que se ligam a genes específicos, regulando e controlando quais deles são transcritos em RNA pela enzima RNA polimerase (LATCHMAN, 1996). É capaz de

induzir a expressão de diferentes genes que contenham uma sequência específica de DNA, em tecidos específicos ou em resposta a determinados estímulos, resultando, assim, no controle negativo da proliferação celular ou indução de apoptose.

O gene p53 normal é dispensável para a viabilidade celular ou para o desenvolvimento embriogênico normal, como demonstrado em camundongos. No entanto, sua ausência ("knockout mice") predispõe o animal para o desenvolvimento de múltiplas neoplasias num período precoce da vida (DONEHOWER, 1992). Pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni, uma condição autossômica-dominante rara, apresentam inativação congênita de um alelo do p53 e tornam-se, após perda ou mutação adquirida do segundo alelo, predispostos a múltiplos tumores primários, tais como carcinoma de mama, sarcomas de partes moles, tumor cerebral, leucemias e outros, nas primeiras décadas da vida (LI, 1982; MALKIN, 1990).

O câncer é um processo multigênico, no qual genes promotores de tumor (oncogenes) assim como supressores de tumor desempenham um papel essencial (KNUDSON, 1985). Eventos genéticos ocorrem sequencialmente, de forma cumulativa, numa cascata de alterações genômicas, tais como mutação, deleção, translocação, amplificação ou rearranjo, num contínuo processo de seleção (BISHOP, 1987; BISHOP, 1991). A diferença crucial entre células normais e malignas está em alterações nestes genes específicos que controlam a proliferação e a homeostase tissular (WYNFORD-THOMAS, 1991). A procura de genes consistentemente relacionados a tumores e a compreensão dos seus mecanismos de ação têm, portanto, implicações clínicas potenciais na patogênese, diagnóstico, prognóstico e tratamento (CORDON-CARDO, 1995; DUFFY, 1993; WEINBERG, 1992).

São vários os possíveis mecanismos de inativação funcional da proteína p53 que, potencialmente, conferem à célula instabilidade genética, permitindo o acúmulo de lesões genômicas, com consequente seleção de clones malignos. A ligação com proteínas celulares ou oncoproteínas virais pode inativar a proteína p53 normal. O oncogene *mdm2*, localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q 12-13) está amplificado numa fração significativa dos sarcomas e a ligação de sua proteína celular (p90) à porção N-terminal da proteína p53 normal regula sua estabilidade e diminui a sua atividade transcricional, prejudicando sua função de supressão de tumor (MOMAND, 1992; OLINER, 1993). A interação do antígeno T do vírus SV-40 com a porção central da molécula p53 tem o mesmo efeito funcional (MIETZ, 1992). O carcinoma do colo uterino está epidemiologicamente relacionado ao papiloma vírus humano (HPV) subtipos 16 e 18, que expressam a proteína E6. A interação de E6 com a proteína p53 normal resulta na sua degradação, constituindo-se num outro mecanismo de inativação epigenética (SCHEFFNER, 1990) e fornecendo a base molecular para a associação carcinoma do colo uterino -HPV.

Mais recentemente, um outro mecanismo de inativação da proteína p53 foi identificado num estudo em câncer de mama (MOLL, 1992). Alguns desses tumores apresentavam níveis elevados de p53 normal no citoplasma das células malignas, onde sua função como fator de transcrição e supressor de proliferação é inativada. Portanto a exclusão nuclear, mantendo a proteína fora do seu sítio de ação, foi proposta como mais um mecanismo de inativação funcional (PERRY, 1993).

A função da proteína normal é muito sensível a pequenas alterações na sequência de aminoácidos da molécula. Mutações envolvendo o gene p53 são a anormalidade genética conhecida mais comum no câncer humano (HOLLSTEIN, 1991), sendo observadas numa grande variedade de tumores (NIGRO, 1989; BARTEK, 1991). Muitos tipos diferentes de alteração do p53 são encontrados nas várias linhagens celulares de tumores humanos. Mutações específicas conferem diferentes fenótipos e podem refletir a ação de diferentes mutágenos, com possíveis implicações etiológicas (VOGELSTEIN, 1992a). No entanto, a alteração mais comum é a mutação pontual ou puntiforme, resultante de uma única substituição de bases na molécula do DNA, em zonas de alta instabilidade ("hot spots"), entre os exons 5 e 8 (CARON DE FROMENTEL, 1992). Mais de 80% das mutações do gene p53 são do tipo "missense", codificando uma proteína com alteração na sua sequência de aminoácidos, modificação de conformação (GANNON, 1990) e propriedades regulatórias alteradas, o que lhe confere potencial oncogênico. A proteína mutante tem, portanto, alterações estruturais e funcionais, destacando-se um significativo aumento da sua estabilidade, com meia-vida que se estende de minutos para horas, com consequente elevação de sua concentração intracelular e perda da capacidade de ligação sequência-específica com o DNA. O estudo de sua estrutura tridimensional dá suporte à hipótese de que a ligação ao DNA é crítica para sua atividade biológica e fornece dados para a compreensão de como mutações causam inativação funcional (CHO, 1994; FRIEND, 1994). A proteína mutante pode formar um complexo com a subunidade normal (wt), alterando sua conformação e prevenindo seu funcionamento, num mecanismo proposto de dominância negativa (KERN, 1992). No entanto, sabe-se que as formas mutantes não são necessariamente equivalentes com relação às suas propriedades bioquímicas e biológicas, e algumas formas podem exibir caráter recessivo (CHEN, 1990). A perda da atividade supressora de tumor e ganho de potencial de transformação são propriedades frequentes das formas mutantes, encontradas predominantemente em agregados de alto peso molecular nas células transformadas.

A expressão aumentada da proteína p53 em tumores humanos, frequentemente relacionada com um fenótipo mais agressivo, é atribuída ao aumento da sua estabilidade e consequente acúmulo intracelular. A análise molecular em muitos desses tumores sugere que a proteína é mutante (BARTEK, 1991; BAAS, 1994; GANNON, 1990). A observação de que existe uma boa correlação entre mutação do gene p53 e acumulação da proteína, aliada à disponibilidade de anticorpos monoclonais com diferentes especificidades (BANKS, 1986; GANNON, 1990; VOJTESEK, 1992; LEGROS,

1993; PEZZELLA, 1994), que podem reconhecer simultaneamente a proteína normal e mutante, têm permitido e estimulado a análise, por técnicas imunohistoquímicas, daquela que, em 1993, foi considerada a molécula do ano (CULOTTA, 1993).

Síndromes Mielodisplásticas

Síndromes mielodisplásticas (SMD) são um grupo heterogêneo de desordens clonais, originadas na célula progenitora hematopoética (JANSSEN, 1989), caracterizadas por hematopoese displástica e ineficaz (KOEFFLER, 1986; GALTON, 1986; DOLL, 1989; GIRALT, 1997; SAN MIGUEL, 1996; KOEFFLER, 1996). O curso natural varia amplamente desde anemias refratárias isoladas, com baixa propensão para transformação leucêmica, até pancitopenias graves com profundos distúrbios na produção e maturação das células sanguíneas e elevado risco de progressão para leucose aguda (YOSHIDA, 1993b; RESEGOTTI, 1992). São mais frequentes em indivíduos com idade superior a 50 anos e sua incidência aumenta com a idade (WILLIAMSON, 1994). Nos indivíduos mais jovens e, eventualmente em crianças, são frequentemente complicação tardia de exposição prévia a agentes químicos, quimioterapia ou radioterapia. As assim denominadas SMD secundárias (SMD-s) correspondem a aproximadamente 10% dos casos e apresentam algumas características especiais (ROSENBLOOM, 1992; ORAZI, 1993). A distribuição é igual para ambos os sexos. A incidência anual oscila entre 2,1 e 12,6 casos por 100.000 habitantes (WILLIAMSON, 1994; AUL, 1995), o que se equipara ou até sobrepe aquela da leucemia mielóide aguda, em especial na faixa etária acima de 60 anos. É provável que a incidência real seja ainda superior, considerando-se a frequência de doença subclínica e a dificuldade diagnóstica nos casos com mielodisplasia leve. Há, no entanto, o consenso de que a incidência é crescente, seja pela disponibilidade de melhores recursos diagnósticos, seja pelo crescente número de casos secundários à quimioterapia, radioterapia e à exposição a agentes ambientais ou ocupacionais (LEVINE, 1992; PARK, 1996).

O diagnóstico de SMD é considerado nos casos de anemia inexplicada e persistente, com resposta inapropriada de reticulócitos, neutropenia, trombocitopenia e/ou monocitose, sem causa justificada de falência medular e não associadas a doenças sistêmicas. Condições tais como deficiências nutricionais (ferro, folato, vitamina B12, piridoxina), dispoese droga-induzida, alcoolismo, anemia das doenças crônicas, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (LORAND METZE, 1991; KALOUTSI, 1994), citopenias de causa imunológica e doença hepática ou renal severa devem ser consideradas (HOFMANN, 1996). No sangue periférico são comuns alterações morfológicas nos eritrócitos (anisocitose, macrocitose, poiquilocitose, pontilhado basófilo,

eritroblastos circulantes) e granulócitos (hipogranulação, hipossegmentação ou anomalia Pelger-Hüet símile, núcleo em anel). A medula é, em geral, normo ou hiper celular, mas celularidade medular inferior a 30% pode ser observada em 10 a 30% dos casos (FOHLMEISTER, 1985; NAND, 1988; YOSHIDA, 1988; TUZUNER, 1995). O diagnóstico citológico se baseia essencialmente nos aspectos displásticos observados em graus variados nas três linhagens celulares. Tais alterações devem estar presentes em pelo menos 10% da população celular na linhagem envolvida (GOASGUEN, 1992; KOUIDES, 1992; KOUIDES, 1996; HO, 1993; FARHI, 1995; REIZENSTEIN, 1992). A eritropoese por vezes é megaloblástica, podendo-se ainda observar multinucleação, hemoglobinizacão deficiente, assincronismo de maturação, sideroblastos em anel à reação de Perls, mitoses aberrantes e pontes internucleares (HEAD, 1989). Na série granulocítica são comuns as formas de grande porte, o retardo e o assincronismo de maturação, o aumento da basofilia citoplasmática, a hipo ou hipergranulação e o aumento de formas monocitóides. Nos precursores da linhagem megacariocítica se observam, em mais de 50% dos casos, grandes formas mononucleadas, hipo ou hiperlobulação e a presença de micromegacariócitos que, junto à hipossegmentação dos neutrófilos, constituem os aspectos displásticos mais comuns e característicos das SMD (KURIYAMA, 1986).

A classificação das SMD se baseia no exame do sangue periférico e aspirado medular, obedecendo os critérios estabelecidos pelo grupo cooperativo franco-americano-britânico (FAB) (BENNETT, 1976; BENNETT, 1982), na tentativa de agrupar entidades com achados similares e implicações prognósticas comuns. Cinco subgrupos distintos são propostos de acordo com o percentual de blastos no sangue periférico e medula óssea, número absoluto de monócitos no sangue periférico e percentual de sideroblastos em anel na medula óssea: Anemia Refratária (AR), Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB), Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação (AREB-t) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC). Situações de difícil classificação existem, correspondendo a aproximadamente 10% dos casos (MICHELS, 1990).

Técnicas citoquímicas e imunológicas, embora dispensáveis para o diagnóstico, podem ser de valor para a definição da linhagem celular (SEO, 1993). A reação com o Sudan black b pode, em geral, definir a origem mielóide de células blásticas, enquanto a esterase não-específica ou dupla-esterase facilita a distinção entre precursores monocíticos e mielócitos hipogranulares. A imunomarcacão com anticorpos monoclonais é também utilizada para a identificacão do tipo celular (MOIR, 1983). São utilizados marcadores específicos para a linhagem mielóide, linfóide e megacariocítica, estes últimos úteis na identificacão de micromegacariócitos que, pelo seu aspecto displástico, podem ser de difícil caracterizacão.

Além dos testes imunocitoquímicos, nos últimos dez anos, a biópsia óssea se estabeleceu como complemento indispensável, fornecendo informacões adicionais de importância no diagnóstico e prognóstico (TRICOT, 1984a; SAAD, 1994;

LAMBERTENGHI, 1993; RIOS, 1990; KAMPMEIER, 1992; BARTL, 1992; TRICOT, 1985): estimativa da celularidade global, avaliação da arquitetura medular, relação do tecido hematopoético com a trabécula óssea, localização anormal de precursores imaturos (ALIP) (TRICOT, 1984b; MANGI, 1991) e associação com fibrose. O estudo imunohistoquímico é atualmente reconhecido como um recurso fundamental no diagnóstico das afecções da medula óssea (FALINI, 1984; VAN DER VALK, 1989; SHIN, 1992). Nas SMD, potencializa o valor diagnóstico e prognóstico, na medida em que sobrepuja algumas limitações inerentes à histologia: limitação precisa das linhagens celulares e identificação de aspectos displásticos, em especial na série megacariocítica.

Eventualmente, nos casos em que as características displásticas são mínimas, critérios adicionais são necessários (VERHOEF, 1995; REIZENSTEIN, 1992). O estudo citogenético é um recurso importante para o diagnóstico, além de ser um importante marcador prognóstico e uma contribuição potencial no estudo da biologia e patogênese das SMD (THIRD MIC, 1988). Alterações simples ou complexas (NOWELL, 1986; HAASE, 1995) estão presentes em 40 a 70% dos casos e, embora não existam aberrações específicas, a perda de material genético ocorre com maior frequência (MUFTI, 1992b) e define síndromes com aspectos morfológicos e citogenéticos específicos: síndrome do 5q- (BOULTWOOD, 1994), síndrome -7 (KERE, 1987) e síndrome 17p- (LAI, 1995).

Até recentemente, as SMD constituíam o estágio identificável mais precoce no processo de múltiplas etapas da leucemogênese, caracterizadas por anormalidades hematológicas, morfológicas e citogenéticas distintas. O desenvolvimento da genética molecular tornou possível não só o estudo da clonalidade e a definição nos casos de diagnóstico morfológico difícil, mas também o estudo dos mecanismos genéticos envolvidos na progressão da doença (LIST, 1992). As evidências sugerem que as SMD podem, na verdade, representar uma etapa mais avançada na progressão para leucemia aguda, precedida por um acúmulo de alterações genômicas que permaneciam até então indetectáveis (JACOBS, 1991; BARTRAM, 1992; STEPHENSON, 1993; BARTRAM, 1996).

Raskind e colaboradores (RASKIND, 1984), através do estudo em células somáticas em mulher heterozigota para a glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), confirmaram a natureza clonal da doença e postularam que pelo menos duas etapas estão envolvidas na patogênese das SMD: a indução de proliferação clonal de células progenitoras hematopoéticas geneticamente instáveis e a aquisição mais tardia de alterações cromossômicas. O câncer é sabidamente o resultado de um processo de múltiplas etapas (PITOT, 1993) e, embora a patogênese das SMD seja ainda foco de muitas pesquisas, evidências sugerem que uma sequência de lesões ao DNA ocorre, levando a alterações na função celular, emergência e conseqüente evolução do clone premaligno. Assim como o modelo proposto por Fearon e Vogelstein (FEARON, 1990) para a tumorigênese colorretal, o acúmulo de lesões genômicas, mais que a sua ordem precisa é um determinante crítico para o

estabelecimento das SMD e evolução para leucemia aguda, embora as lesões responsáveis pela iniciação e progressão da doença permaneçam ainda não estabelecidas.

Como a incidência de SMD é crescente com a idade, presume-se que alterações na célula hematopoética relacionadas à idade tenham um papel favorecedor na iniciação do processo (ROTHSTEIN, 1993). O programa normal de envelhecimento, per si, gera instabilidade cromossômica (HARTWELL, 1994). A diminuição da reserva medular e da capacidade de proliferação tornam as células remanescentes particularmente vulneráveis a insultos mutagênicos espontâneos ou induzidos e favorecem a expansão de clones com vantagem seletiva de proliferação (MAUCH, 1982; LIPSCHITZ, 1984). A injúria genética, seja espontânea, seja secundária à exposição a agentes genotóxicos ocupacionais, ambientais ou terapêuticos, pode representar um evento inicial no desenvolvimento das SMD. A instabilidade genômica que se segue é um fator contributivo reconhecido na progressão tumoral em múltiplas etapas (CHENG, 1993). Mutações somáticas resultam na expressão aumentada ou anormal de proteínas com propriedades regulatórias de proliferação e diferenciação celular, com implicações na iniciação e progressão para o fenótipo maligno. Dentre as alterações moleculares identificadas nas SMD estão incluídas as mutações pontuais no oncogene *ras*, muito frequentes em outras neoplasias (BOS, 1989). A ativação, em especial do *N-ras*, foi demonstrada em aproximadamente 40% dos pacientes portadores de SMD, principalmente nos subtipos LMMC (YUNIS, 1989). Embora não seja necessária nem suficiente para o desenvolvimento das SMD, a mutação do *ras* confere vantagem de proliferação ao clone mutante e, por ocorrer precocemente no curso da doença, é por vezes utilizado como marcador clonal (PARKER, 1996). O proto-oncogene *fms*, que codifica o receptor para o fator estimulador de colônia monocítico/macrofágico (M-CSF), está mutado em aproximadamente 15% dos casos de SMD, também preferencialmente nos subtipos LMMC (PÁDUA, 1992). É possível que sua ativação tenha um papel na leucemogênese, através da sua habilidade de transformação, podendo ocorrer em vários estágios no curso da doença. Porque mutações que ativam o *ras* e/ ou *fms* sozinhas são insuficientes para conferir o fenótipo maligno, questiona-se sua importância na suscetibilidade aumentada a eventos transformadores subsequentes.

Concomitante à ativação de oncogenes, muitas neoplasias exibem também mutações de genes supressores. Em situações normais, a proteína codificada regula a proliferação e diferenciação celular de forma negativa, indiretamente protegendo contra a transformação maligna. Sua inativação permite portanto proliferação descontrolada. Dentre os genes supressores, o p53 é o gene mais comumente mutado em todas as neoplasias humanas (HOLLSTEIN, 1991) e pode estar incluído na cascata de eventos genéticos que forma a base molecular da patogênese das SMD.

A apoptose é um achado frequente na medula óssea de pacientes com mielodisplasia (CLARK, 1990), correlacionando-se com a elevada taxa de morte intra-

medular e consequente citopenia periférica (YOSHIDA, 1993a). Mais recentemente, além dos genes envolvidos na proliferação e reparo do DNA, genes cuja expressão proteica induz ou previne a apoptose têm sido investigados e implicados na fisiopatologia da doença (RAJAPAKSA, 1996). Do mesmo modo, citocinas ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, $\text{IL1}\beta$), com ação estimulatória nas células progenitoras e indutora de apoptose nas células mais diferenciadas, parecem contribuir para o elevado índice de apoptose observado na medula óssea destes pacientes, justificando o paradoxo de medula óssea celular com sangue periférico citopênico (RAZA, 1996a; RAZA, 1996b).

A identificação de anormalidades cromossômicas em pacientes portadores de SMD confirmou a clonalidade dessa desordem e sua relação com aspectos clínicos e biológicos específicos (LIST, 1990; FENAUX, 1996). As evidências indicam que a aquisição de aberrações cromossômicas é um evento tardio na patogênese das SMD e um reflexo da instabilidade do clone mutante. Alterações citogenéticas estão ausentes em aproximadamente 50% dos casos por ocasião do diagnóstico e podem ser adquiridas ao longo da evolução, conferindo um fenótipo mais agressivo, com vantagem seletiva de proliferação e contribuindo decisivamente para a progressão da doença (RASKIND, 1984). Anormalidades cromossômicas clonais, sobretudo se complexas, estão, portanto, associadas a risco elevado de transformação leucêmica e menor sobrevida independente do subtipo FAB (YUNIS, 1988; GEDDES, 1990; SUCIU, 1990; WHITE, 1992; BERNASCONI, 1994; MECUCCI, 1992).

A leucemogênese é, portanto, uma sucessão de lesões genômicas, onde a expressão anormal isolada de um gene é insuficiente para a transformação. A lesão genômica é provavelmente um evento precoce, enquanto as alterações cromossômicas são um evento tardio. A citogenética e a genética molecular são estudos complementares e igualmente relevantes, contribuindo para o diagnóstico, prognóstico e maior conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos na transformação neoplásica. Uma melhor compreensão da patogênese das SMD vai certamente possibilitar maior especificidade e efetividade do tratamento.

Objetivos

2

- 1 – Caracterização morfológica de pacientes portadores de síndromes mielodisplásticas, através do estudo da biópsia óssea, com ênfase para cinco critérios: celularidade estimada, presença de alterações displásticas (dispoeses), presença de aglomerados de precursores mielóides imaturos no espaço intertrabecular (ALIP), presença de fibrose e presença de nódulos linfóides.
- 2 – Caracterização imunohistoquímica quanto à expressão da proteína p53.
- 3 – Avaliação do papel da expressão aumentada da proteína p53 nas síndromes mielodisplásticas.



Material e Métodos

Pacientes

Trinta e três pacientes, portadores de síndrome mielodisplástica, com primeira consulta no período compreendido entre 1982 e 1996, foram retrospectivamente estudados. Previamente diagnosticados de acordo com o quadro clínico, estudo do sangue periférico e aspirado medular e classificados segundo critérios do grupo FAB (BENNETT, 1982), os pacientes foram tratados e acompanhados no Serviço de Hematologia do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará (DMC – UFC). Fizeram parte do estudo aqueles que se submeteram à biópsia óssea e cujos fragmentos apresentavam condições satisfatórias para novos estudos. Todos os prontuários foram revisados e deles retirados dados de interesse para o estudo, que constam no protocolo de inclusão (ANEXO I). Foram incluídos no estudo os pacientes nos quais deficiências nutricionais (ferro, vitamina B12, folato e piridoxina) foram descartadas por dosagem sérica e/ou teste terapêutico. Insuficiência hepática e renal foram excluídas e, desde que disponível, realizado o estudo sorológico para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV). Casos com dados imprecisos ou diagnóstico duvidoso foram excluídos. Os pacientes foram classificados de acordo com o escore Bournemouth modificado (MUFTI, 1985; WORSLEY, 1988), utilizando-se os seguintes parâmetros: percentual de blastos na medula óssea superior a 5%, hemoglobina inferior a 10g/dl, total de neutrófilos inferior a $2,5 \times 10^9 / L$ ou ainda maior que $16 \times 10^9 / L$ e contagem de plaquetas menor que $100 \times 10^9 / L$. Para cada parâmetro foi atribuído um ponto. Pacientes com escore 0 e 1 são classificados como de bom prognóstico, 2 e 3, prognóstico intermediário e 4, mau prognóstico.

Além da primeira biópsia medular, 6 pacientes foram submetidos a uma ou mais biópsias subsequentes, como parte da avaliação de rotina e seguimento. Os pacientes foram classificados como SMD primária ou secundária, caso houvesse relato de exposição prévia a agentes potencial ou reconhecidamente genotóxicos (agrotóxicos, inseticidas, tintas e vernizes, cola de sapateiro e quimioterápicos). A evolução para leucemia aguda foi definida pelo aumento no percentual de blastos na medula óssea para valores superiores a 30%.

Estudo morfológico: biópsia óssea

Quarenta e três fragmentos de biópsia óssea de trinta e três pacientes portadores de síndrome mielodisplástica foram obtidos nos arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML - UFC).

As biópsias ósseas, no Serviço de Hematologia da UFC, são realizadas na crista ilíaca pósterio-superior, sob anestesia local, utilizando-se a agulha de Jamshidi. O material obtido, destinado ao estudo morfológico, é rotineiramente fixado em Bouin - Holande por um período mínimo de 24 h, descalcificado em ácido nítrico a 7% por um período variável de 2 a 12 h e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura são corados pela hematoxilina e eosina (HE), prata-reticulina e ácido periódico de Schiff (PAS). Os fragmentos assim previamente preparados e corados foram revisados, com especial atenção para cinco critérios:

- a) celularidade estimada - casos com celularidade igual ou superior a 50% foram classificados como hipercelular, e aqueles com percentual igual ou inferior a 30%, hipocelular;
- b) presença de características displásticas: alterações de maturação nas linhagens eritroblástica, granulocítica e megacariocítica;
- c) presença de ALIP – casos foram considerados positivos se apresentassem pelo menos 3 agregados de, no mínimo, 5 precursores mielóides no mesmo corte;
- d) presença de condensação da rede reticulínica
- e) presença de nódulos linfóides.

Estudo imunohistoquímico

a) Anticorpos monoclonais

A pesquisa da expressão da proteína p53 foi realizada utilizando-se os seguintes anticorpos monoclonais:

1. DO₇ (DAKO S/A, Glostrup – Dinamarca)

Anticorpo monoclonal produzido em camundongo

– Especificidade: reconhece epítopo na porção N-terminal da proteína humana p53, localizado entre os aminoácidos 19 e 26 (VOJTESEK, 1992). Reage com a forma fisiológica e mutante da proteína.

– Diluição - 1:50

2. Anti-vimentina (DAKO S/A, Glostrup - Dinamarca)

Anticorpo monoclonal produzido em camundongo

– Especificidade: reconhece epítipo da molécula de vimentina, proteína filamentosa intermediária presente em células de origem mesenquimal e altamente sensível à fixação excessiva. É utilizado para monitorizar a preservação do antígeno e a qualidade e uniformidade da fixação em tecidos fixados em formaldeído e incluídos em parafina (BATTIFORA, 1991; MULLINK, 1985).

– Diluição: 1:80

b) Técnica imunoenzimática indireta

O estudo imunohistoquímico foi realizado em material incluído em parafina. Secções de 5 µm de espessura foram colocadas em lâminas previamente tratadas com gelatina (ANEXO II), permanecendo em estufa a 37°C por um período mínimo de 12 horas. Foi pesquisada a expressão aumentada da proteína p53 através do anticorpo monoclonal DO₇. O anticorpo monoclonal anti-vimentina foi utilizado para controle de fixação do material. Como técnica de recuperação antigênica utilizou-se o forno de micro-ondas (SHI, 1991; CATTORETTI, 1993). Adotando-se a técnica imunoenzimática indireta APAAP, “alkaline-phosphatase anti-alkaline-phosphatase” (CORDELL, 1984; ERBER, 1989), foram realizadas as etapas seguintes:

1. desparafinização e hidratação;
2. colocação das lâminas em recipiente plástico contendo tampão citrato 10mM, pH 6,0 (2,1g de ácido cítrico e 1000ml de água destilada, ajustando o pH com cerca de 13ml de NaOH 2M) ;
3. colocação dos recipientes no forno de micro-ondas (MN7809BKDG, Panasonic) na potência máxima, até completar 8 minutos de ebulição. A cada dois minutos foi acrescentado o tampão que derramou;
4. colocação dos recipientes em temperatura ambiente por 20 minutos, ainda em citrato;
5. lavagem em solução salina tamponada (TBS) , 0,05M, pH 7,6 por 5 minutos;
6. transferência das lâminas em estudo para a câmara úmida e incubação em soro normal de coelho (X 902 DAKO) na diluição 1:5 em BSA (solução de albumina bovina) / TBS a 5%, por 20 minutos em temperatura ambiente. Foram utilizados 200 µl da diluição para cada lâmina;
7. retirada do excesso de soro normal de coelho, sem lavar;

8. incubação em câmara úmida, nos soros primários diluídos em BSA/TBS a 5%, por uma noite, a 4°C. Foram utilizados 200 µl da diluição para cada lâmina, de cada um dos seguintes anticorpos monoclonais:

- DO₇ na diluição 1:50
- anti-vimentina na diluição 1:80;

9. lavagem das lâminas em TBS duas vezes durante 5 minutos;

10. transferência das lâminas para a câmara úmida, retirando-se todo o excesso de TBS;

11. aplicação do anticorpo secundário (soro de coelho anti-camundongo-Z 259 DAKO), na diluição 1:25 em BSA/TBS 5%, por 30 minutos em temperatura ambiente;

12. lavagem com TBS, duas vezes durante 5 minutos;

13. transferência das lâminas para a câmara úmida, e aplicação do complexo APAAP (D 651 DAKO) na diluição 1:50 em BSA/TBS 5% durante 30 minutos em temperatura ambiente;

14. lavagem com TBS, duas vezes durante 5 minutos;

15. repetição, para o aumento da intensidade da marcação, após o item 14, dos itens 11, 12, 13 e 14 por mais duas vezes; nas repetições, o tempo de incubação para o anticorpo secundário e complexo APAAP é de 10 minutos;

16. aplicação do substrato da fosfatase alcalina (ANEXO III) por 15 minutos;

17. lavagem em TBS por 2 minutos;

18. contra-coloração com hematoxilina por 1 a 2 minutos;

19. montagem das lâminas utilizando Glycergel (C 563 DAKO);

20. leitura das lâminas em microscópio óptico comum.

Os controles negativos da reação de imunohistoquímica foram obtidos pela omissão dos soros primários. Os controles positivos para p53 foram amostras de câncer de mama ductal infiltrante, já previamente estudados.

Dez fragmentos de biópsia óssea, obtidos de pacientes com doenças benignas (anemia ferropriva, púrpura trombocitopênica imunológica, artrite reumatóide, esquistossomose, hepatite C e síndrome nefrótica), foram utilizados para análise imunohistoquímica como controles externos.

c) Análise e interpretação dos resultados

A leitura das lâminas foi realizada através de objetiva de 40x. Foram analisadas de 300 a 500 células por lâmina e considerados positivos, para a expressão aumentada de p53, os casos com marcação nuclear de cor avermelhada num percentual igual ou superior a 5% das células . A análise dos cortes marcados com anti-vimentina foi qualitativa. Só os casos com evidência de fixação satisfatória, através da marcação adequada de vasos e células do estroma, foram considerados.

Análise Estatística

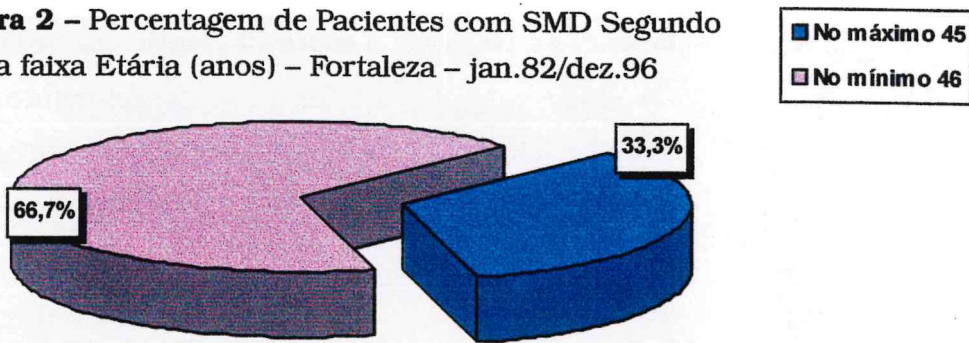
4

A análise estatística, realizada no laboratório de Estatística do Departamento de Matemática e Estatística da Universidade Federal do Ceará, utilizou a avaliação descritiva dos dados e o teste exato de Fisher (SOARES, 1983) nas tabelas de contingência 2x2, para avaliar a significância de associações entre as variáveis estudadas. O nível de significância máximo de 5% foi considerado para definir associações significativas.

Resultados

Foram avaliados 43 fragmentos de biópsia óssea obtidos de 33 pacientes portadores de SMD, previamente diagnosticados e classificados, de acordo com o estudo do sangue periférico e aspirado medular, com primeira consulta no período compreendido entre 1982 e 1996. Dentre os pacientes avaliados, 18(54,5%) eram do sexo masculino e 15(45,5%) do sexo feminino . A faixa etária variou de 20 a 82 anos, com uma idade média de 54,6 anos e desvio padrão de 18,7 anos. O maior percentual de pacientes, 66,7% (22), possui no mínimo 46 anos (Figura 2), sendo que, 25,0% possuem no máximo 38 anos, 50,0% no máximo 58 anos e 75% no máximo 69 anos.

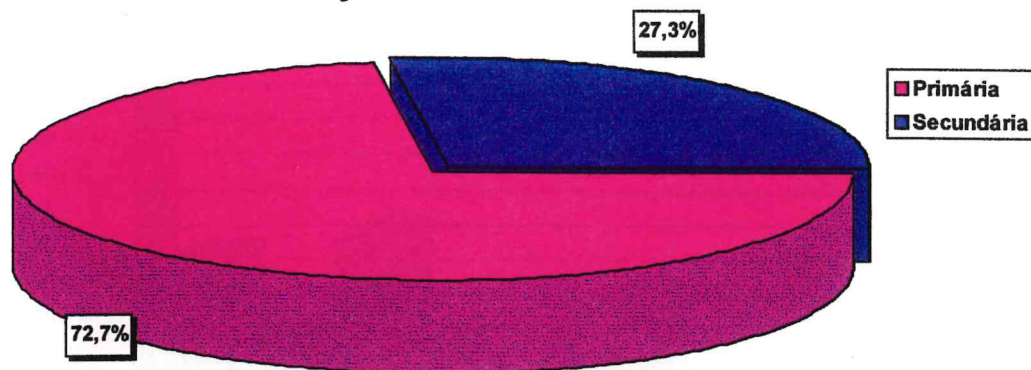
Figura 2 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a faixa Etária (anos) – Fortaleza – jan.82/dez.96



Fonte: HUWC - Serviço de Hematologia-

Em 9 pacientes (27,3%), foi detectado algum tipo de exposição a agentes potencial ou reconhecidamente genotóxicos. Esses pacientes foram classificados como SMD secundária. Em 24 casos (72,7%) nenhuma exposição foi referida, e foram portanto classificados como SMD primária (Figura 3).

Figura 3 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Exposição Prévia a Agentes Mutagênicos
– Fortaleza – jan.82/dez.96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

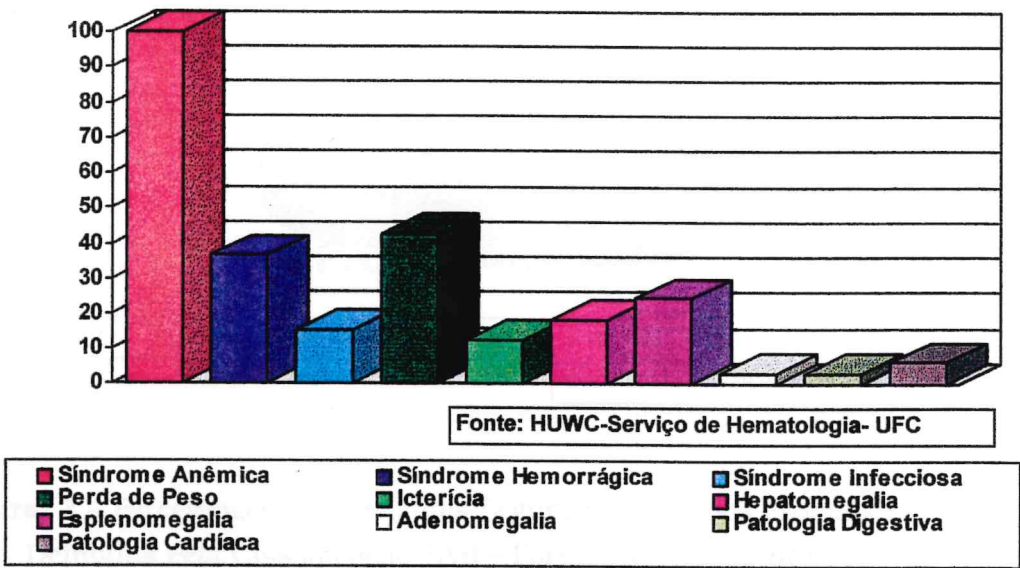
Dentre os sinais e sintomas observados por ocasião do diagnóstico, a síndrome anêmica esteve presente em 100% dos casos, sendo também frequentemente observadas a perda ponderal (42,4%), a síndrome hemorrágica (36,4%) e a esplenomegalia (24,2%) (Tabela 1 e Figura 4). Os demais sinais e sintomas apresentados ocorreram em menos de 20% dos pacientes.

Tabela 1 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo os Sintomas e Sinais Clínicos Apresentados – Fortaleza – janeiro/82/dezembro/96

| Sintomas e Sinais Clínicos | Nº de Pacientes | % |
|----------------------------|-----------------|-------|
| Síndrome anêmica | 33 | 100,0 |
| Síndrome hemorrágica | 12 | 36,4 |
| Síndrome infecciosa | 5 | 15,2 |
| Perda de peso | 14 | 42,4 |
| Icterícia | 4 | 12,1 |
| Hepatomegalia | 6 | 18,2 |
| Esplenomegalia | 8 | 24,2 |
| Adenomegalia | 1 | 3,0 |
| Patologia digestiva | 1 | 3,0 |
| Patologia cardíaca | 2 | 6,1 |

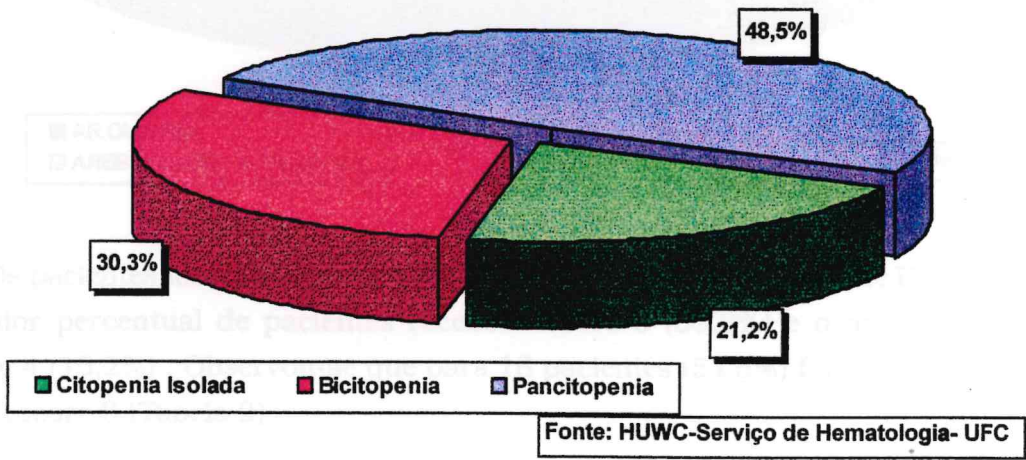
Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Figura 4 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo os Sintomas e Sinais Clínicos Apresentados – Fortaleza – jan/82-dez/96



No hemograma realizado por ocasião do diagnóstico, 16 pacientes (48,5%) apresentavam pancitopenia, 10 pacientes (30,3%) bicitopenia e 7 pacientes (21,2%), uma citopenia isolada (Figura 5).

Figura 5 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo o Resultado do Hemograma – Fortaleza – jan/82-dez/96



De acordo com a classificação FAB, 19 pacientes (57,6%) foram classificados como AR, 3 pacientes (9,1%) como ARSA, 5 pacientes (15,2%) como AREB, 4 pacientes (12,1%) como AREB-t e 2 pacientes (6,1%) como LMMC (Figura 6). Portanto, 22 pacientes (66,7%) pertencem a subtipos de melhor prognóstico – AR e ARSA – enquanto 11 pacientes (33,3%) pertencem aos demais subgrupos – AREB, AREB-t e LMMC (Figura 7).

Figura 6 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Classificação FAB – Fortaleza – jan.82/dez.96.

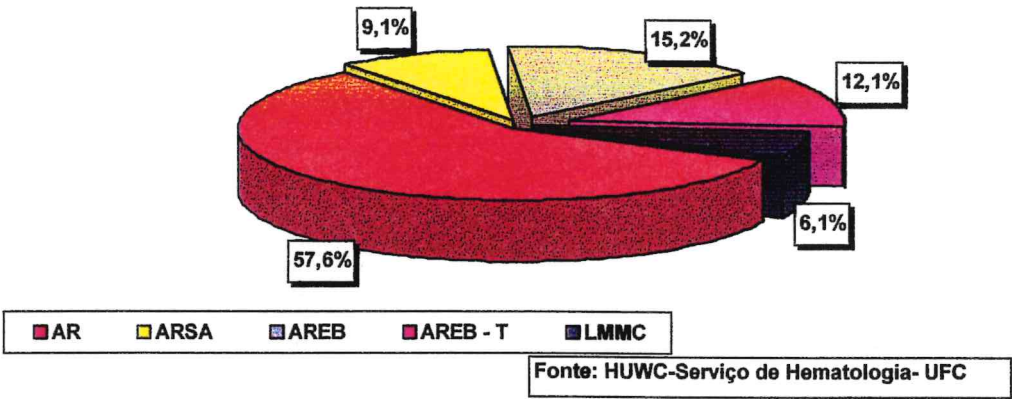
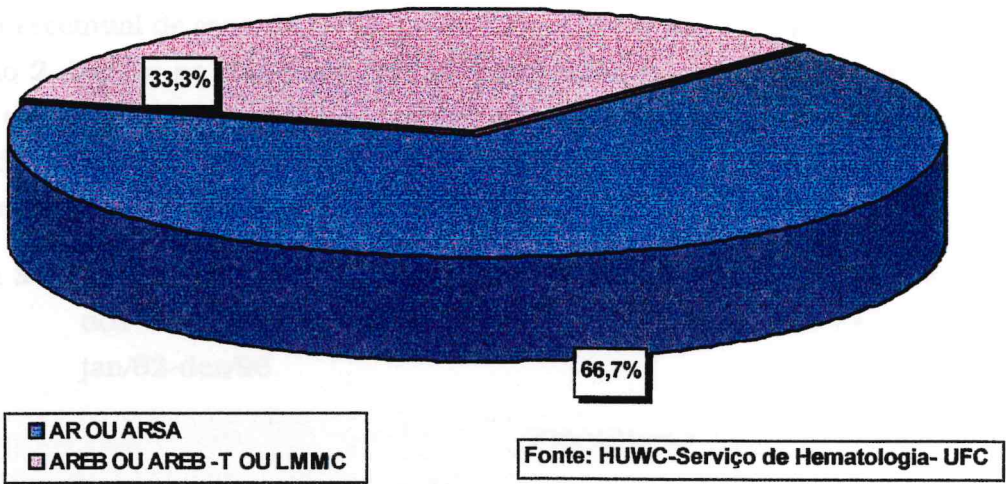


Figura 7 – Percentagem de Pacientes Segundo os Grupos Prognósticos Definidos Pela Classificação FAB – Fortaleza – jan/82-dez/96



Os pacientes foram ainda classificados de acordo com o escore de Bournemouth. O maior percentual de pacientes recebeu escore 3 (39,3%) e o menor percentual escore 4 (15,2%) . Observou-se que para 18 pacientes (54,5%) foi atribuído no mínimo o escore 3 (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo o Escore Bournemouth – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Escore | Nº de pacientes | % |
|---------------|------------------------|----------|
| 1 | 9 | 27,3 |
| 2 | 6 | 18,2 |
| 3 | 13 | 39,3 |
| 4 | 5 | 15,2 |
| TOTAL | 33 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Utilizando a classificação FAB para definição de grupos de melhor (AR e ARSA) e pior prognóstico (AREB, AREB-t e LMMC), observou-se que, no primeiro grupo, o maior percentual de casos(40,9%) obteve escore 1 e ainda, 59,1% obtiveram o escore máximo 2. Dentre os pacientes com pior prognóstico, o maior percentual (45,4%) obteve escore 3 e 81,8% obtiveram escore mínimo 3. Observou-se ainda que, retirando-se da amostra os pacientes do subtipo LMMC, 100% dos casos com pior prognóstico possuem escore mínimo 3 (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo os Escores em Função dos Grupos Prognósticos Obtidos pela Classificação FAB – Fortaleza – jan/82-dez/96.

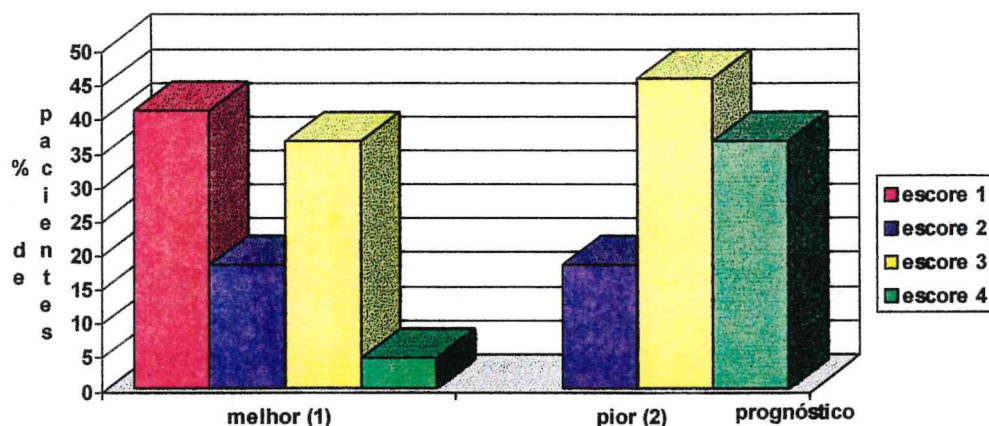
| Escore | Prognóstico | | | |
|---------------|------------------------|----------|------------------------|----------|
| | Melhor (1) | | Pior (2) | |
| | Nº de Pacientes | % | Nº de Pacientes | % |
| 1 | 9 | 40,9 | 0 | 0,0 |
| 2 | 4 | 18,2 | 2 | 18,2 |
| 3 | 8 | 36,4 | 5 | 45,4 |
| 4 | 1 | 4,5 | 4 | 36,4 |
| TOTAL | 22 | 100,0 | 11 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

(1) AR ou ARSA

(2) AREB ou AREB-t ou LMMC

Figura 8 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo os Escores Bournemouth em Função do Prognóstico Definido pela Classificação FAB – Fortaleza – jan.82/dez.96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

(1) AR ou ARSA

(2) AREB ou AREB-t ou LMMC

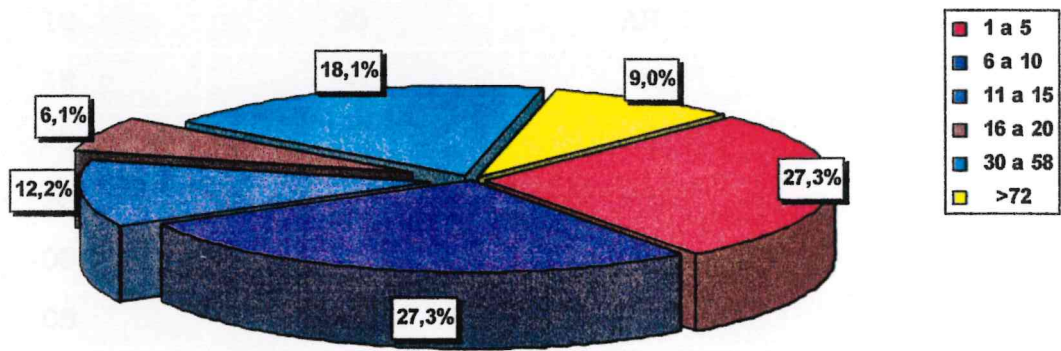
O período de acompanhamento dos pacientes variou de 1 a 132 meses com média de 22,3 meses e desvio padrão de 29,0 meses. As faixas de 1 a 5 meses e de 6 a 10 meses foram as que ocorreram com maior frequência, possuindo cada uma delas 27,3% dos pacientes (Tabela 4 e Figura 9). Aqueles acompanhados por, no mínimo, 72 meses (9,0%), podem ser considerados como discrepantes no conjunto de casos. Considerando os 33 pacientes, observamos que 75% foram observados por, no máximo, 33 meses. Retirando-se da amostra os pacientes com, no mínimo, 72 meses de observação, encontramos que 25% deles foram acompanhados por um período máximo de 4,5 meses, 50% no máximo 8,5 meses e 75% no máximo 16,5 meses e, ainda, o período médio de acompanhamento passa para 15 meses com um desvio padrão de 15,6 meses.

Tabela 4 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo o Período de Acompanhamento (meses) – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Período de Acompanhamento | Nº de pacientes | % |
|---------------------------|-----------------|-------|
| 1 a 5 | 9 | 27,3 |
| 6 a 10 | 9 | 27,3 |
| 11 a 15 | 4 | 12,2 |
| 16 a 20 | 2 | 6,1 |
| 30 a 58 | 6 | 18,1 |
| ≥ 72 | 3 | 9,0 |
| TOTAL | 33 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Figura 9 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo o Período de Acompanhamento (meses) – Fortaleza – jan/82-dez/96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

Dos 33 pacientes analisados, 11 (33,3%) evoluíram para um subtipo mais agressivo da doença e/ou leucemia mielóide aguda (Figura 10 e Tabela 5).

Figura 10 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Evolução da Doença – Fortaleza – jan/82-dez/96.

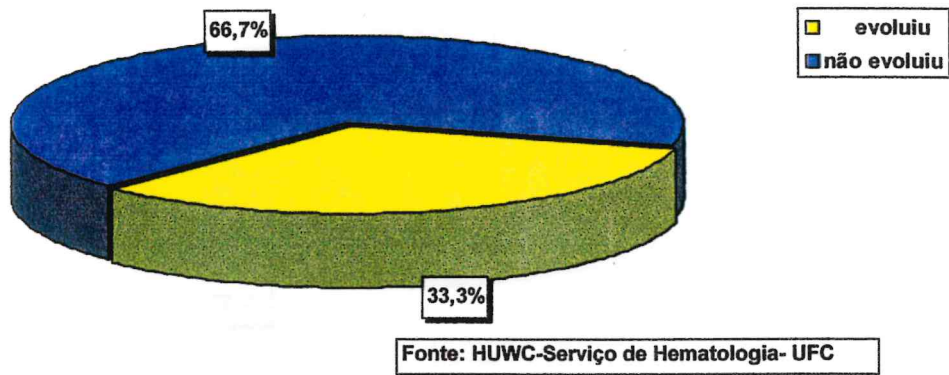


Tabela 5– Pacientes Portadores de SMD com Evolução para Subtipo mais Agressivo da Doença e/ou LMA de Acordo com Idade, Classificação FAB e Tipo de Evolução – Fortaleza – jan/82-dez/96.

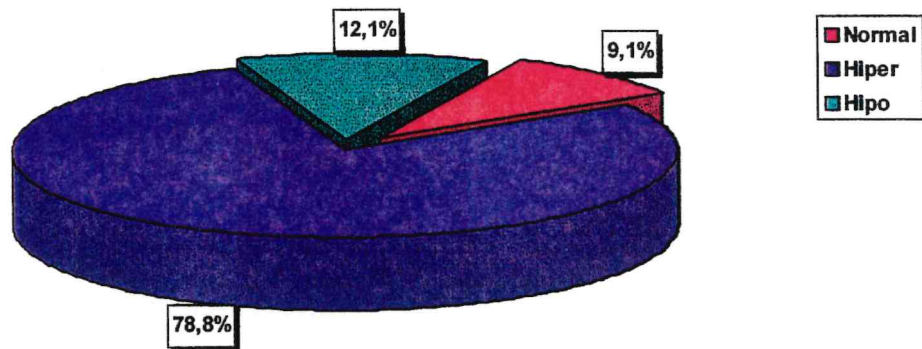
| Casos | Idade (anos) | Classificação FAB | Tipo de Evolução |
|-------|--------------|-------------------|------------------|
| 04 | 69 | AREB | AREB-t |
| 05 | 21 | AREB-t | LMA |
| 16 | 20 | AR | AREB-t |
| 18 | 35 | AR | AREB |
| 20 | 63 | AR | AREB |
| 28 | 63 | LMMC | LMA |
| 06 | 60 | AREB-t | LMA |
| 08 | 22 | AR | AREB |
| 14 | 57 | AREB | AREB-t |
| 22 | 45 | AREB-t | LMA |
| 23 | 68 | AR | LMA |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Nos casos em que mais de uma biópsia do mesmo paciente foram analisadas os exames subsequentes não evidenciaram diferenças relevantes. Os resultados, portanto, consideram apenas a primeira biópsia realizada.

Na avaliação morfológica, o maior percentual de pacientes (78,8%) possuía medula óssea hiper celular, enquanto 9,1% apresentavam medula normocelular e 12,1% hipocelular (Figura 11).

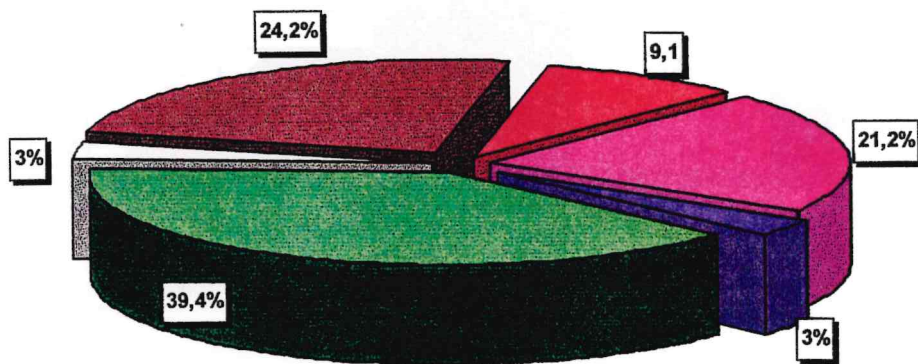
Figura 11 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Celularidade - Fortaleza- jan.82/dez.96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

A análise das alterações de maturação à biópsia óssea evidenciou que a dismegacariopose isolada foi o achado mais frequente (39,4%), seguido da associação dismegacariopose/disgranulopose (24,2%). Em 21,2% dos casos nenhuma alteração foi observada (Figura 12).

Figura 12 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença de Dispoeses – Fortaleza – jan.82/dez.96.



■ Nenhuma
 ■ apenas Disgranulopose
 ■ apenas Dismegacariopose
 ■ Diseritropose e Disgranulopose
 ■ Disgranulopose e Dismegacariopose
 ■ Diseritropose; Disgranulopose e Dismegacariopose

Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

A distribuição dos pacientes com alteração de maturação segundo a linhagem envolvida evidenciou dismegacariopose em 72,7% dos casos, disgranulopose em 39,4% e diseritropose em 12,1% (Tabela 6 e Figuras 13, 14 e 15).

Tabela 6 - Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Dispoese
- Fortaleza - Jan/82-Dez/96

| Dispoeses | Nº de pacientes | % |
|-------------------|-----------------|------|
| Diseritropoese | 4 | 12,1 |
| Disgranulopoese | 13 | 39,4 |
| Dismegacariopoese | 24 | 72,7 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Figura 13 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Dispoese – Fortaleza – jan.82/dez.96.

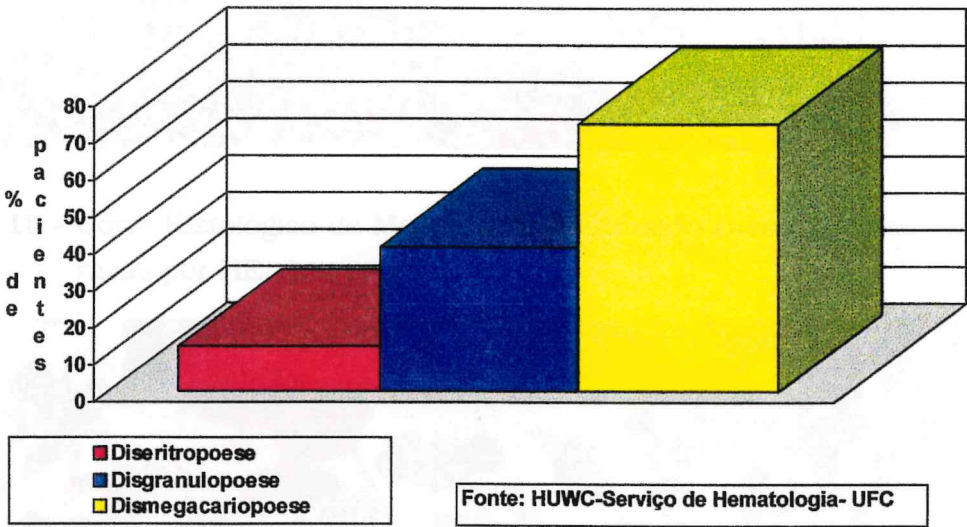


Figura 14 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Dismegacariopese. Coloração por HE. Aumento de 200X.

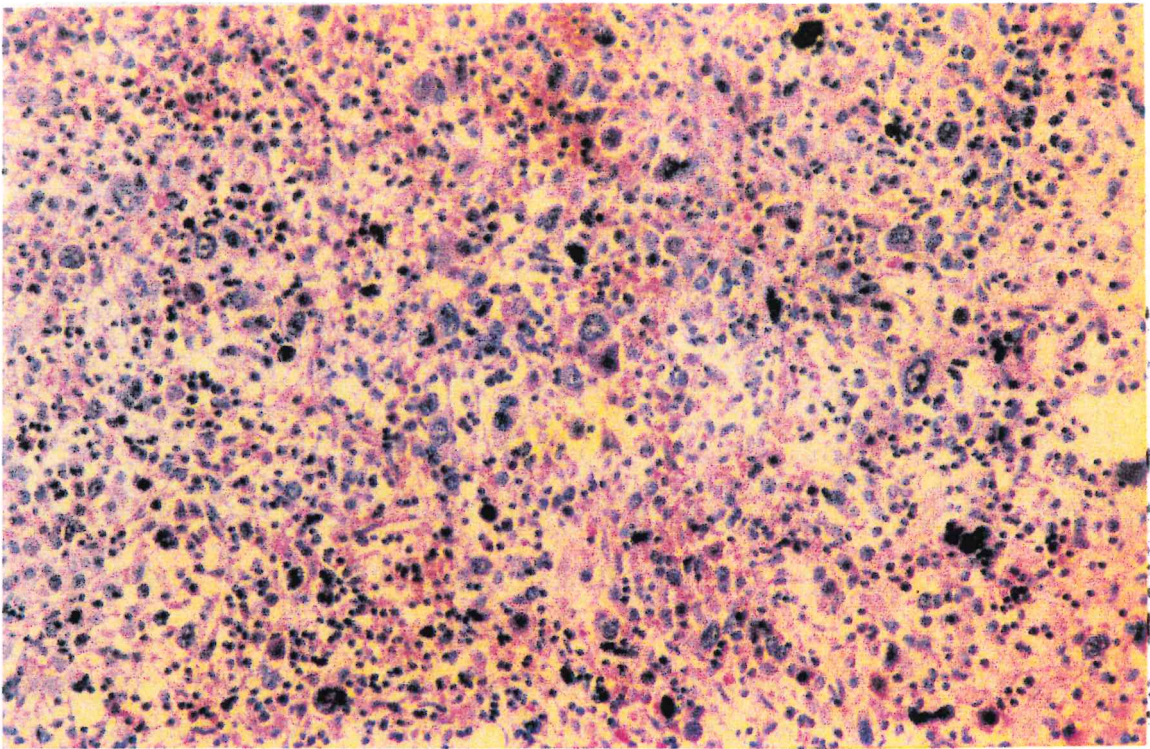
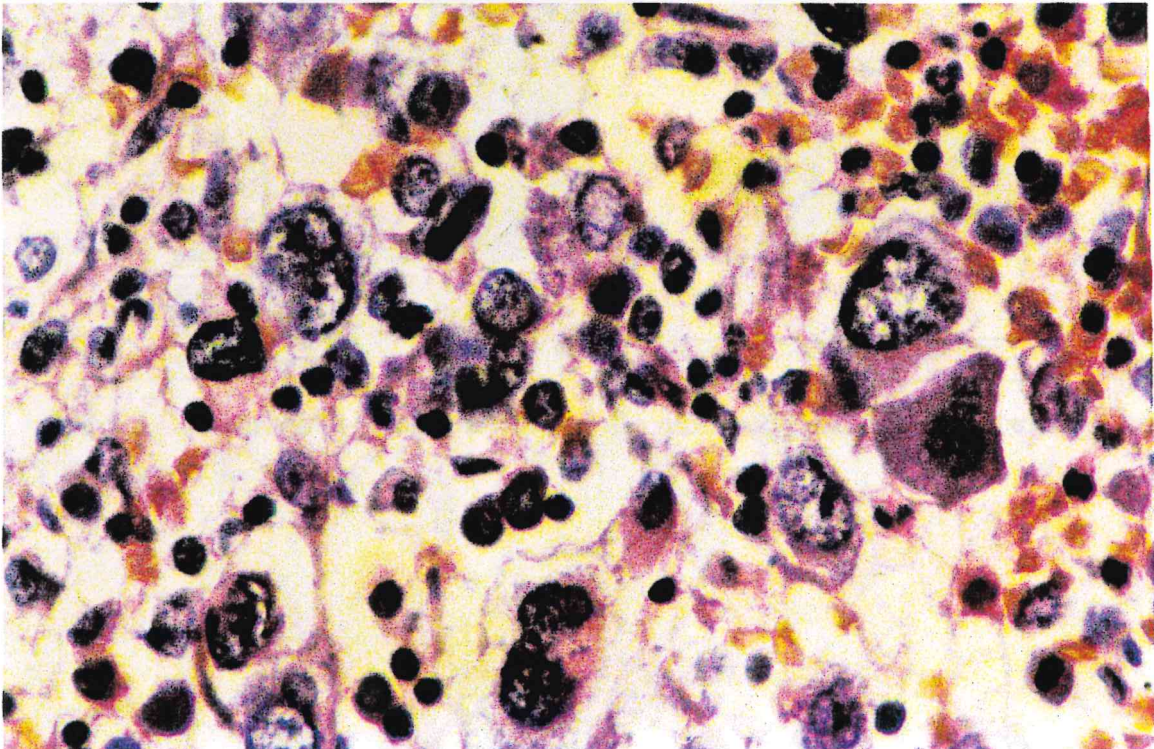


Figura 15 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Dismegacariopese. Coloração por HE. Aumento de 400X.



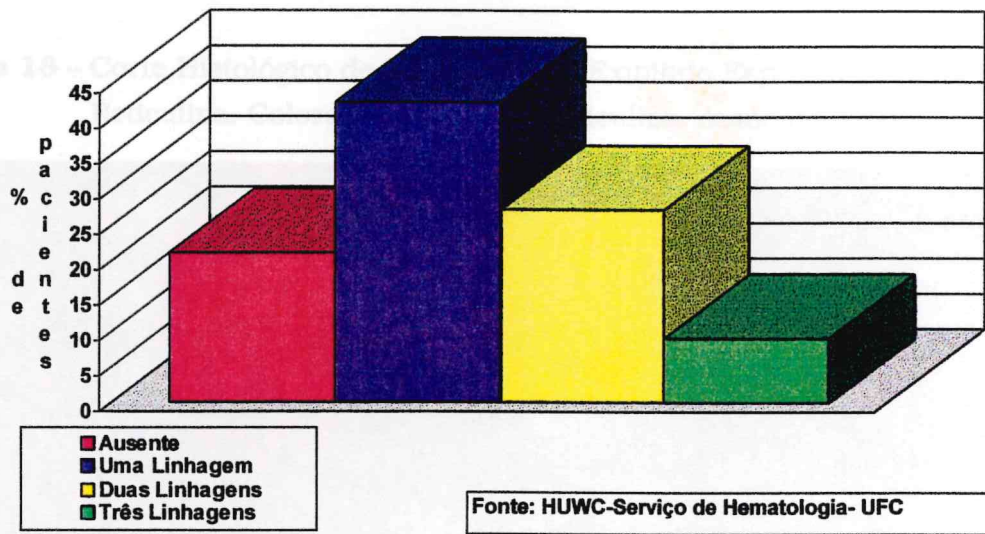
A avaliação do número de linhagens com dispoese mostrou um maior percentual de pacientes (42,4%) com apenas uma linhagem envolvida e, em 78,8% dos casos, pelo menos uma linhagem estava acometida (Tabela 7 e Figura 16).

Tabela 7 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo o Número de Linhagens com Dispoese – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| N. de Linhagens com Dispoese | N./Pacientes | % | % Acumulada |
|------------------------------|--------------|-------|-------------|
| Ausente | 7 | 21,2 | 100,0 |
| Uma linhagem | 14 | 42,4 | 78,8 |
| Duas linhagens | 9 | 27,3 | 36,4 |
| Três linhagens | 3 | 9,1 | 9,1 |
| TOTAL | 33 | 100,0 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Figura 16 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo o Número de Linhagens com Dispoese – Fortaleza – jan/82-dez/96



Em 11 pacientes (34,4%) foi evidenciado aumento da rede de reticulina (Figura 17 e Figura 18).

Figura 17 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Espessamento da Rede de Reticulina. Coloração pela Prata-reticulina. Aumento 200X.

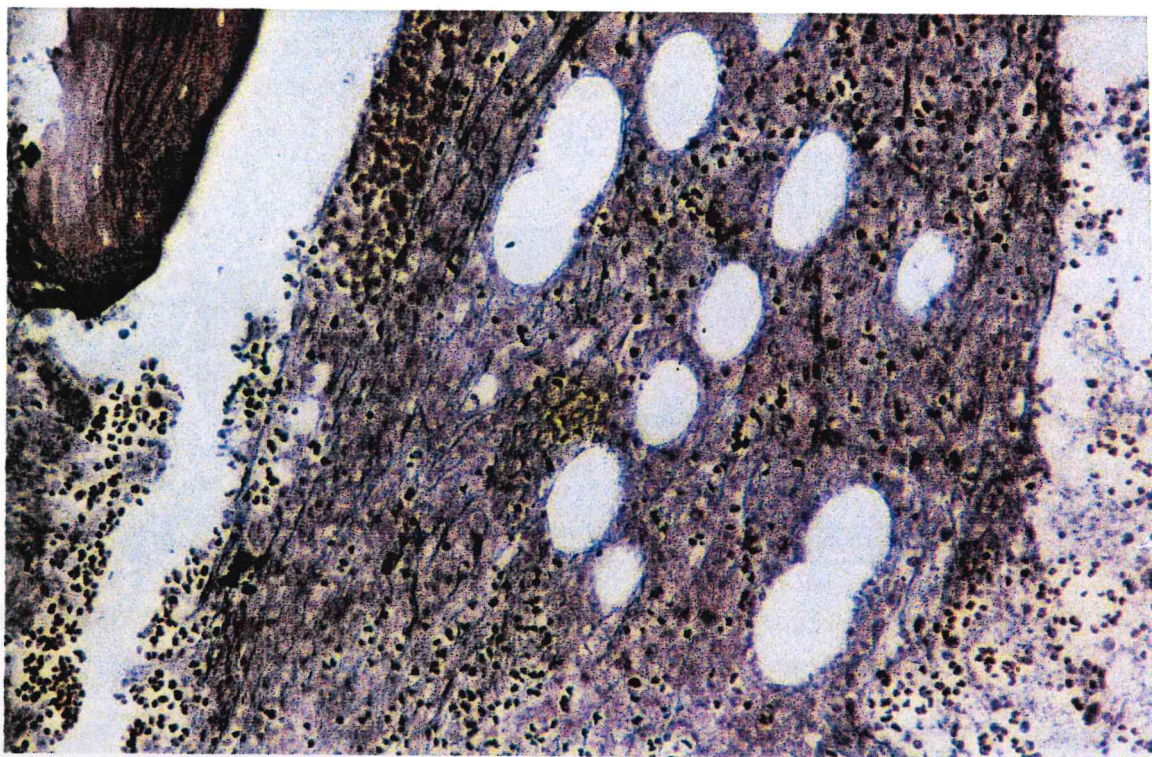
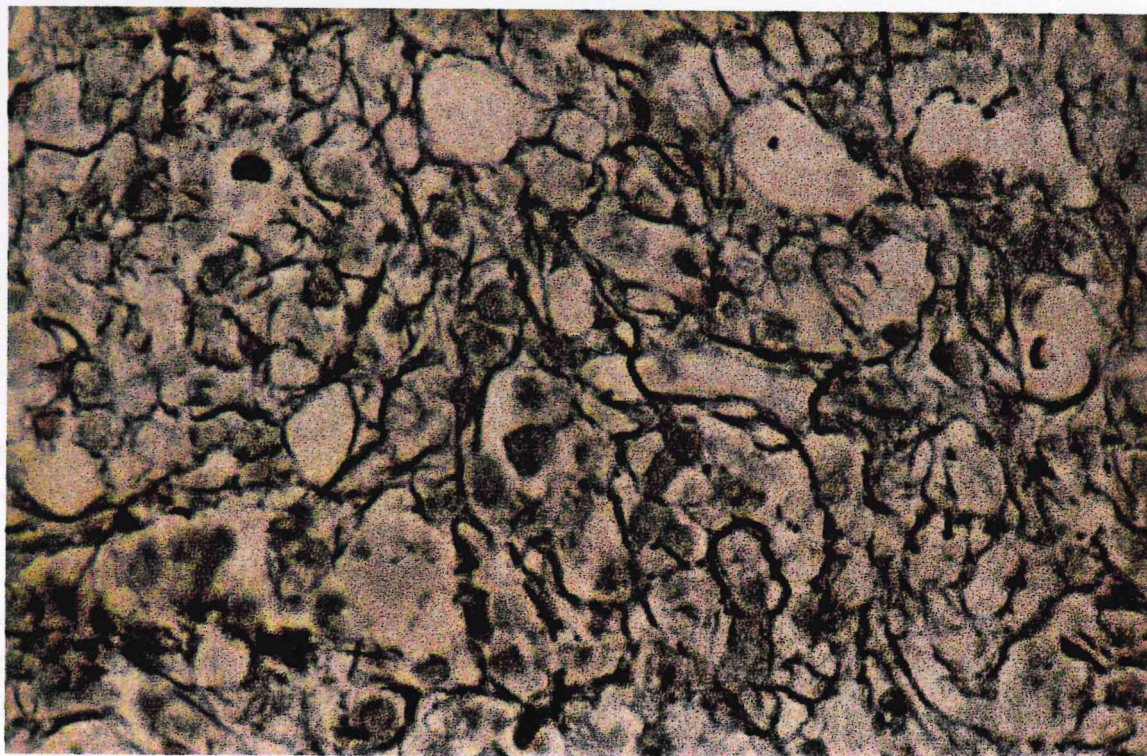
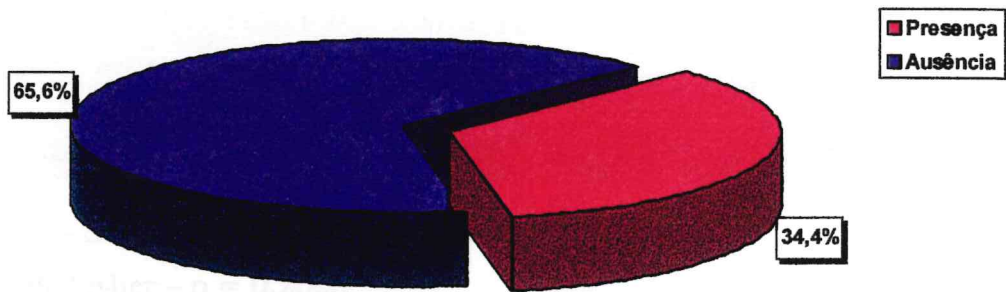


Figura 18 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Espessamento da Rede de Reticulina. Coloração pela Prata-reticulina. Aumento 400X.



Na maioria dos casos, portanto, não foi observada fibrose medular por ocasião do diagnóstico (Figura 19). Quando presente, o espessamento da rede de reticulina foi mais frequente no subtipo AR (21,9%) (Tabela 8).

Figura 19 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença de Fibrose – Fortaleza – jan/82-dez/96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

Tabela 8 – Distribuição dos 32 Pacientes com SMD Segundo a Classificação FAB em Função da Presença de Fibrose – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Subtipo | Presença de Fibrose * | |
|----------------|-----------------------|------|
| | Nº de pacientes | % |
| AR (n = 19) | 7 | 21,9 |
| ARSA (n = 3) | 2 | 6,3 |
| AREB (n = 5) | 1 | 3,1 |
| AREB-t (n = 3) | 1 | 3,1 |
| LMMC (n = 2) | 0 | 0,0 |
| TOTAL (n = 32) | 11 | 34,4 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

* Em um paciente a avaliação da rede de reticulina foi prejudicada.

Uma associação significativa entre a presença de fibrose e dismegacariopose não foi observada ($p=0,2093$), embora, dos pacientes com dismegacariopose, 41,7% possuíam fibrose, enquanto dentre aqueles sem esta dispoese o percentual cai para 12,5% (Tabela 9 e Figura 20).

Tabela 9 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Presença de Fibrose em Função da Presença de Dismegacariopose – Fortaleza – jan/82-dez/96.

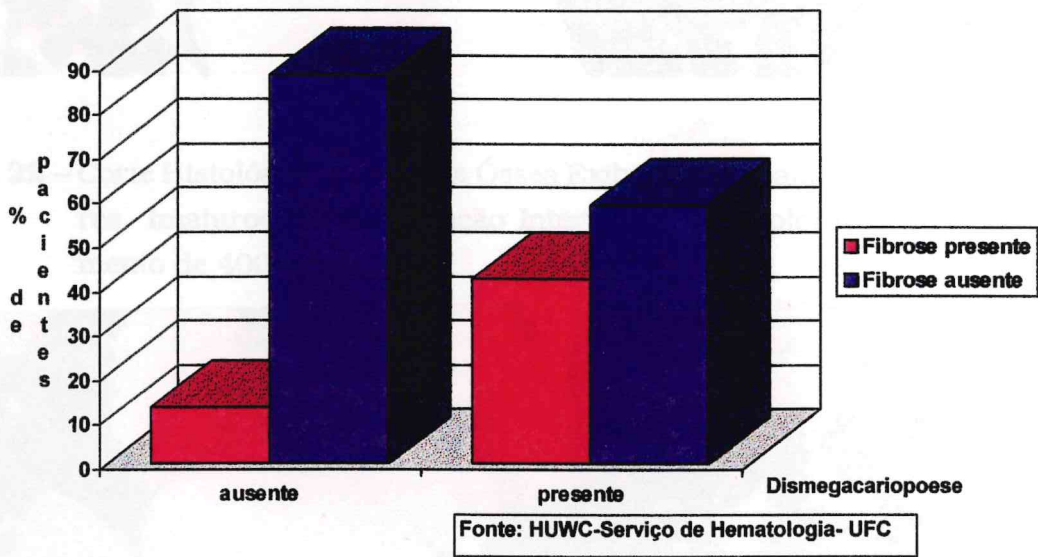
| Fibrose | Dismegacariopose | | | |
|---------|------------------|-------|--------------|-------|
| | Ausente | | Presente | |
| | Nº Pacientes | % | Nº Pacientes | % |
| Sim | 1 | 12,5 | 10 | 41,7 |
| Não | 7 | 87,5 | 14 | 58,3 |
| TOTAL | 8 | 100,0 | 24 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Teste exato de Fisher – p = 0,2093

* Em um paciente a avaliação da rede de reticulina foi prejudicada

Figura 20 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Fibrose em Função da Dismegacariopose – Fortaleza – jan/82-dez/96



A presença de ALIP foi observada em 13 pacientes (39,4%) (Figuras 21 e 22).

Figura 21 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Grupamentos de Precursores Imaturos em Localização Intertrabecular. Coloração por HE. Aumento de 400X.

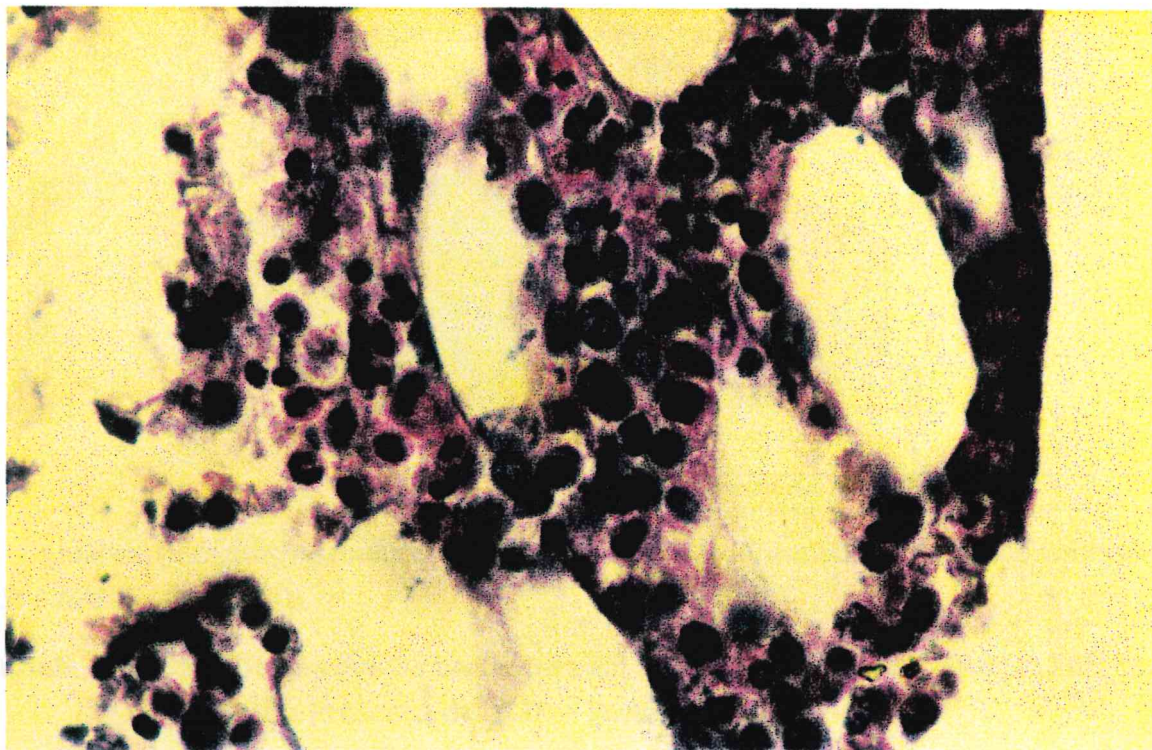
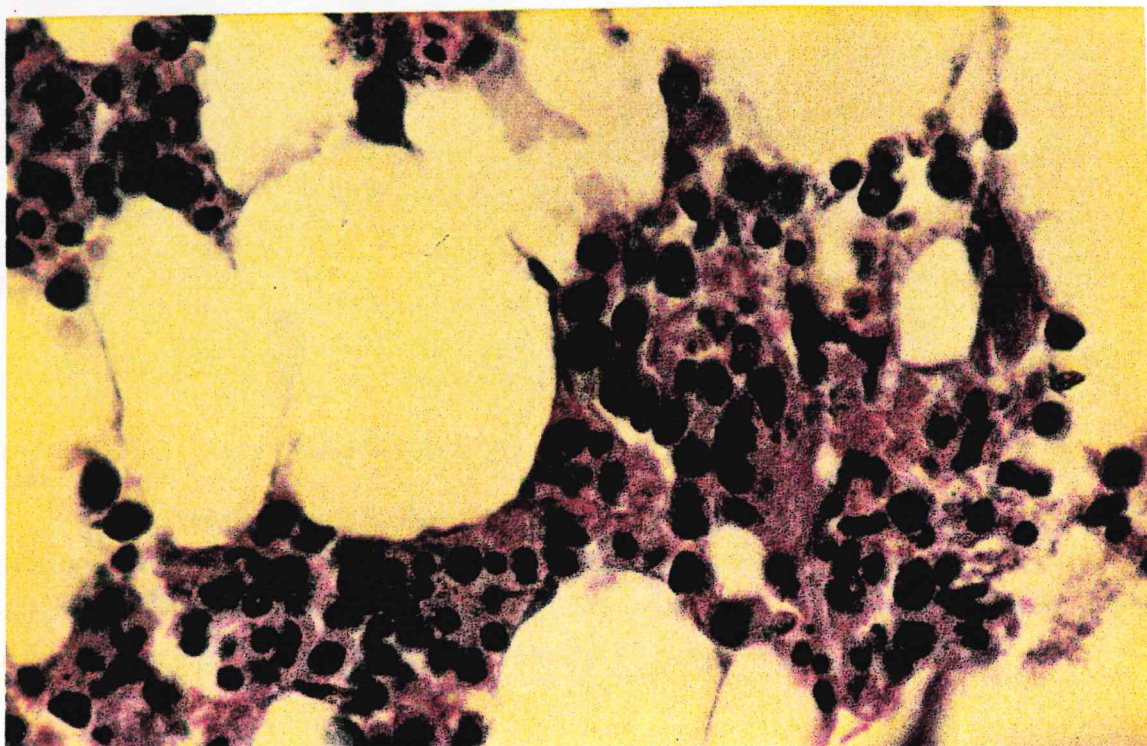
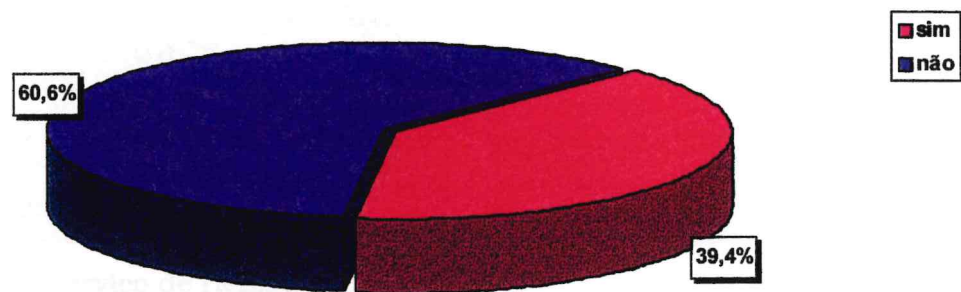


Figura 22 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Grupamentos de Precursores Imaturos em Localização Intertrabecular. Coloração por HE. Aumento de 400X.



Na maioria dos casos (60,6%), a localização anormal dos precursóres imaturos não foi observada (Figura 23).

Figura 23 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a presença de ALIP – Fortaleza – jan/82-dez/96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

Quando presente, os maiores percentuais (12,1%) foram observados nos subtipos AR e AREB (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição dos 33 Pacientes com SMD Segundo a Classificação FAB em Função da Presença de ALIP. – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Subtipo | Presença de ALIP | |
|----------------|------------------|------|
| | Nº de pacientes | % |
| AR (n = 19) | 4 | 12,1 |
| ARSA (n = 3) | 1 | 3,0 |
| AREB (n = 5) | 4 | 12,1 |
| AREB-t (n = 4) | 2 | 6,1 |
| LMMC (n = 2) | 2 | 6,1 |
| TOTAL (n = 33) | 13 | 39,4 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

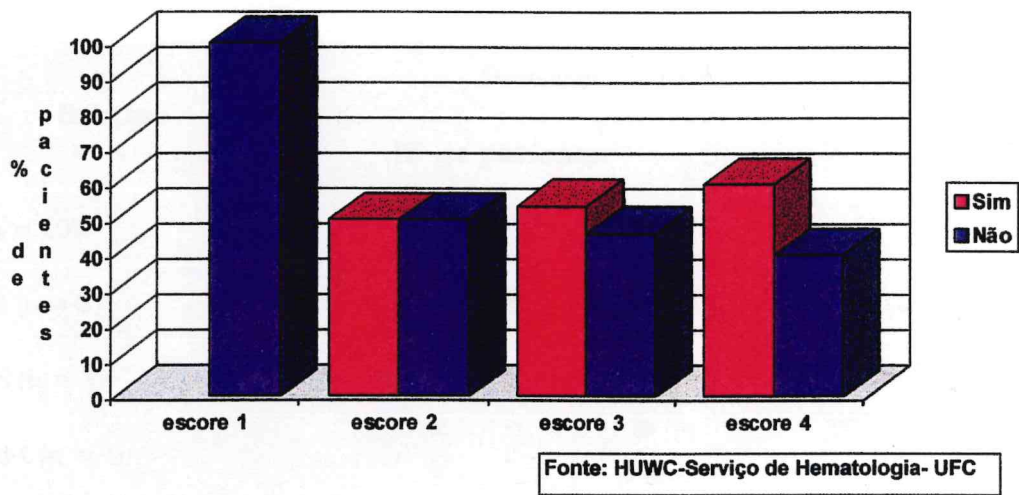
A análise da distribuição dos pacientes, segundo a presença de ALIP em função do escore Bournemouth obtido 1, 2, 3 ou 4, evidenciou que, respectivamente, 0,0%, 50,0%, 53,8% e 60,0% deles apresentavam ALIP, o que sugere uma relação direta entre o escore e a presença de ALIP (Tabela 11 e Figura 24).

Tabela 11 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Localização Anormal de Precusores Imaturos em Função dos Escores Bournemouth – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| ALIP | Escore 1 | | Escore 2 | | Escore 3 | | Escore 4 | |
|-------|----------|-------|----------|-------|----------|------|----------|-------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Sim | 0 | 0,0 | 3 | 50,0 | 7 | 53,8 | 3 | 60,0 |
| Não | 9 | 100,0 | 3 | 50,0 | 6 | 46,2 | 2 | 40,0 |
| TOTAL | 9 | 100,0 | 6 | 100,0 | 13 | 100 | 5 | 100,0 |

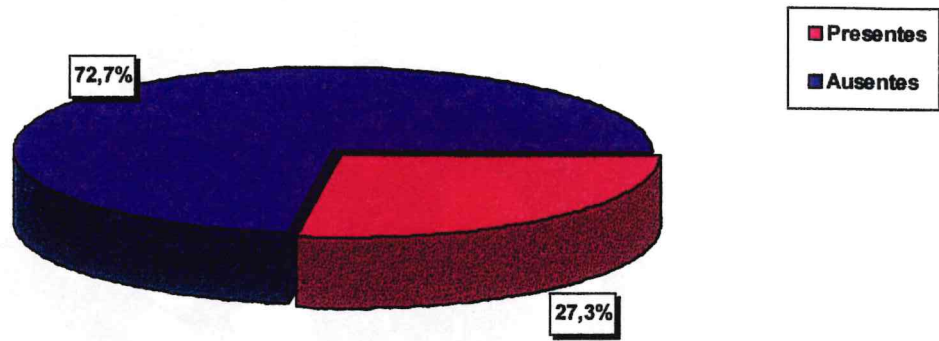
Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Figura 24 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença de ALIP em Função dos Escores BOURNEMOUTH – Fortaleza – jan/82-dez/96.



A presença de nódulos linfóides foi observada na medula óssea de 9 pacientes (27,3%) (Figuras 25, 26, 27, 28 e 29), sendo 7 casos de AR, 1 AREB e 1 AREB-t (Tabela 12).

Figura 25 – Percentagem de Pacientes com SDM Segundo a Presença de Nódulos Linfóides – Fortaleza – jan/82-dez/96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

Tabela 12 – Distribuição dos 33 Pacientes Portadores de SMD Segundo a Classificação FAB em Função da Presença de Nódulos Linfóides – Fortaleza – jan/82-dez/96

| Subtipo | Presença de Nódulos Linfóides | |
|----------------|-------------------------------|------|
| | Nº de pacientes | % |
| AR (n = 19) | 7 | 21,3 |
| ARSA (n = 3) | 0 | 0,0 |
| AREB (n = 5) | 1 | 3,0 |
| AREB-t (n = 4) | 1 | 3,0 |
| LMMC (n = 2) | 0 | 0,0 |
| TOTAL (n = 33) | 9 | 27,3 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Figura 26 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Pequeno Nódulo Linfóide. Coloração por HE. Aumento 200X.

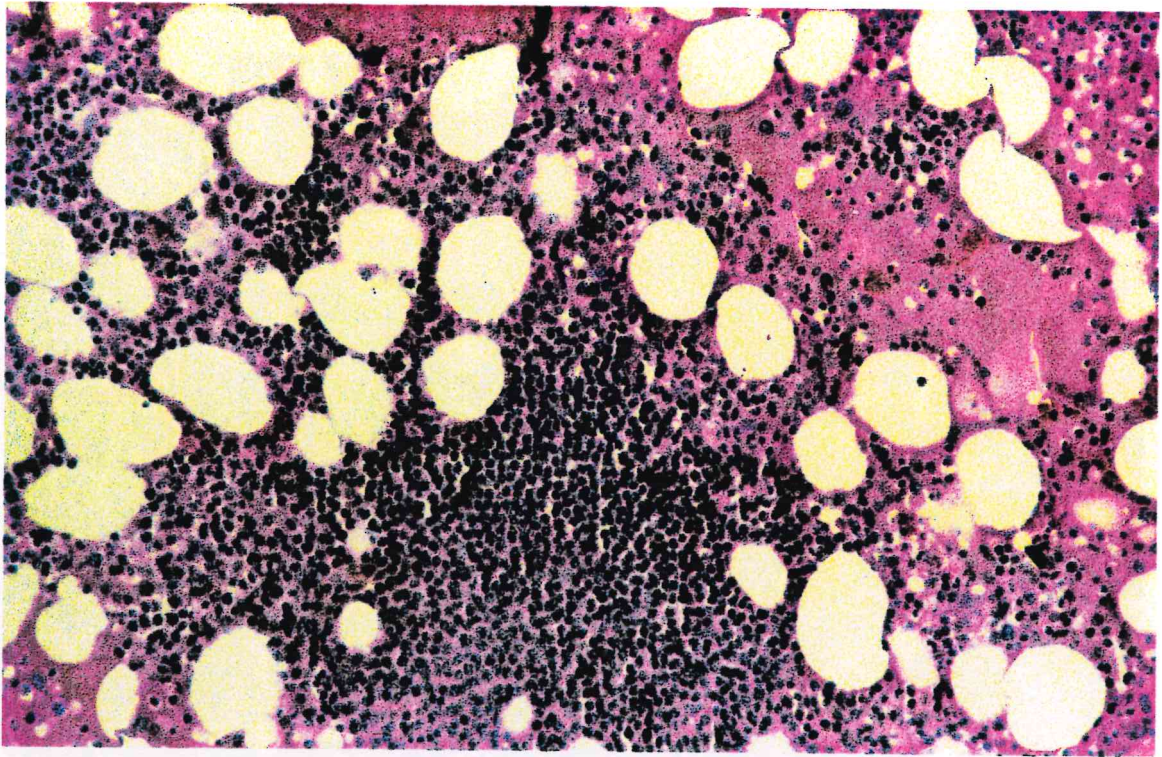


Figura 27 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Volumoso Nódulo Linfóide bem Delimitado. Coloração por HE. Aumento 200X.

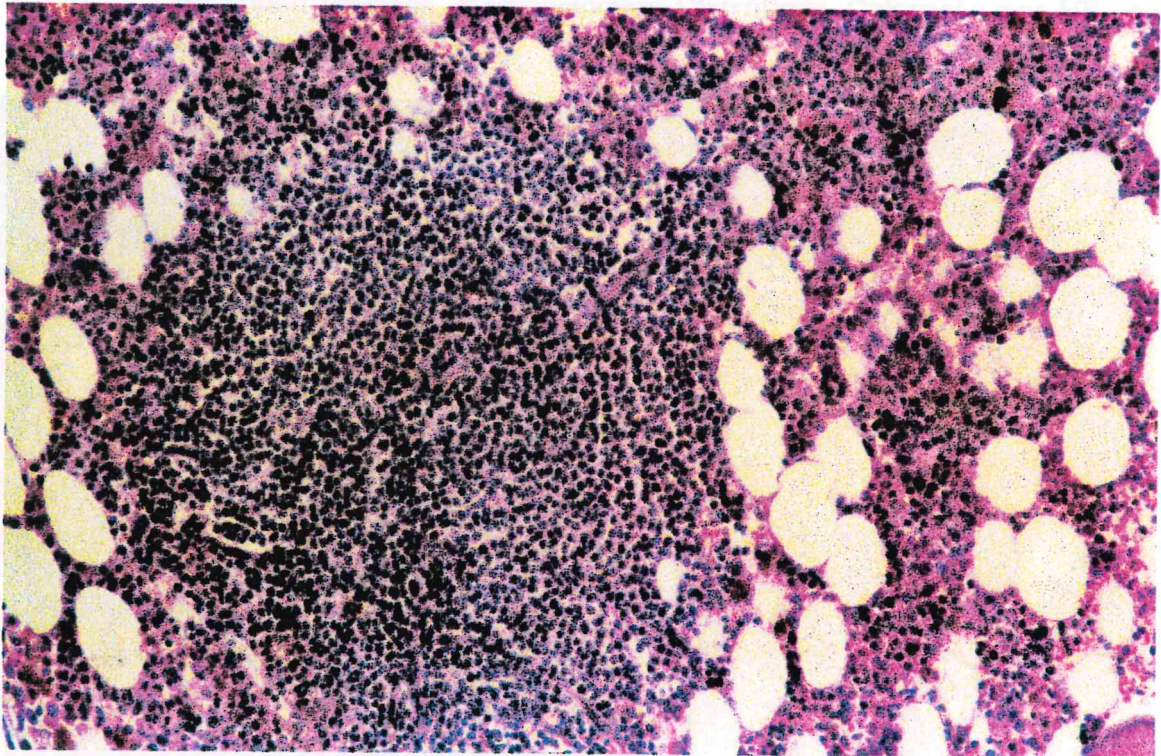


Figura 28 – Corte Histológico de Medula Óssea Evidenciando Pequeno Grupamento Linfóide nas Proximidades da Trabécula Óssea. Coloração por HE. Aumento 200X .

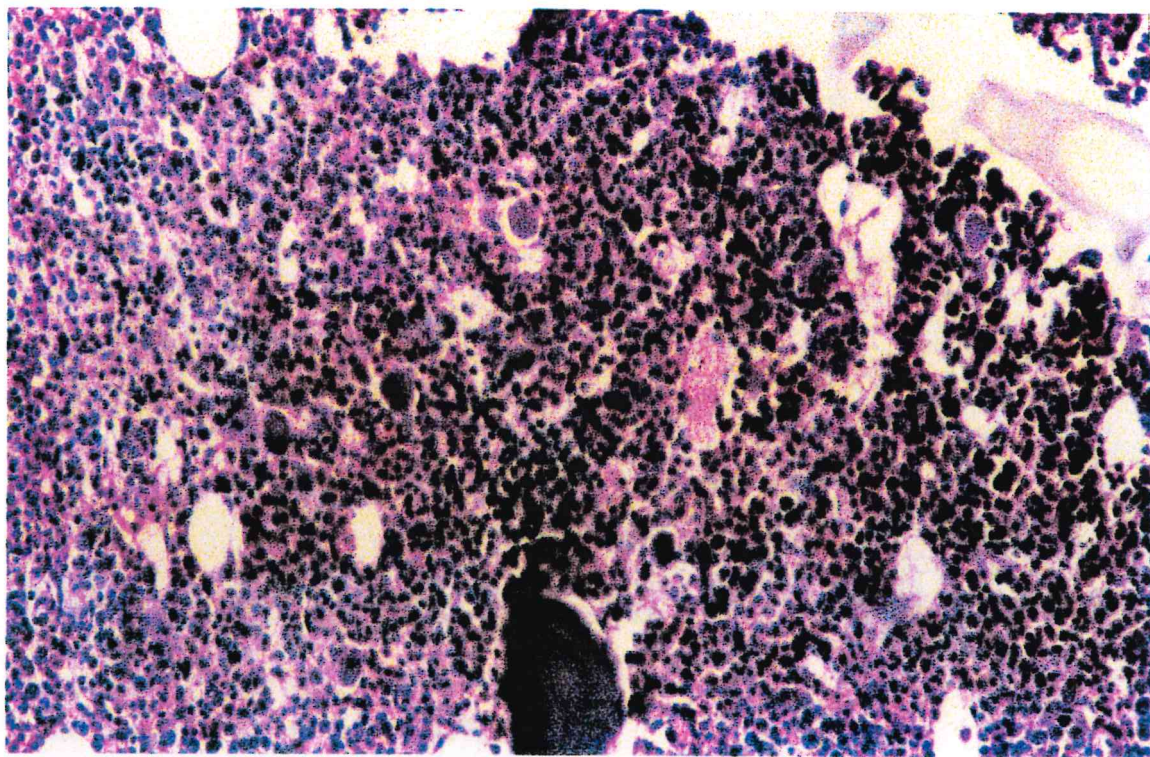
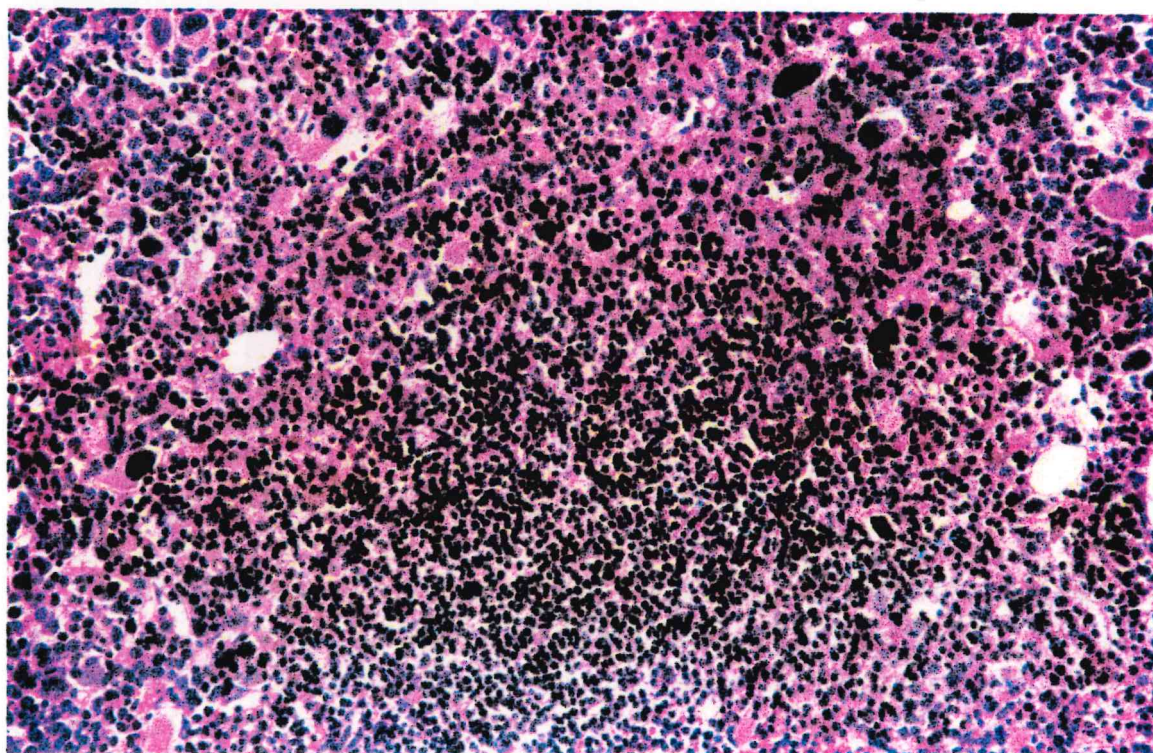


Figura 29 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Agregado Linfóide de Limites Pouco Precisos. Megacariócitos Distróficos. Coloração por HE. Aumento 200X.



Quando avaliada a presença de nódulos linfóides em função da presença de fibrose, observou-se existir uma associação estatisticamente significativa ($p=0,0349$). Dos pacientes que apresentavam nódulos linfóides, 66,7% também possuíam fibrose; dos que não apresentavam nódulos, 78,3% também não possuíam fibrose (Tabela 13 e Figura 30).

Tabela 13 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Presença de Fibrose na Medula em Função da Presença de Nódulos Linfóides – Fortaleza – jan/82-dez/96

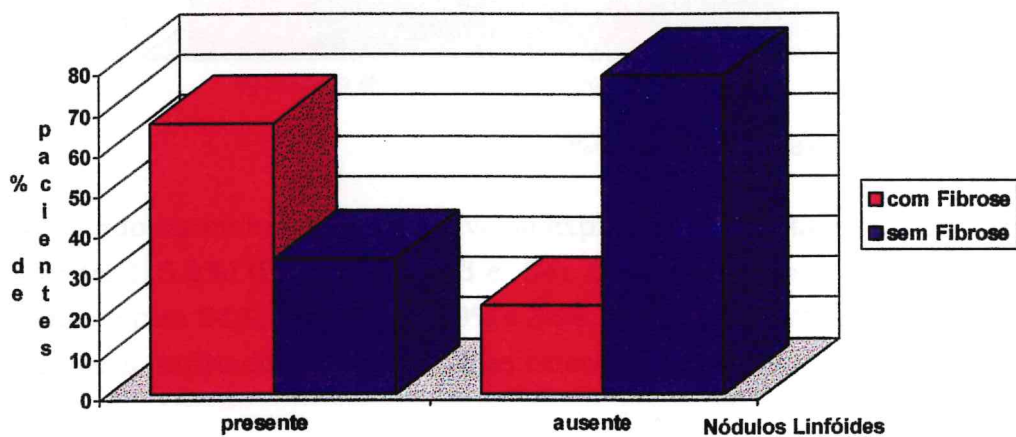
| Fibrose * | Nódulos Linfóides | | | |
|-----------|-------------------|-------|---------|-------|
| | Presente | | Ausente | |
| | Nº | % | Nº | % |
| Sim | 6 | 66,7 | 5 | 21,7 |
| Não | 3 | 33,3 | 18 | 78,3 |
| TOTAL | 9 | 100,0 | 23 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Teste exato de Fisher – $p = 0,0349$

* Em um paciente a avaliação da rede de reticulina foi prejudicada.

Figura 30 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença de Fibrose em Função da Presença de Nódulos Linfóides – Fortaleza – jan/82-dez/96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

Não foi observada associação entre a faixa etária e a presença de nódulos linfóides ($p=0,6808$). Em ambas as faixas analisadas, no máximo 45 anos e no mínimo 46 anos, os maiores percentuais de pacientes não possuíam nódulos linfóides (Tabela 14 e Figura 31).

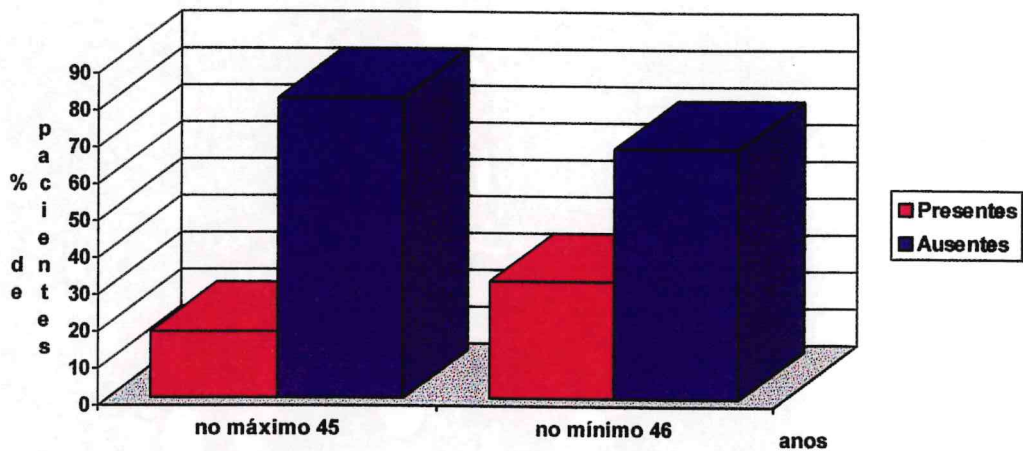
Tabela 14 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Presença de Nódulos Linfóides em Função da Faixa Etária – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Nódulos Linfóides | Faixa Etária | | | |
|-------------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | No máximo 45 | | No mínimo 46 | |
| | Nº de Pacientes | % | Nº de Pacientes | % |
| Presentes | 2 | 18,2 | 7 | 31,8 |
| Ausentes | 9 | 81,8 | 15 | 68,2 |
| TOTAL | 11 | 100,0 | 22 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Teste exato de Fisher p = 0,6808

Figura 31 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença de Nódulos Linfóides em Função da Faixa Etária – Fortaleza – jan.82/dez.96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

O estudo imunohistoquímico revelou expressão aumentada da proteína p53 em 5 pacientes (15,2%) (Figuras 32, 33 e 34). Os percentuais de células positivas em cada caso foram 54%, 39%, 27%, 59% e 36%. Nos 10 pacientes portadores de doenças benignas, utilizados como controles externos, a proteína p53 não foi detectada.

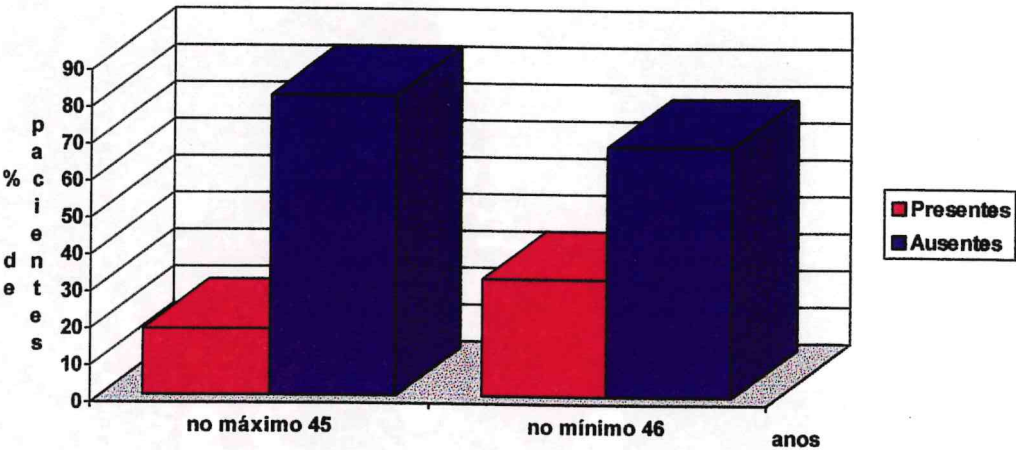
Tabela 14 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Presença de Nódulos Linfóides em Função da Faixa Etária – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Nódulos Linfóides | Faixa Etária | | | |
|-------------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | No máximo 45 | | No mínimo 46 | |
| | Nº de Pacientes | % | Nº de Pacientes | % |
| Presentes | 2 | 18,2 | 7 | 31,8 |
| Ausentes | 9 | 81,8 | 15 | 68,2 |
| TOTAL | 11 | 100,0 | 22 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Teste exato de Fisher $p = 0,6808$

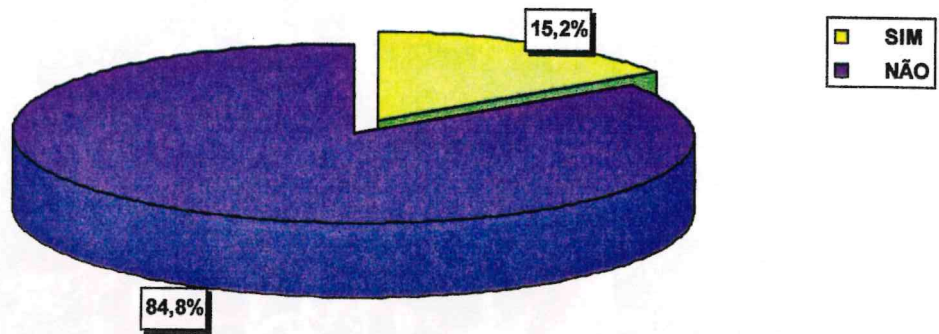
Figura 31 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença de Nódulos Linfóides em Função da Faixa Etária – Fortaleza – jan.82/dez.96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

O estudo imunohistoquímico revelou expressão aumentada da proteína p53 em 5 pacientes (15,2%) (Figuras 32, 33 e 34). Os percentuais de células positivas em cada caso foram 54%, 39%, 27%, 59% e 36%. Nos 10 pacientes portadores de doenças benignas, utilizados como controles externos, a proteína p53 não foi detectada.

Figura 32 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Expressão Aumentada da Proteína p53
– Fortaleza – jan/82-dez/96.



Fonte: HUWC-Serviço de Hematologia- UFC

Figura 33 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Positividade para o Marcador Anti-p53. Técnica APAAP. Aumento 200X.

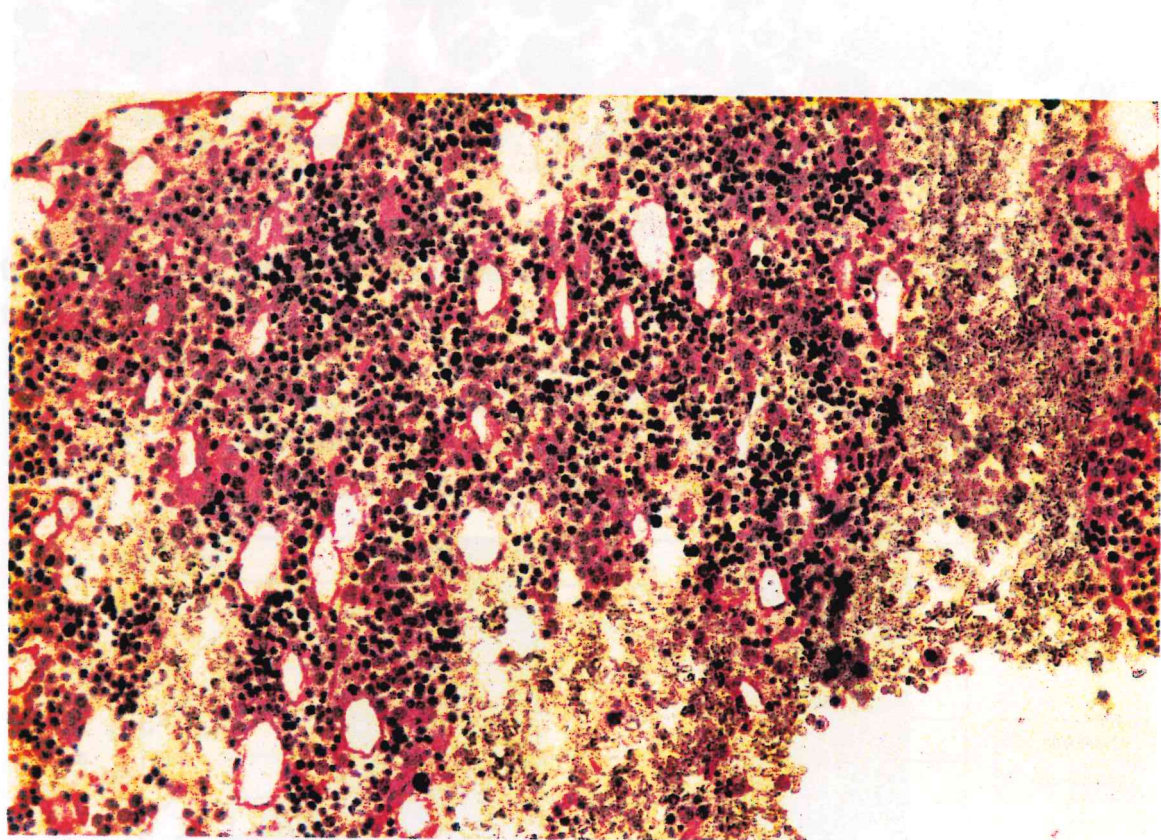
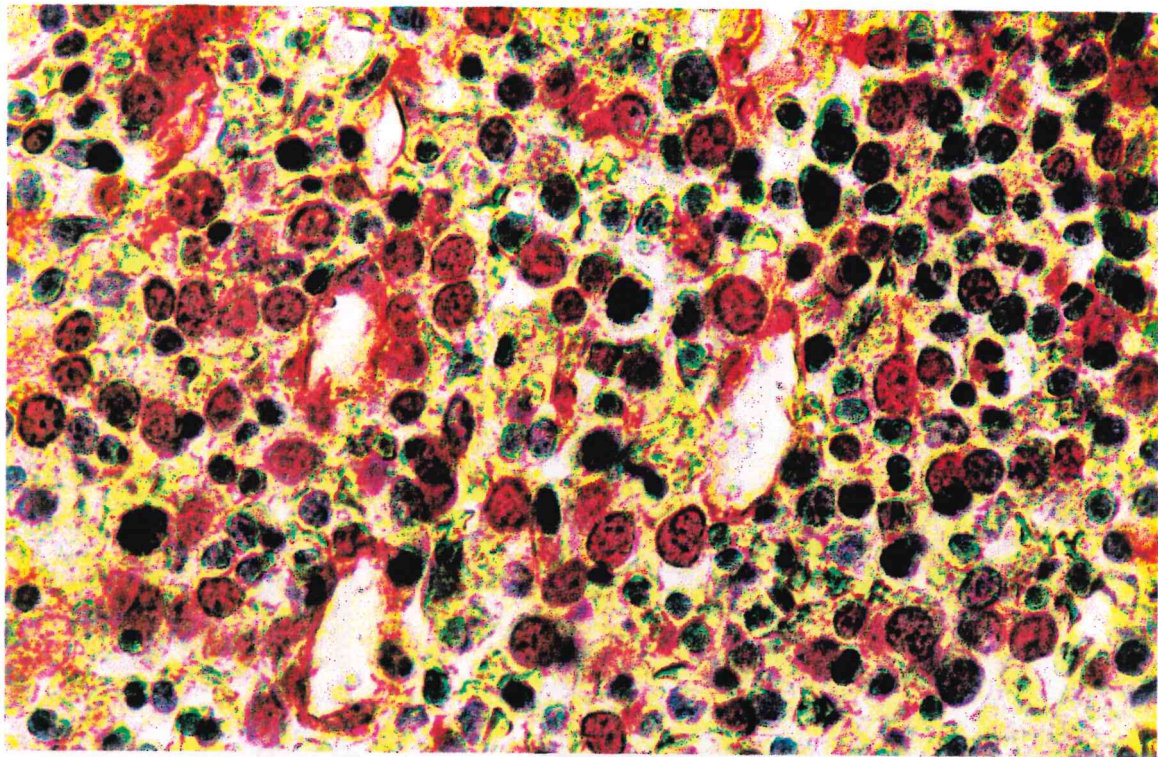
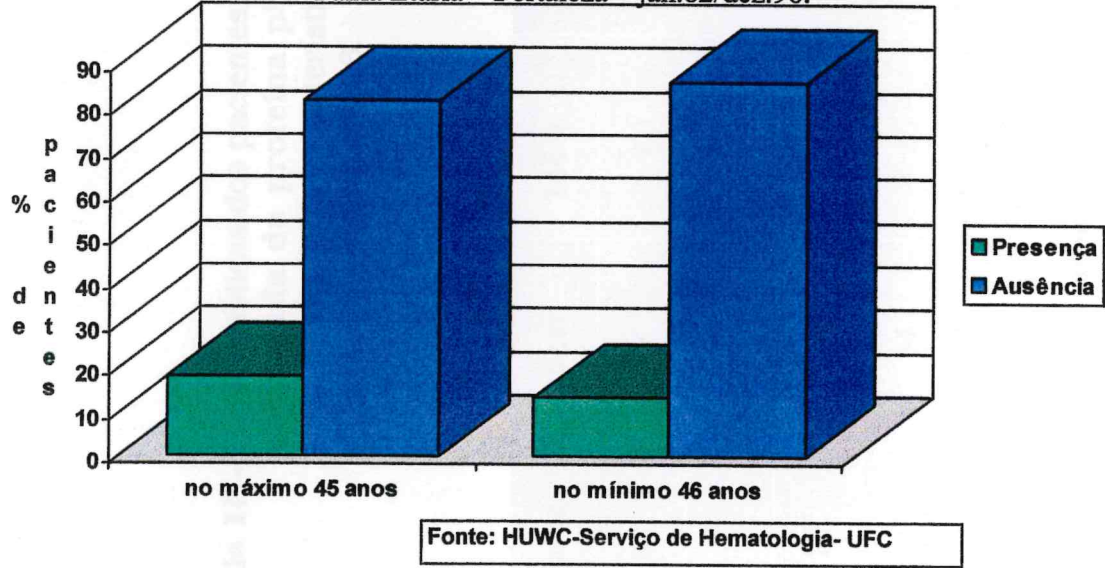


Figura 34 – Corte Histológico de Medula Óssea Exibindo Positividade para o Marcador Anti-p53. Técnica APAAP. Aumento 400X.



Não foi observada associação entre idade e expressão proteica anormal ($p=1,0000$). Em ambas as faixas etárias consideradas, o maior percentual de pacientes não evidenciou alteração (Figura 35).

Figura 35 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença da Expressão Aumentada de p53 em Função da Faixa Etária – Fortaleza – jan.82/dez.96.



Dos casos com expressão aumentada, 2 (6,1%) pertenciam ao subtipo AR, 1 (3,0%) ao subtipo AREB e 2 (6,1%) ao subtipo AREB-t (Tabelas 15, 16 e 17).

Tabela 15 – Características dos pacientes portadores de SMD com expressão aumentada da proteína p53 com relação ao sexo, idade, classificação FAB, características morfológicas e tipo de evolução – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Casos | Sexo | Idade (a) | Subtipo | Celularidade estimada % | ALP | Fibrose | Nódulos Linfoídes | Tipo de Evolução |
|-------|------|-----------|---------|----------------------------|-----|---------|----------------------|---------------------|
| 06 | F | 60 | AREB-t | 80 | Não | Não | Não | LMA |
| 08 | M | 22 | AR | 70 | Não | Não | Não | AREB |
| 14 | M | 57 | AREB | 70 | Sim | Não | Não | AREB-t |
| 22 | M | 45 | AREB-t | 40 | Não | Não | Não | LMA |
| 23 | M | 68 | AR | 95 | Sim | Sim | Sim | LMA |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Tabela 16 – Distribuição dos 33 Pacientes com SMD Segundo a Classificação FAB em Função da Expressão Aumentada da Proteína p53 – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Subtipo | Expressão Aumentada da Proteína p53 | |
|---------|-------------------------------------|------|
| | Nº de Pacientes | % |
| AR | 2 | 6,1 |
| ARSA | 0 | 0,0 |
| AREB | 1 | 3,0 |
| AREB-t | 2 | 6,1 |
| LMMC | 0 | 0,0 |
| TOTAL | 5 | 15,2 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Tabela 17 – Distribuição dos 33 Pacientes com SMD Segundo a Classificação FAB em Função da Expressão Aumentada da Proteína p53 – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Subtipo | Expressão Aumentada da Proteína p53 | | | | | |
|---------|-------------------------------------|------|-----|-------|-------|-------|
| | Sim | | Não | | Total | |
| | n | % | n | % | n | % |
| AR | 2 | 10,5 | 17 | 89,5 | 19 | 100,0 |
| ARSA | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 | 3 | 100,0 |
| AREB | 1 | 20,0 | 4 | 80,0 | 5 | 100,0 |
| AREB-t | 2 | 50,0 | 2 | 50,0 | 4 | 100,0 |
| LMMC | 0 | 0,0 | 2 | 100,0 | 2 | 100,0 |
| TOTAL | 5 | 15,2 | 28 | 84,8 | 33 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

A análise dos casos positivos em função dos grupos prognósticos definidos pela classificação FAB não mostrou associação significativa ($p=0,3041$). É interessante notar, no entanto, que dentre os pacientes com pior prognóstico, 27,3% evidenciaram positividade para p53, enquanto no grupo de melhor prognóstico este percentual é reduzido para 9,1% (Tabela 18 e Figura 36).

Tabela 18 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Presença da Expressão Aumentada da Proteína p53 em Função dos Grupos Prognósticos – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Expressão Aumentada da Proteína p53 | Prognóstico | | | |
|-------------------------------------|-------------|-------|----------|-------|
| | Melhor (1) | | Pior (2) | |
| | Nº | % | Nº | % |
| Sim | 2 | 9,1 | 3 | 27,3 |
| Não | 20 | 90,9 | 8 | 72,7 |
| TOTAL | 22 | 100,0 | 11 | 100,0 |

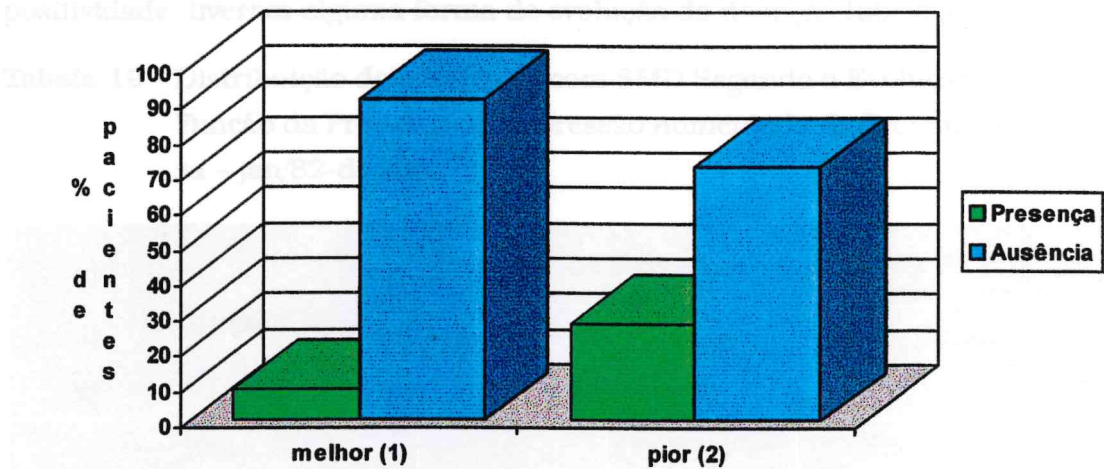
Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Teste exato de Fisher, $p = 0,3041$

(1) AR ou ARSA

(2) AREB ou AREB-t ou LMMC

Figura 36 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença da Expressão Aumentada da Proteína p53 em Função dos Grupos Prognósticos – Fortaleza – jan/82-dez/96

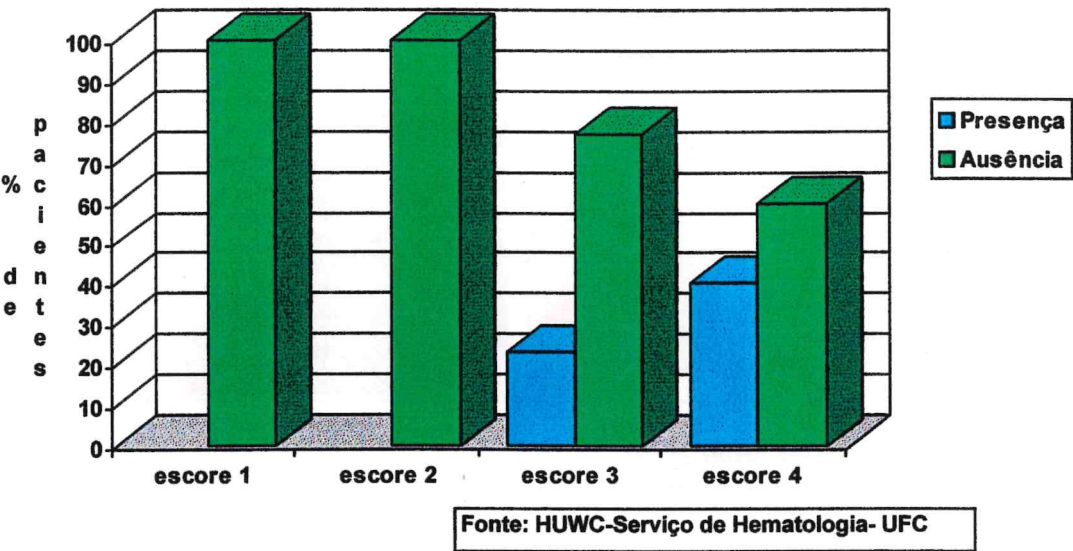


(1) AR ou ARSA (2) AREB ou AREB-t ou LMMC

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC

Retirando-se da amostra os casos de LMMC, o percentual de positividade para p53 no grupo de pior prognóstico passa para 33,3%, o que também não permite uma associação significativa ($p = 0,1313$). Quando avaliados em função do escore de Bournemouth, observou-se que pacientes com expressão aumentada da proteína p53 pertenciam exclusivamente aos escores 3 e 4 (Figura 37).

Figura 37 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Presença da Expressão Aumentada da Proteína p53 em Função dos Escores
Bournemouth – Fortaleza – jan/82-dez/96



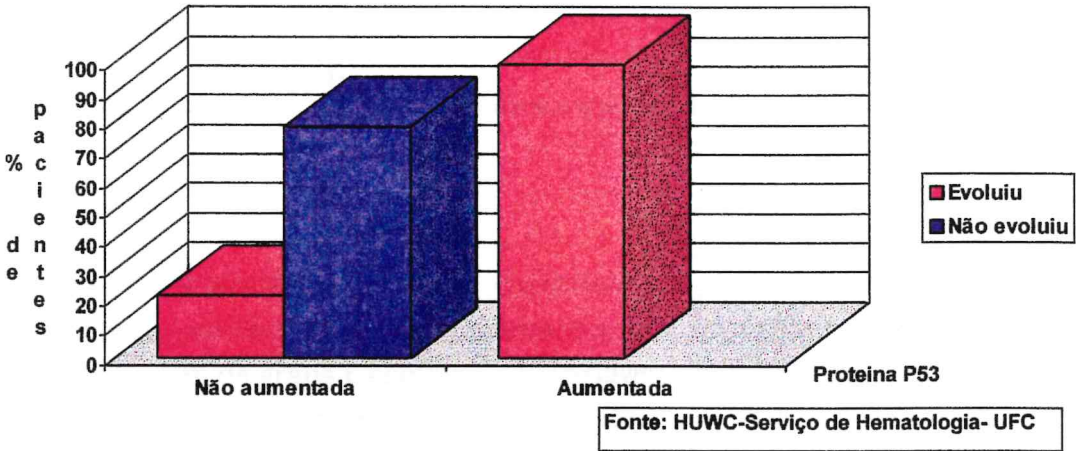
Foi observada uma associação significativa entre a expressão aumentada da proteína p53 e a evolução para subtipo mais agressivo da doença e/ou leucemia aguda ($p= 0,0019$). De acordo com os dados observados, 100% dos pacientes com positividade para p53 evoluíram, enquanto apenas 21,4% daqueles sem essa positividade tiveram alguma forma de evolução da doença (Tabela 19 e Figura 38).

Tabela 19 – Distribuição dos Pacientes com SMD Segundo a Evolução da Doença em Função da Presença da Expressão Aumentada da Proteína p53 – Fortaleza – jan/82-dez/96.

| Evolução | Presença da Expressão Aumentada da Proteína p53 | | | |
|----------|---|-------|-----|-------|
| | Não | | Sim | |
| | Nº | % | Nº | % |
| Sim | 6 | 21,4 | 5 | 100,0 |
| Não | 22 | 78,6 | 0 | 0,0 |
| TOTAL | 28 | 100,0 | 5 | 100,0 |

Fonte: HUWC – Serviço de Hematologia – UFC
 Teste exato de Fisher, $p = 0,0019$

Figura 38 – Percentagem de Pacientes com SMD Segundo a Evolução da Doença em Função da Presença da Expressão Aumentada da Proteína p53 – Fortaleza – jan/82-dez/96.



Síndromes mielodisplásticas são desordens adquiridas da célula progenitora hematopoética, caracterizadas por displasia em uma ou mais linhagens celulares da hematopoese, além de graus e combinações variáveis de citopenias periféricas. O diagnóstico permanece baseado principalmente no exame citológico do aspirado medular (BENNETT, 1982). A biópsia óssea, introduzida inicialmente como auxílio nos casos de diagnóstico difícil, tornou-se indispensável por fornecer avaliação precisa da celularidade global, detecção do aumento das fibras reticulínicas, maior sensibilidade na detecção da displasia megacariocítica e a observação de alterações na arquitetura medular, como o deslocamento do sítio da granulopoese de sua localização normal paratrabecular para a região central intertrabecular da medula (TRICOT, 1984a; TRICOT, 1984b; RIOS, 1990; SAAD, 1994; LAMBERTENGHI, 1993; BARTL, 1992; KAMPMEIER, 1992). Por essas vantagens, a biópsia óssea estabeleceu-se, nos últimos dez anos, como procedimento de rotina no diagnóstico de pacientes com SMD.

No presente estudo, 43 fragmentos de biópsia óssea obtidos de 33 pacientes previamente diagnosticados foram revisados. Seis pacientes foram submetidos a mais de uma biópsia, como método de avaliação da evolução da doença. Cinco critérios foram analisados: celularidade global, presença de fibrose, ALIP, dispoeses e nódulos linfóides.

A maioria dos pacientes com SMD tem medula óssea normo ou hiper celular (mais que 50% do espaço intertrabecular ocupado por tecido hematopoético). Um subgrupo distinto tem medula hipoplástica por ocasião do diagnóstico. Nesses casos, o diagnóstico diferencial com leucemia mielóide aguda hipoplástica ou anemia aplástica pode ser eventualmente difícil. (FOHLMEISTER, 1985; KAMPMEIER, 1992; ROSATI, 1996). De acordo com a maioria dos investigadores as SMD são consideradas hipoplásticas quando a celularidade medular é igual ou inferior a 30%. Tais casos representam, em média, 15% (NAND, 1988; YOSHIDA, 1988; TRICOT, 1984a; RIOS, 1990; LAMBERTENGHI, 1993; KITAGAWA, 1989). Saad e colaboradores (SAAD, 1994) observaram uma incidência elevada (45,6%) de casos hipocelulares, questionando o papel do uso indiscriminado de substâncias mielotóxicas, tais como agrotóxicos. No nosso estudo, apenas quatro casos (12,0%) exibiram medula óssea hipocelular. Um desses pacientes estava cronicamente exposto a tintas e vernizes. Em outros oito pacientes, onde uma exposição a prováveis agentes mutagênicos pôde ser observada, a medula óssea era normo ou hiper celular.

Diseritropoese, disgranulopoese e dismegacariopoese podem ser observadas em cortes histológicos, sobretudo quando é utilizada a inclusão em plástico em vez de parafina (DELACRETAZ, 1987). Além do que a detecção da dismegacariopoese é mais precoce e mais fácil nos fragmentos de biópsia que em esfregaços de aspirado medular (TRICOT, 1984a; RIOS, 1990). No nosso estudo, foram observadas características displásticas na linhagem megacariocítica em 72,7% dos casos, um resultado que está de acordo com outros relatos (TRICOT, 1984a; RIOS, 1990; LABERTENGHI, 1993; SAAD, 1994), enquanto a detecção de diseritropoese, em apenas 12%, foi nitidamente inferior. Saad e colaboradores (SAAD, 1994), num estudo histológico da medula óssea de 46 pacientes portadores de SMD, não observaram atipias celulares nem topografia anormal de células em 21,7% dos casos. Similarmente, não observamos características displásticas em 21,2% dos pacientes.

A descrição inicial da coexistência de mielofibrose em pacientes portadores de SMD foi publicada por Sultan e colaboradores (SULTAN, 1981). Discreto a moderado aumento em número e/ou espessura das fibras reticulínicas é relatado num percentual variável de casos, de 17 a 65%, mais comumente nas formas secundárias (TRICOT, 1984a; RIOS, 1990; LAMBERTENGHI, 1993; SAAD, 1994; MASCHEK, 1992). Nos casos deste estudo, foi observada fibrose medular em 34,4%, o que está de acordo com os relatos da literatura. A mielofibrose nas doenças hematológicas malignas é provavelmente resultado de uma resposta reacional ou inespecífica a estímulos ou injúria à medula (Mc CARTHY, 1985; DÜHRSEN, 1996) e é atribuída à liberação excessiva ou anormal de substâncias estimuladoras da proliferação fibroblástica pelos megacariócitos (CASTRO-MALASPINA, 1981). A associação frequente entre mielofibrose e proliferação atípica de megacariócitos dá suporte a essa hipótese. Maschek e colaboradores (MASCHEK, 1992) observaram uma correlação entre a presença de dismegacariopoese e o desenvolvimento de fibrose na análise de 352 pacientes. Essa associação foi observada nos casos estudados, embora não alcance significância estatística.

Eventualmente, o diagnóstico diferencial entre SMD com fibrose e desordens mieloproliferativas é difícil (KAMPMEIER, 1992; ROSATI, 1996; VERHOEF, 1991; NEUWIRTOVÁ, 1996) e se questiona se não seria uma entidade clinico-patológica distinta (LAMBERTENGHI, 1991)

A localização anormal de precursores imaturos (ALIP) foi primeiramente descrita por Tricot e colaboradores (TRICOT, 1984b) que assim definiram os agregados de três ou mais mieloblastos e promielócitos localizados na região central da medula óssea. A presença de ALIP pode estar presente em qualquer dos subtipos FAB e mesmo na ausência de aumento significativo dos elementos imaturos. Inicialmente descrita como fator prognóstico adverso, relacionada com menor sobrevida e maior probabilidade de transformação leucêmica (TRICOT, 1984b), é também importante para substanciar o diagnóstico de casos difíceis, porque tem o significado de um

padrão anormal de hematopoese (REIZENSTEIN, 1992). A sua presença, no entanto, não é um achado patognomônico de SMD, uma vez que tem sido observada na regeneração medular após hipoplasia induzida por quimioterapia na leucemia mielóide aguda, na leucemia mielóide crônica em crise blástica e após transplante de medula óssea (VAN DEN BERGHE, 1990). No nosso estudo, casos considerados positivos, com pelo menos três agregados no mesmo corte, foram observados em 13 pacientes (39,4%), numa frequência inferior à de outros autores (TRICOT, 1984a; RIOS, 1990; SAAD, 1994). O reconhecimento de ALIP pode ser difícil em cortes de parafina. A inclusão em plástico permite uma avaliação citológica mais detalhada, possibilitando melhores resultados (TRICOT, 1984a; MANGI, 1992). Além das dificuldades técnicas, quando biópsias ósseas são analisadas por mais de um observador, discrepâncias na detecção de ALIP são frequentes, podendo alcançar 17% dos casos (RIOS, 1990).

Nódulos linfóides benignos são um achado relativamente comum na medula óssea (MAEDA, 1977). Nos cortes histológicos são, em geral, bem delimitados e constituídos por pequenos linfócitos maduros, de permeio a raras células reticulares, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos. Raramente são numerosos ou apresentam centro germinativo. A incidência é variável de acordo com o local biopsiado, são discretamente mais frequentes no sexo feminino, raros na infância e mais comuns após a quarta década, aumentando com a idade. Em indivíduos normais, a incidência média é de 15% (NAVONE, 1985). Uma frequência elevada de nódulos linfóides é observada em doenças auto-imunes sistêmicas, doenças mieloproliferativas, anemias hemolíticas e no curso da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) (BRUNNIG, 1996). Nas SMD a incidência de nódulos linfóides é variável, alcançando em alguns estudos 27,3% (MASCHEK, 1992). A importância e o significado desse achado é ainda motivo de controvérsias na literatura. Faulkner-Jones e colaboradores, em estudo sobre a evolução de pacientes com nódulos linfóides na medula óssea, demonstraram que 22% evoluíram para doença linfoproliferativa, sugerindo que o achado de agregados linfóides, ainda que morfologicamente normais, pode não ser fisiológico e alertando para o risco elevado de síndrome linfoproliferativa, em especial linfomas não-Hodgkin (FAULKNER-JONES, 1988). Com os recursos da imunofenotipagem muitos anticorpos monoclonais têm sido propostos para diferenciar nódulos linfóides reacionais benignos de malignos (BEN-EZRA 1994; KUBIK 1989; BLUTH, 1993). Observamos nódulos linfóides em 9 pacientes (27,3%), uma frequência elevada quando comparada à de outros autores (TRICOT, 1984a; RIOS, 1990; MANGI, 1992) e similar à de Maschek e colaboradores (MASCHEK, 1992) (Tabela 20).

Tabela 20 – Revisão de Dados da Literatura sobre o Achado de Nódulos Linfóides na Medula Óssea de Pacientes Portadores de Síndromes Mielodisplásticas.

| Autores – Ano | Nº de Casos | Presença de Nódulos Linfóides (%) |
|-----------------------|--------------------|--|
| Tricot et al., 1984 | 40 | 2,5 |
| Navone et al., 1985 | 96 | 25,0 |
| Rios et al., 1990 | 126 | 10,0 |
| Mangi et al., 1992 | 63 | 15,8 |
| Maschek et al., 1992 | 352 | 27,3 |
| Presente estudo, 1997 | 33 | 27,3 |

Contrariando o conceito de que nódulos linfóides são mais frequentemente observados após a quarta década, não observamos associação entre a faixa etária e a presença de agregados linfóides. Maschek e colaboradores (MASCHEK, 1992), num estudo de 352 casos, observaram nódulos linfóides em 24% dos pacientes sem fibrose associada e em 40% dos pacientes com fibrose. Similarmente observamos uma associação significativa entre a presença de nódulos linfóides e a fibrose, sugerindo que alterações do estroma, além de fatores ambientais, possam ter um papel na formação desses agregados.

A associação SMD-doença linfoproliferativa tem sido amplamente relatada e muitos mecanismos são discutidos para justificá-la (MANOHARAN, 1981; GREENBERG, 1983; COPPLESTONE, 1986; HAMBLIN, 1996): a) é provável que nas SMD ou na neoplasia linfóide fatores de crescimento sejam liberados pela célula neoplásica estimulando outras linhagens; b) células *natural killer* (NK) são um componente imune importante na vigilância imunológica contra tumores, e, se reduzidas em número e/ou com função deficiente nas SMD, podem facilitar o aparecimento de uma outra neoplasia; c) a ocorrência simultânea de duas neoplasias hematológicas pode ser resultado de suscetibilidade genética; d) a doença linfoproliferativa associada à SMD poderia ser consequência de proliferação neoplásica de linfócitos originados de uma célula progenitora comum. No entanto, a análise da população linfóide em pacientes com SMD demonstrou que linfócitos policlonais são detectados na maioria dos casos, sugerindo que, em geral, a célula progenitora neoplásica é provavelmente já comissionada com a linhagem mielóide (CULLIGAN, 1992). Estudos posteriores, em especial sobre o sistema linfóide e as alterações imunológicas nas SMD, serão necessários para o esclarecimento dessa associação. Em três dos nossos casos, estudados anteriormente (MAGALHÃES, 1997), uma evolução distinta foi observada: a) a presença de nódulos linfóides aparentemente não interferiu com a evolução da doença; b) nódulos linfóides volumosos com expressão exclusiva da cadeia leve lambda e com localização paratrabecular sugeriam associação com síndrome linfoproliferativa; c) nódulos linfóides de limi-

tes pouco precisos exibindo fenótipo T “aberrante”, caracterizado por perda antigênica, precederam a evolução para LMA. É necessário, portanto, salientar a importância da detecção, melhor caracterização e seguimento de agregados linfóides nestes pacientes.

Na última década, notáveis avanços contribuíram para a melhor compreensão dos defeitos moleculares atuantes nas doenças malignas humanas. Um número crescente de genes relacionados à tumorigênese vêm sendo identificados. Proto-oncogenes assumem um potencial de transformação maligna através de alterações estruturais ou expressão anormal de proteínas que participam no controle e regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose (BISHOP, 1991). A perda de função dos genes supressores de tumor, através de deleção, mutação ou alteração epigênica tem igualmente papel relevante nesse processo (MARSHALL, 1991; WEINBERG, 1991).

As SMD constituem um bom modelo para o estudo do processo de múltiplas etapas da leucemogênese, através dos mecanismos moleculares responsáveis pela disfunção hematopoética que precede o desenvolvimento da leucemia aguda. Para explicar a transformação leucêmica, Jacobs (JACOBS, 1991) propôs uma evolução gradual da célula progenitora hematopoética através de uma sequência de eventos, a partir de uma injúria genética inicial até o estado preleucêmico e a progressão para leucemia aguda. Esse conceito está de acordo com o já estabelecido processo de múltiplas etapas da transformação maligna (BISHOP, 1991). A natureza da lesão, o tipo de célula inicialmente acometida e, provavelmente, a sequência de lesões adquiridas definem o fenótipo resultante e a apresentação clínica da doença.

O gene supressor de tumor p53 tem merecido destaque por exercer um papel importante na regulação do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (LEVINE, 1991; OREN, 1992; LANE, 1990; LEVINE, 1994; ARROWSMITH, 1996; EWEN, 1996), e sua relevância e aplicação clínica têm-se tornado evidentes (DOWELL, 1994a; HARRIS, 1993; TOMINAGA, 1992). Sua mutação é considerada a alteração genética mais comum no câncer humano (HARRIS, 1990; HOLLSTEIN, 1991) e está por vezes alterado também nas neoplasias hematológicas (IMAMURA, 1994; PROKOCIMER, 1994; BI, 1994; FENAUX, 1992; PROKOCIMER, 1986; SANDER, 1993; MORI, 1992; ICHIKAWA, 1997). O gene p53 tem sido, nos últimos anos, exaustivamente pesquisado em diferentes tumores humanos (ESRIG, 1994; RODRIGUES, 1990; SCOTT, 1991; BOSARI, 1995; PORTER, 1992; BOERS, 1996; NAKANISHI, 1996; POLLER, 1993; OSTROWSKI, 1991; SCHMITT, 1995; SASAKI, 1996). Em levantamento de 210 trabalhos, publicados entre janeiro de 1990 e junho de 1993, a pesquisa de alteração do p53, por análise imunocitoquímica e/ou molecular em diferentes tumores sólidos, evidenciou anormalidades em 40% das neoplasias estudadas, com maiores frequências para melanoma maligno (88%), carcinoma testicular (87%) e carcinoma colorretal (58%) (DOWELL, 1994a).

A caracterização do p53 nos pacientes portadores de SMD evidenciou que em 5 a 10% dos casos se observam mutações, em especial do tipo “missense” (ADAMSON, 1995; JONVEAUX, 1991; LUDWIG, 1992; SUGIMOTO, 1993; NEUBAUER, 1993; FENAUX, 1990; TSUSHITA, 1992; KANEKO, 1995) (Tabela 21).

Tabela 21 – Revisão de Dados da Literatura sobre Alteração do Gene p53 e/ou sua Expressão nas Síndromes Mielodisplásticas.

| Autores – Ano | Método | Nº de Casos | % de Alteração |
|-----------------------|-------------------|-------------|----------------|
| Fenaux et al., 1990 | Southern blot | 41 | 2,4 |
| Jonveaux et al., 1991 | PCR/SSCP | 151 | 3,3 |
| Ludwig et al., 1992 | PCR/SSCP | 61 | 4,9 |
| Tsushita et al., 1992 | PCR/SSCP | 35 | 0,0 |
| Neubauer et al., 1993 | PCR/SSCP | 17 | 0,0 |
| Sugimoto et al., 1993 | PCR/SSCP | 44 | 6,8 |
| Kitagawa et al., 1994 | Imunohistoquímica | 51 | 14,0 |
| Adamson et al., 1995 | PCR/SSCP | 26 | 7,7 |
| Kaneko et al., 1995 | PCR/SSCP | 41 | 7,3 |
| Presente estudo, 1997 | Imunohistoquímica | 33 | 15,2 |

PCR: reação em cadeia da polimerase

SSCP: polimorfismo de conformação de hélice simples

Em número significativo desses pacientes, o segundo alelo é perdido devido à deleção do braço curto do cromossomo 17, uma alteração evidenciada através do estudo citogenético (LAI, 1995). Mutações do gene p53 predominam nos pacientes com subtipos mais agressivos da doença (AREB, AREB-t e LMMC) e estão, em geral, associadas à elevada incidência de aberrações citogenéticas complexas indicando, portanto, pior prognóstico (KANEKO, 1995; WATTEL, 1994).

A detecção de alterações do p53 pode ser feita através de técnicas aplicadas a nível cromossômico, do gene ou da proteína. Anormalidades da expressão protéica podem ser investigadas através de imunocitoquímica e imunohistoquímica, com material a fresco ou incluído em parafina e, mais recentemente, pela dosagem sérica de anticorpos anti-p53 (ANGELOPOULOU, 1994), com base na associação existente entre a estabilidade aumentada da proteína e a presença de mutação (BAAS, 1994; GANNON, 1990). A proteína codificada pelo gene p53 mutante tem conformação alterada e maior estabilidade (GANNON, 1990), o que promove seu acúmulo e permite sua detecção por técnicas imunológicas. Nas neoplasias hematológicas, a imunocitoquímica mostrou resultados concordantes com a análise do DNA em 96%

dos casos (LEPELLEY, 1994) enquanto nos tumores em geral a imunomarcção (proteína) evidencia alteração numa frequência superior (DOWELL, 1994a), sugerindo que o estudo da proteína seja mais relevante, por informar com mais precisão sobre o *status* funcional do gene (WYNFORD, 1992; HALL, 1994; DOWELL, 1994b). Alguns pontos no entanto merecem consideração: a) o uso de técnicas de recuperação antigênica pode alterar o limiar do nível detectável da proteína, induzindo à perda da correlação entre mutação e expressão proteica aumentada (McKEE, 1993); b) células expostas a agentes genotóxicos ou erros genéticos espontâneos, que ocorrem com elevada frequência nas células tumorais, podem apresentar expressão aumentada da forma normal da proteína (wt-p53); c) fatores não-mutacionais, tais como ligação a proteínas celulares ou virais são capazes de estabilizar a proteína induzindo resultados positivos, por vezes pela simples redução ou interrupção na sua via normal de degradação (MIETZ, 1992; SCHEFFNER, 1990; MOMAND, 1992). Também resultados falso-negativos podem ocorrer, ou seja, ausência de positividade à imunohistoquímica na presença de mutação do gene, como ocorre, embora raramente, se há deleção de ambos os alelos ou mutação do tipo "stop codon". Mesmo levando-se em consideração esses aspectos, o consenso é de que a imunohistoquímica tem valor real no estudo do câncer, com relevância clínica no diagnóstico (COSSMAN, 1991; DOWELL, 1994c; HALL, 1991), prognóstico e avaliação da progressão da doença (DOWELL, 1994a).

Recentemente, Prioleau e Schnitt (PRIOLEAU, 1995), em estudo da expressão do p53 em câncer de mama, relataram progressiva diminuição da positividade à imunohistoquímica, em lâminas armazenadas em temperatura ambiente. A perda antigênica nesses casos poderia ser causa de resultados falso-negativos. Posteriormente, Jacobs e colaboradores (JACOBS, 1996) evidenciaram diminuição da marcação em 75% dos casos estudados, com alguns casos positivos tornando-se negativos após armazenados em temperatura ambiente por 12 semanas. A perda da imunoreatividade também foi observada no estudo de outros antígenos (HENSON, 1996).

Nos trinta e três casos aqui analisados por imunohistoquímica, uma expressão aumentada da proteína foi evidenciada em 5 pacientes (15,2%). Essa alteração não se demonstrou associada à instabilidade genômica própria do programa normal de envelhecimento, uma vez que em ambas as faixas etárias consideradas, no máximo 45 anos e no mínimo 46 anos, o maior percentual de pacientes não apresentou níveis detectáveis da proteína.

No presente estudo apenas marcação nuclear foi observada. No entanto, é sabido que a forma mutante do p53 pode eventualmente ser detectada no citoplasma, devido em parte à sua interação com proteínas do choque térmico (hsp70), de localização citoplasmática (FINLAY, 1988). No estudo do carcinoma colorretal Bosari e colaboradores (BOSARI, 1995) observaram que o acúmulo nuclear da proteína está significativamente associado à mutação do gene, enquanto expressão citoplasmática foi observada em tumores com a forma normal do gene, portanto sem correlação com

mutação. A localização citoplasmática foi ainda descrita no estudo do câncer de mama por Moll e colaboradores (MOLL, 1992). A observação, nesses casos, de ausência de mutação levou à sugestão de mais um mecanismo de inativação da proteína normal, definido pelos autores como exclusão nuclear. A maioria dos investigadores, portanto, sustenta que só a marcação nuclear é um indicador genuíno de mutação do gene p53.

Kitagawa e colaboradores (KITAGAWA, 1994), através de estudo imunohistoquímico de 51 pacientes portadores de SMD, evidenciaram expressão nuclear aumentada de p53 em 14% dos casos, um percentual comparável ao aqui observado e superior àqueles que utilizam técnicas de análise do DNA (Tabela 21), em concordância com os achados de Dowell (DOWELL, 1994a) para tumores em geral. Assim como Kitagawa e colaboradores (KITAGAWA, 1994) e, contrariando o relato dos demais autores, observamos dois casos de expressão aumentada no subtipo AR, sugerindo que a alteração do p53, quando presente, não seja necessariamente um evento tardio ao longo do processo da leucemogênese. No entanto, a baixa frequência de alterações de p53 nas SMD, similar àquela observada na LMA (FENAUX, 1992), sugere que, diferentemente do que acontece com os tumores sólidos, mutações do p53 podem não exercer um papel relevante como fator iniciador nas SMD.

Mutações do gene p53 estão associadas com a progressão da doença nos linfomas foliculares (SANDER, 1993) e com a evolução para crise blástica na leucemia mieloide crônica (MASHAL, 1990). Uma associação similar não foi ainda convincentemente estabelecida para as SMD. No nosso estudo a expressão aumentada da proteína p53, como indicador de mutação, esteve significativamente associada com a evolução para formas mais agressivas da doença e/ou leucemia aguda, o que está de acordo com os achados de Kitagawa e colaboradores (KITAGAWA, 1994). Uma positividade para p53 foi observada em 45,5% dos pacientes que evoluíram e, ainda, todos aqueles com expressão proteica aumentada sofreram algum tipo de progressão da doença, sugerindo que a alteração do p53 possa conferir vantagem seletiva de proliferação ao clone mutante e, assim, contribuir para o acúmulo de lesões genômicas e consequente evolução. Kitagawa e colaboradores (KITAGAWA, 1994) mostraram ainda uma positividade crescente em biópsias sequenciais, durante a evolução dos pacientes estudados, alcançando marcação em mais de 30% das células por ocasião da transformação leucêmica. Esse achado não foi observado no presente estudo, possivelmente, em função das limitações de um estudo retrospectivo.

A análise da genética molecular nas SMD deu suporte ao conceito de múltiplas etapas da leucemogênese. No entanto, lesões genômicas específicas não foram até então inequivocamente demonstradas. As implicações clínicas de alterações moleculares nessa doença incluem, no momento, seu uso como marcador clonal na elucidação do modo de ação e monitorização da eficácia de diferentes agentes terapêuticos (BARTRAM, 1996; MUFTI, 1992a).

O conhecimento das bases moleculares de controle da hematopoese normal e anormal tem contribuído para melhor compreensão da fisiopatogenia das doenças onco-hematológicas e progressivamente permitido sua aplicação clínica (SACHS, 1996). Também os recentes conhecimentos sobre apoptose e seu papel em muitos processos fisiológicos e patológicos têm propiciado uma melhor compreensão da oncogênese (WILLIAMS, 1991; WRIGHT, 1994; WYLLIE, 1995; KERR, 1994; WILLIAMS, 1993). É sabido que os fatores de crescimento promovem a proliferação e diferenciação dos precursores hematopoéticos através da supressão da apoptose (WILLIAMS, 1990) e o gene p53, na sua forma fisiológica (wt), tem participação no processo de diferenciação das células hematopoéticas (KASTAN, 1991b). Nas neoplasias, a apoptose é um fator importante no equilíbrio entre ganho (proliferação) e perda celular (diferenciação e morte). Nos tumores malignos, a apoptose induzida pelo p53 é capaz de restringir a proliferação tumoral e a progressão da doença (SYMONDS, 1994; DONEHOWER, 1996). Nas SMD, a apoptose é um achado comum na medula óssea, correlacionando-se com a elevada taxa de morte intra-medular e consequente citopenia periférica (CLARK, 1990; YOSHIDA, 1993a; RAJAPAKSA, 1996; RAZA, 1996a; RAZA, 1996b; BOGDANOVIC, 1996; LEPELLEY, 1996). A progressão da doença para leucemia aguda está, em geral, associada à diminuição da apoptose e maior sobrevida das células imaturas, com consequente expansão do clone anormal (RAJAPAKSA, 1996; RAZA, 1996b). Mutações do gene p53 podem, portanto, contribuir para a evolução da doença, não só possibilitando o acúmulo de lesões genômicas (perda do mecanismo de reparo), mas também através da perda de um agente indutor de apoptose. O controle genético desse mecanismo de morte celular, a participação de citocinas e a interrelação entre as vias p53-dependente e p53-independente (PELED, 1996) permanecem ainda objetivo de muitas pesquisas.

A pesquisa e identificação de lesões genéticas associadas com a gênese e progressão de preleucemia para leucemia aguda, além de contribuírem para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na leucemogênese, podem vir a identificar pacientes com risco elevado de transformação, complementando o estudo citogenético e, eventualmente, constituindo novos alvos para um tratamento mais específico e eficaz dos pacientes com SMD.

Conclusões

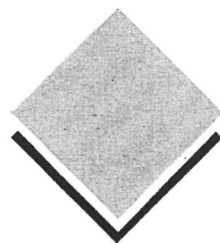


1. A distribuição dos subtipos AR (57,6%), ARSA (9,1%), AREB (15,2%), AREB-t (12,1%) e LMMC (6,1%) foi similar à de outras séries.
2. Os critérios morfológicos, tais como celularidade, presença de características displásticas, espessamento das fibras de reticulina e localização anormal de precursores imaturos (ALIP), não diferiram de forma relevante daqueles observados por outros autores.
3. Nódulos linfóides na medula óssea de pacientes com SMD foram mais frequentes que em outras séries. Não houve correlação com a faixa etária nos casos estudados, mas foi observada uma associação significativa com a presença de fibrose. Uma maior atenção deve ser dispensada para a detecção e seguimento de agregados linfóides nestes pacientes.
4. A detecção de alteração no gene p53 através do estudo da sua expressão proteica por imunohistoquímica mostrou uma frequência maior que as técnicas de análise do DNA, quando comparada com dados da literatura.
5. Quando presente, a alteração da expressão proteica do gene p53 não é necessariamente um evento tardio ao longo da evolução da doença.
6. A baixa frequência de alterações do p53 encontrada (15,2%) não permite uma conclusão sobre sua participação como evento iniciador na SMD.
7. Uma vez presente, a expressão aumentada da proteína p53 pode conferir vantagem seletiva de proliferação ao clone mutante, permitindo o acúmulo de lesões genômicas e a diminuição do índice de apoptose, contribuindo assim para a progressão da doença. Tem, portanto, utilidade para predizer a evolução.
8. Estudos posteriores, com um maior número de casos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão da SMD.

Anexos



Anexo 1



Síndromes Mielodisplásticas

01. PRONTUÁRIO Nº: _____ FICHA Nº: _____

NOME: _____

IDADE: _____ SEXO: _____ COR: _____ EST. CIVIL: _____

PROCEDÊNCIA: _____ PROFISSÃO: _____

ENDEREÇO: _____

02. EXPOSIÇÃO A AGENTES MUTAGÊNICOS: [] SIM [] NÃO

ESPECIFICAR: _____

03 PRIMEIROS SINTOMAS _____

(QUEIXA PRINCIPAL RELACIONA DA À SÍNDROME ANÊMICA, SIND. INFECCIOSA, SIND. PURPÚRICA OU OUTROS)

04. DATA DOS PRIMEIROS SINTOMAS _____

(ATÉ O DIAGNÓSTICO EM MESES)

05. EXAME FÍSICO:

[] PALIDEZ [] GÂNGLIOS

[] FEBRE [] FÍGADO _____ cm

[] MANIF. HEMORRÁGICAS [] BAÇO _____ cm

[] PERDA PONDRAL [] OUTROS _____

06. EXAMES LABORATORIAIS:

HEMOGRAMA INICIAL EM: ____/____/____

G.V.: _____ HTC.: _____ % HB.: _____ g/dl VCM.: _____

MORFOLOGIA: [] NORMAL [] POIQUILOCITOSE
 [] ANISOCITOSE [] HIPOCROMIA
 [] MICROCITOSE [] POLICROMASIA
 [] MACROCITOSE [] PONT. BASÓFILO
 [] HOWELL- JOLLY [] OUTROS

LEUCÓCITOS: _____/L

MB _____ PRO _____ MIE _____ MET _____

BAST _____ SEG _____ EO _____ BAS _____ Li _____ MO _____

ERITROBLASTOS/100: _____

OBS: _____

PLAQUETAS: _____/L RETICULÓCITOS: _____/L

FERRO SÉRICO: _____ mg/dl C.L.L.F.: _____ mg/dl

IST: : _____ % TRANSFERRINA:: _____ mg/dl

MIELOGRAMA CELULARIDADE: [] NORMO [] HIPER [] HIPO [] NA

RELAÇÃO MIELÓIDE/ERITRÓIDE: _____ : _____

CELULARIDADE ESPECÍFICA:

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

DISPOIESES (+ a + + + +):

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

BLASTOS: _____ % AUER: _____

PERLS _____

CITOQUÍMICA: _____

CITOGENÉTICA: _____

BIÓPSIA ÓSSEA (1a) EM _____ / _____ / _____:

CELULARIDADE ESTIMADA: _____

ALIP: _____ FIBROSE: _____ NOD.LINF. _____

DESCRIÇÃO: _____

IMUNOHISTOQUÍMICA (P53): _____

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

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

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

T3: _____ T4: _____ TSH : _____

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS: _____

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

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

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

07. CLASSIFICAÇÃO: [] AR [] ARSA [] AREB [] AREB-t [] LMMC

08. ASSOCIAÇÃO COM MIELOFIBROSE:

[] SIM [] NÃO

09. TRANSFORMAÇÃO PARA LEUCEMIA AGUDA:

[] SIM [] NÃO

TEMPO DE EVOLUÇÃO P/LEUCOSE AGUDA: _____

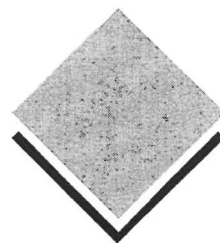
(DA PRIMEIRA CONSULTA AO DIAGNÓSTICO DE LEUCOSE AGUDA)

10. PERÍODO DE AVALIAÇÃO: _____

(DA PRIMEIRA CONSULTA À ÚLTIMA NOTÍCIA)

11. ÚLTIMA NOTÍCIA: DATA: _____ / _____ / _____

Anexo 2



Lâminas tratadas com gelatina

Mergulhar duas vezes as lâminas em água destilada

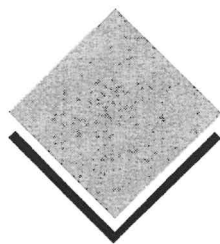
Colocar no seguinte meio:

| | |
|----------|---|
| 10 g | gelatina |
| 1 g | sulfato de cromo III de potássio (alúmem de cromo) |
| 2.000 ml | H ₂ O destilada aquecida (não é necessário ferver) |

Preparação do meio

- Aquecer a água e juntar a gelatina, deixando dissolver até ficar clara e transparente
- Adicionar depois o sulfato de potássio (alúmem de cromo), obtendo uma solução esverdeada
- Filtrar
- Retirar as lâminas da água destilada e colocar nesta solução durante 30 minutos
- Deixar secar as lâminas muito bem à temperatura ambiente, normalmente de um dia para o outro.

Anexo 2



Lâminas tratadas com gelatina

Mergulhar duas vezes as lâminas em água destilada

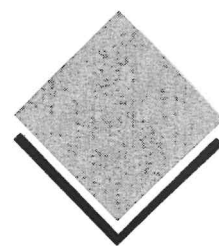
Colocar no seguinte meio:

| | |
|----------|---|
| 10 g | gelatina |
| 1 g | sulfato de cromo III de potássio (alúmem de cromo) |
| 2.000 ml | H ₂ O destilada aquecida (não é necessário ferver) |

Preparação do meio

- Aquecer a água e juntar a gelatina, deixando dissolver até ficar clara e transparente
- Adicionar depois o sulfato de potássio (alúmem de cromo), obtendo uma solução esverdeada
- Filtrar
- Retirar as lâminas da água destilada e colocar nesta solução durante 30 minutos
- Deixar secar as lâminas muito bem à temperatura ambiente, normalmente de um dia para o outro.

Anexo 3



Substrato

| | |
|----------------------------|-------------|
| Naftol AS-MX fosfato | 20 mg |
| Dimetilformamida | 2 ml |
| Tris 0,1 M pH 8,2 | 98 ml |
| Levamisol 1M | 100 μ l |
| Sal Fast Red TR..... | 100 mg |

Preparar esta solução dissolvendo o naftol AS-MX fosfato em dimetilformamida num tubo de vidro. Diluir no tampão Tris 0,1 M pH 8,2 e adicionar o levamisol para bloquear a fosfatase alcalina endógena, sem interferir com a fosfatase alcalina do complexo. Esta solução pode ser armazenada no congelador sem o “Fast Red” adicionando-o imediatamente antes de usar, filtrando diretamente sobre as lâminas

1. ADAMSON, D.J.A., DAWSON, A.A., BENNETT, B., KING, D.J., HAITES, N.E. p53 mutation in the myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 89, p. 61-66, 1995.
2. ANGELOPOULOU, K., DIAMANDIS, E.P., SUTHERLAND, D.J.A., KELLEN, J.A., BUNTING, P.S. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. **Int. J. Cancer**, v. 58, p. 480-487, 1994.
3. ARROWSMITH, C.H., MORIN, P. New insights into p53 function from structural studies. **Oncogene**, v. 12, p. 1379-1385, 1996.
4. AUL, C., GATTERMANN, N., SCHNEIDER, W. Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndromes. **Leuk. Lymphoma**, v. 16, p. 247-262, 1995.
5. BAAS, I.O., MULDER, J.W.R., OFFERHAUS, G.J.A., VOGELSTEIN, B., HAMILTON, S.R. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. **J. Pathol.**, v. 172, p. 5-12, 1994.
6. BANKS, L., MATLASHEWSKI, G., CRAWFORD, L. Isolation of human- p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. **Eur. J. Biochem.**, v. 159, p. 529-534, 1986.
7. BARTEK, J., BARTKOVA, J., VOJTESEK, B., STASKOVA, Z., LUKAS, J., REJTHAR, A., KOVARIK, J., MIDGLEY, C.A., GANNON, J.V., LANE, D.P. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. **Oncogene**, v. 6, p. 1699-1703, 1991.
8. BARTL, R., FRISCH, B., BAUMGART, R. Morphologic classification of the myelodysplastic syndromes (MDS): combined utilization of bone marrow aspirates and trephine biopsies. **Leuk. Res.**, v. 16, p. 15-33, 1992.
9. BARTRAM, C.R. Molecular genetic aspects of myelodysplastic syndromes. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 6, p. 557-569, 1992.

10. _____. Molecular genetic aspects of myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 139-149, 1996.
11. BASERGA, R. The cell cycle: myths and realities. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6769-6771, 1990.
12. BATTIFORA, H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentina internal control. **Am. J. Pathol.**, v. 96, p. 669-671, 1991.
13. BEN-EZRA, J.M., KING, B.E., HARRIS, A.C., TODD, W.M., KORNSTEIN, M.J. Staining for bcl-2 protein helps to distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow biopsies. **Mod. Pathol.**, v. 7, p. 560-564, 1994.
14. BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, MT., FLANDRIN, G., GALTON, D.A.G., GRALNICK, H.R., SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. **Br. J. Haematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.
15. _____. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 51, p. 189-199, 1982.
16. BERNASCONI, P., ALESSANDRINO, E.P., BONI, M., BONFICHI, M., MORRA, E., LAZZARINO, M., CAMPAGNOLI, C., ASTORI, C. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical evolution, and survival. **Am. J. Hematol.**, v. 46, p. 270-277, 1994.
17. BI, S., LANZA, F., GOLDMAN, J.M. The involvement of "tumor suppressor" p53 in normal and chronic myelogenous leukemia hemopoiesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 582-586, 1994.
18. BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v. 64, p. 235-248, 1991.
19. _____. The molecular genetics of cancer. **Science**, v. 235, p. 305-311, 1987.
20. BLUTH, R.F., CASEY, T.T., MCCURLEY, T.L. Differentiation of reactive from neoplastic small-cell lymphoid aggregates in paraffin-embedded marrow particle preparations using L-26 (CD 20) and UCHL-1 (CD 45RO) monoclonal antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 99, p. 150-156, 1993.
21. BOERS, J.E., TEN VELDE, G.P.M., THUNNISSEN, F.B.J.M. p53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 153, p. 411-416, 1996.
22. BOGDANOVIC, A.D., JANKOVI, G.M., COLOVI, M.D., TRPINA, D.P., BUMBA, V.Z. Apoptosis in bone marrow of myelodysplastic syndrome patients [letter]. **Blood**, v. 87, p. 3064, 1996.

23. BOS, J.L. *Ras* oncogenes in human cancer. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4682- 4689, 1989.
24. BOSARI, S., VIALE, G., RONCALLI, M., GRAZIANE, D., BORSANI, G., LEE, A. K. C., COGGI, G. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 790-798, 1995.
25. BOULTWOOD, J., LEWIS, S., WAINSCOT, J.S. The 5q-syndrome. **Blood**, v. 84, p. 3253-3260, 1994.
26. BRUNNING, R.D. Bone marrow. In: Surgical Pathology, 8th ed., Rosai, J., Mosby, 1996, p. 1797-1915.
27. CARON DE FROMENTEL, C., SOUSSI, T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. **Genes Chrom. Cancer**, v. 4, p. 1-15, 1992.
28. CASTRO-MALASPINA, H., RABELLINO, E.M., YEN, A., NACHMAN, R.L., MOORE, M.A.S. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. **Blood**, v. 57, p. 781-787, 1981.
29. CATTORETTI, G., PILERI, S., PARRAVICINI, C., BECKER, M.H.G., POGGI, S., BIFULCO, C., KEY, G., D'AMATO, L., SABATTINI, E., FEUDALE, E., REYNOLDS, F., GERDES, J., RILKE, F. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. **J. Pathol.**, v. 171, p. 83-98, 1993.
30. CHEN, P.L., CHEN, Y., BOOKSTEIN, R., LEE, W.H. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. **Science**, v. 250, p. 1576-1579, 1990.
31. CHENG, K.C., LOEB, L.A. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. **Adv. Cancer Res.**, v. 60, p. 121-156, 1993.
32. CHO, Y., GORINA, S., JEFFREY, P.D., PAVLETICH, N.P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**, v. 265, p. 346-355, 1994.
33. CLARK, D.M., LAMPERT, I.A. Apoptosis is a common histopathological finding in myelodysplasia: the correlates of ineffective haematopoiesis. **Leuk. Lymphoma**, v. 2, p. 415-418, 1990.
34. COPPLESTONE, J.A., MUFTI, G.J., HAMBLIN, T.J., OSCIER, D.G. Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 63, p. 149-159, 1986.
35. CORDELL, J.L., FALINI, B., ERBER, W.N., GOSH, A.K., ABDULAZIZ, Z., MACDONALD, S., PULFORD, K.A.F., STEIN, H., MASON, D.Y. Immuno-

- enzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). **J. Histochem. Cytochem.**, v. 32, p. 219-229, 1984.
36. CORDON-CARDO, C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 545-560, 1995.
 37. COSSMAN, J., SCHLEGEL, R. p53 in the diagnosis of human neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 980-981, 1991.
 38. CULLIGAN, D. J., CACHIA, P., WHITTAKER, J., JACOBBS, A., PADUA, A. Clonal lymphocytes are detectable in only some cases of MDS. **Br. J. Haematol.**, v. 81, p. 346-352, 1992.
 39. CULOTTA, E., KOSHLAND JR., D.E. p53 sweeps through cancer research. **Science**, v. 262, p. 1958-1961, 1993.
 40. DELACRETAZ, F., SCHMIDT, P.M., PIGUET, D., BACHMANN, F., COSTA, J. Histopathology of myelodysplastic syndrome: the FAB classification (proposals) applied to bone marrow biopsy. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 87, p. 180-186, 1987.
 41. DOLL, D.C., LIST, A.F. Myelodysplastic syndromes. **West J. Med.**, v. 151, p. 161-167, 1989.
 42. DONEHOWER, L.A. Effects of p53 mutation on tumor progression: recent insights from mouse tumor models. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1242, p. 171-176, 1996.
 43. DONEHOWER, L.A., HARVEY, M., SLAGLE, B.L., McARTHUR, M.J., MONTGOMERY, C.A., BUTEL, J.S., BRADLEY, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. **Nature**, v. 356, p. 215-221, 1992.
 44. DOWELL, S.P., HALL, P.A. The clinical relevance of the p53 tumour suppressor gene. **Cytopathology**, v. 5, p. 133-145, 1994a.
 45. DOWELL, S.P., LANE, D.P., HALL, P.A. The immunohistochemical detection of p53 protein in cytological specimens: technical considerations. **Cytopathology**, v. 5, p. 76-81, 1994b.
 46. DOWELL, S.P., WILSON, P.O.G., DERIAS, N.W., LANE, D.P., HALL, P.A. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2914-2918, 1994c.
 47. DUFFY, M.J. Cellular oncogenes and suppressor genes as prognostic markers in cancer. **Clin. Biochem.**, v. 26, p. 430-447, 1993.

48. DÜHRSEN, U., HOSSFELD, D.K. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. **Ann. Hematol.**, v. 73, p. 53-70, 1996.
49. ERBER, W.N., MCLANCHLAN, J. Use of APAAP technique on paraffin wax embedded bone marrow trephines. **J.Clin.Pathol.**, v. 42, p. 1201-1205, 1989.
50. ESRIG, D., ELMAJIAN, D., GROSHEN, S., FREEMAN, J.A., STEIN, J.P., CHEN, S.C., NICHOLS, P.W., SKINNER, D.G., JONES, P.A., COTE, R.J. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 1259-1264, 1994.
51. EWEN, M., MILLER, S.J. p53 and translational control. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1242, p. 181-184, 1996.
52. FALINI, B., MARTELLI, M.F., TARALLO, F., MOIR, D.J., CORDELL, J.L., GATTER, K.C., LORETI, G., STEIN, H., MASON, D.Y. Immunohistological analysis of human bone marrow trephine biopsies using monoclonal antibodies. **Br.J.Haematol.**, v. 56, p. 365-386, 1984.
53. FARHI, D.C. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Diagnostic criteria and pitfalls. **Pathol. Ann.** v. 30, p. 29-57, 1995.
54. FAULKNER-JONES, B.E., HOWIE, A.J., BOUGHTON, B.J., FRANKLIN, I.M. Lymphoid aggregates in bone marrow: study of eventual outcome. **J. Clin. Pathol.**, v. 41, p. 768-775, 1988.
55. FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 758-767, 1990.
56. FENAUX, P., d'HOOGHE, M.C., JUVEAUX, P., LAÏ, J.L., BAUTERS, F., LOUCHEUX, M.H., KERCKAERT, J.P. Rearrangement and expression of the p53 gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, v. 32, p. 341-344, 1990.
57. FENAUX, P., MOREL, P., LAI, J.L. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 127-138, 1996.
58. FENAUX, P., PREUDHOMME, C., QUIQUANDON, I., JONVEAUX, P., LAÏ, J.L., VANRUMBEKE, M., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M. H., BAUTERS, F., BERGER, R., KERCKAERT, J.P. Mutations of the p53 gene in acute myeloid leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 80, p. 178-183, 1992.
59. FIELDS, S., JANG, S.K. Presence of potent transcription activating sequence in the p53 protein. **Science**, v. 249, p. 1046-1051, 1990.
60. FINLAY, C.A., HINDS, P.W., LEVINE, A.J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**, v. 57, p. 1083-1093, 1989.

61. FINLAY, C.A., HINDS, P.W., TAN, T.H., ELIYAHU, D., OREN, M., LEVINE, A.J. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms on hsp 70-p53 complex with an altered half-life. **Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 531-539, 1988.
62. FOHLMEISTER, I., FISCHER, R., MÖDDER, B., RISTER, M., SCHAEFER, H-E. Aplastic anaemia and the hypocellular myelodysplastic syndrome: histomorphological, diagnostic, and prognostic features. **J. Clin. Pathol.**, v. 38, p. 1218-1224, 1985.
63. FRIEND, S. p53: a glimpse at the puppet behind the shadow play. **Science**, v. 265, p. 334-335, 1994.
64. GALTON, D. A. G. The myelodysplastic syndromes. **Scand. J. Haematol.**, v. 36, p. 11-20, 1986.
65. GANNON, J. V., GREAVES, R., IGGO, R., LANE, D.P. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. **Embo J.**, v. 9, p. 1595-1602, 1990.
66. GEDDES, A. D., BOWEN, D. T., JACOBS, A. Clonal karyotype abnormalities and clinical progress in the myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v. 76, p. 194-202, 1990.
67. GIRALT, M. Síndromes mielodisplásicos. **Sangre**, v. 42, p. 63-71, 1997.
68. GOASGUEN, J.E., BENNETT, J.M. Classification and morphologic features of the myelodysplastic syndromes. **Semin. Oncol.**, v. 19, p. 4-13, 1992.
69. GREENBERG, B.R., MILLER, C., CARDIFF, R.D., MACKENZIE, M.R., WALLING, P. Concurrent development of preleukaemic, lymphoproliferative and plasma cell disorders. **Br. J. Haematol.**, v. 53, p. 125-133, 1983.
70. GREENBLATT, M.S., BENNETT, W.P., HOLLSTEIN, M., HARRIS, Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.
71. HAASE, D., FONATSCH, C., FREUND, M., WURMANN, B., BODENSTEIN, H., BARTELS, H., STOLLMANN-GIBBELS, B., LENGFELDER, E. Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 70, p. 171-187, 1995.
72. HALL, P., RAY, A., LEMOINE, N., MIDGLEY, C.A., KRAUSZ, T., LANE, D.P. p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. (letter) **Lancet**, v. 338, p. 513, 1991.

73. HALL, P.A., LANE, D.P. p53 in tumor pathology can we trust immunohistochemistry? - revisited! **J. Pathol.**, v. 172, p. 1-4, 1994.
74. HALL, P.A., MCKEE, P.H., MENAGE, H.P., DOVER, R., LANE, D.B. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. **Oncogene**, v. 8, p. 203-207, 1993.
75. HAMBLIN, T. J. Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v.33, p.150-162, 1996.
76. HARRIS, A.L. Mutant p53-the commonest genetic abnormality in human cancer? **J. Pathol.**, v. 62, p. 5-6, 1990.
77. HARRIS, C.C., HOLLSTEIN, M. Clinical implications of p53 tumor-suppressor gene. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 1318-1327, 1993.
78. HARTWELL, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. **Cell**, v. 71, p. 543-546, 1992.
79. HARTWELL, L.H., KASTAN, M.B. Cell cycle control in cancer. **Science**, p. 1821-1828, 1994.
80. HEAD, D.R., KOPECKY, K., BENNETT, J.M., GRENIER, K., MORRISON, F.S., MILLER, K.B, GREVER, M.R. Pathogenetic implications of internuclear bridging in myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 64, p. 2199-2202, 1989.
81. HENSON, D.E. Loss of p53-immunostaining intensity in breast cancer. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 88, p. 1015-1016, 1996.
82. HINDS, P., FINLAY, C., LEVINE, A.J. Mutation is required to activate the gene for cooperation with the *ras* oncogene and transformation. **J. Virol.**, v. 63, p. 739-746, 1989.
83. HO, P.J, GIBSON, J., VINCENT, P., JOSHUA, D. The myelodysplastic syndromes: diagnostic criteria and laboratory evaluation. **Pathology**, v. 25, p.297-304, 1993.
84. HOFMANN, W.K., OTTMANN, O.G., GANSER, A., HOELZER, D. Myelodysplastic syndromes: clinical features. **Semin. Hematol.**, v. 33, n. 3, p. 117-185, 1996.
85. HOLLINGSWORTH, R.E., LEE, W.H. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 91-96, 1991.
86. HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOLGESTEIN, B., HARRIS, C.C. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, p. 49-53, 1991.

87. ICHIKAWA, A., KINOSHITA, T., WATANABE, T., KATO, H., NAGAI, H., TSUSHITA, K., SAITO, H., HOTTA, T. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 529-534, 1997.
88. IMAMURA, J., MIVOSHI, I., KOEFFLER, H.P. p53 in hematologic malignancies. **Blood**, v. 84, p. 2412-2421, 1994.
89. ISOBE, M., EMANUEL, B.S., GIVOL, D., OREN, M., CROCE, C.M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature**, v. 320, p. 84-85, 1986.
90. JACOBS, A. Genetic abnormalities in myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 56, p. 1-6, 1991.
91. JACOBS, T.W., PRIOLEAU, J.E., STILLMAN, I.E., SCHNITT, S.J. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 88, p. 1054-1059, 1996.
92. JANSSEN, J.W.G., BUSCHLE, M., LAYTON, M., DREXLER, H.G., LYONS, J., VAN DEN BERGHE, H., HEIMPEL, H., KUBANEK, B., KLIHAUER, E., MUFTI, G.J., BARTRAM, C.R. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. **Blood**, v. 73, p. 248-254, 1989.
93. JONVEAUX, P., FENAUX, I., QUIQUANDON, J.M., PIGNON, J.L., LAÏ, M.H., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M., GOOSSENS, F., BAUTERS, F., BERGER, R. Mutations in the p53 gene in myelodysplastic syndromes. **Oncogene**, v. 6, p. 2243-2247, 1991.
94. KALOUTSI, V., KOHLMAYER, U., MASCHEK, H. Comparison of bone marrow and hematologic findings in patients with human immunodeficiency virus infection and those with myelodysplastic syndromes and infectious diseases. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 101, p. 123-129, 1994.
95. KAMPMEIER, P., ANASTASI, J., VARDIMAN, J.W. Issues in the pathology of the myelodysplastic syndromes. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 6, p. 501-522, 1992.
96. KANEKO, H., MISAWA, S., HORIIKE, S., NAKAI, H., KASHIMA, K. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. **Blood**, v. 85, p. 2189-2193, 1995.
97. KASTAN, M.B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VOLGESTEIN, B., CRAIG, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6304-6311, 1991a.

98. KASTAN, M.B., RADIN, A.I., KUERBITZ, S.J., ONYEKWERE, O., WOLKOW, C.A., CIVIN, C.I., STONE, K.D., WOO, T., RAVINDRANATH, Y., CRAIG, R.W. Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. **Cancer Res.**, v. 51, p. 4279-4286, 1991b.
99. KERE, J., RUUTU, T., DE LA CHAPELLE, A. Monosomy 7 in granulocytes and monocytes in myelodysplastic syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 316, p. 499-503, 1987.
100. KERN, S.E., PIETENPOL, J.A., THIAGALINGAM, S., SEYMOUR, A., KINZLER, K.W., VOLGESTEIN, B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. **Science**, v. 256, p. 827-830, 1992.
101. KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M., HARMON, B.V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994
102. KITAGAWA, M., KAMIYAMA, R., TAKEMURA, T., KASUNGA, T. Bone marrow analysis of the myelodysplastic syndromes: histological and immunohistochemical features related to evolution of overt leukemia. **Virchows Archiv. B. Cell Pathol.**, v. 57, p. 47-53, 1989.
103. KITAGAWA, M., YOSHIDA, S., KUWATA, T., TANIZAWA, T., KAMIYAMA, R. p53 expression in myeloid cells of myelodysplastic syndromes. Association with evolution of overt leukemia. **Am. J. Pathol.**, v. 145, p. 338-344, 1994.
104. KNUDSON, A.G. Antioncogenes and human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 10914-10921, 1993.
105. KNUDSON Jr, A. G. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1437-1443, 1985.
106. KOEFFLER, H. P. Introduction: myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 87-94, 1996.
107. _____. Myelodysplastic syndromes (preleukemia). **Semin. Hematol.**, v. 23, p. 284-299, 1986.
108. KOUIDES, P.A., BENNETT, J.M. Morphology and classification of myelodysplastic syndromes. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.** v. 6, p. 485-499, 1992.
109. _____. Morphology and classification of myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 96-110, 1996.
110. KUBIC, V.L., BRUNNING, R.D. Immunohistochemical evaluation of neoplasms in bone marrow biopsies using monoclonal antibodies in paraffin-embedded tissue. **Mod. Pathol.**, v. 2, p. 618-629, 1989.

111. KURIYAMA, K., TOMONAGA, M., MATSUO, T., GINNAI, I., ICHIMARU, M.
Diagnostic significance of detecting pseudo-Pelger-Huët anomalies and micro-megakaryocytes in myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v. 63, p. 665-669, 1986.
112. LAI, J-L., PREUDHOMME, C., ZANDECKI, M., FLACTIF, M., VANRUMBEKE, M., LEPELLEY, P., WATTEL, E., FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of p53 mutation. **Leukemia**, v. 9, p. 370-381, 1995.
113. LAMB, P., CRAWFORD, L. Characterization of the human p53 gene. **Mol. Cell. Biol.**, v. 6, p. 1379-1385, 1986.
114. LAMBERTENGHI-DELILIERIS, G., ANNALORO, C., ORIANI, A., SOLIGO, D., POZZOLI, E., POLLI, E.E. Prognostic relevance of histological findings on bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 66, p. 85-91, 1993.
115. LAMBERTENGHI-DELILIERIS, G., ORAZI, A., LUKSCH, R., ANNALORO, C., SOLIGO, D. Myelodysplastic syndrome with increased marrow fibrosis: a distinct clinico-pathological entity. **Br. J. Haematol.**, v. 78, p. 161-166, 1991.
116. LANE, D.P. A death in the life of p53. **Nature**, v. 362, p. 786-787, 1993.
117. _____. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, p. 15-16, 1992.
118. LANE, D.P., BENCHIMOL, S. p53: oncogene or anti-oncogene? **Genes Dev.**, v. 4, p. 1-8, 1990.
119. LANE, D.P., CRAWFORD, L.V. T-antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v. 278, p. 261-263, 1979.
120. LATCHAMAN, D.S. Transcription-factor mutations and disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 28-33, 1996.
121. LEGROS, Y., LACABANNE, V., d'AGAY, M.F., LARSEN, C.J., PLA, M., SOUSSI, T. Production of human p53 specific monoclonal antibodies and their use in immunohistochemical studies of tumor cells. **Bull. Cancer**, v. 80, p. 102-110, 1993.
122. LEPELLEY, P., CAMPERGUE, L., GRARDEL, N., PREUDHOMME, C., COSSON, A., FENAUX, P. Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndromes? **Br. J. Haematol.**, v. 95, p. 368-371, 1996.
123. LEPELLEY, P., PREUDHOMME, C., VANRUMBEKE, M., QUESNEL, B., COSSON, A., FENALUX, P. Detection of p53 mutations in hematological malignancies:

- comparison between immunocytochemistry and DNA analysis. **Leukemia**, v. 8, p. 1342-1349, 1994.
124. LEVINE, A.J., MOMANDI, J., FINLAY, C.A. The p53 tumour suppressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453-456, 1991.
 125. LEVINE, A.J., PERRY, M.E., CHANG, A., SILVER, A., DITTMER, D., WU, M., WELSH, D. The 1993 Walter Hubert lecture: the role of the p53 tumour - suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v. 69, p. 409-416, 1994.
 126. LEVINE, E.G., BLOOMFIELD, C.D. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation and environmental exposure. **Semin. Oncol.**, v. 19, p. 47-84, 1992.
 127. LI, F.P., FRAUMENI, J.F. Prospective study of a family cancer syndrome. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 247, p. 2692-2694, 1982.
 128. LIPSCHITZ, D.A., UDUPA, K.P., MILTON, K.Y., THOMPSON, C.O. Effect of age on hematopoiesis in man. **Blood**, v. 63, p. 502-509, 1984.
 129. LIST, A.F., GAREWAL, H.S., SANDBERG, A.A. The myelodysplastic syndromes: biology and implications for management. **J. Clin. Oncol.**, v. 8, p. 1424-1441, 1990.
 130. LIST, A.F., JACOBS, A. Biology and pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. **Semin. Oncol.**, v. 19, p. 14-24, 1992.
 131. LORAND-METZE, I., ARRUDA, V.R., VASSALO, J. Differential diagnosis between HIV-related marrow abnormalities and primary myelodysplasia. **Pathol. Res. Pract.**, v. 187, p. 719, 1991.
 132. LUDWIG, L., SCHULZ, A.S., JANSSEN, J.W.G., GRÜNEWALD, K., BARTRAM, C.R. p53 mutations in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 6, p. 1302-1304, 1992.
 133. MAEDA, K., HYUN, B.H., REBUCK, J.W. Lymphoid follicles in bone marrow aspirates. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 67, p. 41-48, 1977.
 134. MAGALHÃES, S.M.M., ROCHA, F. F. D., DUARTE, F.B., PONTE, L.P., HOLANDA, R.A.R.R. Nódulos linfóides na medula óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplástica - relato de três casos. **J. Bras. Patol.**, v. 33, p. 126-132, 1997.
 135. MALKIN, D., LI, F.P., STRONG, L.C., FRAUMENI, J.F., NELSON, C.E., KIM, D.H., KASSEL, J., GRYKA, M.A., BISCHOFF, F.Z., TAINSKY, M.A., FRIEND, S.H. Germ line p53 mutations in a family syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. **Science**, v. 250, p. 1233-1238, 1990.

136. MANGI, M. H., MUFTI, G. J. Primary myelodysplastic syndromes: diagnostic and prognostic significance of immunohistochemical assessment of bone marrow biopsies. **Blood**, v. 79, p. 198-205, 1992.
137. MANGI, M. H., SALISBURY, J. L., MUFTI, G. J. Abnormal localization of immature precursors (ALIP) in the bone marrow of myelodysplastic syndromes: current state of knowledge and future directions. **Leuk. Res.**, v. 7, p. 627-639, 1991.
138. MANOHARAN, A., CATOVSKY, D., CLEIN, P., TRAUBE, N. E., COSTELLO, C., O'BRIEN, M., BORALESSA, H., GALTON, D. A. G. Simultaneous or spontaneous occurrence of lympho - and myeloproliferative disorders: a report of four cases. **Br. J. Haematol.**, v. 48, p. 111-116, 1981.
139. MARSHALL, C. J. Tumor suppressor genes. **Cell**, v. 64, p. 313-326, 1991.
140. MARX, J. How p53 suppress cell growth. **Science**, v. 262, p. 1644-1645, 1993.
141. MASCHEK, H., GEROGII, A., KALOUTSI, V., WERNER, M., BANDECAR, K., KRESSEL, M. G., CHORITZ, H., FREUND, M., HUFNAGL, D. Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a retrospective study of 352 patients. **Eur. J. Haematol.**, v. 48, p. 208-214, 1992.
142. MASHAL, R., STHALRID, M., TALPAZ, M., KANTARJIAN, H., SMITH, L., BERAN, M., CORK, A., TRUJILLO, J., GUTTERMAN, J., DEISSEROTH, A. Rearrangement and expression of p53 in the chronic phase and blast crisis of chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 75, p. 180, 1990.
143. MAUCH, P., BOTNICK, L. E., HANNON, E. C., OBBAGY, J., HELLMAN, S. Decline in bone marrow proliferative capacity as a function of age. **Cancer**, v. 60, p. 245-251, 1982.
144. MCCARTHY, D. Fibrosis of the bone marrow: content and causes. **Br. J. Haematol.**, v. 59, p. 1-7, 1985.
145. MCKEE, P. H., HOBBS, C., HALL, P. A. Antigen retrieval by microwave irradiation lowers immunohistological detection thresholds. **Histopathology**, v. 23, p. 377-379, 1993.
146. MECUCCI, C., VAN DEN BERGHE, H. Cytogenetics. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 6, p. 523-540, 1992.
147. MICHELS, S., CHAN, W., JAKUBOWSKI, D., VOGLER, R. Unclassifiable myelodysplastic syndrome: a study of sixteen cases with a proposal for a new subtype. **Lab. Invest.**, v. 62, p. 67A, 1990.

148. MIETZ, J.A., UNGER, T., HUIBREGTSE, J.M., HOWLEY, P.M. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and HPV 16 E6 oncoprotein. **Embo. J.** v. 11, p. 5013-5020, 1992.
149. MOIR, D.J., GHOSH, A.K., ABDULAZIZ, Z., KNIGHT, P.M., MASON, Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies. **Br. J. Haematol.**, v. 55, p. 395-410, 1983.
150. MOLL, U.M., RIOU, G., LEVINE, A.J. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 7262-7266, 1992.
151. MOMAND, J., ZANBETTI, G.P., OLSON, T.C., GEORGE, D., LEVINE, A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. **Cell**, v. 69, p. 1237-1245, 1992.
152. MORI, N., WADA, M., YOKOTA, J., TERADA, M., OKADA, M., TERAMURA, M., MASUDA, M., HOSHINO, S., MOTOJI, T., OSHIMI, K., MIZOGUSHI, H. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in haematologic neoplasms. **Br. J. Haematol.**, v.81, p. 235-240, 1992.
153. MUFTI, G.J. A guide to risk assessment in the primary myelodysplastic syndrome. **Hem. Oncol. Clin. North Am.**, v. 6, p. 587-607, 1992a.
154. _____. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. **Leuk. Res.**, v. 16, p. 35-41, 1992b.
155. MUFTI, G.J., STEVENS, J.R., OSCIER, D.G., HAMBLIN, T.J., MACHIN, D. Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. **Br. J. Haematol.**, v. 59, p. 425-433, 1985.
156. MULLINK, H., HENZEN-LOGMANS, S.C., TADEMA, T.M., MOL, J.J., MEIJER, C.J.L.M. Influence of fixation and descalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 33, p. 1103-1109, 1985.
157. NAKANISHI, K., KAWAI, T., TORIKATA, C. Immunohistochemical evaluation of p53 oncoprotein in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. **Hum. Pathol.**, v. 27, p. 1336-1340, 1996.
158. NAND, S., GODWIN, J.E. Hypoplastic myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 62, p. 958-964, 1988.
159. NAVONE, R., VALPREDA, M., PICH, A. Lymphoid nodules and nodular lymphoid hyperplasia in bone marrow biopsies. **Acta Haemat.**, v. 74, p. 19-22, 1985.

160. NEUBÄUER, A., BRENDDEL, C., VOGEL, D., SCHMIDT, C.A., HEIDE, I., HUHN, D.
Detection of p53 mutations using nonradioactive SSCP analysis: p53 is not frequently mutated in myelodysplastic syndromes (MDS). **Ann. Hematol.**, v. 67, p. 223-226, 1993.
161. NEUWIRTOVÁ, R., MOCIKOVÁ, K., MUSILOVÁ J., JELINEK, J., HAVLICEK, F., MICHALOVÁ, K., ADAMKOV, M. Mixed myelodysplastic and myeloproliferative syndromes. **Leuk. Res.**, v. 20, p. 717-726, 1996.
162. NIGRO, J.M., BAKER, S.J., PREISINGER, A.C., JESSUP, J.M., HOSTETTER, R., CLEARY, K., BIGNER, S.H., DAVIDSON, N., BAYLIN, S., DEVILEE, P., GLOVER, T., COLLINS, F.S., WESTON, A., MODALI, R., HARRIS, C.C., VOLGESTEIN, B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, p. 705-708, 1989.
163. NOWELL, P.C., BESA, E.C., STELMACH, T., FINAN, J.B. Chromosome studies in preleukemic states. V. Prognostic significance of single versus multiple abnormalities. **Cancer**, v. 58, p. 2571-2575, 1986.
164. OLINER, J.D., PIETENPOL, J.A., THIAGALINGAM, S., GYURIS, J., KINZLER, K.W., VOLGESTEIN, B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation of tumour suppressor p53. **Nature**, v. 362, p. 857-860, 1993.
165. ORAZI, A., CATTORETTI, G., SOLIGO, D., LUKSCH, R., LAMBERTENGHI-DELILIERIS, G. Therapy-related myelodysplastic syndromes: FAB classification, bone marrow histology and immunohistology in the prognostic assessment. **Leukemia**, v. 7, p. 838-847, 1993.
166. OREN, M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? **FASEB J.**, v. 6, p. 3169-3176, 1992.
167. OSTROWSKI, J.L., SAWAN, A., HENRY, L., WRIGHT, C., HENRY, J.A., HENNESSY, C., LENNARD T.J.W., ANGUS, B., HORNER, C.H.W. p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. **J. Pathol.**, v. 164, p. 75-81, 1991.
168. PADUA, R.A. Genetic lesions in myelodysplasia. **Br. J. Haematol.**, v. 82, p. 234-236, 1992.
169. PARADA, L.F., LAND, H., WEINBERG, R.A., WOLF, D., ROTTER, V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and *ras* in cellular transformation. **Nature**, v. 312, p. 649-651, 1984.
170. PARK, D. J., KOEFFLER, H. P. Therapy-related myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 256-273, 1996.

171. PARKER, J., MUFTI, G.J. *Ras* and myelodysplasia: lessons from the last decade. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 206-224, 1996.
172. PELED, A., ZIPORI, D., ROTTER, V. Cooperation between p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in myeloid cells. **Cancer Res.**, v. 56, p. 2148-2156, 1996.
173. PERRY, M.E., LEVINE, A.J. Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 3, p. 50-54, 1993.
174. PEZZELA, F., MICKLEM, K., TRULEY, H., PULFORD, K., JONES, M., KOCIALKOWSKI, S., DELIA, D., AIELLO, A., BICKNELL, R., SMITH, K., HARRIS, A.L., GATTER, K.C., MASON, D.Y. Antibody for detecting p53 protein by immunohistochemistry in normal tissues. **J. Clin. Pathol.**, v. 47, p. 592-596, 1994.
175. PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, p. 962-970, 1993.
176. POLLER, D.N., ROBERTS, E.C., BELL, J.A., ELSTON, C.W., BLAMEY, R.W., ELLIS, I.O. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. **Hum. Pathol.**, v. 24, p. 463-468, 1993.
177. PORTER, P.L., GOWN, A.M., KRAMP, S.G., COLTRERA, M.D. Widespread p53 over expression in human malignant tumors. **Am. J. Pathol.**, v. 140, p. 145-153, 1992.
178. PRIOLEAU, J., SCHNITT, S.J. p53 antigen loss in stored paraffin slides. (letter) **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1521-1522, 1995.
179. PROKOCIMER, M., ROTTER, V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. **Blood**, v. 84, p. 2391-2411, 1994.
180. PROKOCIMER, M., SHAKLAI, M., BASSAT, H.B., WOLF, D., GOLDFINGER, N., ROTTER, V. Expression of p53 in human leukemia and lymphoma. **Blood**, v. 68, p. 113-118, 1986.
181. RAJAPAKSA, R., GINZTON, N., ROTT, L.S., GREENBERG, P.L. Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. **Blood**, v. 88, p. 4275-4287, 1996.
182. RASKIND, W.H., TIRUMALI, M., JACOBSON, R., SINGER, J., FIALKOW, P.J. Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 63, p. 1318-1323, 1984.

183. RAZA, A., MUNDLE, S., SHETTY, V., ALVI, S., CHOPPA, H., SPAN, L., PARCHARIDOU, A., DAR, S., VENUGOPAL, P., BOROK, R., GEZER, S., SHOWEL, J., LOEW, J., ROBIN, E., RIFKIN, S., ALSTON, D., HERNANDEZ, B., SHAH, R., KAIZER, H., GREGORY, S. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. **Int. J. Hematol.**, v. 63, p. 265-278, 1996a.
184. RAZA, A., MUNDLE, S., SHETTY, V., ALVI, S., CHOPPA, H., SPAN, L., PARCHARIDOU, A., DAR, S., VENUGOPAL, P., BOROK, R., GEZER, S., SHOWEL, J., LOEW, J., ROBIN, E., RIFKIN, S., ALSTON, D., HERNANDEZ, B., SHAH, R., KAIZER, H., GREGORY, S., PREISLER, H. A paradigm shift in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 10, p. 1648-1652, 1996b.
185. REIZENSTEIN, P., OST, A. What is MDS? Minimal diagnostic criteria for the myelodysplastic syndrome in clinical practice. **Leuk. Res.**, v. 16, p. 1-11, 1992.
186. RESEGOTTI, L. Myelodysplasia - The nature and natural history of myelodysplasia. **Br. J. Haematol.**, v. 82, p. 232-234, 1992.
187. RÍOS, A., CAÑIZO, M.C., SANZ, M.A., VALLESPÍ, T., SANZ, G., TORRABADELLA, M., GOMIS, F., RUIZ, C., SAN MIGUEL, J.F. Bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes: morphological characteristics and contribution to the study of prognostic factors. **Br. J. Haematol.** v. 75, p. 26-33, 1990.
188. RODRIGUES, N.R., ROWAN, A., SMITH, M.E.F., KERR, I.B., BODMER, W.F., GANNON, J.V., LANE, D.P. p53 mutations in colorectal cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 7555-7559, 1990.
189. ROSATI, S., ANASTASI, J., VARDIMAN, J. Recurring diagnostic problems in the pathology of the myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v. 33, p. 111-126, 1996.
190. ROSENBLOOM, B., SCHRECK, R., KOEFFLER, H.P. Therapy-related myelodysplastic syndromes. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 6, p. 707-722, 1992.
191. ROTHSTEIN, G. Hematopoiesis in the aged: a model of hematopoietic dysregulation? **Blood**, v. 82, p. 2601-2604, 1993.
192. SAAD, S.T.O., VASSALO, J.A., ARRUDA, V.A., LORAND-METZE, I. The role of bone marrow study in diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndrome. **Pathologica**, v. 86, p. 47-51, 1994.
193. SACHS, L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 4742-4749, 1996.

194. SAGER, R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. **Science**, v. 246, p. 1406-1412, 1989.
195. SAN MIGUEL, J.F., SANZ, G.F., VALLESPÍ, T., DEL CAÑIZO, M.C., SANZ, M.A. Myelodysplastic syndromes. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 23, p. 57-93, 1996.
196. SANDER, C.A., YANO, T., CLARK, H.M., HARRIS, C., LONGO, D.L., JAFFE, E.L., RAFFELD, M. p53 mutations is associated with progression in follicular lymphomas. **Blood**, v. 82, p. 1994-2004, 1993.
197. SASAKI, K., SATO, T., KUROSE, A., IKEDA, E. Immunohistochemical detection of p21^{waf1/cip1/sdi1} and p53 proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of colorectal carcinoma. **Hum. Pathol.**, v. 27, p. 912-916, 1996.
198. SCHEFFNER, M., WERNES, B.A., HUIBREGTSE, J.M., LEVINE, A.J., HOWLEY, P.M. The E₆ oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, p. 1129-1136, 1990.
199. SCHMITT, F.C., LEAL, C., LOPES, C. p53 protein expression and DNA content in breast intraductal proliferations. **J. Pathol.**, v. 176, p. 233-241, 1995.
200. SCOTT, N., SAGAR, P., STEWART, J., BLAIR, G.E., DIXON, M.F., QUIRKE, P. p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. **Br. J. Cancer**, v. 63, p. 317-319, 1991.
201. SEO, I.S., LI, C.Y., YAM, L.T. Myelodysplastic syndrome: diagnostic implications of cytochemical and immunocytochemical studies. **Mayo Clin. Proc.** v. 68, p. 47-53, 1993.
202. SHAULSKY, G., GOLDFINGER, N., TOSKY, M.S., LEVINE, A.J., ROTTER, V. Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. **Oncogene**, v. 6, p. 2055-2065, 1991.
203. SHI, S.R., KEY, M.E., KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 39, p. 741-748, 1991.
204. SHIN, S.S., SHEIBANI, K., KEZIRIAN, J., NADEMANEE, A., FORMAN, S.J., LEE, S.K., WINBERG, C.D. Immunoarchitecture of normal human bone marrow: a study of frozen and fixed tissue sections. **Hum. Pathol.**, v. 23, p. 686-694, 1992.
205. SOARES, I.F.J., BARTMAN, F.C. **Métodos Estatísticos em Medicina e Biologia-Instituto de Matemática Pura e Aplicada**, Rio de Janeiro, 1983.

206. STEPHENSON, J., MUFTI, G.J., YOSHIDA, Y. Myelodysplastic syndromes: from morphology to molecular biology. Part II. The molecular genetics of myelodysplasia. **Int. J. Hematol.**, v. 57, p. 99-112, 1993.
207. SUCIU, S., KUSE, R., WEH, H. J., HOSSFELD, D.K. Results of chromosome studies and their relation to morphology, course, and prognosis in 120 patients with *de novo* myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 44, p. 15-26, 1990.
208. SUGIMOTO, K., HIRANO, N., TOYOSHIMA, H., CHIBA, S., MANO, H., TAKAKU, F., YASAKI, Y., HIRAI, H. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. **Blood**, v. 81, p. 3022-3026, 1993.
209. SULTAN, C., SIGAUX, F., IMBERT, M., REYES, F. Acute myelodysplasia with myelofibrosis: a report of eight cases. **Br. J. Haematol.**, v. 49, p. 11-16, 1981.
210. SYMONDS, H., KRALL, L., REMINGTON, L., SAENZ-ROBLES, M., LOWE, S., JACKS, T., van DYKE, T. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. **Cell**, v. 78, p. 703-711, 1994.
211. THIRD MIC COOPERATIVE STUDY GROUP: Recommendations for a morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of primary and therapy-related myelodysplastic disorders. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 32, p. 1-10, 1988.
212. TOMINAGA, O., HAMELIN, R., REMVIKOS, Y., SALMON, R.J., THOMAS, G. p53 from basic research to clinical applications. **Crit. Rev. Oncogen.**, v. 3, p. 257-282, 1992.
213. TRICOT, G., DE WOLF-PETERS, C., HENDRICKX, B., VERWILGHEN, R.L. Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes. I. Histological findings in myelodysplastic syndromes and comparison with bone marrow smears. **Br. J. Haematol.**, v. 57, p. 423-430, 1984a.
214. TRICOT, G., DE WOLF-PETERS, C., VLIETINCK, R., VERWILGHEN, R.L. Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes. II. Prognostic value of abnormal localization of immature precursors in MDS. **Br. J. Haematol.**, v. 58, p. 217-225, 1984b.
215. TRICOT, G., VLIETINCK, R., HENDRICKX, B., DE WOLF-PEETERS, C., VAN DEN BERGHE, H., VERWILGHEN, L. Prognostic factors in the myelodysplastic syndromes: importance of initial data on peripheral blood

counts, bone marrow cytology, trephine biopsy and chromosomal analysis.
Br.J.Haematol., v.60, p. 19-32, 1985.

216. TSUSHITA, K., HOTTA, T., ICHIKAWA, A., SAITO, H. Mutation of p53 gene does not play a critical role in myelodysplastic syndrome and its transformation to acute leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 81, p. 456-457, 1992.
217. TUZUNER, N., COX, C., ROWE, J.M., WATROIS, D., BENNETT, J.M. Hypocellular myelodysplastic syndrome (MDS): new proposals. **Br. J. Haematol.**, v. 91, p. 612-617, 1995.
218. VAN DEN BERGHE, H., KLUIN, P.M., VASSEN, J.M. Early reconstitution of hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective histopathological study of bone marrow biopsy specimens. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 365-369, 1990.
219. VAN DER VALK, P., MULLINK, H., HUIJGENS, P.C., TADEMA, T.M., VOS, W., MEIJER, C.J.L.M. Immunohistochemistry in bone marrow diagnosis. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 13, p. 97-106, 1989.
220. VERHOEF, G.E.G., DE WOLF-PEETERS, C., FERRANT, A., DEPREZ, MEEUS, P., STUL, M., ZACHEÉ, P., CASSIMAN, J.J., VAN DEN BERGHE, H., BOOGAERTS, M.A. Myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis: a myelodysplastic disorder with proliferative features. **Ann. Hematol.**, v. 63, p. 235-241, 1991.
221. VERHOEF, G.E.G., PITTALUGA, S., DE WOLF-PEETERS, C., BOOGAERTS, M.A. FAB classification of myelodysplastic syndromes: merits and controversies. **Ann. Hematol.** v. 71, p. 3-11, 1995.
222. VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. Carcinogens leave fingerprints. **Nature**, v. 355, p. 209-210, 1992a.
223. _____. p53 function and dysfunction. **Cell**, v. 70, p. 523-526, 1992b.
224. VOJTESEK, B., BÁRTEK, J., MIDGLEY, C.A., LANE, D.P. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. **J. Immunol. Methods**, v. 151, p. 237-244, 1992.
225. WATTEL, E., PERUDHOMME, C., HECQUET, B., VANRUMBEKE, M., QUESNEL, B., DERVITE, I., MOREL, P., FENAUX, P. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. **Blood**, v. 84, p. 3148-3157, 1994.
226. WEINBERG, R.A. The integration of molecular genetics into cancer management. **Cancer**, v. 70, p. 1653-1658, 1992.

227. _____. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, p. 1138-1146, 1991.
228. WHITE, A. D., CULLIGAN, D.J., HOY, T.G., JACOBS, A. Extended cytogenetic follow-up of patients with myelodysplastic syndrome (MDS). **Br. J. Haematol.**, v. 81, p. 499-502, 1992.
229. WILLIAMS, G.T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. **Cell**, v. 65, p. 1097-1098, 1991.
230. WILLIAMS, G.T., SMITH, C.A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. **Cell**, v. 74, p. 777-779, 1993.
231. WILLIAMS, G.T., SMITH, C.A., SPOONCER, E., DEXTER, T.M., TAYLOR, D.R. Haemopoietic colony-stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. **Nature**, v. 343, p. 76-79, 1990.
232. WILLIAMSON, P.J., KRUGER, A.R., REYNOLDS, P.J., HAMBLIN, T.J., OSCIER, D.G. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.** v. 87, p. 743-745, 1994.
233. WORSLEY, A., OSCIER, D.G., STEVENS J.R., FIGES, A., MUFTI, G.J., HAMBLIN, T.J. Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. **Br. J. Haematol.**, v. 68, p. 17-21, 1988.
234. WRIGHT, S.C., ZHONG, J., LARRICK, J.W. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. **FASEB J.**, v. 8, p. 654-660, 1994.
235. WYLLIE, A.H. The genetic regulation of apoptosis. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 5, p. 97-104, 1995.
236. WYNFORD-THOMAS, D. Oncogenes and anti-oncogenes; the molecular basis of tumour behaviour. **J. Pathol.**, v. 165, p. 187-201, 1991.
237. _____. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? **J. Pathol.**, v. 166, p. 329-330, 1992.
238. YONISH-ROUACH, E., RESNITZKY, D., LOTEM, J., SACHS, L., KIMCHI, A., OREN M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid cells that is inhibited by interleukin-6. **Nature**, v.352, p. 345-347, 1991.
239. YOSHIDA, Y. Hypothesis: apoptosis may be the mechanism responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, v. 7, p. 144-146, 1993a.
240. YOSHIDA, Y., OGUMA, S., UCHINO, H., MAEKAWA, T. Refractory myelodysplastic anaemias with hypocellular bone marrow. **J. Clin. Pathol.**, v. 41, p. 763-767, 1988.

241. YOSHIDA, Y., STEPHENSON, J., MUFTI, G.J. Myelodysplastic syndromes: from morphology to molecular biology. Part I. Classification, natural history and cell biology of myelodysplasia. **Int. Hematol.**, v. 57, p. 87-97, 1993b.
242. YUNIS, J.J., BOOT, A.J.M., MAYER, M.G., BOS, J.L. Mechanisms of *ras* mutation in myelodysplastic syndrome. **Oncogene**, v. 4, p.609-614, 1989.
243. YUNIS, J.J., LOBELL, M., ARNESEN, M.A., OKEN, M., MAYER, M.G., RYDELL, R.E., BRUNNING, R.D. Refined chromosome study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 68, p. 189-194, 1988.