ROBERTA SANDRA DA SILVA TANIZAWA

**Estudo morfológico e por citogenética da medula óssea de portadores
de síndrome mielodisplásica secundária no Serviço de Hematologia do
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Prof^a. Dra. Elvira Deolinda Rodrigues
Pereira Velloso

SÃO PAULO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tanizawa, Roberta Sandra da Silva

Estudo morfológico e por citogenética da medula óssea de portadores de síndrome mielodisplásica secundária no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / Roberta Sandra da Silva Tanizawa. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientadora: Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso.

Descritores: 1.Síndromes mielodisplásicas 2.Neoplasias associadas à terapia 3.Segunda malignidade 4.Medula óssea 5.Análise citogenética 6.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-252/10

Ao meu querido e saudoso pai Osvaldo (*in memoriam*)
e ao meu querido marido Akira

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai *Oswaldo Ferro da Silva (in memorian)*, aos meus irmãos *Elisabeth*, *Luiz Carlos* e *Carla* e ao meu marido *José Akira Tanizawa* pela minha formação pessoal.

Ao Professor Dr. *Dalton de Alencar Fischer Chamone*.

À minha orientadora Dra *Elvira D Rodrigues Pereira Velloso*, a quem tenho profunda admiração e respeito, pela confiança, atenção e dedicação dispensadas.

À minha co-orientadora, Dra *Maria Claudia Nogueira Zerbini*, a quem tive o prazer de conhecer durante a realização deste trabalho, pela disposição, paciência e dedicação durante a revisão das lâminas de histologia.

Ao Dr *Ricardo Rosenfeld*, meu primeiro professor de hematologia, pelo incentivo, encorajamento ao estudo e pelo auxílio na revisão das lâminas de análise morfológica.

Ao Dr *Raymundo Soares de Azevedo Neto*, a quem me auxiliou tão gentilmente na análise estatística deste trabalho.

À amiga *Cristina Aiko Kumeda* pelo acolhimento pessoal e auxílio profissional na realização do exame de FISH.

À minha sempre amiga *Vera Lúcia Kawano* pelo companheirismo.

À *Aline* pelos valiosos conselhos.

Ao *Leandro* pela amizade.

À *Patrícia Ferreira* pelo apoio.

Ao *Tadeu* pelo bom humor.

Ao *Tiago* pela descontração.

À *Roseli* pelo seu eterno sorriso e otimismo.

Às Dras *Camila*, *Vaninha*, e *Marcela* do setor de Citogenética do Serviço de Hematologia do HC-FMUSP.

Ao Dr *Israel Bendit* e aos colegas e estagiários do setor de Biologia Tumoral, principalmente à *Mafalda*, *Luciana*, *Patrícia Bueno*, *Toninho*, *Juliana* e *Taís*.

À *Deise*, *Iara* e *Marisa* do Laboratório de Hematologia do HC-FMUSP.

À Sra. *Lucilla* e aos colegas do Setor de Imunopatologia do HC-FMUSP.

À *Angélica* e *Rose* da Pós Graduação pelos esclarecimentos prestados.

Agradeço aos *Pacientes*.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse Amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse Amor, nada seria.”

Paulo de Tarso

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO DA LITERATURA	4
1 - SMD/NM secundária após uso de drogas antineoplásicas	5
1.1 - SMD-t/Neoplasia mielóide relacionada à terapia	5
1.1.1 - Conceito	5
1.1.2 - Etiologia e Fisiopatologia	5
1.1.2.1 - Polimorfismo genético das enzimas de metabolização de drogas	7
1.1.2.2 - Sistema de reparo do DNA	9
1.1.3 - Incidência	11
1.1.4 - Os agentes alquilantes	12
1.1.5 - Inibidores de topoisomerase II	14
1.1.6 - Antimetabólitos	15
1.1.7 - Radioterapia	16
1.1.8 - Outros fatores que podem predispor à NM-t	17
1.1.9 - As neoplasias primárias mais frequentes associadas às NM-t	19
2 - SMD/NM secundária após uso de drogas imussupressoras	24
2.1 - SMD/NM secundária pós-aplasia (SMD-AA)	24
2.1.1 - Conceito	24
2.1.2 - Incidência, Etiologia e Fisiopatologia	24
2.2 - SMD/NM secundária após tratamento de doenças auto-imunes	26
2.3 - SMD/NM secundária após transplante de órgãos sólidos	27
3 - Diagnóstico da SMD/ NM secundária	28
3.1 – Diagnóstico da SMD/NM-t	28
3.2 – Diagnóstico da SMD/NM após imunossupressão	38
3.3 - Achados citogenéticos e moleculares	39

3.3.1 - Achados citogenéticos na SMD/NM secundária após uso de drogas antineoplásicas e de radioterapia	41
3.3.2 - Achados citogenéticos na SMD/NM secundária após uso de drogas imunossupressores	50
3.4 - Achados bioquímicos	50
4 - Evolução das SMD/NM-t	51
5- Tratamento das SMD/NM-t	52
III - OBJETIVOS	53
IV - CASUÍSTICA E MÉTODOS	55
1 - Casuística	56
2 - Métodos	56
2.1 - Coleta de dados clínicos	56
2.2 - Achados morfológicos	58
2.2.1 - Hemograma	58
2.2.2 - Mielograma - Análise morfológica do aspirado medular/imprint	58
2.2.3 - Biópsia de medula óssea	60
2.3 - Achados citogenéticos	64
2.3.1 - Procedimentos utilizados para realização de Citogenética Convencional	64
2.3.2 - Citogenética Molecular	65
2.4 - Análise estatística	67
V - RESULTADOS	68
1 - Aspectos clínicos	69
2 - Dosagens bioquímicas	74
3 - Achados morfológicos	75
3.1 - Hemograma	75
3.2 - Achados em aspirado/imprint de medula óssea	76
3.2.1 - Celularidade	76
3.2.2 - Displasia	77
3.2.3 - Contagem diferencial e caracterização da NM-t	79
3.2.4 - Sideroblastos em anel	80
3.3- Achados em biópsia de medula óssea	85

4 - Achados em citogenética	97
5 – Sobrevida e análise prognóstica das variáveis	108
5.1 – Sobrevida global para a população total	108
5.1.1 – Análise univariada para fatores relacionados à sobrevida global	108
5.1.2 – Regressão logística binária para fatores relacionados à sobrevida global	119
5.1.3 – Análise de associação de variáveis	120
VI - DISCUSSÃO	124
VII - CONCLUSÕES	136
VIII - ANEXOS	139
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Anemia aplástica
AAS	Anemia aplástica severa
<i>ALIP</i>	<i>Abnormal localization of immature precursor</i>
<i>AML1</i>	<i>Acute myeloid leukemia 1 gene</i>
AR	Anemia refratária
AREB-T	Anemia refratária com excesso de blastos em transformação
ARSA	Anemia refratária com sideroblasto em anel
BMO	Biópsia de medula óssea
<i>CD</i>	<i>Cluster designation or cluster of differentiation</i>
CFM	Ciclofosfamida
CRDM	Citopenia refratária com displasia de multilinhagem
CSA	Ciclosporina A
CYP	Enzima citocromo P450
DHL	Enzima desidrogenase láctica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPO	Eritropoetina
FAB	Franco-Americano-Britânico
FAB M3	Leucemia promielocítica aguda
FAB M4	Leucemia mielomonocítica aguda
FAB M5	Leucemia monocítica aguda
<i>FISH</i>	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GAL	Globulina antilinfocítica
GAT	Globulina antitimocítica
G-CSF	Fator estimulante de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de granulócitos e monócitos
GST	Enzima glutationa S-transferase
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clínicas
ICT	Irradiação corporal total
IHQ	Imunoistoquímica
<i>IPSS</i>	<i>International Prognosis Score System</i>
IS	Imunossupressão
LH	Doença de Hodgkin/ Linfoma de Hodgkin
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMA-t	Leucemia mielóide aguda relacionada à terapia
LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica
LNH	Linfoma não Hodgkin
MGC	Megacariócitos
<i>MLL</i>	<i>Mixed lineage leukemia gene</i>
MO	Medula óssea
NM-t	Neoplasia mielóide relacionada à terapia
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p53</i>	<i>p53 gene</i>
p53	Proteína p53
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SMD	Síndrome mielodislásica
SMD/AA	Síndrome mielodislásica pós aplasia
SMD/DMP	Síndrome mielodislásica/ Doença mieloproliferativa
SMD/NM	Síndrome mielodislásica/Neoplasia mielóide
SMD/NM-t	Síndrome mielodislásica/Neoplasia mielóide relacionada à terapia
SMD-t	Síndrome mielodislásica relacionada à terapia
SP	Sangue periférico
SS	Síndrome de Sjögren
TCTH	Transplante de células tronco hematopoéticas

TCTH-alo	Transplante de células tronco hematopoéticas alogênico
TSP	Tumores sólidos primários
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos pacientes (%) por sexo e faixa etária	69
Figura 2: Distribuição (%) dos pacientes por doença prévia	71
Figura 3: Frequência (%) dos principais achados em hemograma	75
Figura 4: Principais achados (%) em relação à celularidade no aspirado/imprint de MO	76
Figura 5: Distribuição (%) de displasia e principais achados em aspirado/imprint de MO	79
Figura 6: Frequência (%) dos principais achados na contagem diferencial e na coloração de Perls em aspirado/imprint de MO	80
DISPLASIA EM ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA – Figuras 7 a 12	
Figura 7: Paciente 34 - Blastos. Leishman x 1000	82
Figura 8: Paciente 18 – Dismegacariopose: megacariócito pequeno e bilobado. Leishman x 1000	82
Figura 9: Paciente 14 – Diseritropose: binucleação. Leishman 1000X	83
Figura 10: Paciente 14 – Disgranulopose: núcleo bizarro. Leishman 1000X	83
Figura 11: Paciente 33 – Diseritropose: alterações megaloblastóides e lobulação nuclear. Leishman x 1000	84
Figura 12: Paciente 36 – Diseritropose: lobulação nuclear. Leishman x 1000	84
Figura 13: Distribuição (%) da celularidade global e achados referentes à série megacariocítica em biópsia de MO	86
Figura 13A: Distúrbio de maturação: Distribuição (%) por predominância dos tipos de megacariócitos observados em biópsia de MO	86
Figura 14: Principais achados (%) observados em biópsia de MO	88
HISTOLOGIA DE MEDULA ÓSSEA - Figuras 15 a 33	
Figura 15: Paciente 1: p53 (1+) 400x	90
Figura 16: Paciente 4: p53 (2+) 400x	90
Figura 17: Paciente 14: p53 (3+) 400x	90
Figura 18: Paciente 3: Megacariócitos com distúrbio de maturação e arquitetural, localizado em região peritrabecular H&E 400x	91

Figura 19: Paciente 3: Hipercelularidade, distúrbio de maturação e arquitetural da série eritróide H&E 400 x	91
Figura 20: Paciente 31: Hipercelularidade, distúrbio de maturação e arquitetural da série megacariocítica H&E 200x	92
Figura 21: Paciente 31: Hipercelularidade e distúrbio de maturação da série megacariocítica megacariócitos grandes com lobulação anormal H&E 400x	92
Figura 22: Paciente 1: Fibrose grau 1 400x	93
Figura 23: Paciente 33: Fibrose grau 2 400x	93
Figura 24: Paciente 22: Fibrose grau 3 400x	93
Figura 25: Paciente 16: Hipocelularidade global H&E 100x	94
Figura 26: Paciente 3: Hipercelularidade global H&E 200 x	94
Figura 27: Paciente 39: Ferro (3+) Perls 100x	94
Figura 28: Paciente 34: Células CD 117+ perivascular 200x	95
Figura 29: Paciente 34: Células CD 117+ perinodular 200x	95
Figura 30: Paciente 32: Células CD117+ (> 20%) 400x	95
Figura 31: Paciente 1: Células CD 34+ (1-10%) 400x	96
Figura 32: Paciente 33: Células CD 34+ (10-20%) 400x	96
Figura 33: Paciente 15: Células CD 34+ (> 20%), formando agrupamentos 400x	96
Figura 34: Frequência (%) das anormalidades citogenéticas clonais	98
CARIÓTIPOS – Figuras 35 a 38	
Figura 35: Paciente 9: 46,XX,t(3;21)(q26;q22)[7]/46,XX[2]	102
Figura 36: Paciente 14: cariótipo complexo	103
Figura 37: Paciente 18: 46,XY,del(7)(q22)[16]/46,XY[4]	104
Figura 38: Paciente 34: 45,XY,-7[3]/46,XY,-7+21[16]	105
FISH – Figuras 39 e 40	
Figura 39: FISH centromérico cromossomo 7 (paciente 25)	107
Figura 40: FISH centromérico cromossomo 7 (paciente 1)	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Agentes citotóxicos implicados nas NM-t	12
Tabela 2: Classificação FAB (1985) para SMD <i>de novo</i>	33
Tabela 3: Classificação OMS (1997) para a SMD <i>de novo</i>	34
Tabela 3A: Classificação OMS (2008) para SMD <i>de novo</i>	35
Tabela 4: Alterações cromossômicas numéricas e estruturais mais frequentes em SMD secundária	40
Tabela 5: Anormalidades citogenéticas mais frequentes nas NM-t	42
Tabela 6: Caracterização dos anticorpos utilizados para exame IHQ	63
Tabela 7: Pacientes que realizaram TCTH autólogo para tratamento da doença prévia	71
Tabela 8: Distribuição dos pacientes de acordo com a terapia prévia utilizada	72
Tabela 9: Pacientes que realizaram TCTH alogênico para tratamento da SMD/NM secundária	73
Tabela 10: Cálculo da mediana dos valores do hemograma	75
Tabela 11: Alterações displásicas observadas na série eritrocítica	77
Tabela 12: Alterações displásicas observadas na série granulocítica	77
Tabela 13: Alterações displásicas observadas na série megacariocítica	78
Tabela 14: Positividade da IHQ (BMO) de células precursoras CD34+ e CD117+	88
Tabela 15: Avaliação Citogenética	99
Tabela 16: Sumário das variáveis que mostraram significância estatística ou tendência para sobrevida	110
Tabela 17: Análise por regressão logística binária	119
Tabela 18: Presença de p53 à histologia medular e estudo citogenético	121
Tabela 19: Teste exato de Fisher - análise de associação de variáveis	123

LISTA DE GRÁFICOS

MÉTODO DE KAPLAN-MEIER

Gráfico 1: Estimativa de sobrevida global para o total de pacientes	111
Gráfico 2: Estimativa de sobrevida global para o total de pacientes censurando a data do TCTH alogênico	111
Gráfico 3: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados pela presença ou não de doença oncohematológica prévia	112
Gráfico 4: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados pela presença ou não de aplasia medular prévia	112
Gráfico 5: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados pela realização ou não de TCTH alogênico para terapêutica de NM secundária.	113
Gráfico 6: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados para as dosagens DHL ≤ 480 U/L e DHL > 480 U/L	113
Gráfico 7: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados para as dosagens de ferritina ≤ 1000 ng/mL e ferritina > 1000 ng/mL	114
Gráfico 8: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados para as contagens de plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{L}$ e plaquetas $< 100.000/\mu\text{L}$	114
Gráfico 9: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados para as contagens de blastos $\geq 5\%$ e blastos $< 5\%$ em MO	115
Gráfico 10: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados por detecção pela imunoistoquímica de agrupamentos de células CD117+	115
Gráfico 11: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados pela presença ou não de imunoexpressão positiva de p53 detectado por imunoistoquímica	116
Gráfico 12: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados por detecção pela imunoistoquímica de células CD34+ $\leq 1\%$ e CD34+ $> 1\%$	116

Gráfico 13: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados pela presença ou não de anormalidades citogenéticas clonais	117
Gráfico 14: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados pela presença ou não de complexidade cariotípica	117
Gráfico 15: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados comparando a complexidade cariotípica com a monossomia do cromossomo 7	118
Gráfico 16: Estimativa de sobrevida global para pacientes estratificados por IPSS baixo + intermediário I (risco) e IPSS intermediário II + alto (risco)	118

Resumo

As Síndromes mielodisplásicas (SMD) são doenças clonais da célula progenitora hematopoética, cursando com citopenias, medula óssea displásica e tendência à evolução para leucemia. As SMD secundárias estão associadas a fatores de risco como doenças congênitas (Anemia de Fanconi), doenças hematológicas adquiridas (aplasia medular, HPN), exposição à quimioterápicos (alquilantes, inibidores de topoisomerase II) e radioterapia e substâncias químicas (benzeno, petróleo). Agentes imunossupressores associados ou não a fatores hemopoéticos particularmente utilizados para tratamento da Aplasia medular também se associam à SMD secundária. A OMS recentemente adotou o termo síndrome mielodisplásica/neoplasia mielóide (SMD/NM) relacionada à terapêutica para englobar casos de neoplasias mielóides que preenchem critérios morfológicos não somente de SMD, mas também de leucemia mielóide aguda (LMA) ou neoplasias mieloproliferativas. O objetivo do trabalho foi analisar dados clínicos, morfológicos e citogenéticos de 42 portadores de SMD/NM secundária em uma coorte de pacientes diagnosticados no SH-HCFMUSP no período de 1987 a 2008. Vinte e três pacientes (54,8%) eram homens, com mediana de idade de 53,5 (4-88) anos. 45,2% eram portadores de doenças onco-hematológicas, 26,2% de anemia aplástica, 14,3% de tumores sólidos e 14,3% de outras doenças (auto-imunes e transplante de órgãos sólidos). 33% dos pacientes utilizaram exclusivamente QT, 26% combinação QT e RT, 2% RT isolada e 28% agentes imunossupressores. Cinco (11,9%) pacientes haviam sido submetidos a TCTH autólogo para tratamento de doença oncohematológica prévia. A mediana da latência entre a doença primária e a SMD secundária foi de 85 meses (23- 221 meses). Oito pacientes foram submetidos ao TCTH alogênico aparentado para tratamento da SMD secundária. Anemia, neutropenia, plaquetopenia e blastos circulantes foram observados em 64,3%, 54,8%, 78,6% e 26,2% dos casos respectivamente. Cerca de 1/3 dos aspirados medulares apresentavam hemodiluição, 29,7% apresentavam hipocelularidade global, 62,2% apresentavam contagem de blastos superior a 5% e 14,3% sideroblastos em anel acima de 15%. Displasia da série eritróide, granulocítica e megacariocítica foi observada em 79,4%, 77,1% e 68,2% dos casos respectivamente. A histologia medular realizada em 22 casos revelou hipocelularidade global, *ALIPs* e nódulos linfóides em 9,1%, 23,8% e 40,9% dos casos. A detecção por imunoistoquímica de células CD34>1%, CD117>1%, agrupamento de células CD34+ e de CD117+ e da proteína p53+ foi observada respectivamente em 77,2%, 82,3%, 59%, 29,4% e 33,3% dos casos. Anormalidades clonais foram observadas em 84,3% dos casos, com grande predomínio das não balanceadas (96%), sendo 37% com monossomia 7, 44,4% cariótipos complexos e 18% com outras anormalidades. A mediana de sobrevida global foi de 5,7 meses, pacientes submetidos ao TCTH alogênico para tratamento da SMD/NM secundária tiveram mediana de 40 meses ($p=0,007$). Fatores associados à pior sobrevida incluíram: doença oncohematológica prévia, baixa contagem plaquetária, elevação de DHL e ferritina, presença de células CD117+ agrupadas, imunoexpressão positiva da p53, citogenética anormal, *IPSS* intermediário II ou alto risco. Nenhum parâmetro estudado do aspirado medular se associou à sobrevida. Houve tendência à associação da imunoexpressão positiva de p53 a cariótipo anormal e *IPSS* de maior risco. Não se observou associação entre a presença de *ALIP*, porcentagem de blastos na morfologia medular e células CD34+ e CD117+. Estes dados reforçam a importância da análise citogenética e da imunoistoquímica da biópsia de medula óssea para diagnóstico e prognóstico das SMD secundárias e do TCTH alogênico no seu tratamento. Mais estudos com maior número de casos devem ser realizados para confirmar a importância do escore *IPSS* na SMD secundárias, provavelmente substituindo a porcentagem de blastos ao aspirado medular, pela presença de células precursoras detectadas por imunoistoquímica.

Descritores: Análise citogenética, imunoistoquímica, Síndrome mielodisplásica, neoplasias associadas à terapia, segunda malignidade, medula óssea,

Morphological and cytogenetic bone marrow studies in patients with secondary myelodysplastic syndrome diagnosed at Department of Hematology of Clinical Hospital of São Paulo Medical School

Summary

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal hematopoietic stem cell disorders, characterized by cytopenias, dysplastic bone marrow (BM) and propensity to progress to acute myeloid leukemia. Secondary MDS are associated with risk factors such as congenital disorders (Fanconi's anemia), acquired bone marrow failures, exposure to chemotherapy (alkylating agents, topoisomerase II inhibitors) agents and radiation and chemicals (benzene, petroleum). Immunosuppressive agents associated with hematopoietic growth factors are also associated with secondary MDS. The WHO classification has recently adopted the term therapy-related myeloid neoplasms for cases of myeloid malignancies that fulfill morphological criteria not only for MDS but also for AML or myeloproliferative neoplasms. The aim of the study was to analyze clinical, morphological and cytogenetic features of 42 patients with secondary MDS/MN in a cohort of patients diagnosed at our institution from 1987 to 2008. 23 patients (54.8%) were male, median age 53.5 (4-88) years. 45.2% had primary hematologic malignancies, 26.2% aplastic anemia, 14.3% solid tumors and 14.3% other diseases (autoimmune diseases and solid organ transplantation). 33% had undergone chemotherapy alone, 2% RT alone, 26% both modalities and 28% immunosuppressive agents. Five (11.9%) patients had undergone autologous HSCT for treatment of previous malignancies. The median latency between the primary disease and secondary MDS/MN was 85 (23-221) months. Eight patients underwent allogeneic HSCT (allo-HSCT) for treatment of related secondary MDS. Anemia, neutropenia, thrombocytopenia and peripheral blasts were observed in 64.3%, 54.8%, 78.6% and 26.2%, respectively. BM aspirates was poorly representative in 1/3 of cases, 29.7% global hypocellularity, 62.2% more than 5% of blast counts and 14.3% more than 15% of ring sideroblasts. Dysplasia in erythroid, granulocytic and megakaryocytic series was observed in 79.4%, 77.1% and 68.2%, respectively. Twenty two BM biopsies were performed. Global hypocellularity, ALIP and lymphoid nodules were shown in 9.1%, 23.8% and 40.9%. The immunohistochemistry showed more than 1% of CD34+ and CD117+ cells, clusters of CD34+ and CD117+ and immunoexpression of p53 protein in 77.2%, 82.3%, 59%, 29.4% and 33.3%, respectively. Clonal abnormalities were observed in 84.3% of cases with high prevalence of unbalanced (96%) rearrangements. 37% showed monosomy 7 and 44.4% complex karyotypes. The median overall survival was 5.7 for all patients and 40 months for patients treated with allo-HSCT ($P=0.007$). Hematologic malignancies, low platelet count, serum high LDH and ferritin, detection of CD117+ clusters, positive immunoexpression of p53, abnormal cytogenetics, intermediate-II or high-risk IPSS groups were associated with poor survival. No parameter studied from bone marrow aspirate had impact in survival. p53 expression was associated to abnormal karyotype ($P=0.092$) and IPSS risk ($P=0.054$). There was no association between the presence of ALIP, BM blast counts and immunoexpression of CD34+ and CD117+. Our study shows that cytogenetic analysis and BM immunohistochemistry are very important in diagnosis and prognosis, and that allo-HSCT could improve the survival of secondary MDS/MN. More studies with larger numbers of cases should be conducted to confirm the importance of the IPSS for secondary MDS, probably replacing the bone marrow aspirate blast counts by the immunohistochemistry detection of precursor cells.

Descriptors: Cytogenetic analysis, immunohistochemistry, Myelodysplastic syndromes, therapy-associated neoplasms, second malignancy, bone marrow

I - INTRODUÇÃO

O primeiro caso de síndrome mielodisplásica (SMD) foi provavelmente descrito em 1900 por Von Leube (Von Leube, 1900 – apud Hellström-Lindberg, 2008) que relatou o caso de um paciente com anemia megaloblástica grave que evoluiu para leucemia. Este caso foi seguido por relatos similares de pacientes caracterizados por citopenia em sangue periférico (SP), displasia de precursores hematopoéticos, aumento de blastos em medula óssea (MO) e um significativo risco de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA). Por sua complexidade a SMD recebeu várias denominações no decorrer de décadas (Hellström-Lindberg, 2008). Em 1982 a primeira definição precisa da SMD e sua classificação foi publicada pelo Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), subdividindo-a em 5 subgrupos (Bennett et al., 1982; Nimer, 2008).

A SMD *de novo* representa um grupo heterogêneo de desordem hematológica clonal, originado na célula progenitora hematopoética, caracterizado clinicamente e morfológicamente pela hematopoese ineficaz. A história natural destas doenças nos mostra um espectro clínico extremamente variável que vai de um curso indolente até um curso rápido com progressão para leucemia aguda (Nösslinger et al., 2001). Neste sentido, Greenberg et al. (1997) elaboraram o escore denominado *IPSS* “*International Prognosis Score System*”, o qual utilizando as variáveis porcentagem de blastos, alterações citogenéticas e número de citopenias, estabeleceu subgrupos prognósticos para a SMD *de novo*, com estimativa de sobrevida e evolução para a LMA.

Em 1997, um grupo de morfologistas e clínicos reunidos sob a coordenação da Organização Mundial de Saúde (OMS), iniciou os estudos para uma nova classificação. A classificação OMS teve como princípio básico utilizar não somente as características morfológicas, mas todas as informações disponíveis, incluindo-se

assim a genética, a biologia molecular, e as características clínicas para uma melhor definição e especificação da doença. A classificação OMS divide a SMD em oito subgrupos, definindo-se também a classificação para mielodisplasia/doença mieloproliferativa. Nesta classificação está descrito o uso de agentes mielotóxicos como os alquilantes/radiação e o de inibidores topoisomerase II e o subsequente aparecimento de síndrome mielodisplásica terapia relacionada (SMD-t) e/ou leucemia mielóide terapia relacionada (LMA-t) (Harris et al., 1999; Vardiman et al., 2002). Neoplasia mielóide terapia relacionada (NM-t) é o termo recentemente proposto pela OMS (2008), o qual compreende doenças previamente descritas como Síndrome mielóide displásica relacionada à terapia (SMD-t) e Leucemia mielóide aguda relacionada à terapia (LMA-t) (Larson , 2009).

A SMD pode surgir como doença primária (*de novo*) ou secundária. As Síndromes mielodisplásicas/Neoplasias mielóides (SMD/NM) secundárias podem surgir a partir de circunstâncias que envolvem o contato acidental com agentes reconhecidamente mielotóxicos ou por uso de drogas antineoplásicas e/ou imunossupressoras ou ainda pode ser decorrente de alterações genéticas constitucionais do indivíduo predispondo-o à doença (Luna-Fineman et al., 1995; Huebner et al., 2000; Naschitz, 2001; Jesus et al., 2006).

Este trabalho se propõe a estudar os pacientes que se expuseram ao uso de drogas antineoplásicas e/ou imunossupressoras que desenvolveram SMD/NM secundárias e que foram diagnosticados e tratados no Serviço de Hematologia do HC-FMUSP no período de 1987 a 2008.

II - REVISÃO DA LITERATURA

1- SMD/NM SECUNDÁRIA APÓS USO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS

1.1-SMD-t/NEOPLASIA MIELÓIDE RELACIONADA À TERAPIA

1.1.1- Conceito

A SMD-t/Neoplasia mielóide relacionada à terapia (SMD/NM-t) pode ocorrer tardiamente como complicação de exposição prévia citotóxica, ou seja, terapia para doença prévia neoplásica. É uma doença geralmente letal, onde a única alternativa de cura é o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TCTH-alogênico) (Larson, 2009).

1.1.2- Etiologia e Fisiopatologia

A patogênese permanece incerta, mas há hipóteses que a origem das SMD/NM-t seja consequência de eventos mutacionais induzidos por terapia citotóxica (químio/radioterapia). Alguns indivíduos podem ter uma predisposição genética devido ao polimorfismo de genes que afetam o metabolismo das drogas ou o mecanismo de reparo do DNA (Vardiman et al., 2008). O estudo da predisposição genética tem sido uma área de grande interesse nos últimos anos. A interação entre os efeitos genotóxicos da quimioterapia e da radiação ionizante no paciente é influenciada entre outros, pelo polimorfismo genético das enzimas de metabolização de drogas e do sistema de reparo de DNA, os quais podem aumentar a susceptibilidade individual a esses agentes (Leone et al., 2007; Hake et al., 2007).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que mais de 90% dos cânceres estão relacionados a fatores ambientais, como o tabaco e a dieta, e que diversos compostos

químicos parecem interagir com as macromoléculas celulares e iniciar o processo tumoral (Raunio et al., 1995).

As neoplasias secundárias são eventos que ocorrem em cerca de 7% dos pacientes que trataram previamente uma neoplasia primária. (Felix et al., 1998).

Apesar de estabelecido o envolvimento da quimioterapia e da radioterapia nas leucemias secundárias, 20-30% dessas doenças se desenvolveram na ausência desses eventos, sugerindo que a predisposição genética e os fatores ambientais também podem contribuir para o processo neoplásico (Leone et al., 2007).

Lopes et al. (2001) pesquisaram a presença do gene híbrido V λ /J β em linfócitos de sangue periférico de pacientes pediátricos que trataram LLA e tumor sólido. Este rearranjo é formado pelo segmento V do TCR (receptor de celular T) no locus gama (7p14-15) e do segmento J do TCR (receptor de células T) no locus beta (7q35), podendo estar presente em baixos níveis nos linfócitos de indivíduos normais, mas segundo dados de literatura pode também estar relacionado com o desenvolvimento de neoplasias *de novo* ou associadas ao aparecimento de neoplasias secundárias. O estudo foi realizado antes, durante e após quimioterapia, observando-se a frequência mais elevada durante o tratamento quimioterápico. Sugeriu-se então que agentes quimioterápicos poderiam induzir o rearranjo V λ /J β , sendo transitório na maioria dos casos. Entretanto, seria indicado determinar a exata relação entre a persistência do rearranjo e a ocorrência de leucemia secundária.

Entre os anos de 1992 e 1996, o grupo italiano realizou estudo de 179 pacientes diagnosticados com NM-t, os quais haviam recebido diagnóstico de doença prévia maligna. Destes pacientes, 67% receberam tratamento com quimioterapia (QT) e radioterapia (RT), enquanto 33% receberam tratamento exclusivamente cirúrgico (grupo com idade mais elevada). Demonstrou-se que o tempo de latência entre o

diagnóstico da doença prévia e secundária, a taxa de remissão e a sobrevida desses pacientes foram similares. Considerando a alta taxa de pacientes que receberam tratamentos exclusivamente cirúrgicos em suas doenças prévias, não pode ser excluída a possibilidade de pacientes com câncer possuir aumento na predisposição para leucemias (Leone et al., 1999).

1.1.2.1- Polimorfismo genético das enzimas de metabolização de drogas

As enzimas de metabolização de drogas são responsáveis pela biotransformação e detoxificação de compostos químicos estranhos ao organismo, denominados xenobióticos, as mesmas têm função de proteção contra danos celulares, sendo classificadas de acordo com a sua ação em: enzimas de fase I, fase II ou fase III. Estas enzimas podem estar presentes em condições basais ou aumentadas quando expostas aos xenobióticos.

A fase I é realizada principalmente pelas enzimas da superfamília do Citocromo P-450 (*CYP*), que inclui as reações de oxidação, redução ou de hidrólise. Desta forma as drogas podem ser ativadas, inativadas ou terem inalteradas as suas atividades. Estas enzimas são encontradas em abundância no fígado, trato gastrointestinal, pulmão e rins.

A fase II é realizada por superfamílias de enzimas, incluindo sulfotransferases, glucuronosiltransferases, *NAD(P)H*: quinona-oxiredutase (NQO), epóxido-hidrolases (*EPH*), glutathione S-transferases (*GST*) e N-acetiltransferases (*NAT*) (Bozina, et al., 2009). Durante a fase II, que envolve reações de conjugação, quase sempre ocorre inativação total do xenobiótico, geralmente realizado pelas enzimas da família das

GSTs e NATs. Quando produtos formados na fase I não sofrem inativação ou são ativados a substâncias mais reativas pelas enzimas de fase II, estes intermediários reativos podem se ligar covalentemente ao DNA, agindo como agentes mutagênicos (Felix et al., 1998; Hein et al., 2006).

As epipodofilotoxinas, etoposide e teniposide, assim como, a ciclofosfamida, a ifosfamida, a vinblastina, e a vindesina são substratos para metabolismo de *CYP3A*, a enzima mais abundante da superfamília *CYP-450* no fígado humano. A variante *CYP3A4* afeta a produção de metabólitos resultantes das epipodofilotoxinas, o qual é precursor de potencial dano ao DNA (Felix et al., 1998). Sendo assim, indivíduos com genótipo *CYP3A4* podem ter aumentada a produção de intermediários reativos com alto grau de toxicidade ao DNA, aumentando assim o risco das NM-t (Leone et al., 2007).

O Benzeno é o modelo do agente carcinógeno nas NM-t, em particular, devido aos seus efeitos tóxicos no sangue e na medula óssea. O benzeno é metabolizado pela *CYP2E1*, enzima hepática de fase I, em óxido de benzeno, o qual espontaneamente forma o fenol, e mais uma vez metabolizado pela *CYP2E1* é transformada em hidroxiquinona. A hidroxiquinona é um potente genotóxico que pode ser convertido pela enzima *NQO1* para um metabólito hidroxil menos tóxico. Defeitos na via dessa enzima também causam aceleração no encurtamento dos telômeros e uma interferência na hematopoese. A variante *NQO1*-Pro187Ser, leva a uma instabilidade proteica com perda de função aumentando assim os danos do estresse oxidativo. A frequência dessa variante é maior entre pacientes de leucemia do que o esperado na população em geral (Larson et al., 1999), e tem sido associada também às NM seguidas de quimioterapia (Voso et al., 2007).

A Glutathione S-transferase (*GST*), possui seis subfamílias conhecidas como: alpha

(*GSTA*), mu (*GSTM*), omega (*GSTO*), pi (*GSTP*), theta (*GSTT*) e zeta (*GSTZ*). São as enzimas mais importantes da fase II de detoxificação por inativar alguns carcinógenos, drogas terapêuticas, toxinas ambientais e produtos de estresse oxidativo (Voso et al., 2007; Moyer et al., 2007).

Muitas drogas citotóxicas como adriamicina, BCNU, bleomicina, clorambucil, cisplatina, etoposide, melfalano, mitomicina C, mitoxantrone, vincristina e ciclofosfamida são inativadas pela *GST*. A *GSTP1* variante, (Ile/Val variante) ou (pacientes *GSTP1 codon 105Val* alelo), com redução de atividade enzimática, tem sido associada ao aumento do risco de NM-t para pacientes que se expuseram a tratamentos com quimioterapia (Leone et al., 2007).

Os polimorfismos genéticos envolvendo deleções da *GSTT1*, e *GSTM1*, denominados respectivamente de *GSTT1-null* e *GSTM1-null* têm sido relacionados com a perda da atividade enzimática e com a incidência das neoplasias mielóides.

Quando o carcinógeno não é detoxificado, ele induz a formação de aductos de DNA, mas a integridade genômica ainda pode ser restaurada através do sistema de reparo do DNA (Voso et al., 2007).

1.1.2.2- Sistema de Reparo do DNA

Outro importante mecanismo relacionada às SMD/NM-t são os defeitos no sistema de reparo de DNA. O dano em fita dupla do DNA é o evento de maior importância, podendo determinar a morte celular ou levar a perda de material genético, causando deleções ou translocações. As radiações ionizantes, assim como os quimioterápicos, como a bleomicina e os inibidores de topoisomerase II podem causar este tipo de alteração (Daulny e Tansey, 2009).

Os danos em dupla fita de DNA são predominantemente reparados nas células dos mamíferos por dois métodos:

- Recombinação homóloga (RH), onde a quebra da fita dupla de um cromossomo é reparada com o uso de informação do cromossomo homólogo intacto.
- Reparo por união terminal não-homóloga, quando há a união das extremidades de cromossomos diferentes, translocando fragmentos de um cromossomo para outro, e removendo vários pares de base do ponto de quebra na fase final do processo.

Devido à complexidade do sistema de reparo da fita dupla, este processo pode se tornar mutagênico (Goodsell, 2005).

A RAD51 é uma proteína importante no processo de recombinação homóloga, que interage com BRCA1 e BRCA2 e é essencial na viabilização da estabilidade genômica. O polimorfismo *RAD51-G135C* está associado a superexpressão da proteína *RAD51* e aumento do reparo do DNA. No processo de recombinação homóloga, a RAD51 reage e é estabilizada por XRCC3. Os polimorfismos *RAD51-G135C* e *XRCC3-Thr241Met* têm sido associados ao aumento de risco de LMA e um risco ainda maior para LMA-t (Seedhouse et al., 2004).

O reparo de base malpareada (“mismatch repair”) é o recurso utilizado para corrigir os erros de replicação. Nos seres humanos o complexo de proteínas MutS (MSH2 e MSH6) e MutSα (MSH2 e MSH3) reconhecem e se ligam a base malpareada ou em alças formadas (“loops” de DNA). Subsequentemente recrutam proteínas do complexo MutLα (MLH1 e PMS2) facilitando a degradação e resíntese da região malpareada. Muito embora a alteração de qualquer proteína possa causar falha nesse sistema de reparo, o processo é mais amplamente afetado por anormalidades das proteínas MSH2 ou MLH1. A instabilidade de microssatélites, que é uma forma de

falha do “mismatch repair” tem sido citada em trabalhos que mostram a presença desta anormalidade associada a SMD-t e LMA-t (Rund et al., 2005).

1.1.3- Incidência

A quimioterapia/radioterapia como parte de um esquema de tratamento em pacientes de câncer tem elevado a taxa de cura, porém a intensificação da quimioterapia aliada à irradiação corporal total (ICT) e ao transplante autólogo de célula-tronco hematopoética (TCTH-autólogo) como suporte no tratamento tem aumentado a taxa de incidência das NM-t (Kröger et al., 2009).

As NM-t somam de 10 – 20% de todos os casos de LMA, SMD e SMD/SMP. A incidência entre os pacientes tratados com agentes citotóxicos varia de acordo com a estratégia do tratamento da doença prévia. Qualquer grupo de idade pode ser acometido, mas o risco associado ao uso de agentes alquilantes ou radiação geralmente aumenta com a idade, enquanto o risco para aqueles pacientes tratados com inibidor de topoisomerase II é similar para todas as idades. Os agentes citotóxicos comumente implicados nas NM-t estão relacionados na tabela 1 (Vardiman et al., 2008).

Tabela 1: Agentes citotóxicos implicados nas NM-t (Vardiman et al., 2008)

Agentes Alquilantes

Melfalano, ciclofosfamida, mostarda nitrogenada, clorambucil, bulsufano, carboplatina, cisplatina, dacarbazina, procarbazina, carmustina, mitomicina C, thiotepa, lomustine, etc.

Terapia de radiação ionizante

Grandes áreas de irradiação, incluindo medula óssea ativa

Inibidor de topoisomerase II

Etoposide, teniposide, doxorubicina, daunorubicina, actinomicina, mitoxantrone, amsacrina.

Outros

Antimetabólitos: tiopurinas, micofenolato, fludarabina.

Agentes antitubulínicos (usualmente em combinação com outros agentes): vincristina, vinblastina, vindesina, paclitaxel, docetaxel.

1.1.4- Os agentes alquilantes

Os agentes alquilantes quimioterápicos possuem em comum a propriedade de se tornarem eletrófilos fortes, através da formação de intermediários de íon carbônico ou de complexos de transição entre as moléculas-alvo. Estas reações resultam na formação de ligações covalentes pela alquilação de vários componentes nucleofílicos, como os grupos fosfato, amino, sulfidril, hidroxila, carboxila e imidazol. Os efeitos quimioterápicos e citotóxicos são diretamente relacionados com a alquilação do DNA (DeVita e Chu, 2008).

A **mecloretamina HCL** é usada principalmente no esquema de quimioterapia de combinação MOPP (mecloretamina, oncovin (vincristina), procarbazina e prednisona), o qual foi o protótipo de tratamento em pacientes com linfoma de Hodgkin e outros tumores sólidos (Canellos, 2001).

A **ciclofosfamida** possui um espectro clínico muito amplo. É componente essencial em esquemas para o tratamento de linfomas não-Hodgkin. Frequentemente é usado em combinação com metotrexato (ou doxorrubicina) e **fluorouracil** como terapia adjuvante após câncer de mama. Devido a sua importante propriedade imunossupressora tem sido usado no controle da rejeição de órgão transplantado e em doenças com reatividade imune alterada. A ciclofosfamida tem efeito dose dependente (McCarthy et al., 1998; Huebner et al., 2000).

A **ifosfamida** é um análogo da ciclofosfamida, é utilizada em combinação com outras drogas para câncer testicular de células germinativas e é amplamente usada para tratar sarcomas pediátricos e de adultos. É um componente comum dos esquemas de quimioterapia com altas doses usadas na salvação de medula óssea ou células primordiais (Josting et al., 2003; Singer et al., 1998).

O **melfalano** com a facilidade da administração oral tornou-se útil no tratamento do mieloma múltiplo (Barlogie et al., 2008).

O **clorambucil** é a mostarda nitrogenada de ação mais lenta em uso clínico. É agente padrão para pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) e macroglobulinemia de Waldenström) (Morrison et al., 2002).

O **bulsufano** tem efeito benéfico no tratamento de doenças mieloproliferativas crônicas, incluindo policitemia vera e mielofibrose com metaplasia mielóide. Altas doses de busulfano foram usada eficazmente em combinação com altas doses de ciclofosfamida para condicionamento de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e para o transplante de medula óssea (Scott e Sandmaier, 2006; Ho et al., 2004).

A **carmustina (BCNU)** tem resposta importante no tratamento da doença de Hodgkin, e taxa de resposta menor nos linfomas e mielomas. Por sua capacidade de

atravessar a barreira hemato-encefálica, a carmustina é usada como componente do tratamento dos astrocitomas malignos e tumores metastáticos do cérebro. Respostas benéficas foram descritas em pacientes com melanoma e tumores gastrintestinais (Garside et al., 2007; Josting et al., 2000)

A **lomustina (CCNU)** tem resposta benéfica para tumores cerebrais primários, melanoma e cânceres gastrintestinais (Chamberlain e Raiser, 2009)

A **Dacarbazina (DTIC)** é empregada em esquemas de combinação para o tratamento de melanoma, doença de Hodgkin, e de sarcomas em adultos (Serrone et al., 2000).

1.1.5- Inibidores de topoisomerase II

A **etoposida (VP-16)** e a **teniposida (VM-26)** são semi-sintéticos derivados das podofilotoxinas e mostram significativa atividade terapêutica em várias neoplasias, incluindo leucemia na infância, carcinomas de pequenas células de pulmão, tumores testiculares, doença de Hodgkin e linfomas de grandes células. Diferente da podofilotoxina, não param as células em mitose, em vez disso, estes compostos formam um complexo quartenário com topoisomerase II e DNA. Este complexo resulta em quebras de DNA bifilamentar, mas a passagem do filamento e a reparação da quebra que normalmente seguem-se a ligação de topoisomerase ao DNA são inibidos pela droga. A enzima permanece ligada à extremidade livre do filamento quebrado de DNA, levando ao acúmulo de quebras e morte celular. As células na fase S (período síntese de DNA) e G₂ (período pré-mitótico) do ciclo celular são mais sensíveis à etoposida e à teniposida (Hawkins et al., 1992; Smith et al., 1999).

1.1.6- Antimetabólitos

Os antimetabólitos são uma classe de agentes quimioterápicos estruturalmente semelhantes aos compostos naturais encontrados no nosso organismo para síntese do DNA. São eles os análogos do ácido fólico, de purina ou de pirimidina. Estes bloqueiam bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, sua ação é restrita a fase S do ciclo celular. A **Azatioprina** é um derivado da 6-mercaptopurina, usada como agente imunossupressor. Muitas tentativas foram realizadas para modificar a estrutura desses análogos com o intuito de melhorar seus índices terapêuticos ou sua seletividade. A azatioprina pode reagir com compostos sulfidrílicos como o glutatión, de tal forma a servir como uma pró-droga permitindo a liberação lenta de mercaptopurina nos tecidos. Dessa forma apresentando maior atividade imunossupressora do que a mercaptopurina. Nos últimos 20 anos a azatioprina tem sido um dos principais agentes utilizados na prevenção de rejeição de transplantes (Huebner et al., 2000).

A **fludarabina fosfato** é um antimetabólito que inibe a DNA polimerase, DNA primase e ribonucleotídeo redutase, e é incorporado ao DNA e ao ácido ribonucleico (RNA). A fludarabina fosfato é usada principalmente em pacientes com LLC, e em casos de linfomas de células B refratários à terapia padrão. A fludarabina é um análogo de purina que, como monoterapia tem atividade significativa no tratamento de LLC e de LNH indolente. É raro o relato da ocorrência de leucemias secundárias quando a fludarabina é utilizada como monoterapia, porém quando utilizada em combinação com agentes alquilantes como a ciclofosfamida, parece haver um efeito sinérgico na inibição no sistema de reparo do DNA, aumentando o risco do desenvolvimento das NM-t (Tam et al., 2006). A associação da fludarabina com o clorambucil também parece aumentar o risco para as NM-t. Pacientes com LLC

tratados com fludarabina associada a alquilantes evoluíram para LMA-t, com prognóstico desfavorável e mediana de sobrevida estimada em 3,5 meses (algumas semanas até 10,1 meses) (Morrison et al., 2002). Estudos demonstraram que 8/202 (4%) pacientes com Linfoma indolente estágio IV, que receberam como terapia inicial a combinação de fludarabina, mitoxantrone e dexametasona, evoluíram para NM-t no período de latência com mediana de 42 meses (6-70 meses) (McLaughlin et al., 2005).

1.1.7- Radioterapia

O risco de LMA ocorre em função do número de mutações acumuladas em uma mesma célula progenitora. Apesar da radiação ionizante ser fator que contribui neste processo, estudos mostram que pacientes submetidos à radioterapia isolada, sem associação com agentes alquilantes parecem não apresentar aumento significativo de leucemias secundárias (Leone et al., 1999). O efeito leucemogênico da radiação é dependente da dose e do tempo de exposição à radiação ionizante. Os efeitos mutagênicos foram avaliados em animais, em sobreviventes de exposição de bomba atômica e em portadores de espondilite anquilosante que se submeteram a tratamento radioterápico. As baixas doses, porém frequentes e lineares, mostraram *in vitro* estar mais associadas com a indução de aberrações cromossômicas do que a alta dose de radiação ionizante (Alessandrino et al., 2001).

Pacientes com doença de Hodgkin têm sido os mais citados no desenvolvimento da segunda neoplasia, hematológicas ou não-hematológicas. A LMA secundária tem se desenvolvido com incidência de 3 a 7% destes pacientes que receberam radioterapia no sistema linfático e que foram expostos à quimioterapia. Alguns estudos mostram que o tempo de latência é em média 5,5 anos (3 meses - 21 anos) (Lopes et al., 2000).

A radioterapia como alternativa terapêutica antes de transplante ou o uso de altas doses de QT no condicionamento tem sido relacionada com o aumento da incidência de NM-t entre pacientes com doença de Hodgkin (Josting et al., 2003).

1.1.8- OUTROS FATORES QUE PODEM PREDISPOR À NM-t

O uso do **G-CSF**. Os fatores de crescimento hematopoéticos recombinantes são uma família de glicoproteínas que agem na proliferação, diferenciação, sobrevivência da célula precursora hematopoética e progenitores celulares e também nas funções de células maduras. Dentre estes fatores, estão o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) e o fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF). Estes têm mostrado eficácia na redução da neutropenia febril quando administrados imediatamente após a quimioterapia e como terapia de suporte para pacientes que se submeteram ao transplante de medula óssea (Gómez Raposo et al., 2006; Frankfurt e Tallman, 2007). O tratamento com G-CSF e GM-CSF como parte da terapia antileucêmica pode aumentar a destruição de células por levá-las à fase S do ciclo celular, onde ocorre a replicação do DNA. Ao mesmo tempo, a terapia com fator de crescimento pode pelo menos, em teoria, acelerar o índice de recidiva de leucemias, por estimular células precursoras malignas (Goodman & Gilman, 1996). A estimulação da proliferação e diferenciação celular vista *in vitro* tem sido a base para a utilização desses fatores no tratamento de pacientes jovens com LMA que não possuem alterações em seus cariótipos. (Frankfurt e Tallman, 2007).

O **transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) autólogo** possui potencial curativo para uma variedade de doenças hematológicas, malignas ou não. São tipicamente reservados para doenças associadas a alto risco de recaídas seguidas

de quimioterapia convencional (Majhail, 2008). As NM-t são doenças que têm sido reconhecidas com certa frequência e consideradas potencialmente sérias complicações após TCTH-autólogo para pacientes portadores de doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e mieloma múltiplo. A ocorrência dessas doenças depende da variedade dos fatores de risco como a idade no momento do transplante, tipo de quimioterapia (especialmente agentes alquilantes) e intensidade (número de ciclos) aliada à área corporal total irradiada em regime de condicionamento e as alterações citogenéticas e morfológicas prévias ao transplante (Laurenti et al., 2002; Sevilla et al., 2002). Polimorfismo dos genes que codificam enzimas responsáveis pela metabolização das drogas e o mecanismo de reparo de DNA também têm sido reconhecidos no envolvimento da leucemogênese pós TCTH-autólogo (Hake et al., 2007). Aumento no risco de NM-t após alta dose de terapia e TCTH-autólogo para tratamento de linfomas tem sido descrito com incidências variáveis entre 1 a 12%. Em decorrência disso, o Grupo Alemão de Estudo dos linfomas de baixo grau desenvolveu um estudo randomizado comparando pacientes que se submeteram ao TCTH-autólogo, com pacientes que usaram interferon alfa (IFN- α) na manutenção de linfoma indolente. O risco de desenvolver neoplasia hematológica secundária no período de 5 anos para pacientes que se submeteram ao transplante foi estimado em 3.8%, enquanto que para o segundo grupo foi de 0,0% ($p=0,0248$) (Lenz et al., 2004). As SMD-t e LMA-t têm sido observadas entre 5 a 15 % dos pacientes que se submeteram ao TCTH- autólogo e tem ocorrido em período de latência de 2 a 5 anos, enquanto que essas doenças são extremamente raras como consequência de TCTH alogênico (Majhail, 2008).

1.1.9- AS NEOPLASIAS PRIMÁRIAS MAIS FREQUENTES ASSOCIADAS ÀS NM-t

A incidência das NM-t vem aumentando nos últimos anos paralelamente ao avanço da quimioterapia, assim como os regimes de condicionamento relacionados aos transplantes de MO. Tem sido observado risco aumentado de NM-t em pacientes seguidos por longa data com doenças linfóides, os quais receberam altas doses de quimioterapia/radioterapia com suporte de TCTH-autólogo (Kröger et al., 2003).

A taxa de mortalidade de todos os tipos de câncer decaiu 1,1% no período de 1993 a 2002 nos Estados Unidos, e conseqüentemente houve um aumento do número de pacientes curados, porém com risco aumentado de desenvolver NM-t, sendo as doenças primárias mais frequentemente envolvidas doença de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin, câncer de mama no adulto e a LLA e tumores do sistema nervoso central em crianças (Leone et al., 2007).

A terapia para mieloma múltiplo, policitemia vera, cânceres de órgãos sólidos como pulmão, ovário, trato gastrointestinal, testículo e tecidos moles também podem ser associados a subsequente desenvolvimento de NM-t (Giles e Koeffler, 1994).

AS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

- **Linfoma não Hodgkin-** Tratamentos padronizados para Linfoma não-Hodgkin (LNH), o qual inclui a prednisona ou regimes que incluem a mecloretamina, procarbazona, o clorambucil com dosagem cumulativa de 1300 mg ou maior, estão associados com o aumento do risco de desenvolver SMD-t/LMA-t. Os regimes

incluindo a ciclofosfamida nesta doença parece não ter uma significância no aumento do risco para SMD-t/LMA-t (Leone et al., 1999). Estas doenças secundárias surgem em média 5 a 7 anos após exposição. Os fatores de risco incluem: idade, exposição prolongada ao agente alquilante e exposição a ICT. Em média, mais de 10% dos pacientes com LNH que seguem um tratamento convencional ou usam altas doses de terapia e se submetem ao TCTH-autólogo podem desenvolver SMD-t/LMA-t num período de 10 anos a partir da doença primária (Armitage et al., 2003).

▪ **Doença de Hodgkin-** A incidência de NM-t parece aumentar proporcionalmente em relação ao total da dose de alquilantes usados no esquema de tratamento da doença de Hodgkin (Alessandrino et al., 2001). O regime MOPP (mecloretamina, vincristina (oncovin), procarbazina e prednisona) possui uma significativa toxicidade aumentando o risco de leucemia aguda devido aos agentes alquilantes, enquanto que o ABVD (doxorrubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina), introduzido em 1975 como alternativa de terapia para os casos de doença de Hodgkin que falharam após o MOPP, tem a vantagem de ser menos tóxica à célula progenitora hematopoética e as células germinativas (Josting, 2005). O regime BEACOPP (bleomicina, etoposide, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona), introduzido pelo grupo alemão é uma alternativa de terapia para doença de Hodgkin. O tratamento escalonando com ciclofosfamida (BEACOPP escalonado) tem sido associado à alta toxicidade hematológica. (Canellos, 2001; Josting, 2005). O uso em primeira linha do BEACOPP escalonado parece estar associado a maior risco de LMA secundária quando comparados com protocolos mais antigos que incluem COPP/ABVD ou COPP/ABV/IMEP (ifosfamida, metotrexate, etoposide e prednisona) (Josting et al., 2003). Quando no regime MOPP, a mecloretamina é substituída pela ciclofosfamida

(COPP) há uma significativa redução do risco de leucemia secundária (Leone et al., 1999).

A literatura sobre NM-t em sua grande parte refere-se a pacientes adultos. No entanto, essa patologia tem se mostrado de importância na infância, afetando no mínimo 1% dos pacientes de neoplasias pediátricas. Dos pacientes com doença de Hodgkin na infância, no mínimo 4% desenvolvem NM-t (Rubin et al., 1991).

▪ **Discrasia das células plasmáticas** - A mediana de sobrevida no mieloma múltiplo, antes da introdução de agentes alquilantes era estimada em um ano. Desde a introdução do melfalano (M) com a prednisona há cerca de 40 anos atrás, esta combinação tem sido muito utilizada para pacientes com mieloma. O melfalano é usualmente administrado na dose de 0.25mg/Kg/dia por 4 dias, com 60 mg/m² de prednisona a cada 4 a 6 semanas, dependendo da tolerância hematológica. Apesar da introdução do melfalano marcar um avanço importante na terapia do mieloma, ao longo do tempo modificações se fizeram necessárias, surgindo outras combinações com o melfalano. Ciclofosfamida (C), prednisona (P), carmustina (BCNU) (B), vincristina (V), e adriamicina (A) têm sido empregadas até o presente momento, onde as associações mais comuns são: VBMCP (protocolo M-2), BMCP, VCMP, VBAP e VCAP (San Miguel et al., 1999).

A duração da quimioterapia inicial, bem como a manutenção depende da resposta do paciente. A manutenção da quimioterapia aumenta o risco do desenvolvimento das NM-t. Para pacientes com mieloma múltiplo a estimativa do risco cumulativo é acentuada, e já foi relatado em até 17% em 50 meses (Bergsagel, 1985).

▪ NEOPLASIAS DE ÓRGÃOS SÓLIDOS

A quimioterapia e/ou a radioterapia de pacientes com tumores sólidos primários (TSP) pode resultar em consequente desenvolvimento de malignidade secundária incluindo a SMD-t e LMA-t. Particularmente em câncer de mama são descritas grandes heterogeneidades na incidência e no tempo de ocorrência. Estas diferenças são no mínimo, em parte relacionadas pela administração de diferentes agentes quimioterápicos e diferentes dosagens (Abdelhameed et al., 2008).

▪ **Câncer de mama** - No tratamento do câncer de mama os agentes alquilantes e os inibidores de topoisomerase são convencionalmente usados, resgatando cerca de um terço das mulheres que eventualmente morreriam por metástase do câncer da mama. No entanto, no período de 10 anos, a incidência das LMA e SMD secundárias pode alcançar índice de aproximadamente 1,5%, e o risco cumulativo aumenta de 0,25 para 1% nos primeiros 8 anos após o tratamento (Park et al., 2005). O aumento do risco da leucemia em pacientes com câncer de mama, os quais foram tratados com agentes alquilantes, especialmente o melfalano tem sido bem documentado. O uso de quimioterapia adjuvante para o tratamento do câncer de mama tem sido estendida para pacientes com nódulos positivos até pacientes de baixo risco. Mais recentemente, os inibidores de topoisomerase II, incluindo as antraciclina (daunorrubicina, doxorubicina e epirubicina) têm se demonstrado mais eficaz que os agentes alquilantes, enquanto as antracenedionas (mitoxantrone) demonstrou sua eficácia no câncer de mama metastático, o qual foi utilizado em toda a Europa durante os anos de 1990 para tratamento de câncer de mama localizado. Ambas têm sido associadas à ocorrência de LMA e SMD secundárias (Le Deley et al., 2007).

▪ **Câncer de ovário** - Atualmente a combinação da cisplatina com a carboplatina é o tratamento de escolha para câncer de ovário, anteriormente tratado entre outros com o melfalano. Um grande estudo controle conduzido por Travis et al. (1999) analisou uma coorte de 28.971 mulheres com câncer de ovário invasivo nos Estados Unidos, Dinamarca, Finlândia e Suécia. A NM-t ocorreu insidiosamente, em média, 4 anos após o diagnóstico do câncer de ovário. Este estudo revelou associação significativa entre os agentes alquilantes, particularmente melfalano e os compostos de platina com a NM-t. A adição da radioterapia para os pacientes tratados com derivados da platina aumentou o risco relativo das NM-t de 6,5 para 8,1 vezes. Uma dose maior cumulativa de cisplatina também foi associada a um aumento do risco das NM-t (See et al., 2006).

▪ **Câncer testicular** - Uma grande parte de pacientes com câncer testicular tem a possibilidade de cura através de radio-quimioterapia, incluindo o uso de inibidores de topoisomerase II e cisplatina. A radioterapia quando aplicada na ausência da quimioterapia está associada a risco cumulativo de 3 vezes elevado para leucemias, aumentando de acordo com o aumento da dose de radiação. O risco relativo estimado para leucemia para dose cumulativa de 650 mg de cisplatina, a qual comumente faz parte de esquemas terapêuticos para tratamento de câncer testicular é de 3,2. O aumento da dose para 1000 mg tem sido relacionado com aumento do risco para 6 vezes. Nesses casos o aumento do uso de etoposide parece não contribuir para o risco das leucemias secundárias (Leone et al., 2007).

2. SMD/NM SECUNDÁRIA APÓS USO DE DROGAS IMUSSUPRESSORAS

2.1- SMD/NM SECUNDÁRIA PÓS-APLASIA (SMD-AA)

2.1.1- Conceito

Pacientes com longa sobrevida após o diagnóstico de anemia aplástica apresentam aumento do risco de desenvolver doenças clonais como a Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e as NM-t. Admite-se que pelo menos em uma parcela dos casos, o clone anormal seja preexistente (Bagby et al., 2004).

2.1.2- Incidência, Etiologia e Fisiopatologia

A SMD-AA está relacionada ao uso de imunossupressores para tratamento da anemia aplástica. O tratamento da AA inclui imunossupressão e TCTH-alogênico, na dependência da idade, gravidade e presença de doador relacionado. O tratamento não substitutivo inclui andrógenos, globulina antitimocítica (GAT), globulina antilinfocítica (GAL), ciclosporina A (CSA), altas doses de ciclofosfamida ou corticosteróides, e G-CSF, produzindo melhoras hematológicas em grande parte dos pacientes (Teramura et al., 1996; Bagby et al., 2004; Gurion et al., 2009). A imunossupressão é o principal recurso para os pacientes que não são elegíveis ao TCTH-alogênico. Para os pacientes com AA grave, a terapêutica isolada ou combinada de GAT/GAL com CSA tem melhorado a resposta e consequentemente a taxa de sobrevida desses pacientes, porém elevando o risco de desenvolvimento de doença clonal. (Young et al., 2000). O desenvolvimento de doença clonal secundária associada ao tratamento com imunossupressores é bem documentado, sendo relatada em 5-10% de pacientes com AA tratados antes da era dos fatores de crescimento. A

associação de imunossupressor com G-CSF elevando o risco de evolução para SMD/NM-t tem sido referido em alguns estudos (Gurion et al., 2009).

A SMD-AA pode ocorrer mais rapidamente em crianças do que em adultos, geralmente dentro dos três primeiros anos do diagnóstico da aplasia (Hasle e Passmore, 2003). Estudo em crianças aplásicas que utilizaram ciclosporina e um curto período de G-CSF demonstrou baixa incidência de SMD, contrastando com o alto risco de SMD naquelas submetidas a tratamento mais prolongado com o G-CSF ou com resposta desfavorável ao G-CSF (Ohara, 1997; Hasle e Passmore, 2003). No entanto, estudo realizado por Imashuku et al. (2003) com crianças com aplasia e também tratadas com diferentes IS isolados ou combinados ao G-CSF durante um período mediano de 3,7 anos, não mostrou aumento no risco de desenvolvimento de doença secundária no grupo tratado com combinação de G-CSF.

Assim, permanece a dúvida quanto ao papel do G-CSF na indução da SMD secundária, caracteristicamente com monossomia do cromossomo 7. Dados laboratoriais, *in vitro*, sugerem que o clone com monossomia do cromossomo 7 possa preferencialmente se expandir na presença de doses farmacológicas de G-CSF (Young et al., 2000). Outros admitem a possibilidade desta anormalidade citogenética já estar presente ao diagnóstico da anemia aplástica e não ser detectado pela citogenética convencional, por ser um método com menor sensibilidade. Sugere-se então a pesquisa por meio de um método de mais sensível, como o FISH, *fluorescent in situ hybridization* (Bagby et al., 2004).

A instabilidade genética nos pacientes com AA com transformação para malignidade, é sugerida pelo fato de colônias derivadas de células mononucleares da MO (células formadoras de colônias) consistirem em uma mistura de clones de células com cariótipo normal e com monossomia do cromossomo 7, sugerindo que inicialmente

essas células formadores de colônia teriam cariótipo normal, subsequentemente perdendo o cromossomo 7 durante a hematopoese. Sendo assim, os clones geneticamente instáveis diminuiriam na presença da imunossupressão, mas se manteriam nos pacientes não responsivos, evoluindo para a SMD secundária (Kogima et al., 2002).

2.2- SMD/NM SECUNDÁRIA APÓS TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTO-IMUNES

Alguns estudos têm indicado uma ligação entre doenças reumáticas, fenômeno autoimune e câncer. Na casuística de Schoch et al. (2004) 6,4% dos 93 pacientes com NM-t eram portadores de doenças auto-imune. Aumento do risco de neoplasias hematológicas, comparado com a população em geral, foi encontrado em pacientes com artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico (LES). Também, prevalência de 3 a 7% de tumores sólidos foi observada em pacientes com esclerose sistêmica (Abu-Shakra et al., 2001).

São três as hipóteses levantadas para explicar a alta prevalência de neoplasias e doenças reumáticas:

- Síndrome paraneoplásica: concomitância da doença neoplásica com a doença reumática.
- As doenças reumáticas podem no decorrer da sua evolução, transformar-se em condições malignas, consequência de sua fisiopatologia. A desregulação do sistema imune promovendo a transformação de autoimunidade para malignidade. Este modelo tem sido bem estudado na síndrome de Sjögren (SS). A sequência de eventos observada em pacientes com SS inclui inicialmente a produção de anticorpos

policlonais, posteriormente produção de proteína monoclonal e instalação da doença linfoproliferativa.

- Resultado da terapêutica. A terapêutica imunossupressora usada para o controle dessas patologias pode constituir risco acrescido de neoplasia. Tem sido sugerido que o uso destas terapêuticas, que incluem principalmente alquilantes como imunossupressores, confira um estado imunológico permissivo ao desenvolvimento de neoplasias secundárias.

O intervalo entre o diagnóstico da doença reumática e a neoplasia secundária pode ser de até 20 anos, e ao contrário dos pacientes receptores de órgãos sólidos, os pacientes com doenças reumáticas geralmente recebem baixa ou moderada dose de drogas imunossupressoras. A ciclofosfamida tem sido relacionada com o desenvolvimento das neoplasias hematológicas e neoplasia de bexiga, enquanto que a azatioprina e o metotrexato tem sido mais associados ao aparecimento de linfomas (Naschitz et al., 2001; Jesus et al., 2006).

2.3- SMD/NM SECUNDÁRIA APÓS TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS SÓLIDOS

Pacientes que receberam transplante de órgãos sólidos, como coração, fígado e rim possuem aumento do risco de desenvolver câncer, particularmente linfomas de células B e carcinomas de pele (Melosky et al., 1992). As NM-t são raras. No entanto, a sua ocorrência parece estar relacionada à imunossupressão de manutenção, basicamente composta de prednisona, ciclosporina e azatioprina. Provavelmente devido a maior intensidade de imunossupressão, o risco de desenvolver NM-t é maior no transplantado cardíaco do que no renal (Huebner et al., 2000).

3- DIAGNÓSTICO DA SMD/NM SECUNDÁRIA

DIAGNÓSTICO DA SMD/ NM-t

O diagnóstico das SMD/NM-t baseia-se em dados clínicos, morfológicos e citogenéticos. As características das NM-t e o tempo de evolução após o tratamento da doença prévia dependem: da exposição, dose acumulativa e intensidade de dose a agentes específicos. O agente alquilante/radiação proporciona um período de latência de 5 a 7 anos, entre o tratamento da doença prévia e a NM-t secundária. Este tipo de LMA-t é frequentemente precedido por um período de SMD-t, enquanto que a terapia prévia com inibidores de topoisomerase II, como o etoposide, as antraciclina, e mais recentemente antracenedionas, ocorre geralmente em média após 2 anos, podendo ocorrer até no prazo de 12 meses, e não é precedido por um período de SMD-t. Essas entidades frequentemente se apresentam com uma rápida evolução para leucemia com alta contagem de leucócitos (Kröger et al., 2003; Godley e Larson, 2008).

Fadiga e fraqueza são as queixas mais comuns, ocasionalmente é relatada febre. Anemia macrocítica e trombocitopenia são extremamente frequentes. O aumento do volume corpuscular médio (VCM) é geralmente a primeira pista para o diagnóstico.

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO

Tanto na SMD *de novo* como na SMD secundária, o achado morfológico característico é a presença de displasia (Bennett et al., 1982; Doll e List, 1989; Yoshida et al., 1996). Para fins diagnósticos são necessários mais de 10% de células com características inequívocas de displasia de uma determinada linhagem para definição de displasia (Singh et al., 2007).

- **Diseritropoese:** No sangue periférico (SP), as hemácias podem se apresentar normocrômicas e normocíticas, ou mais comumente normocrômicas e macrocíticas, com eritroblastos circulantes, anisopoiquilocitose de grau variado, e pontilhado basófilo. Na medula óssea (MO) a diseritropoese se manifesta pelo assincronismo de maturação dos eritroblastos, como a presença de eritroblastos megaloblastóides, alterações de núcleo como multinuclearidade, lobulação, “pontes nucleares”, citoplasma com deficiência de hemoglobinizacão e pontilhado basófilo. Os sideroblastos patológicos (em anel) são evidenciados pela coloração de Perls.

- **Disgranulopoese:** Alterações morfológicas na série granulocítica podem ser observadas tanto no SP quanto na MO, hipersegmentação com formas bizarras ou hipossegmentação com hipogranulação denominada pseudo-anomalia de Pelger-Hüet (achado mais típico da SMD). É comum a persistência de basofilia no citoplasma, podendo aparecer grânulos anormais (pseudo Chédiak-Higashi), alteração nos grânulos azurófilos dos promielócitos.

- **Dismegacariopoese:** Caracteriza-se pela presença de megacariócitos displásticos que podem ser de três tipos: micromegacariócitos, megacariócitos grandes monolobados e megacariócitos com núcleos múltiplos e separados. O SP pode apresentar plaquetas gigantes e hipogranulares.

Para melhor entendimento das anormalidades de SP e MO observadas nas NM-t, vamos relatar as detectadas nas SMD *de novo* e depois compará-las com as relatadas nas NM-t.

SMD *de novo*

A característica marcante da SMD é a hematopoese ineficaz gerando células sanguíneas com anormalidades quantitativas (citopenias) e qualitativas (morfologia e

função) (Yoshida et al., 1996). As citopenias são responsáveis pelas possíveis manifestações clínicas de anemia, infecções e sangramentos. A neutropenia é encontrada na metade dos pacientes. Os blastos circulantes, quando presentes, geralmente estão em número inferior a 5% e raramente evidenciam bastão de Auer (Doll e List, 1989). Os neutrófilos pelgeróides e hipogranulares no sangue juntamente com os megacariócitos displásicos na medula óssea são achados importantes para o diagnóstico (Valent et al., 2007).

Na maioria dos casos os megacariócitos variam em número, apresentando formas displásicas, variáveis em tamanho e núcleos monolobados, hipolobados ou núcleos separados. Os núcleos dos megacariócitos podem se mostrar também hipercromáticos (Orazi, 2007; Vardiman et al., 2008). A avaliação citomorfológica da displasia pelo mielograma é complementada pela biópsia de medula óssea com informações da celularidade, da topografia dos elementos medulares e displasia dos megacariócitos (Brown et al., 1992).

O fragmento de medula óssea deve medir mais de 1,5 cm (Valent et al., 2007) e além da coloração usual da hematoxilina-eosina (H&E), a coloração de Giemsa é útil na identificação de plasmócitos, mastócitos e na diferenciação de mieloblastos e proeritroblastos. A impregnação pela prata cora as fibras reticulínicas permitindo a graduação da reticulina como normal, aumentada (discreta, moderada ou intensamente) ou ausente, e aumentos focais (vistos em pós-terapia) devem ser relatados (Lee et al., 2008).

Devido às dificuldades criadas pelas próprias alterações morfológicas, as colorações histológicas são complementadas por marcadores de imunohistoquímica (IHQ) (Orazi, 2007). O painel mínimo de IHQ para diagnóstico de SMD inclui os seguintes marcadores: anti-CD34 (células progenitoras), anti-glicoforina A (eritroblastos), anti-

CD31, CD42 ou CD61 (megacariócitos) e triptase (mastócitos). Em alguns casos de diagnóstico diferencial mais abrangente, podem ser empregados os anti-CD3, CD20, CD25 e CD117 (Valente et al., 2007).

Um aumento difuso de linfócitos, plasmócitos e macrófagos são achados frequentes. Agregados linfóides são vistos em cerca de 25% dos casos. Existem evidências de reação imune contra o clone anormal, principalmente com envolvimento de linfócitos CD8 oligoclonais, levariam a supressão do clone normal residual, aumentando os níveis de citopenias periférica (Lorand-Metze, 2003).

Os megacariócitos frequentemente atípicos, em topografia anormal e formando agrupamentos (“clusters”) são precisamente identificados pelos marcadores específicos, assim como os eritroblastos megaloblastóides. Os mastócitos, aumentados em muitos casos e não evidenciados no HE, são identificados pela triptase. O anti-CD117 é útil em raros casos em que as células progenitoras são CD34 negativas (Valente et al., 2007).

Além da avaliação da celularidade, desorganização estrutural da hematopoese, alterações estromais e fibrose, a biópsia de medula óssea permite uma avaliação mais acurada de células precursoras (Lee et al., 2008)

Normalmente, as células precursoras granulocíticas, mieloblastos e promielócitos, se localizam preferencialmente nas regiões peritrabeculares. Na SMD, as células precursoras são encontradas pelo interstício medular e podem formar agrupamentos denominados de *ALIP* (“abnormal localization immature myeloid precursor”). O *ALIP* é definido pela presença de 5 ou mais células agrupadas ou “clusters” (de 3 a 5 células) ao redor do capilar central e sua identificação é facilitada pela marcação de anti-CD34 nas células precursoras. Os casos positivos são definidos pela presença de no mínimo três agregados ou “clusters” no fragmento de medula óssea e são

associados a SMD de prognóstico desfavorável e transformação para LMA. Apesar de ser um importante marcador na SMD, o *ALIP* não é exclusivo dessa patologia, podendo ser encontrados em condições hematológicas reacionais como pós TCTH e após indução por QT (Orazi, 2007).

Expressão positiva aberrante de CD34 em megacariócitos demonstra megacariócitos neoplásicos com morfologia atípica. No entanto, esse tipo de megacariócito pode ser visualizado em outras neoplasias mielóides, bem como, em condições reacionais como na anemia megaloblástica (Orazi, 2007). Para um diagnóstico mais elucidativo da desordem medular, frequentemente são correlacionados outros exames como as contagens em SP (Lee et al., 2008).

Anti-CD117 (c-kit) recentemente tem sido proposto como um marcador adicional para identificar as células precursoras mielóides na biópsia de pacientes com SMD. Porém, este marcador não substitui o anti-CD34 por apresentar-se mais fraco e variável na expressão dos mieloblastos da SMD. A mieloperoxidase é um marcador útil na verificação da maturação normal dos precursores mielóides, que são extremamente positivos em relação aos blastos leucêmicos, os quais se apresentam fracamente positivos ou negativos nos casos de SMD (Orazi, 2007).

As alterações morfológicas da medula óssea (MO) e do sangue (SP), particularmente a porcentagem de blastos são a base para a classificação FAB das SMD *de novo* (Bennett et al, 1982) (Tabela 2). Posteriormente, com o reconhecimento do valor prognóstico das displasias medulares e de subtipos genéticos, a OMS propôs em 1997 uma nova classificação (Tabela 3), modificada em 2008 (Tabela 3A).

Tabela 2: Classificação FAB (1985)

Classificação FAB para SMD <i>de novo</i>		
Subgrupo	Sangue periférico (SP)	Medula óssea (MO)
Anemia refratária (AR)	Blastos $\leq 1\%$	Blastos $\leq 5\%$
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Blastos $\leq 1\%$	Blastos $\leq 5\%$ Sideroblastos em anel $> 15\%$
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	Blastos $< 5\%$	Blastos $> 5\%$ e $< 20\%$
Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)	Blastos $< 5\%$ Monócitos $> 1000/\mu\text{L}$	Blastos $< 20\%$
Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T)	Blastos $\geq 5\%$	Blastos $> 20\%$ e $< 30\%$ ou com bastonetes de Auer

Fonte: Bortolheiro, 2006 (*Rev. Bras. Hematol.Hemot.*)

Tabela 3: Classificação OMS (1997) dividindo a SMD *de novo* em 8 subgrupos

Classificação OMS para SMD <i>de novo</i>		
Subgrupo	Achados em SP	Achados em MO
Anemia refratária (AR)	Anemia Blastos < 1%	Displasia apenas na linhagem eritroblástica Blastos < 5%
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Anemia Ausência de blastos	Displasia apenas na linhagem eritroblástica Blastos < 5% Sideroblastos em anel ≥ 15%
Citopenia refratária com displasia de multilinhagem (CDRM)	Bi ou pancitopenia Blastos < 1%	Displasia em células de duas ou mais linhagens ≥ 10% Blastos < 5%
Citopenia refratária com displasia de multilinhagem e sideroblastos em anel (CRDMSA)	Bi ou pancitopenia Blastos < 1%	Displasia em células de duas ou mais linhagens ≥ 10% Blastos < 5% Sideroblastos em anel ≥ 15%
Anemia refratária com excesso de blastos - 1 (AREB-1)	Bi ou pancitopenia Blastos < 5%	Displasia uni ou multilinhagem Blastos 5% - 9%
Anemia refratária com excesso de blastos - 2 (AREB-2)	Bi ou pancitopenia Blastos 5% - 19% Monócitos < 1000/μL	Displasia uni ou multilinhagem Blastos 10% - 19%
Síndrome mielodisplásica inclassificável	Neutropenia ou Plaquetopenia Blastos raros ou ausentes	Displasia unilinhagem Blastos < 5%
Síndrome mielodisplásica com del(5q) isolada	Anemia Plaquetas normais ou elevadas Blastos < 5%	Megacariócitos em número normal ou elevado com núcleo monolobado Blastos < 5% Alteração citogenética: 5q-isolada

Fonte: Bortolheiro, 2006 (Rev. Bras. Hematol. Hemot.)

Tabela 3A: Classificação OMS (2008) para SMD *de novo*

Subgrupo	Achados em SP	Achados em MO
Citopenias refratárias com displasia de única linhagem (CRDU): Anemia refratária (AR); Neutropenia refratária (NR); Trombocitopenia refratária (TR)	Citopenia única ou bicitopenia ^a Blastos ausentes ou raros (<1%) ^b	Displasia de única linhagem: ≥10% das células em uma única linhagem mielóide <5% de blastos <15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA)	Anemia e Ausência de blastos	Displasia apenas na linhagem eritróide <5% de blastos ≥15% de sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasia de multilinhagem (CRDM)	Citopenia(s) Blastos ausentes ou raros (<1%) ^b Ausência de bastonetes de Auer Monócitos <1000/μL	Displasia em ≥10% das células em duas ou mais linhagens <5% de blastos Ausência de bastonete de Auer 15% de sideroblasto em anel
Anemia refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenia(s) <5% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer Monócitos <1000/μL	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 9% de blastos ^b Ausência de bastonete de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenias 5 a 19% de blastos Bastonete de Auer presente ou não ^c Monócitos <1000/μL	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 19% de blastos Bastonete de Auer presente ou não ^c
Síndrome mielodisplásica não – classificável (SMD-NC)	Citopenias ≤1% de blastos ^b	Displasia em <10% das células em uma ou mais linhagens quando acompanhadas de anormalidades citogenéticas presuntivas de SMD ^d <5% de blastos
Síndrome mielodisplásica associada com del(5q) isolada	Anemia Contagem de plaquetas normal ou elevada Blastos ausentes ou raros (<1%)	Normo a hiper celularidade megacariocítica – núcleo monolobado <5% de blastos Anormalidade citogenética: del(5q) isolada

^aBicitopenia pode ser observada ocasionalmente. Casos com pancitopenia devem ser classificados como SMD-NC.

^bSe a percentagem de mieloblastos na MO for <5%, mas existirem de 2 a 4% de mieloblastos em SP, deve-se classificar como AREB-1.

Casos de CRDU e CRDM com 1% de mieloblastos no SP devem ser classificados como MDS-NC.

^cCasos com bastonetes de Auer e <5% de mieloblastos em SP e <10% em MO devem ser classificados como AREB-2.

^dMais frequentes: 7q-/7, 5q-/5, i(17q) ou t(17p), del(11q), del(12p) ou t(12p), -13 ou t(13q), t(11;16)(q23;p13.3).

Fonte: Moraes et al., 2009 (Rev. Bras. Hematol. Hemot.)

▪ NM SECUNDÁRIAS

As SMD secundárias apresentam com maior frequência hipocelularidade ou hiper celularidade com aumento de fibrose medular, o que leva a maior detecção de células blásticas no SP e a não correlação com a contagem dessas células em MO. Observa-se, com frequência sideroblastos em anel e precursores de megacariócitos imaturos e anormais podem ser vistos em SP e em aspirado medular (Bennett et al., 1982).

▪ SMD/NM-t

Tanto em crianças como em adultos submetidos à exposição a agentes alquilantes, uma fase de mielodisplasia precede a LMA-t, com presença de displasia nas três linhagens mielóides.

Em crianças expostas a inibidores de topoisomerase II, ocorre evolução direta para LMA-t com componente monocítico e leucocitose (FAB M4 e M5) (Rubin et al., 1991; Smith et al., 1999; Kröger et al., 2003). Entretanto, outros subtipos incluindo a leucemia promielocítica aguda (FAB M3) também foi descrita (Lopes et al., 1999).

Vinte a 30% dos pacientes com NM-t evoluem diretamente para LMA-t (Vardiman et al., 2008).

Nas SMD-t após uso de alquilantes/radioterapia os achados em SP e MO lembram os mesmos na SMD *de novo*, apesar de apresentarem tipicamente maior grau de disgranulopoese e dismegacariopoese. O SP mostra citopenias e anisopoiquilocitose importante e ocasionalmente eritroblastos circulantes. Há anemia com frequente macrocitose e plaquetopenia; leucopenia pode estar presente, os neutrófilos apresentam hipolobulação, e hipogranulação citoplasmática e a basofilia é achado

frequente. Alterações displásicas são geralmente observadas nas três linhagens celulares. Os bastonetes de Auer são raramente observados. As reações de mieloperoxidase e a esterase não-específica são fracamente reativas. A presença de sideroblastos em anel é relatada em mais de 60% dos casos, com alguns casos excedendo 15% de sideroblastos em anel nos precursores eritróides. (Kröger et al., 2003; Godley & Larson, 2008; Vardiman et al., 2008). Quase 50% dos casos possuem menos de 5% de blastos em MO (Vardiman et al., 2008). A expressão do CD34 é quase sempre aumentada (Orazi, 2007). A MO é em média menos celular que a SMD *de novo*. A fibrose presente em 25-50% dos casos pode variar de discreta até intensamente marcada (Orazi et al., 1993).

O valor da subclassificação morfológica parece não estar claro nas NM-t. Diferente do observado nas SMD *de novo*. É difícil classificar as SMD-t pelos critérios FAB (tabela 2), principalmente pela presença de fibrose na medula, o qual pode causar diluição na aspiração e subestimar o número de blastos. Além disso, muitos casos mostram displasia de múltiplas linhagens e menos de 5% de blastos em SP e MO. Tais casos são classificados de maneira mais adequada pela OMS, como citopenia refratária com displasia de multilinhagem (CRDM) (tabela 3) (Singh et al., 2007). Cerca de 5% dos pacientes que foram expostos aos alquilantes possuem características de SMD/DMP (síndrome mielodisplásica/doença mieloproliferativa), como a leucemia mielomocítica crônica (LMMC), com contagem de monócitos superior a 1000/ μ L em SP, blastos inferior a 5% em SP e inferior a 20% em MO (Vardiman et al., 2008).

Ao contrário da SMD *de novo*, alguns trabalhos têm sugerido que a porcentagem de blastos e a subclassificação morfológica não possuem valor preditivo para a doença (Singh et al., 2007; Vardiman et al., 2008). Ao contrário, parâmetros derivados da

avaliação da biópsia medular, como *ALIPs*, Células CD34+ e Fibrose têm se mostrado de grande importância. Trabalho realizado em 14 pacientes portadores de SMD-t mostrou que a presença de *ALIPs* em MO conferia mediana de sobrevida de 10 meses e sua ausência, mediana de 43 meses ($p < 0,0005$). A presença de mais de 1% de células CD34+ foi correlacionada com sobrevida mais curta (10 vs 43 meses, $p < 0,0005$), assim como a fibrose medular score $\geq 2+$ (mediana de sobrevida de 10,5 vs 43 meses, $p < 0,0005$) (Orazi et al., 1993).

3.2- DIAGNÓSTICO DA SMD/NM PÓS IMUNOSSUPRESSÃO

O diagnóstico da SMD/NM pós-tratamento da AA, assim como o diagnóstico diferencial da AA com a SMD hipocelular nem sempre é fácil. A presença de atipias celulares nas linhagens hematopoéticas, de dismegacariopoeese e de fibrose da MO orientam para o diagnóstico de SMD hipocelular e se associam a alto risco de evolução para LMA (Fohlmeister et al., 1985). Outros marcadores que podem ajudar no diagnóstico diferencial da AA e SMD hipocelular são a quantidade de células precursoras CD34+ e marcadores de proliferação celular (Bennett e Orazi, 2009). Pacientes tratados com GAL mostram medula com número reduzido de megacariócitos e persistente atipia dos monócitos. Os pacientes que evoluem para SMD-AA basicamente não diferem dos pacientes com AA, mas mostram um aumento do número de sideroblastos em anel e monócitos atípicos durante a regeneração (Socié, 1996).

Poucos estudos relatam as características morfológicas das SMD/NM após IS. O estudo de 11 crianças com AA tratadas com IS e G-CSF e que desenvolveram SMD/LMA secundária mostraram que cinco delas se apresentaram como AR, duas

como AREB, três como AREB-T e uma como leucemia mielomonocítica aguda (LMA-M4) (Ohara et al., 1997). Em oito pacientes submetidos a IS para tratamento de doenças auto-imunes, a SMD/NM foi caracterizada como AREB-T (dois pacientes), AREB (dois pacientes) e SMD não-classificável (quatro pacientes) (McCarthy et al., 1998). Cinco pacientes com NM pós-transplante cardíaco foram descritos por Huebner et al. (2000) e destes, dois apresentavam AREB e três LMA: M1-sem maturação, M6-eritroleucemia e M7- leucemia megacarioblástica aguda.

3.3- ACHADOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES

O estudo citogenético é de grande importância no diagnóstico e prognóstico das neoplasias mielóides. As anormalidades citogenéticas estão presentes em 80 a 95% dos pacientes com SMD secundária, geralmente apresentando cariótipo complexo (3 ou mais anormalidades), com média de 5,3 anormalidades por caso. A frequência de clones citogenéticos não relacionados é de 5,7%. A monossomia do cromossomo 7 é a alteração mais comumente encontrada nos pacientes após uso de drogas antineoplásicas, anemia aplástica e em SMD de crianças. A tabela 4 mostra as alterações citogenéticas mais frequentes em SMD secundária (Heim, 1992).

Tabela 4: Alterações cromossômicas numéricas e estruturais mais frequentes em SMD secundária (Heim, 1992).

Alteração cromossômica	%
monossomia do 7 ou -7	41
deleção do braço longo do 5 ou del(5q)	28
monossomia do 5 ou -5	11
derivativo do braço longo do 21 ou der(21)	9
deleção do braço longo do 7 ou del(7q)	8
trissomia do 8 ou +8	
derivativo do braço curto do 12 ou der(12p)	
translocação balanceada entre 1 e 7 ou t(1;7)	7
monossomia do 12 ou -12	
derivativo do braço curto do 17 ou der(17p)	6
derivativo do braço curto do 3 ou der(3p)	5
derivativo do braço curto do 6 ou der (6p)	
derivativo do braço longo do 3 ou der(3q)	4
derivativo do braço longo do 11 ou der(11q)	
monossomia do 17 ou -17	
monossomia do 18 ou -18	
derivativo do braço longo do 19 ou der (19q)	

3.3.1- ACHADOS CITOGENÉTICOS NA SMD/NM SECUNDÁRIA APÓS USO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS E DE RADIOTERAPIA

Dois diferentes tipos de exposição a agentes citotóxicos, com diferentes alterações cromossômicas recorrentes em NM-t são observados:

- Agentes alquilantes/radiação: Cerca de 90% destes pacientes possuem alterações genéticas clonais, incluindo monossomias ou deleções dos cromossomos 5 e ou 7, o cariótipo complexo possui frequentemente muitos marcadores cromossômicos.
- Inibidor de topoisomerase II: neste grupo os rearranjos cromossômicos envolvidos mais comumente encontrados são: 11(q23), t(8;21), t(15;17), t(8;16) ou inv(16), na sua grande maioria translocações balanceadas, ocorrendo como evento único (Kröger, et al., 2009)

Para os pacientes que se submeteram ao TCTH-autólogo, as alterações clonais recorrentes mais comuns, se relacionam ao uso de agentes alquilantes, com envolvimento dos cromossomos 5 e do 7, e com os agentes inibidores de topoisomerase, com o envolvimento do rearranjo 11q23 (Hake et al., 2007).

Na tabela 5, podemos observar a frequência de anormalidades citogenéticas mais comuns ao grupo das SMD-t e LMA-t. Na SMD-t as alterações não balanceadas, particularmente a deleção do braço longo do cromossomo 5 (5q-) e do 7 (7q-) e a monossomias do cromossomo 5 (-5) e do 7 (-7) são observadas em 50 a 70% dos pacientes. O cariótipo normal é observado em 5 a 10% dos casos, sendo raras as alterações balanceadas. Na LMA-t as alterações não balanceadas com 5q-/5 e 7q-/7 são também comuns, de 10 a 15% dos casos apresentam cariótipo normal e 15 a 20% apresentam translocação balanceada ou inversão (Pedersen-Bjergaard et al., 2007).

Tabela 5: Anormalidades citogenéticas mais frequentes nas NM-t

NM-t	Anormalidade Citogenética		
	não balanceada (%)	balanceada (%)	cariótipo normal (%)
	5q-/-5, 7q-/-7	11q23, 21q22	
	+8	17q21, 16q22	
SMD-t	50-70	rara	5-10
LMA-t	40-50	15-20	10-15

Uma complicação preocupante da terapia com etoposide é o aparecimento da NM-t, com envolvimento do gene *MLL* situado no cromossomo 11q23. Particularmente na LLA e no linfoma linfoblástico na infância, o risco cumulativo é estimado em 5 a 10%. O mesmo não ocorre em pacientes com tumores sólidos que também usam epipodofilotoxinas, pois os esquemas de administração e dose cumulativa são diferentes. Para tumores de células germinativas recebendo etoposide (esquema: 5 vezes/dia e dose cumulativa $\leq 2,0 \text{ g/m}^2$) em combinação com cisplatina e bleomicina a estimativa de risco cumulativo é de aproximadamente 0,6% (Smith et al., 1999).

O rearranjo 11q23 inclui translocações e deleções, sempre envolvendo o mesmo ponto de quebra. Esta anormalidade tem sido descrita após o uso de inibidores de topoisomerase II, incluindo antracíclicos, e actinomicina D, frequentemente usados em combinação com cisplatina e agentes alquilantes (Rubin et al. 1991).

Apesar da predominância da anormalidade citogenética como 11q23 frequentemente estar associada à terapia prévia com inibidores de topoisomerase II, outras alterações como a inversão do cromossomo 16, inv(16), translocação balanceada entre os cromossomos 15 e 17, t(15;17) e translocação balanceada entre os cromossomos 9 e

22, t(9;22), também têm sido descritas. Comparativamente, a LMA-t na infância seguida de terapia com epipodofilotoxinas para LLA, possui de maneira predominante o rearranjo 11q23, enquanto que em adultos a alteração mais frequente parece ser 21q22 (Andersen et al., 1998).

Como os adultos, as crianças expostas a agentes alquilantes, também apresentam alterações como 5 e 7. As aberrações incluem perda total desses cromossomos, deleções e translocações não balanceadas, resultando na perda de material do braço longo dos cromossomos 5 e 7. Porém, as crianças raramente apresentam translocações balanceadas envolvendo o cromossomo 5 na banda q31, a qual é uma região crítica desse cromossomo (Rubin et al., 1991).

A presença da anormalidade 5q- compondo o cariótipo complexo na SMD-t é relacionada a um prognóstico desfavorável. Recentemente, interessantes associações entre mutação do *p53* e 5q- têm sido descritas, sugerindo que ambas as lesões podem fazer parte de uma mesma via molecular, particularmente favorecendo a instabilidade genômica (Alessandrino et al., 2001).

Pedersen-Berjaard e colaboradores (2007) estudaram 140 pacientes portadores de NM-t e sugeriram a divisão destes pacientes em 8 subgrupos de acordo com as vias genéticas envolvidas na patogênese para o desenvolvimento da doença:

1ª via- Incluem os pacientes portadores de -7/7q-, porém sem alterações do cromossomo 5 e sem alterações balanceadas. Estes casos se apresentam caracteristicamente como SMD-t e são observados após terapia prévia com uso de agentes alquilantes. Estes pacientes frequentemente têm mutações de ponto de gene *AML1*, o qual são significativamente associados com progressão para LMA-t.

2ª via- Compreendem os pacientes com -5/5q-, mas sem alterações balanceadas. Podem se apresentar como SMD-t ou LMA-t. A maioria destes casos mostra

alterações do *p53* e cariótipo complexo. São principalmente observados após terapia com agentes alquilantes. Ocasionalmente estes pacientes podem apresentar -7/7q-.

3ª via- É representada por pacientes com LMA-t e translocações balanceadas envolvendo o cromossomo 11, banda q23, resultando em rearranjo quimérico entre o gene *MLL* e outros numerosos parceiros alternativos. Este tipo de leucemia é frequentemente classificado como os subtipos M4 e M5 da classificação FAB e significativamente associados com o uso de terapia prévia com inibidor de topoisomerase II, principalmente epipodofilotoxinas. Neste grupo mutações do *NRAS*, *KRAS* ou *BRAF* são comuns.

4ª via- Incluem pacientes com translocações balanceadas envolvendo o cromossomo 21, banda q22 (gene *AML1*) ou inversão do cromossomo 16 (gene *CBFB*). Exceto pelos casos de t(3;21), estes pacientes apresentam LMA-t e frequentemente são seguidos por terapia com antraciclina.

5ª via- Compreendem pacientes com leucemia promielocítica aguda e rearranjo quimérico do *RARA*, gene localizado no cromossomo 17, banda q21. Devido a boa resposta ao ácido retinóico e prognóstico favorável, eles são agrupados separadamente. Nos casos de LMA-t tem sido observado o uso prévio de mitoxantrone para câncer de mama, e como os pacientes de leucemia promielocítica aguda *de novo*, eles frequentemente apresentam duplicação interna *in tandem* do gene *FLT3*.

6ª via- Este grupo é representado por pacientes de SMD-t e LMA-t com rearranjo quimérico envolvendo o cromossomo 11, banda p15. Tais casos são na maioria das vezes relacionados ao uso prévio de inibidor de topoisomerase II, mas sem outras alterações relatadas até o momento.

7ª via- Englobam os pacientes com cariótipo normal. Mutações de ponto do *RAS* e duplicação interna *in tandem* do *MLL* são ocasionalmente observadas em pacientes com LMA-t com cariótipo normal. Na SMD-t e na LMA-t o cariótipo normal é observado em casos atípicos sem associação a um tipo específico de terapia prévia.

8ª via- Os pacientes com SMD-t e LMA-t são representados por outras alterações cromossômicas e frequentemente anormalidade única. A trissomia do cromossomo 8 pode ser incluída nesta categoria. Também não apresentam relação com terapia prévia específica e por razões desconhecidas podem raramente apresentar mutações dos genes na via de transdução *RAS-BRAF* ou mutação de fatores de transcrição.

▪ O CROMOSSOMO 11 E O GENE *MLL*

O *MLL* (*Mixed lineage leukemia*) é um fator de transcrição importante que regula a expressão de genes homeobox (*HOX*, em humanos), genes que são homólogos ao de *Drosophila trithorax*, os quais possuem controle nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e na hematopoese (Tenen et al., 1997). Este gene foi originalmente identificado em 1991, por ter envolvimento em translocações em LLA e LMA. É um gene localizado no cromossomo 11, banda q23, e tem sido descrito participando de rearranjos com mais de 40 genes diferentes (Klymenko et al., 2005). A translocação resulta na junção da parte amino-terminal do *MLL* com a parte carboxila final do gene parceiro (5'*MLL*/3'gene parceiro). Esse processo sugere um ganho por parte desse gene, contribuindo para o processo leucemogênico (Klymenko et al., 2005).

Tem sido descrito associado às leucemias agudas bifenotípicas ou monocíticas, da infância ou nas leucemias secundárias induzidas por uso de inibidor de topoisomerase. Duplicações *in tandem* do gene *MLL* tem sido encontradas em alguns

casos de SMD *de novo* com cariótipo normal ou trissomia do cromossomo 11 (Hirai, 2003). Nas LMA, particularmente na LMA-t, o cromossomo parceiro, mais comumente envolvido na translocação com o *MLL*, é o cromossomo 9 (Leone et al., 2007).

Na SMD *de novo* cerca de 5% dos pacientes revelam anormalidades envolvendo cromossomo banda 11q23 e frequentemente ocorrem como parte de um cariótipo complexo sendo associado a outras anormalidades, usualmente -7/7q-. Nestas condições a SMD é considerada de mau prognóstico com progressão para LMA em 20 -30% dos casos (Sreekantaiah, 2007).

▪ O CROMOSSOMO 17 E O GENE *P53*

O gene *p53* é um importante gene supressor de tumor, localizado no braço curto do cromossomo 17, banda p13. O gene *p53* é considerado da maior importância para estabilidade genética e integridade do genoma (Hirai, 2003) (Sugimoto, et al., 1993) (Christiansen, et al., 2001). A proteína *p53* (fosfoproteína nuclear) atua durante a interfase, nos “checkpoints” (pontos de checagem) nas fases G1 (fase pós mitótica) e G2 (fase pré mitótica) do ciclo celular, com a função de levar o DNA à reparação quando necessário. No caso da não ocorrência do reparo, a proteína *p53* ativa a via de apoptose (morte celular programada). A perda da função do *p53* resulta em um aumento na frequência de mutações, anormalidades cromossômicas, amplificação genética, desregulação do centrôssomo com segregação de cromossomos anormais, e descontrole do ciclo celular (Christiansen et al., 2001). Mutações somáticas adquiridas do *p53* têm sido observadas em mais de 50% de pacientes com tumores sólidos, as quais têm sido relacionadas com progressão do tumor e prognóstico desfavorável. Suas alterações estão envolvidas na patogênese de várias neoplasias

humanas, incluindo leucemias e linfomas. A inativação do gene *p53* em ambos os alelos, perda da heterozigose (LOH), por mutações ou deleções tem sido relacionada à predisposição para transformação neoplásica. O produto do gene *p53* mutado é uma proteína com conformação anormal, meia-vida prolongada, estabilizada e com propriedades oncogênicas, a qual participa no processo da leucemogênese (Batsakis et al., 1995). O gene “wild-type”, forma selvagem, tem como produto, uma proteína normal com meia-vida curta de apenas 15 minutos, enquanto que a proteína *p53* mutante, tem meia-vida prolongada de algumas horas. A extensão prolongada da meia-vida da proteína mutante resulta em um aumento de expressão no meio intracelular. (Kitagawa et al., 1994).

Rearranjos resultando na perda do 17p têm sido observados em 5% dos casos de SMD *de novo*. A perda pode ocorrer através da monossomia, deleção, translocações não balanceadas entre o 17p e outro cromossomo ou formação de isocromossomo. A maioria dos pacientes possuem cariótipo complexo com envolvimento dos cromossomos 5 e ou 7. Clinicamente os pacientes com deleção do 17p mostram uma resposta desfavorável à terapia e sobrevida curta (Sreekantaiah, 2007).

A inativação do gene *p53* é detectada em cerca de 5-20% das SMD *de novo*, principalmente em casos clinicamente avançados, indicando que o gene *p53* tem envolvimento na progressão para leucemia aguda, se relacionando a um mau prognóstico (Christiansen, et al., 2001; Hirai, 2003; Raimondi, 2003).

O *p53* tem se mostrado mutado em cerca de 25-70% nas SMD-t de adultos, sendo inferior na SMD *de novo* e SMD-t em crianças (Raimondi, 2003). As alterações do *p53*, com LOH tem sido associadas com anormalidades citogenéticas, como -5/5q- e -17/17p-. Pacientes com mutações no *p53* caracteristicamente apresentam cariótipo complexos e rearranjos cromossômicos com duplicação ou amplificação dos

cromossomos 11, banda q23 e cromossomo 21, banda q22, os quais compreendem os genes *MLL* e *AML1* respectivamente, e marcadores cromossômicos, tipo “sandwich-like”, que são marcadores cromossômicos compostos de material de no mínimo três cromossomos diferentes (Pedersen-Bjergaard et al., 2007).

Kitagawa et al. (1994) realizaram estudo para avaliação da expressão de p53 em células hematopoéticas de MO de pacientes com SMD de *novo* (n=51), LMA *de novo* (n=42), Anemia aplástica (n=20) e indivíduos normais (n=12). Constatou-se que a expressão foi positiva em 14% dos pacientes SMD e em 5% para LMA, sendo uniformemente negativa para anemia aplástica e indivíduos normais. Metade dos pacientes portadores de SMD que apresentaram expressão positiva de proteína p53 ao diagnóstico, evoluiu para LMA e mantiveram a expressão da proteína durante a evolução da doença. Os resultados sugerem que a mutação do *p53* que ocorre nas células mielóides do paciente com SMD *de novo* confere vantagens para a evolução para LMA.

A imunoistoquímica (IHQ) e a citometria de fluxo (CF) são atualmente os métodos descritos como ideais para detecção da proteína p53 em amostras de pacientes leucêmicos. A desvantagem desses métodos é a incapacidade de identificar a proteína p53 em tumores com mutação *nonsense* em suas sequências genéticas, visto que em tal mutação ocorre ausência de expressão da proteína. Calcula-se, no entanto, que essas alterações ocorram em menos de 20% das mutações do gene *p53* em tumores humanos (Kitagawa et al., 1994).

A superexpressão da proteína p53 pode ser frequentemente observada, particularmente em casos associados com o uso prévio de alquilantes. Este fato tem sido associado ao aumento da sinalização da apoptose das células hematopoéticas na medula com hematopoese ineficaz (Orazi et al., 2007). A superexpressão desta

proteína tem se mostrado mais frequente em pacientes portadores de SMD *de novo*, subgrupo AREB (Magalhães e Ponte, 1999).

▪ O CROMOSSOMO 21 E O GENE *AML1*

O *AML1* é um gene localizado no cromossomo 21, banda q22. É um fator de transcrição envolvido no controle de genes essenciais para a proliferação e diferenciação na hematopoese normal. O gene *AML1* (*Runx*) codifica o fator de transcrição heterodimérico, o qual liga o DNA através do domínio Runt, e é frequentemente envolvido em translocações associadas às leucemias humanas. As mutações “missense”, (que resultam em uma proteína que o aminoácido é substituído por outro), são identificadas em aproximadamente 5% das LMA. Tem sido descrito que as mutações do gene *AML1*, são principalmente encontradas em LMA com fenótipo M0 (FAB) com uma frequência de 22%, e a maioria dessas mutações são bialélicas. Muito embora menos frequente, o gene *AML1* é também um alvo de mutações em SMD *de novo* (Hirai, 2003).

Segundo Christiansen et al. (2004), em estudo realizado em 140 pacientes portadores de SMD-t/LMA-t para pesquisa de mutações somáticas do gene *AML1* através de sequenciamento direto, foram constatadas anormalidades em 15,7% (22/140) pacientes, todos heterozigotos, para as seguintes mutações: nove “missense”, três “nonsense”(onde o códon terminador substitui um códon de aminoácido, levando a terminação prematura da tradução) e dez mutações “frame-shift” (que provoca uma alteração na matriz (sequência) de leitura (“reading frame”), levando à introdução de aminoácidos não-afins na composição da proteína, geralmente seguido por um códon terminador). Desses, 86,4% (19/22) tinham recebido terapia prévia com alquilante. Esse trabalho mostrou que a mutação do *AML1* associado com SMD-t foi

altamente significativa ($p=0,003$), com a presença de 7q/-7 ($p=0,001$) e com subsequente transformação para LMA-t ($p=0,0001$).

3.3.2 - ACHADOS CITOGENÉTICOS NA SMD/NM SECUNDÁRIA APÓS USO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORES

As anormalidades citogenéticas mais frequente encontradas na SMD-AA, envolvem os cromossomos 6, 7 e 8 (Maciejewski & Selleri, 2004). Alguns casos podem evoluir com anormalidades citogenéticas transitórias, como a trissomia do cromossomo 8, responsiva ao tratamento imunossupressivo, e trissomia do cromossomo 6. Particularmente a monossomia 7 é a mais frequente e ocorre em pacientes com mínima resposta clínica ou naqueles que recaem com pancitopenia severa (Bagby et al., 2004) ou que fizeram uso de G-CSF por longo tempo (Young et al., 2006).

3.4 - ACHADOS BIOQUÍMICOS

Poucos dados foram encontrados na literatura em relação a alterações de variáveis bioquímicas. Entretanto, estudo japonês conduzido por Takeyama et al. (2000), mostrou que a hipoproteinemia foi observada em 35,8% dos pacientes portadores de NM-t e associada a mau prognóstico ($p=0,0034$).

Na SMD *de novo*, níveis elevados da desidrogenase láctica (DHL), têm sido considerado como indicador de hemopoese ineficaz e evolução para LMA, sendo correlacionado com sobrevida curta (Alessandrino et al., 2001). A obtenção dos níveis de eritropoetina e de ferritina são essenciais no momento do diagnóstico da

SMD *de novo* para direcionar a terapia, porém os níveis elevados não conferem um fator prognóstico claro e independente (Steensma e Bennet, 2006).

4 - EVOLUÇÃO DAS SMD/NM-t

As NM-t apresentam alta mortalidade e morbidade decorrente de citopenias graves e da persistência da doença maligna prévia, particularmente câncer metastático ou linfoma. Alguns fatores em potencial podem corroborar para a evolução desfavorável nas NM-t, como:

- Danos em órgãos e seus sistemas vasculares, devido a tratamento prévio que podem comprometer a habilidade do paciente em receber indução com poliquimioterapia ou condicionamento para TCTH.
- Pode haver depleção da célula precursora hematopoética, devido ao tratamento prévio, sendo assim esses pacientes sofrem de longas citopenias após a indução.
- O estroma da MO pode estar prejudicado, especialmente pela radiação em campos que incluem a pélvis ou região lombosacral, consequentemente não regenerando para uma hematopoese normal.
- Pacientes com MN-t, devido a tratamento prévio são frequentemente imunodeprimidos e susceptíveis a infecções com bactéria e fungos antibiótico-resistentes.
- Devido a terapias prévias de suporte, os pacientes podem se tornar refratários a transfusões adicionais necessárias.
- A alta frequência de cariótipo complexo, indica rápida e emergente resistência a tratamentos (Larson, 2007; Godley e Larson, 2008).

Estudo japonês, compreendendo 256 pacientes, sendo 41% com SMD-t e 59% com LMA-t, observou que as variáveis: anormalidade do cromossomo 5,

hipoproteïnemia, altos níveis de proteína C reativa, plaquetopenia e persistência da doença prévia se associavam a prognóstico mais desfavorável (Larson, 2007).

Para as NM-t, o curso clínico é tipicamente progressivo e relativamente resistente às terapias convencionais utilizadas nas leucemias *de novo* (Larson, 2009).

5 - TRATAMENTO DAS SMD/NM-t

O TCTH-alogênico é a única modalidade terapêutica com potencial de cura para pacientes com NM-t. No entanto, estudos têm mostrado sobrevida curta, mesmo com o transplante, com taxa de sobrevida variando de 20-30% (Larson, 2009; Kröger et al., 2009). Características presentes no pré-transplante estão associadas à sobrevida livre de doença, como: estágio da doença, alterações citogenéticas, tipo de terapia citotóxica prévia, regime de condicionamento e idade do paciente (Chang et al., 2007).

A taxa de morte precoce relacionada à toxicidade do condicionamento é mais alta na NM-t do que na NM *de novo* (Larson, 2009).

Segundo Kröger et al. (2009), em estudo realizado pelo EBMT (“European Group for Blood and Marrow Transplantation”) de 461 pacientes com NM-t que se submeteram ao TCTH-alo entre 1981 e 2006, somente um terço se curou. Em análise multivariada observou-se uma evolução mais favorável para pacientes jovens (<40 anos), com cariótipo normal, e transplantado em primeira remissão.

III - OBJETIVOS

▪ OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliação clínica, morfológica e citogenética dos pacientes portadores de Síndrome mielodisplásica secundária diagnosticados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas de São Paulo desde o ano de 1987 até 2008, através de:

- Levantamento de dados clínicos, coletados dos prontuários desses pacientes.
- Revisão e documentação das características morfológicas, arquiteturais e imunoistoquímicas da medula óssea através do mielograma e da biópsia de medula óssea desses pacientes na data do diagnóstico.
- Revisão e documentação das alterações citogenéticas da medula óssea através de análise citogenética convencional, e quando necessária a realização de análise citogenética molecular desses pacientes na data do diagnóstico.

▪ OBJETIVO SECUNDÁRIO

Análise da sobrevida global (SG) dos pacientes de acordo com as características clínicas e dados laboratoriais.

IV - CASUÍSTICA E MÉTODOS

1 - CASUÍSTICA

Para este estudo foram selecionados inicialmente 45 pacientes diagnosticados como síndrome mielodisplásica secundária de um banco de dados com 410 pacientes cadastrados como síndrome mielodisplásica no SH-HCFMUSP, entre os anos de 1987 a 2008. Foram incluídos inicialmente pacientes com SMD secundária à terapia com drogas antineoplásicas, com drogas imunossupressoras e secundárias às doenças genéticas. Optou-se por não analisar o último grupo composto por apenas três pacientes (duas portadores de Síndrome de Turner e um portador de Síndrome de Bloom). Dessa maneira a nossa casuística foi composta por 42 pacientes

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o Protocolo de Pesquisa nº 0405/07(Anexo A).

2 - MÉTODOS

2.1 - COLETA DE DADOS CLÍNICOS

A coleta de dados clínicos foi realizada para os 42 pacientes, através de levantamento dos prontuários, sendo coletados os seguintes dados:

- Idade e sexo
- Doença prévia e data do seu diagnóstico
- Resultado de exame citogenético na data do diagnóstico da doença de base
- Em relação ao tratamento da doença prévia:
 - QT - Uso de droga antineoplásica: - alquilantes
- inibidores de topoisomerase II
 - Radioterapia

- Uso de droga imunossupressora: - CSA;
 - GAT/GAL
 - antimetabólitos
- Realização de TCTH-autólogo, data e condicionamento
- Uso de G-CSF
- Data do diagnóstico da SMD/NM secundária
- Data de evolução para LMA secundária
- Em relação ao tratamento da SMD/NM secundária:
 - Uso de quimioterapia
 - Uso de fatores de crescimento/ Imunomoduladores
 - Realização de TCTH-alogênico, data e condicionamento
- Data do óbito ou último seguimento

▪ EXAMES BIOQUÍMICOS

Foram coletados os resultados de DHL, Albumina e Ferritina (realizados no Laboratório Central do HC-FMUSP) na data do diagnóstico da SMD/NM secundária, sendo:

- DHL, desidrogenase láctica, obtida pelo método cinético, sendo considerado valor normal a 37°C: 240 a 480 U/L;
- Albumina, obtida pelo método de separação eletroforética em agarose , sendo considerado valor normal 3,2 a 5,0 g/dL
- Ferritina, obtida pelos métodos:

Imunoturbidimétrico , sendo considerado valor normal para:

homens: 30 a 400 ng/mL

mulheres: 15 a 150 ng/mL

Imunoturbidimétrico automatizado, sendo considerado valor normal para:

homens: 25 a 300 µg/L

mulheres: 10 a 125 µg/L

crianças: 10 a 140 µg/L

2.2 - ACHADOS MORFOLÓGICOS

Os achados morfológicos foram observados em esfregaço de sangue periférico (SP); em medula óssea (MO), através de lâminas de aspirado/imprint e biópsia de MO na data do diagnóstico da SMD/NM secundária.

2.2.1 - Hemograma

Os dados mais relevantes do hemograma (realizados no Laboratório Central), foram computados: hemoglobina (g/dL)*, VCM, volume corpuscular médio (fL), blastos (%), leucócitos/µL, neutrófilos/µL*, monócitos/µL e plaquetas/µL*,

* Utilizou-se os valores de hemoglobina abaixo de 10g/dL; neutropenia abaixo de 1800/µL e plaquetopenia abaixo de 100.000/µL, para detecção de citopenias, segundo critérios adotados pelo *IPSS* (Greenberg et al., 1997).

2.2.2 - Mielograma - Análise morfológica do aspirado medular/imprint

As lâminas submetidas à coloração de Leishman, e de Perls foram obtidas do arquivo do Laboratório de Imunopatologia do SH-HCFMUSP. A análise foi realizada em 200 células para determinação da contagem diferencial, determinação do número de blastos (%)*, em microscópio de dupla observação simultânea por dois observadores devidamente capacitados.

*Para contagem de blastos: quando eritroblastos abaixo a 50%, (G:E > 1) os blastos foram contados entre 200 células viáveis totais. Na hiperplasia eritróide, eritroblastos

acima ou igual a 50%, ($G:E \leq 1$), os blastos foram contados entre 200 células não-eritróides (Niero-Melo et al., 2006).

Foram avaliadas as celularidades:

- **Global** - estabelecendo relação entre tecido hematopoético e adipócitos, corrigida pela idade e local de punção. A celularidade global foi quantificada nos grumos; na ausência destes, a celularidade foi considerada não avaliável (Williams, 1983).

- **Relativa** – estabelecendo a relação entre granulócitos e eritroblastos (G/E)

A série eritrocítica foi considerada normocelular quando os eritroblastos representavam de 14 a 30% de todas as células nucleadas da MO (Jandl, 1987).

- **Maturativa** – avaliando a maturação dos precursores mielóides: a eritropoese, a granulopoese e a megacariopoese.

- **Displasia:** Avaliou-se a displasia nas três séries: eritrocítica, granulocítica e megacariocítica, obedecendo ao critério de displasia presente quando ocorrer em no mínimo 10% de uma mesma linhagem (Singh et al., 2007), e a quantificando qualitativamente por Sdis (discreta), Smod (moderada) ou Sac (acentuada). Consideramos a displasia presente quando pelo menos um dos observadores a assinalou. A presença de neutrófilos pelgeróides foi assinalada por S (sim) ou N (não).

A celularidade da série megacariocítica foi considerada reduzida quando o número de megacariócitos era inferior a 1/1000 células nucleadas (Varela, 1985), procurando-se sempre avaliar no mínimo pelo menos 10 megacariócitos.

Coloração de Perls: (Coloração de azul da Prússia), para contagem de sideroblastos em anel em 300 eritroblastos totais, obtendo o resultado por porcentagem (%) (Niero-Melo et al., 2006). Sideroblasto em anel é definido pela presença de pelo menos 5 grânulos de ferro com distribuição perinuclear, podendo estar circundando

todo o núcleo, distribuído em porções da área perinuclear ou ainda circundando 1/3 do núcleo (Mufti et al., 2008).

2.2.3 - Biópsia de medula óssea

As biópsias de medula óssea dos pacientes foram obtidas do arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do ICHC, sendo avaliados os parâmetros descritos a seguir, em microscópio de dupla observação simultânea por dois observadores capacitados, os casos de dúvida foram revistos em conjunto por quatro observadores capacitados em um microscópio de múltiplos observadores.

PARÂMETROS AVALIADOS EM BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA

Comprimento do fragmento de biópsia

Celularidade - % de tecido hematopoético em relação ao tecido adiposo, de acordo com a idade cronológica.

- N (normal); D (diminuída); A (aumentada)
- Distribuição irregular do tecido hematopoético adiposo: S (sim) N (não)

Série eritrocítica: avaliada através da H&E e IHQ-glicoforina

- Celularidade: N (normal); D (diminuída); A (aumentada)
- Distúrbio de maturação (DM): 0-3+
- Distúrbio arquitetural (desorganização da distribuição em colônias) (DA): 0-3+

Série granulocítica: avaliada através da H&E e IHQ-mieloperoxidase (MPO)

- Celularidade: N (normal); D (diminuída); A (aumentada)
- Distúrbio de maturação - retardo de maturação (DM): 0-3+
- Distúrbio de arquitetura/ maturação: localização anômala dos precursores

imatuross (ALIP): presente/ausente

Série megacariocítica: avaliada através da H&E

- Celularidade: N (nomal); D (diminuída); A (aumentada)
- Atipia citológica (células hipolobadas/monolobadas/micromegacariócitos/multinucleação) (DM): 0-3+
- Distúrbio arquitetural (agrupamentos, localização peritrabecular) (DA): 0-3+

Células mononucleares: avaliadas através da H&E e IHQ: CD20/CD3/CD138**Linfócitos**

- Nódulos linfóides: ausentes (A); presentes (P) (número)
- Linfócitos B (CD20+): Intersticiais (I) ; Nódulos linfóides (Nod)
- Linfócitos T (CD3+): Intersticiais (I) ; Nódulos linfóides (Nod)

Plasmócitos: avaliados através do H&E e IHQ (CD138):

- Número: <5%; 5-10%; >10%
- Distribuição: predominantemente perivascular (PV); Intersticiais isolados ou em pequenos agrupamentos (I); agrupamentos extensos de caráter expansivo (GE)

Mastócitos: não avaliados**Blastos: avaliados através da IHQ: CD34 e CD117**

- Número: ≤1%; 1-10%; 10-20%; >20%
- Distribuição: isolados (I); agrupados (>2células) (Ag)
- CD34 e CD117- avaliada a positividade nos MGC como presente (P) ou ausente (A)

Células p53: avaliada através da IHQ: 0-3+

Estroma:

Fibrose: 0-4+ (Bauermeister, 1971)

- grau 0: ausente
- grau 1: área focal de fibras reticulínicas finas
- grau 2: fibras reticulínicas finas distribuídas difusamente
- grau 3: presença de fibras grossas
- grau 4: fibrose colagênica

Ferro: avaliado pelo H&E e Perls: 0-3+

Para a análise das biópsias foram utilizadas as colorações de H&E, Perls, reticulina, e reações imunoistoquímicas (IHQ) utilizando-se anticorpos primários relacionados na Tabela 6.

Tabela 6: Caracterização dos anticorpos utilizados para exame IHQ

Anticorpo		Diluição	Clone	Fornecedor	Linhagem celular/padrão
MPO*	policlonal	1:80.000	Policlonal	Dako	Granulocítica/C
Glicoforina A*	monoclonal	1:10.000	JC159	Dako	Eritróide/M
CD34*	monoclonal	1:6000	QB-	Novocastra	CP/M; endotélio/M
			END/10		
CD117*	policlonal	1:1000	c-kit	Dako	CP/M; mastócitos/C
CD20*	monoclonal	1:2000	L26	Dako	LinfócitosB maduros/M
CD3*	monoclonal	1:2000	F7.2.38	Dako	Linfócitos T/M
CD138*	monoclonal	1:2000	MI15	Dako	Plasmócitos
P53**	monoclonal	1:100.000	DO7	Dako	Proteína relacionada ao gene p53/N

MPO: mieloperoxidase; **MGC:** megacariocítica; **C:** citoplasmático;

M: membranoso; **N:** nuclear

Amplificação: *ENVISIN DUAL-LINK, marca Dako

**PICTURE-MAX, Marca Zymed

Os procedimentos técnicos relativos às reações de IHQ obedeceram aos protocolos convencionais incluindo as etapas de desparafinização, rehidratação em concentrações decrescentes de etanol, recuperação antigênica pelo calor úmido em tampão citrato (pH 6,0), bloqueio de peroxidase endógena através do peróxido de hidrogênio, e incubação “overnight” com o Ac primário diluído em PBS contendo soroalbumina bovina a 1%, em título previamente estabelecido, a 4°C. A seguir foram utilizados o sistema de amplificação e a revelação com cromógeno utilizando-se o substrato diaminobenzidina (DAB), que confere um precipitado de cor marrom no local onde ocorreu a reação Ag/Ac. Para a visualização das estruturas histológicas os preparados foram contracolorados com a Hematoxilina de Harris.

2.3 - ACHADOS CITOGENÉTICOS

Os exames de citogenética convencional foram realizados no Laboratório de Citogenética do SH-HCFMUSP, segundo procedimento 4.2.3.1. Para os exames anteriores a 2007, as imagens arquivadas foram resgatadas e revisadas no mesmo Laboratório. Para análise de citogenética molecular complementar foi separado o material fixado (metanol/ácido acético) para os casos relevantes.

2.3.1 - Procedimentos utilizados para realização de citogenética convencional

- **CULTURA CELULAR:** Amostra de 2 a 3 mL de aspirado medular, colhido de maneira estéril em heparina sódica. As amostras foram adicionadas em meio de cultura apropriado (RPMI 1640 suplementado com 30% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 0,5% de penicilina-estreptomicina), sem agente mitógeno (estimulante) e submetida à cultura de 24 e 48 horas em estufa de CO₂ à temperatura de 37°C.

Em seguida, adicionou-se 200µL de colchicina (4×10^{-5} M), a fim de interromper o processo de divisão celular. As amostras foram submetidas ao processo convencional de hipotonização com solução de KCL (cloreto de potássio) a 0,075M e de fixação com solução fixadora de Carnoy (1 parte de ácido acético + 3 partes de metanol). Os sedimentos foram ressuspensos em solução fixadora em quantidade suficiente para se obter uma boa concentração celular. O material foi pingado em lâmina de vidro e levados para estufa a 37°C para envelhecimento. O material (fixado) proveniente de cada paciente foi estocado em freezer a -20°C.

- **BANDAMENTO G:** Foi utilizada a técnica segundo Yunis et al. (1978), modificado. Nessa técnica os cromossomos são bandados em zonas claras e escuras, que nos permite identificar cada par de cromossomos humano, assim como alterações numéricas e estruturais presentes. As lâminas foram imersas em solução

de 2X SSC (solução de cloreto de sódio + citrato de sódio) e incubadas em banho-maria a 45°C, por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas. O corante foi preparado com a mistura de 2 partes de solução de tampão fosfato pH=6,8 (solução de Sorensen) para 1 parte de solução de corante Wright. Para coloração, cobriu-se completamente as lâminas com esse corante por aproximadamente 1 minuto. Em seguida as mesmas foram lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente e encaminhadas para análise citogenética.

- **ANÁLISE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL:** Para análise citogenética convencional, foram pesquisadas 20 metáfases, sempre que possível. As metáfases foram visualizadas em microscópio óptico (Olympus BX60), acoplada a um sistema de captura e digitalização de imagem (IRIS-PSI Genetics Systems), o qual permite organizar os cromossomos em forma de kariograma, possibilitando a visualização de anormalidade citogenéticas numéricas e estruturais. A análise citogenética convencional foi descrita de acordo com as normas do “International System for Chromosome Nomenclature” (ISCN 2009).

2.3.2 - Citogenética Molecular

A técnica de hibridização “in situ” por fluorescência (FISH) para pesquisa da monossomia do cromossomo 7 foi utilizada nos casos em que o cariótipo se mostrou sem anormalidades ou nos casos de ausência total de metáfases (ATM).

- **FISH para pesquisa da monossomia do cromossomo 7:** O procedimento técnico foi realizado com a sonda “CEP® Chromosome Enumeration DNA FISH Probes-Vysis,Inc”, para pesquisa do cromossomo 7, seguindo as recomendações do fabricante. No 1º dia, uma gota do material a ser analisado, em concentração ideal, foi pingada em lâmina de vidro. No dia seguinte, iniciou-se o processo de

denaturação. A lâmina foi acondicionada em jarra de plástico contendo solução tampão (2XSSC/0,5% de Tween 20) pré-aquecida a 37°C, e colocada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Feito isso, o material foi desidratado em uma bateria de álcoois nas seguintes concentrações: 70%, 85% e 100% , por exatamente 1 minuto, em temperatura ambiente. Após, aplicou-se 10µL da mistura da sonda (7µL de tampão Vysis + 2µL de água MilliQ +1µL da sonda) sobre o material em lâmina, a mesma foi coberta com película plástica e foi colocada sobre placa quente a 73°C por exatamente 1 minuto. Feito isso. A lâmina foi incubada em câmara úmida e escura a 42°C “overnight”no hibridizador. No dia seguinte, após a hibridização, a película plástica foi removida e a lâmina foi imediatamente submetida a duas lavagens para retirada de sinais inespecíficos, a mesma foi imersa em solução de lavagem (0,4XSSC/0,3%Tween) pré aquecida e incubada a 73°C, em banho-maria por exatamente dois minutos, e em seguida, foi imersa em solução de lavagem (2XSSC/0,1%Tween), por exatamente um minuto em temperatura ambiente. Feito isso, foi colocado 20 µL do corante fluorogênico DAPII (Vysis,Inc.) sobre o material em lâmina, para a coloração de fundo, e coberto com lamínula para análise. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (OlympusBX60), com objetiva de imersão (100X), equipado com filtros de banda simples de espectros: verde, vermelho e azul, e filtro de banda tripla (filtro com os três espectros). A análise foi realizada por dois observadores capacitados. Para cada paciente foram analisados 200 núcleos interfásicos, por cada observador e os resultados foram descritos de acordo com as normas do ISCN 2009.

2.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS versão 16.0.

A sobrevida global dos pacientes foi estimada empregando-se o estimador produto-limite de Kaplan-Meier. Foi utilizado para cálculo da sobrevida global, o intervalo de tempo decorrido entre a data do diagnóstico da SMD/NM secundária e a data do óbito. Utilizou-se a estratégia de considerar os pacientes submetidos ao TCTH alogênico como sobreviventes até a data do procedimento para estudo de todas as variáveis à exceção do próprio procedimento de TCTH alogênico.

A comparação das curvas de sobrevida foi realizada através do teste de log-rank (teste de Mantel-Cox), com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) (Kleinbaum, 1996).

As variáveis significativas em análise univariada ($p < 0,1$) foram submetidas à regressão logística binária de modo a verificar que variáveis combinadas melhor explicariam a sobrevida.

Para a análise de hipótese de igualdade de proporção entre os grupos: imunoeexpressão positiva da proteína p53, *ALIPs*, blastos (MO), comprimento do fragmento BMO e tempo de latência para desenvolvimento da NM secundária foi utilizado o teste exato de Fisher (Rosner, 1982).

Para padronização do valor de corte referência para monossomia do cromossomo 7 por FISH foi utilizado o teste estatístico do função β inversa usando o Microsoft Excel (Anexo H).

V - RESULTADOS

1- ASPECTOS CLÍNICOS (Anexo B)

Foram avaliados 42 pacientes, sendo 23 (54,8%) do sexo masculino, e 19 (45,2%) do sexo feminino, com mediana de idade de 53,5 anos (4-88) (Figura 1).

Figura 1: distribuição dos pacientes (%) por sexo e faixa etária

▪ DOENÇAS PRÉVIAS E TRATAMENTO (Figura 2, tabela 8 e Anexos B e C).

As doenças oncohematológicas apresentaram-se com maior frequência como doença prévia 19/42 (45,2%). Das discrasias de células plasmáticas, o mieloma múltiplo 9/42 (21,4%) foi a mais frequente. Um paciente com doença de Hodgkin 1/42 (2,4%), seis com linfomas não Hodgkin 6/42 (14,3%) e um com LMA e posterior transplante cardíaco. Para o tratamento, todos os pacientes com discrasias de células plasmáticas usaram melfalano, enquanto que os pacientes com LNH, linfoma folicular associaram alquilantes e fludarabina.

Dos tumores sólidos 6/42 (14,3%), o mais frequente foi câncer de mama 3/42 (7,1%).

Uma paciente com câncer de ovário e posterior câncer de mama 1/42 (2,4%), um

com câncer de próstata 1/42 (2,4%) e um com rabdomiossarcoma 1/42 (2,4%). Para o tratamento dos tumores sólidos, predominou o uso da ciclofosfamida [2/42 (4,8%)]. Dos seis pacientes portadores de doenças não neoplásicas e não hematológicas 4/42 (9,5%) possuíam doenças auto-imunes, como a síndrome de Behcet (paciente 26), poliarterite nodosa (paciente 27), retocolite ulcerativa (paciente 28) e lúpus eritematoso sistêmico (paciente 29) e 2/42 (4,8%) eram transplantados de órgãos sólidos, um hepático e um renal. As pacientes 26 e 27, 2/42 (4,8%) utilizaram alquilantes para imunossupressão (ciclofosfamida e/ou clorambucil), a paciente 28 usou azatioprina e a paciente 29 usou CSA. Como terapia para imunossupressão, o transplantado renal recebeu associação de azatioprina com CSA e GAT.

Dos portadores de anemia aplástica 11/42 (26,2%), 3/42 cursavam com clone HPN. A imunossupressão para tratamento da AA consistiu em: 2/42 (4,8%) uso exclusivo de CSA, 5/42 (11,9%) associaram IS e G-CSF, 1/42 (2,4%) associou CSA e GAL, e 3/42 (7,1%) não utilizaram terapia imunossupressora. Para aqueles que utilizaram G-CSF a mediana do tempo de uso de foi de 20,5 meses (4-42).

Figura 2: Distribuição (%) dos pacientes por doença prévia

O TCTH autólogo foi uma modalidade terapêutica utilizada por 5/42 (11,9%) dos pacientes que possuíam doenças oncohematológicas (Tabela 7)

Tabela 7: Pacientes que realizaram TCTH autólogo para tratamento da doença prévia

TCTH autólogo - Condicionamento	
paciente	
4	BEAM (carmustina + etoposide + citarabina + melfalano)
9	ciclofosfamida + bulsufano + melfalano
16	BEAM (carmustina + etoposide + citarabina + melfalano)
17	BEAM (carmustina + etoposide + citarabina + melfalano)
19	não informado

Como terapia para doença prévia 14/42 (33%) pacientes utilizaram exclusivamente a QT, 1/42 (2%) exclusivamente a RT e 11/42 (26%) fizeram associação de QT + RT . A imunossupressão foi utilizada em 12/42 (28%) dos pacientes, por vezes associando o uso de G-CSF (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição dos pacientes de acordo com a terapia prévia utilizada

Doença prévia	Nº de pactes	QT	RT	QT+RT	TCTH autólogo	IS	G-CSF
Doenças oncohematológicas	19	12	0	7	5	0	2
Doença de Hodgkin	1	0	0	1	0	0	0
Linfoma não Hodgkin	6	4	0	2	2	0	0
Discrasias células plasmáticas	11	7	0	4	2	0	1
LMA	1	1	0	0	1	0	1
Tumores sólidos	6	0	1	4	0	0	0
mama	3	0	0	2	0	0	0
ovário+mama	1	0	0	1	0	0	0
próstata	1	0	1	0	0	0	0
rabdomiossarcoma	1	0	0	1		0	0
Doenças não neoplásicas/alquilantes	2	2	0	0	0	0	0
Doenças não neoplásicas/imunossupressão	4	0	0	0	0	4	2
Aplasia	11	0	0	0	0	8	5
Total (%)	42(100)	14(33)	1(2)	11(26)	5(12)	12(28)	9(21)

QT: uso exclusivo de quimioterapia; RT: uso exclusivo de radioterapia; QT+RT: associação das duas terapias; TCTH autólogo: realização da TCTH autólogo; IS: uso de imunossupressão; G-CSF: uso de fator de crescimento granulocítico

▪ LATÊNCIA ENTRE A DOENÇA PRÉVIA E A SMD/NM SECUNDÁRIA (Anexo B)

A mediana da latência da doença prévia até a SMD/NM secundária foi de 85,4 meses, com variação menor para o paciente 16 com linfoma de grandes células B (23,8 meses) e maior para o paciente 37 com anemia aplástica grave com clone HPN (221,3 meses).

▪ TRATAMENTO DA SMD/NM SECUNDÁRIA (Anexo C)

Os pacientes foram tratados com suporte incluindo fatores de crescimento. Quatro pacientes (9,5%) foram submetidos a poliquimioterapia.

O TCTH alogênico com doador relacionado e HLA compatível foi realizado em 8/42 (19%) dos pacientes, com diferentes regimes de condicionamento (Tabela 9).

Tabela 9: Pacientes que realizaram TCTH alogênico para tratamento da SMD/NM secundária

TCTH alogênico - Condicionamento		Óbito até 31/12/2008
paciente		
4	fludara + melfalano	Não
16	(mini-alogênico) fludara + melfalano	Sim
17	bulsufano + melfalano	Não
18	bulsufano + melfalano	Não
26	não informado	Sim
28	ciclofosfamida + ICT	Não
33	ciclofosfamida + bulsufano	Sim
41	bulsufano + melfalano	Não

ICT: irradiação corporal total

2 - DOSAGENS BIOQUÍMICAS (Anexo D)

Dosagens bioquímicas realizadas ao diagnóstico da NM secundária:

DHL: A dosagem de DHL foi realizada em 24/42 (57,1%) dos pacientes. Do total de 24 pacientes avaliados 10/24 (41,7%) mostraram com valores acima de 480U/L, com o cálculo de mediana de 414 U/L (271-4310), sendo a menor variação para o paciente 37 e a maior para o paciente 13.

ALBUMINA: A dosagem de albumina foi realizada em 22/42 pacientes. Do total dos 22 pacientes, 5/22 (22,7%) apresentaram albumina com valores inferiores a 3,2 g/dL, com cálculo de mediana de 3,6 g/dL (2,1-4,5), sendo a menor variação para o paciente 11 e a maior para o paciente 4.

FERRITINA: A dosagem de ferritina foi realizada em 16/42 pacientes. Do total dos 16 pacientes, 13/16 (81,2%) apresentaram ferritina com valores superiores a 400 ng/mL para homens e 150ng/mL para mulheres com cálculo de mediana de 822 ng/mL (45-7842), sendo a menor variação para o paciente 20 e a maior para o paciente 34.

3 - ACHADOS MORFOLÓGICOS

3.1 - Hemograma (Anexo E)

O hemograma foi realizado nos 42 pacientes ao diagnóstico. Vinte e sete (64,3%) apresentavam taxa de Hb abaixo de 10g/dL, 23/42 (54,8%) apresentavam-se com contagem absoluta de neutrófilos abaixo de 1.500/ μ L e 33/42 (78,6%) se apresentavam com contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ L. A presença de blastos circulantes foi observada em 11/42 pacientes (26,2%) (Figura 3).

Figura 3: Frequência (%) dos principais achados em hemograma

Os cálculos das medianas dos dados mais relevantes do hemograma estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Cálculo da mediana dos valores do hemograma

	Mediana	variação
Contagem global de leucócitos	2.690/ μ L	(890-42.400)
Hemoglobina	9,0 g/dL	(5,8-14,7)
VCM	94 fL	(64,1-120,4)
Blastos (%)	0	(0-51)
Contagem absoluta dos neutrófilos	1.212/ μ L	(100-10.800)
Plaquetas	43.500/ μ L	(7.000-368.000)

3.2 - ACHADOS EM ASPIRADO/IMPRINT DE MEDULA ÓSSEA (Anexo F)

3.2.1 - Celularidade (Figura 4)

O exame do aspirado/imprint da MO foi realizado em 41/42 pacientes. A celularidade global foi avaliável em 37 casos (quatro casos não avaliáveis por ausência de grumos medulares). Foi observada hipercelularidade global em 15/37 (40,5%), hipocelularidade em 11/37 (29,7%) e a celularidade se encontrava normal em 11/37 (32,4%). A diluição esteve presente em 12/37 (32,4%).

A hipercelularidade relativa da série eritrocítica foi observada em 11/37 (29,7%), hipocelularidade em 9/37 (24,3%) e normocelularidade em 17/37 (45,9%) casos. A série granulocítica mostrou-se com normocelularidade relativa em 23/37 (62,2%) dos casos, sendo hipocelular em 12/37 (32,4%) e hipercelular em 2/37 (5,4%). A série megacariocítica foi avaliável em 36/37 (97,2%) casos: 19/36 (52,8%) apresentaram hipocelularidade, 8/36 (22,2%) hipercelularidade e 9/36 (25%) estavam normocelulares.

Figura 4: Principais achados (%) em relação a celularidade no aspirado/imprint de MO

3.2.2 - Displasia (Figura 5)

▪ **SÉRIE ERITROCÍTICA:** avaliáveis 34 casos, onde 27/34 (79,4%) apresentaram diseritropoese. As alterações mais frequentemente observadas foram as alterações megaloblastóides em 17/27 (63%), seguidas de alterações nucleares em 6/27 (22,2%) (Tabela 11).

Tabela 11: Alterações displásicas observadas na série eritrocítica n=27

Série Eritrocítica	nº de pacientes (%)
Alterações megaloblastóides	17 (63)
Alterações megaloblastóides e lobulação nuclear	1 (3,7)
Pontilhado basófilo	3 (11,1)
Eritroblastos com lobulação nuclear	2 (7,4)
Eritroblasto com multinucleação	2 (7,4)
Aumento de proeritroblastos	1 (3,7)
Vacuolização citoplasmática, binucleação e fragmentação nuclear	1 (3,7)

▪ **SÉRIE GRANULOCÍTICA:** avaliáveis 35 casos, dos quais 27/35 (77,1%) apresentaram disgranulopoe. A alteração displásica mais comum nesta série foi a presença de neutrófilos hipossegmentados e hipogranulares, pelgeróides em 10/27 (37%) (pacientes: 3, 4, 5, 10, 12, 14, 24, 26, 30 e 34) e assincronismo maturativo em 5/27 (18,5%) (Tabela 12).

Tabela 12: Alterações displásicas observadas na série granulocítica n=27

Série Granulocítica	nº de pacientes (%)
Neutrófilos pelgeróides	10 (37)
Assincronismo maturativo	5 (18,5)
Neutrófilos hipogranulares	2 (7,4)
Neutrófilos grandes	3 (11,1)
Outras anormalidades	7 (26)

▪ **SÉRIE MEGACARIOCÍTICA:** pode ser avaliada em 22 casos. Para os demais casos a frequente hipocelularidade não permitiu avaliação de no mínimo dez megacariócitos por esfregaço. A dismegariopose mostrou-se presente em 15/22 (68,2%) pacientes. A alteração mais frequente foi a presença de megacariócitos pequenos e hipolobados 10/15 (66,7%), megacariócitos pleomórficos em 3/15 (20%) e micromegacariócitos em 2/15 (13,3%). Os “clusters” foram observados em apenas um caso (6,7%) (Tabela 13).

Tabela 13: Alterações displásicas observadas na série megacariocítica n=15

Série Megacariocítica	nº de pacientes (%)
Megacariócitos pequenos e hipolobados	8 (53,3)
Megacariócitos pequenos, hipolobados e multinucleados	1 (6,7)
Megacariócitos pequenos, hipolobados e micromegacariócitos	1 (6,7)
Megacariócitos hipolobados e micromegacariócitos	1 (6,7)
Megacariócitos monolobados grandes	1 (6,7)
Megacariócitos pleomórficos	1 (6,7)
Megacariócitos pleomórficos e atípicos	1 (6,7)
Megacariócitos pleomórficos com "clusters"	1 (6,7)

Vinte e dois pacientes puderam ser avaliados quanto à displasia nas três linhagens, sendo que 2/22 (9,1%) não apresentaram displasia (pacientes 11 e 28). Foram observadas displasias em uma linhagem em 3/22 (13,6%) (pacientes 19, 40 e 42); em duas linhagens 3/22 (13,6%) (pacientes 21, 27 e 31) e em três linhagens em 14/22 (63,6%) dos casos (pacientes 2, 3, 5, 9, 14, 18, 20, 24, 26, 29, 33, 36, 37 e 39).

Figura 5: Distribuição (%) de displasia e principais achados em aspirado/imprint de MO

3.2.3 - Contagem diferencial (Figura 6) e Caracterização da NM-t

▪ **BLASTOS:** A porcentagem de blastos foi avaliada em quatro grupos: <5%, 5-9%, 10-19% e $\geq 20\%$. Porcentagem de blastos inferior a 5% foi observado em 14/37 (37,8%), entre 5 e 9% em 8/37 (21,6%); entre 10 e 19% em 8/37 (21,6%) e $\geq 20\%$ de blastos em 7/37 (18,9%) dos casos.

Portanto pudemos caracterizar como SMD (blastos < 20 e citopenias) 28/37 (75,7%), como LMA 7/37 (18,9%), (pacientes: 6,8,15,25,27,34 e 35), como SMD/SMP 1/37 (2,7%) paciente 3 e como LMMC 1/37 (2,7%) caso 33 que evoluiu com plaquetose. (Anexo E e F).

Eosinófilos acima de 5,2% foram observados em 3/37 (8,1%), basófilos acima de 1% em 2/37 (5,4%) e plasmócitos acima de 5% em 2/37 (5,4%) dos pacientes.

3.2.4 - Sideroblastos em anel (Figura 6)

A coloração de Perls foi realizada em 25 casos, sendo quatro não avaliáveis, portanto um total de 21 casos. A presença de sideroblastos em anel foi observada em 7/21 (33,3%) dos casos. Sideroblastos em anel acima de 15% foi observado em 3/21 (14,3%).

Figura 6: Frequência (%) dos principais achados na contagem diferencial e na coloração de Perls em aspirado/imprint de MO

DISPLASIA EM ASPIRADO MEDULAR

Figura 7: Paciente 34 - Blastos

Leishman 1000x

Figura 8: Paciente 18 - Dismegacariopoeses- megacariócito pequeno e bilobado
Leishman 1000x

Figura 9: Paciente 14 - Diseritropoese: binucleação
Leishman 1000x

Figura 10: Paciente 14- Disgranulopoese: núcleo bizarro
Leishman 1000x

Figura 11: Paciente 33- Diseritropoese: alterações megaloblastóides e lobulação nuclear Leishman 1000x

Figura 12: Paciente 36- Diseritropoese - lobulação nuclear Leishman 1000x

3.3 - ACHADOS EM BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA

(Anexo G, Figuras 13 e 13a)

A biópsia de medula óssea (BMO) foi realizada em 24 pacientes, sendo 22 casos avaliáveis. Vinte casos (90,9%) tiveram o comprimento do fragmento igual ou superior a 1,0 cm. O comprimento médio do fragmento da biópsia foi de 1,4 cm (0,6-3,7).

Hipercelularidade global foi observada em 13/22 (59 %), normocelularidade em 7/22 (31,8%) e hipocelularidade em 2/22 (9,1%) casos.

A celularidade da série megacariocítica foi avaliável em 22 casos, onde 9/22 (40,9%) apresentaram-se hipercelulares, 7/22 (31,8%) hipocelulares e 6/22 (27,3%) estavam normocelulares.

Na série megacariocítica a frequência de distúrbio de maturação e arquitetural pode ser avaliada em 19 casos, ocorrendo em 17/19 (89,5%) e 13/19 (68,4%) respectivamente. Em relação à maturação observou-se a frequência de megacariócitos (MGC) hipolobados em 11/19 biópsias (57,8%), monolobados em 10/19 (52,6%), multinucleados em 6/19 (31,5%), micromegacariócitos em 6/19 (31,5%) e megacariócitos típicos em 2/19 (10,5%).

Figura 13: Distribuição (%) da celularidade global e achados referentes à série megacariocítica (MGC) em biópsia de MO.

Figura 13A: Distúrbio de maturação: distribuição (%) por predominância dos tipos de megacariócitos (MGC) observados em biópsia de MO.

A presença de *ALIPs* (H&E) foi observada em 5/21 (23,8%) (pacientes: 23, 31, 32, 33 e 42) (Figura 14).

Os nódulos linfóides estiveram presentes em 9/22 (40,9%) biópsias, com uma média de 2,3 nódulos /biópsia (1-7) (Figura 14).

Houve proliferação reticulínica grau 2 em 11 /21 (52,4%) casos (pacientes: 3, 4, 13, 14, 15, 20, 22, 31, 33, 38 e 40) e grau 3 em 2/21 (9,5%) (pacientes 23 e 30).

Nenhum caso apresentou reticulogênese grau 4 (Figura 14).

A presença de Ferro foi observada pelo H&E em 13/22 (59%). Sete dos 22 pacientes (31,8%) apresentaram Ferro medular (2-3+) (pacientes: 9,16,27,32,34,37 e 39) (Figura 14).

A positividade da IHQ para as células precursoras CD34 pode ser avaliada em 22 casos, sendo CD34+ >1% em 17/22 (77,2%) e agrupamento de células CD34 em 13/22 (59%). A imunomarcção para CD117 apresentou resultados confiáveis em 17 casos somente, sendo CD117+ >1% em 14/17 (82,3%) e agrupamento de células CD117+ em 5/17 (29,4%) dos casos (Tabela 14) (Figura 14).

Os megacariócitos não apresentaram marcação aberrante pelo CD34, mas houve marcação pelo CD117 em 5/17 (29,4%).

A imunomarcção para a proteína p53 foi positiva em 7/21 (33,3%) casos (pacientes: 1, 3, 4, 13, 14, 15 e 32) (Figura 14).

Tabela 14: Positividade da IHQ (BMO) de células precursoras CD34+ e CD117+

Grupos	CD34+	CD117+
≤1%	5/22 (22,7%)	3/17 (17,6%)
1-10%	12/22 (54,5%)	9/17 (52,9%)
10-20%	2/22(9,1%)	2/17 (11,8%)
>20%	3/22 (13,6%)	3/17 (17,6%)
Células+ agrupadas	13/22 (59%)	5/17 (29,4%)

Figura 14: Principais achados (%) observados em biópsia de MO

HISTOLOGIA DE MEDULA ÓSSEA

Figura 15: Paciente 1: p53 (1+) 400x

Figura 16: Paciente 4: p53 (2+) 400x

Figura 17: Paciente 14: p53 (3+) 400x

Figura 18: Paciente 3: Megacariócitos com distúrbio de maturação e arquitetural, localizado em região peritrabecular H&E 400x

Figura 19: Paciente 3: Hipercelularidade, distúrbio de maturação e arquitetural da série eritróide H&E 400x

Figura 20: Paciente 31: Hipercelularidade, distúrbio de maturação e arquitetural da série megacariocítica H&E 200x

Figura 21: Paciente 31: Hipercelularidade e distúrbio de maturação da série megacariocítica. Megacariócitos grandes com lobulação anormal H&E 400x

Figura 22: Paciente 1: Fibrose grau 1 Reticulina 400x

Figura 23: Paciente 33: Fibrose grau 2 Reticulina 400x

Figura 24: Paciente 22: Fibrose grau 3 Reticulina 400x

Figura 25: Paciente 16: Hipocelularidade global H&E 100x

Figura 26: Paciente 3: Hiper celularidade global H&E 200x

Figura 27: Paciente 39: Ferro (3+) Perls 100x

Figura 28: Paciente 34: Células CD117+ perivascular 200x

Figura 29: Paciente 34: Células CD 117+ perinodular 200x

Figura 30: Paciente 32: Células CD117+ (> 20%) 400x

Figura 31: Paciente 1: Células CD34+ (1-10%) 400x

Figura 32: Paciente 33: Células CD34+ (10-20%) 400x

Figura 33: Paciente 15: Células CD34+ (> 20%)
e formando agrupamentos 400x

4 - ACHADOS EM CITOGENÉTICA (Tabela 15)

Estudo citogenético foi realizado em 38 pacientes quando da suspeita do diagnóstico da SMD/NM secundária. Em seis casos não se obteve metáfases, anormalidades clonais foram observadas em 25/32 (78,1%) cariótipos.

O estudo por FISH para pesquisa de monossomia do cromossomo 7 para foi realizado em 12 pacientes (pacientes: 1, 12, 16, 19, 23, 25, 31, 35, 38, 40, 41, 42) onde 2/12 (16,7%) se mostraram positivos. Este exame foi realizado em material fixado, sempre que disponível e quando o cariótipo se mostrou normal ou não apresentou crescimento celular. Os pacientes 38 e 41 tiveram material analisado proveniente de sangue periférico (material fixado).

Associados os dados da hibridização *in situ* e cariótipo convencional as anormalidades clonais foram classificadas em monossomia do 7 (-7), complexo (C) e outros (cariótipo com menos de 3 alterações clonais).

De 27 pacientes com anormalidades clonais, 10/27 (37%) apresentaram monossomia do cromossomo 7, 12/27 (44,4%) cariótipo complexo e 5/27 (18,5%) outras anormalidade, incluindo a deleção do braço longo do cromossomo 7, tetrassomia do cromossomo 8, t(3;21) e alterações estruturais envolvendo os cromossomos 1 e 21 (Figura 34).

A frequência de anormalidades não balanceadas (NB) foi de 26/27 (96,3%) e apenas um caso apresentou anormalidade balanceada (B).

A descrição dos cariótipos, segundo a nomenclatura ISCN 2009, assim como a classificação das anormalidades (-7, C e outros) e a divisão das anormalidades entre balanceadas e não balanceadas estão descritas na Tabela 15.

cromossomo

Figura 34: Frequência (%) das anormalidades citogenéticas clonais

Tabela 15: Avaliação Citogenética

pac	Cariótipo	FISH -7	perfil citogenético	B/NB
1	46,XY[13]	positivo	-7	NB
2	45,XY,del(5)(q12q33),-7[8]/45,XY,-15[4]/45,XY,-21[8]	.	C	NB
3	45,XY,-7[23]/45,XY,-1,der(1;7)(q10;p10),add(12)(p12),+mar,inc[7]	.	C	NB
4	ATM	NR	ATM	ATM
5	43,X,-Y,-5,-7,add(11)(p15),add(12)(p13),add(17)(p12)[20]	.	C	NB
6	33~40,X,-Y,-4,der(5),-8,-9,-12,-15,-17,-18,-22,+mar[cp7]/46,XY[2]	.	C	NB
7	NR	NR	NR	NR
8	44~47,XX,-5,-17,-18,+19,+21,+2mar[cp23]/46,XX[4]	.	C	NB
9	46,XX,t(3;21)(q26;q22)[7]/46,XX[2]	.	O	B
10	NR		NR	NR
11	45,XY,-7[17]/46,XY[3]	.	-7	NB
12	ATM	negativo	ATM	ATM
13	49~52,XY,+1,-4,-5,+6,+7,-8,-9,-17,-20,+21,+21,+mar[cp18]	.	C	NB
14	46,XX,del(5)(q?14q?31),del(13)(q?21q?31)[16]/47,XX,idem,+8[4]	.	C	NB
15	47,XX,add(21)(q21),+mar[10]/46,XX[12]	.	O	NB
16	46,XY[19]	negativo	NL	NL
17	45,XY,-7,add(11)(p15)[7]/45,XY,idem,add(17)(p12)[12]	.	C	NB
18	46,XY,del(7)(q22)[16]/46,XY[4]	.	O	NB
19	ATM	negativo	ATM	ATM
20	46,XX,-7,+mar[18]	.	-7	NB
21	NR		NR	NR
22	ATM	NR	ATM	ATM
23	ATM	negativo	ATM	ATM
24	46~49,-X,Y,-5,+2mar+r[cp3]	.	C	NB
25	46,XY[20]	positivo	-7	NB
26	48,XX,+8,+8[20]		O	NB
27	47,XX,+der(1;7)(q10;p10),-7,+21[20]	.	C	NB
28	47,XX,inc,-6,+2mar[15]	.	C	NB
29	44,XX,-5,-7,+8,add(17)(q10),-18,-21,+2mar[10]	.	C	NB
30	47,XY,+der(1)add(q11)[7]	.	O	NB
31	46,XY[21]	negativo	NL	NL
32	45,XX,-7[18]		-7	NB
33	45,XY,-7[10]/46,XY[3]		-7	NB
34	45,XY,-7[3]/46,XY,-7+21[16]		-7	NB
35	ATM	negativo	ATM	ATM
36	45,XY,inv(3)(q?23q?26),-7[9]		-7	NB
37	45,XX,-7[17]		-7	NB
38	46,XY[9]	negativo- sp	NL	NL

pac	Cariótipo	FISH -7	perfil citogenético	B/NB
39	46,XX,-7,+21[20]		-7	NB
40	46,XX[12]	negativo	NL	NL
41	NR	NR	NR	NR
41		negativo- sp	NL	NL
42	46,XY[10]	negativo	NL	NL

- Perfil citogenético: -7: monossomia do cromossomo 7
C: cariótipo complexo
O: outros
- Anormalidades citogenéticas B: balanceadas
NB: não balanceadas
- NR: cariótipo não realizado
- NL: cariótipo normal
- ATM: ausência total de metáfases
- FISH: sp: exame realizado em sangue periférico
- Resultado FISH: Paciente 1: nuc ish(D7Z1x1)[22/200]
Paciente 25: nuc ish(D7Z1x1)[34/200]

CARIÓTIPOS

Figura 35: Paciente 9: 46,XX,t(3;21)(q26;q22)[7]/46,XX[2]

Figura 36: Paciente 14: 46,XX,del(5)(q?14q?31),del(13)(q?21q?31)[16]/47,XX,idem,+8[4]

Figura 37: Paciente 18: 46,XY,del(7)(q22)[16]/46,XY[4]

Figura 38: Paciente 34: 45,XY,-7[3]/46,XY,-7+21[16]

FISH

Figura 39: FISH centromérico cromossomo 7 (paciente 25): presença de 1 núcleo interfásico com 1 sinal (monossomia 7) , um núcleo interfásico e 1 metáfase com dois sinais (normais)

Figura 40: FISH centromérico cromossomo 7 (paciente 1): mostra a presença de um núcleo interfásico com dois sinais (normal) e 1 sinal (monossomia 7)

5 - SOBREVIDA E ANÁLISE PROGNÓSTICA DAS VARIÁVEIS

5.1 - Sobrevida global para a população total

A mediana de sobrevida global para os 42 pacientes foi de 6 meses (Gráfico 1) e de 5,7 meses se censurarmos a data do TCTH-alogênico (Gráfico 2). Dos oito pacientes submetidos ao TCTH alogênico, cinco se encontravam vivos até 31/12/2008 (Anexo C).

5.1.1- Análise univariada para fatores relacionados à sobrevida global (Tabela 16 e Anexo J)

Em relação aos dados clínicos não houve diferença significativa na sobrevida global em relação as variáveis: sexo, idade (menor que 50 e maior ou igual a 50 anos), período de latência para desenvolvimento da NM-T e tipo de tratamento utilizado previamente (QT, IS, etc) .

Portadores de doenças oncohematológicas tiveram sobrevida significativamente menor que outros ($p=0,018$) (Gráfico 3), enquanto que os portadores de aplasia medular tiveram sobrevida significativamente maior ($p= 0,041$) (Gráfico 4).

Pacientes submetidos a TCTH-alogênico (Gráfico 5) tiveram mediana de sobrevida de 40 meses enquanto que para os demais observou-se 5 meses de sobrevida ($p=0,007$).

Em relação aos dados bioquímicos o nível sérico de DHL >480 U/L ($p=0,002$) (Gráfico 6) e da ferritina >1000 ng/mL ($p=0,037$) (Gráfico 7) associaram-se a pior sobrevida, não sendo observado o mesmo para a variável albumina.

A contagem plaquetária <100.000/ μ L teve tendência a pior sobrevida ($p=0,084$) (Gráfico 8), enquanto que as outras variáveis de sangue periférico não mostraram significância.

Nenhuma das variáveis estudadas do aspirado medular (celularidade, displasia, número de blastos, porcentagem de eosinófilos, basófilos e plasmócitos) associou-se significativamente ao prognóstico. Pacientes portadores de blastos $\geq 5\%$ tiveram mediana de sobrevida de 5,6 meses enquanto os demais tiveram sobrevida de 5,1 meses ($p=0,825$) (Gráfico 9).

Em relação às variáveis estudadas na histologia medular associou-se a pior sobrevida: a presença de células CD117+ agrupadas ($p=0,029$) (Gráfico 10) e houve tendência marginal para pior sobrevida a presença de imunoexpressão de proteína p53 ($p=0,056$) (Gráfico 11). A mediana de sobrevida do portador de células CD34 $\leq 1\%$ não foi atingida, talvez pelo pequeno número de pacientes ($p=0,181$) (Gráfico 12). As demais variáveis não se associaram ao prognóstico.

A citogenética normal associou-se a melhor sobrevida (não tendo sido atingida a mediana, neste estudo) comparada com a citogenética anormal (mediana de sobrevida de 5 meses) ($p=0,03$) (Gráfico 13). Houve tendência marginal quando comparamos cariótipo complexo frente aos demais ($p=0,057$) (Gráfico 14). Não houve diferença entre os pacientes com monossomia do cromossomo 7 e cariótipo complexo ($p=0,123$) (Gráfico 15).

Os pacientes portadores de *IPSS* com risco baixo+ intermediário I tiveram melhor sobrevida ($p=0,038$) (Gráfico 16).

Tabela 16: Sumário das variáveis que mostraram significância estatística ou tendência para sobrevida

Variável	p=(log-rank)	Menor sobrevida
Doença prévia- oncohematológica	0,018	Sim
Doença prévia- aplasia medular	0,041	Não
TCTH alogênico	0,007	Não
DHL > 480U/L	0,002	Sim
Ferritina > 1000ng/mL	0,037	Sim
Plaquetas < 100.000/μL	0,084	Sim
Células CD117+ agrupadas	0,029	Sim
Imunoexpressão positiva de p53	0,056	Sim
Cariótipo normal vs anormal	0,030	Anormal
Cariótipo complexo vs outros	0,057	Complexo
<i>IPSS</i>	0,038	Intermediário II + Alto (risco)

Gráfico 1: Estimativa de sobrevida global para o total de pacientes (método de Kaplan-Meier).

Gráfico 2: Estimativa de sobrevida global para o total de pacientes (método de Kaplan-Meier) censurando a data do TCTH alogênico.

Gráfico 3: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados pela presença ou não de doença oncohematológica prévia.

Gráfico 4: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados pela presença ou não de aplasia medular prévia.

Gráfico 5: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados pela realização ou não de TCTH alogênico para terapêutica de NM secundária.

Gráfico 6: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados para as dosagens DHL ≤ 480 U/L e DHL > 480 U/L.

Gráfico 7: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados para as dosagens de ferritina $\leq 1000\text{ng/mL}$ e ferritina $> 1000\text{ng/mL}$

Gráfico 8: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados para as contagens de plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{L}$ e plaquetas $< 100.000/\mu\text{L}$

Gráfico 9: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados para as contagens de blastos $\geq 5\%$ e blastos $< 5\%$ em MO

Gráfico 10: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados por detecção pela imunoistoquímica de agrupamentos de células CD117+

Gráfico 11: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados pela presença ou não de imunopositividade de p53 detectado por imunohistoquímica

Gráfico 12: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados por detecção pela imunohistoquímica de células CD34+ ≤1% e CD34+ >1%

Gráfico 13: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados pela presença ou não de anormalidades citogenéticas clonais

Gráfico 14: Estimativa de sobrevida global (método Kaplan-Meier) para pacientes estratificados pela presença ou não de complexidade cariotípica

5.1.2- REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA PARA FATORES RELACIONADOS À SOBREVIDA GLOBAL

Esta análise deve ser observada com cuidado, pois somente cinco (11,9%) pacientes possuíam a avaliação completa dos parâmetros significantes na análise univariada. Entretanto, a análise de 32 pacientes que apresentavam dados clínicos, de hemograma, mielograma e citogenética (portanto sem avaliação de dados bioquímicos e histológicos) mostraram que a presença de plaquetopenia inferior a 100.000/ μ L, citogenética anormal e não realização do TCTH alogênico se associaram a pior sobrevida (tabela 17).

Tabela 17- Análise por regressão logística binária

n=32	Variável	p=(long-rank)
	Doença prévia- oncohematológica	0,109
	Doença prévia - aplasia medular	0,739
	TCTH-alogênico	0,014
	Plaquetas <100.000/ μ L	0,028
	Cariótipo Normal vs Anormal	0,012

5.1.3 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE VARIÁVEIS (Tabela 18, Tabela 19 e Anexo K)

Foi analisada a frequência de imunexpressão positiva de p53 detectada por imunohistoquímica frente a: anormalidade citogenética, complexidade cariotípica, monossomia do cromossomo 7 e *IPSS* intermediário II + alto risco. Observou-se tendência ($p= 0,092$) na associação da anormalidade cariotípica com presença de imunexpressão positiva de p53. De sete casos com imunexpressão positiva de p53, seis apresentaram cariótipo anormal (Tabela 18). Entretanto, não parece haver associação da imunexpressão positiva de p53 com complexidade cariotípica ($p= 0,217$) ou presença de monossomia do cromossomo 7 ($p= 0,262$). De maneira especial, ocorreu associação entre *IPSS* subgrupo de maior risco e imunexpressão positiva de p53 ($p= 0,054$).

Tabela 18: Presença de p53 à histologia medular e estudo citogenético

pac	Cariótipo	p53
1	46,XY[13] Fish positivo monossomia 7	+1
3	45,XY,-7[23]/45,XY,-1,der(1;7)(q10;p10),add(12)(p12),+mar,inc[7]	+3
4	ATM	+2
13	49~52,XY,+1,-4,-5,+6,+7,-8,-9,-17,-20,+21,+21,+mar[cp18]	+3
14	46,XX,del(5)(q?14q?31),del(13)(q?21q?31)[16]/47,XX,idem,+8[4]	+3
15	47,XX,add(21)(q21),+mar[10]/46,XX[12]	+3
32	45,XX,-7[18]	+3
9	46,XX,t(3;21)(q26;q22)[7]/46,XX[2]	0
16	46,XY[19] FISH negativo	0
20	46,XX,-7,+mar[18]	0
22	ATM	0
23	ATM FISH negativo	0
27	47,XX,+der(1;7)(q10;p10),-7,+21[20]	0
30	47,XY,+der(1)add(q11)[7]	0
31	46,XY[21] FISH negativo	0
33	45,XY,-7[10]/46,XY[3]	0
34	45,XY,-7[3]/46,XY,-7+21[16]	0
38	46,XY[9] FISH negativo	0
39	46,XX,-7,+21[20]	0
40	46,XX[12] FISH negativo	0
42	46,XY[10] FISH negativo	0

Estudou-se também a associação da positividade da expressão da proteína p53 e a presença de células CD34, CD117 e *ALIPs*, não se observando correlação com nenhum dos parâmetros ($p=0,557$, $p=0,176$ e $p=0,439$, respectivamente).

Estudou-se a associação entre *ALIPs*, células CD34+ , CD117+ e blastos detectados no aspirado medular; não se observou correlação com nenhuma destas variáveis ($p=0,728$, $p=0,604$ e $p=0,162$ respectivamente). Entretanto deve-se ressaltar que foram detectados *ALIPs* em apenas cinco casos em nossa casuística.

Não houve associação entre blastos e: células CD34+, células CD34+ agrupadas, células CD117+ e células CD117+ agrupadas em nossa casuística ($p=0,674$, $p=0,583$, $p=0,604$ e $p=0,126$ respectivamente).

Não se observou associação entre o comprimento do fragmento ósseo e: expressão de células CD34+ e expressão de células CD117+, imunoexpressão de proteína p53, detecção de *ALIPs* e distúrbio arquitetural. Entretanto deve-se observar que apenas duas amostras possuíam medida do fragmento inferior a 1 cm.

Estudou-se também a associação entre o período de latência para o desenvolvimento de NM secundária e o tipo de doença preexistente. Houve tendência a maior latência para o desenvolvimento da NM secundária à aplasia medular como doença prévia ($p=0,093$). Não se observou correlação entre o período de latência e a terapêutica prévia utilizada.

Tabela 19: Teste exato de Fisher - análise de associação de variáveis

Variável	Variável	(Teste exato de Fisher)
		p=
Imunoexpressão positiva de p53	Anormalidade citogenética	0,092
Imunoexpressão positiva de p53	Complexidade cariotípica	0,217
Imunoexpressão positiva de p53	Monossomia do cromossomo 7	0,262
Imunoexpressão positiva de p53	<i>IPSS</i>	0,054
Imunoexpressão positiva de p53	Células CD34+	0,554
Imunoexpressão positiva de p53	Células CD117+	0,176
Imunoexpressão positiva de p53	<i>ALIPs</i>	0,439
<i>ALIPs</i>	Células CD34+	0,728
<i>ALIPs</i>	Células CD117+	0,604
<i>ALIPs</i>	Blastos (MO)	0,162
Blastos(MO)	Células CD34+	0,674
Blastos(MO)	Células CD34+ agrupadas	0,583
Blastos(MO)	Células CD117+	0,604
Blastos(MO)	Células CD117+ agrupadas	0,126
Fragmento BMO	Células CD34+	0,411
Fragmento BMO	Células CD117+	0,176
Fragmento BMO	Distúrbio arquitetural	0,574
Fragmento BMO	Imunoexpressão positiva p53	0,433
Fragmento BMO	<i>ALIPs</i>	0,532
Latência	Doença oncohematológica	0,220
Latência	Tumor sólido	0,476
Latência	Doença não-neoplásica e não-hematológica	0,645
Latência	Aplasia medular	0,093
Latência	somente QT	0,279
Latência	somente RT	0,526
Latência	QT + RT	0,307
Latência	QT + RT + TCTH	0,550
Latência	Imunossupressão	0,550

VI - DISCUSSÃO

Uma das mais sérias complicações encontradas em pacientes que trataram doenças prévias com agentes reconhecidamente mielotóxicos e ou imunossupressores por longa data, é o desenvolvimento de neoplasia secundária subsequente. As NM-t que incluem a SMD, LMA e a SMD/DMP secundárias (OMS, 2008) possuem papel importante neste cenário. Sua incidência vem aumentando nos últimos anos paralelamente ao avanço das terapêuticas como quimioterapia, radioterapia, agentes imunossupressores, regimes de condicionamento relacionados ao TCTH autólogo. Este trabalho se propôs a estudar pacientes portadores de SMD/NM secundária, que foram submetidos a tratamento de doença prévia neoplásica ou não com essas diferentes modalidades terapêuticas.

A primeira dificuldade encontrada foi a escolha de pacientes para inclusão em nossa casuística: pacientes que realizaram apenas QT/RT prévia ou também pacientes submetidos à imunossupressão. Três pacientes portadores de doenças genéticas constitucionais foram excluídos por ser um grupo pequeno e talvez possuir características biológicas bastante diferenciadas.

A classificação OMS em capítulo a parte, inclui as NM-t decorrentes de uso prévio de agentes citotóxicos, principalmente agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II associados ou não à RT. (Vardiman et al., 2008).

Utilizamos dados clínicos, exames de SP, MO e citogenéticos para o diagnóstico de SMD/NM nesta casuística. Para critério diagnóstico de nossos pacientes, nos baseamos na presença de citopenias de curso crônico e irreversível associadas a tratamento de doença prévia, com detecção de anormalidades displásticas em aspirado medular e ou biópsia de MO e presença de anormalidades cariotípicas clonais. Alguns casos apresentaram características de SMP ou monocitose ou contagem de blastos igual ou superior a 20% na MO ou SP. As NM secundárias

englobam assim tanto SMD, como LMA e SMD/DMP (LMMC) (Bennett et al., 1982), (Heim, 1992), (Valente et al., 2007), (Orazi, 2007), (Pedersen-Bjergaard et al., 2007), (Vardiman et al., 2008), (Kröger, et al., 2009). Todos os dados do aspirado medular, da biópsia de medula óssea e metáfases foram revisados e o estudo foi complementado com IHQ e por FISH para monossomia do cromossomo 7.

Como a SMD/NM secundária é uma doença rara, a nossa casuística foi composta por 42 pacientes com diferentes doenças prévias (Doenças neoplásicas vs Doenças não-neoplásicas) e diferentes tratamentos (QT/RT vs IS). Apesar de observarmos que estes subgrupos parecem possuir características peculiares, optamos por estudá-las em conjunto.

A incidência da SMD/NM secundária em nosso estudo foi de 10,2%. Este número é concordante com a literatura que trata especificamente das SMD/NM secundária relacionada à terapia, a qual mostra incidência entre 10-20% de todas as SMD/NM (Leone et al., 2007) (Voso et al., 2007) (Pedersen-Bjergaard et al., 2007) (Vardiman et al., 2008).

A mediana de idade dos nossos pacientes foi de 53,5 anos (4-88 anos), coincidente em estudo em NM-t realizado por Smith et al. (2003), onde a mediana de idade observada foi de 58 anos (6-86 anos).

Na nossa casuística a doença oncohematológica (46%) foi a doença prévia de maior prevalência. Houve o predomínio de pacientes com discrasia de células plasmáticas com uso prévio de melfalano. Observou-se três portadores de linfoma folicular (7,1%), tratados com fludarabina e ciclofosfamida. A associação da fludarabina com alquilantes ou mitoxantrone tem sido associada ao aumento de incidência da NM-t (Tam et al., 2006) (Sacchi et al., 2008). Estudo realizado por Morrison et al. (2002)

em pacientes portadores de LLC demonstrou que o risco de desenvolver NM-t após uso de fludarabina, clorambucil e de fludarabina associada ao clorambucil foi respectivamente de 0,5%, 0% e 3,5%. O câncer de mama (7,1%) foi a segunda neoplasia de maior prevalência, dados compatíveis com a literatura. Segundo estudo realizado por Abdelhameed et al. (2008) com casuística de 131 pacientes com tumor sólido primário que evoluíram para NM-t, o câncer de mama foi o tumor de maior prevalência com a incidência de 29,8%.

O TCTH autólogo foi realizado em 5/42 (11,9%) dos pacientes da nossa casuística. Esta modalidade parece também estar associada ao aumento do risco das NM-t, devido às altas doses de QT do condicionamento que incluem principalmente os alquilantes (Kröger et al., 2003) (Hake et al., 2007). Em trabalho realizado por Majhail (2008), o risco de SMD/NM secundária foi estimado em 5-15% após 5 anos de realização do TCTH autólogo, sendo muito raro após TCTH alogênico.

O tempo de latência para o desenvolvimento da SMD/NM secundária não se associou estatisticamente à doença prévia, mas houve tendência a maior latência para os portadores de anemia aplástica ($p=0,093$). O esquema terapêutico utilizado QT, RT, QT/RT ou imunossupressão utilizada no tratamento prévio também não se associou ao período de latência. A mediana da latência para os 42 pacientes foi de 85 meses, porém deve ser observada a heterogeneidade da nossa casuística. Trabalhos que tratam especificamente de NM-t como o do grupo alemão com 5.411 pacientes portadores de doença de Hodgkin que utilizaram esquemas como COPP, ABVD e BEACOPP, associados ou não a RT (Josting et al., 2003), ou outro com portadores de tumor sólido primário tratados com QT associada ou não à RT (Abdelhameed et al., 2008), mostraram respectivamente mediana de latência de 55 e 50 meses para o desenvolvimento da NM-t.

Na nossa casuística a mediana de sobrevida global foi de 6 meses e de 5,7 meses quando censuramos a data do TCTH alogênico, dado coincidente com a literatura. Estudando 306 pacientes com NM-t, Smith et al. (2003) mostraram que a mediana de sobrevida global foi de apenas 8 meses. Os pacientes apresentaram uma sobrevida curta com curso clínico progressivo e refratário a tratamentos convencionais às leucemias *de novo* (Larson, 2009). Em estudo conduzido por Josting et al. (2003) os pacientes portadores de NM-t mostraram uma mediana de sobrevida de apenas 4 meses, sendo que 22% dos pacientes foram a óbito dentro de 1 mês a partir da data do diagnóstico da NM-t.

Oito dos nossos 42 pacientes (19%) foram submetidos ao TCTH alogênico para tratamento da NM secundária (quatro pacientes portadores de doença oncohematológica, dois portadores de doença não hematológica e não neoplásica e dois portadores de aplasia de medula). Cinco pacientes (62,5%) estavam vivos até 31/12/2008, e a mediana de sobrevida desses pacientes foi de 40 meses, bastante superior aos não submetidos a este procedimento. O TCTH alogênico é a única alternativa de cura e parece haver uma evolução mais favorável para pacientes jovens, com cariótipo normal, e transplantado em primeira remissão. (Chang et al., 2007) (Kröger et al, 2009). Apesar dessa modalidade terapêutica ser a única com potencial curativo, nem todos os pacientes portadores de NM-t são elegíveis para este procedimento devido à toxicidade crônica e cumulativa da quimioterapia prévia, impactando na performance do TCTH alogênico. Entretanto, estudos têm estimado uma sobrevida de 2 anos para cerca de 30% dos pacientes que se submetem ao TCTH alogênico para o tratamento da NM-t (Godley & Larson, 2008).

Procuramos estudar os dados do hemograma, aspirado medular, biópsia de medula óssea, cariótipo e marcadores bioquímicos, visando descrever as anormalidades observadas em nossa casuística, compará-la com a literatura e detectar parâmetros associados ao prognóstico nas NM secundárias.

Quanto aos dados do hemograma, a plaquetopenia, foi o achado mais frequente (78,6%) seguido por anemia (64,3%). A presença de blastos em SP ocorreu em 26,2% dos nossos pacientes. A contagem de plaquetas inferior a 100.000/ μ L se relacionou estatisticamente com pior sobrevida, não ocorrendo o mesmo para as variáveis hemoglobina inferior a 10 g/dL, contagem de neutrófilos inferior a 1.800 / μ L e presença de blastos em SP. Dado concordante com estudo japonês conduzido por Takeyama et al. (1999), onde a plaquetopenia foi um fator de mau prognóstico para pacientes portadores de SMD/NM-t.

O exame do aspirado medular acrescentou pouco ao prognóstico, apesar de haver reprodutibilidade entre os observadores. A qualidade do material foi prejudicada pela presença de diluição em 32,4%, gerando dificuldade de avaliação do aspirado. Para a série megacariocítica foram avaliados somente 22 casos dos 37 casos considerados avaliáveis inicialmente. Destes observou-se dismegacariopoeia em 68,2%, onde a alteração mais frequente foi a presença de megacariócitos pequenos e hipolobados (66,7%), a presença de micromegacariócitos foi observada em apenas 13,3%. A presença de neutrófilos pelgeróides foi observada em 37% dos casos, sendo esta alteração displástica da série granulocítica mais comumente observada em nossa casuística. Não encontramos referência para este dado nas SMD/NM secundárias, mas acreditamos ser um importante marcador morfológico como na

SMD *de novo*. A porcentagem de blastos em MO inferior a 5% foi de 37,8%, entre 5 -19% de 43,2% e igual ou maior que 20% ocorreu em 18,9% comprovando a presença de LMA-t em nossa casuística. Dois pacientes apresentaram características de SMD/DMP, paciente 3 que evoluiu com plaquetose e paciente 33 portador de LMMC. Segundo Vardiman et al. (2008) na SMD/NM-t a porcentagem de blastos inferior a 5% pode ocorrer em até 50% dos casos. Vinte a 30% dos pacientes com NM-t evoluem diretamente para LMA-t. Em contrapartida, Zingh et al. (2007) acreditam que a porcentagem de blastos pode estar subestimada nesse tipo de casuística, prejudicando a subclassificação morfológica, e talvez explicando a ausência do valor prognóstico. Em nosso estudo observamos que os pacientes com contagem de blastos em medula óssea, inferior, igual ou superior a 5% tiveram igual sobrevida. Este achado é bastante diferente das SMD *de novo*, onde a porcentagem de blastos é a variável de maior impacto nos escores prognósticos utilizados IPSS e WPSS (Greenberg et al., 1997; Malcovati et al., 2005). A presença de sideroblastos em anel de 33,3% dos casos e de sideroblastos acima de 15% em 14,3% foi inferior a relatada por outros autores que citam a presença de sideroblastos em anel em mais de 60% dos casos, com alguns casos excedendo 15% de sideroblastos em anel nos precursores eritróides em pacientes portadores de SMD/NM-t. (Kröger et al., 2003) (Godley & Larson, 2008).

A biópsia de medula óssea se mostrou exame essencial para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes. A hipocelularidade global medular foi detectado em somente 9,1% das biópsias, dado discordante da literatura que relata a frequência de hipocelularidade medular, como característica nos casos de NM-t (Bennett et al., 1982). A baixa taxa de ALIPs em 23,8%, também surpreendeu, uma vez que a

presença de *ALIPs* é bastante sugestiva do diagnóstico de SMD *de novo*, sendo um marcador desfavorável desta doença. Fibrose grau 2 e 3 somaram 61,9% dos casos, dado concordante com a literatura. Segundo Orazi (2007) nas NM-t ocorre em grau ≥ 2 . Em nossa casuística os nódulos linfóides estiveram presentes em 40,9% dos casos, taxa superior a observada em SMD *de novo* e em indivíduos normais, 25% e 15% respectivamente (Magalhães et al., 1997; Lorand-Metze, 2003). O distúrbio de maturação da série megacariocítica esteve presente em 89,5% dos casos, sendo o megacariócito hipolobado o mais comumente observado. Não foi observada a expressão aberrante de CD34 pelos megacariócitos em nossa casuística, como tem sido relatado para casos de SMD *de novo* (Pellegrini et al., 2000). Entretanto, observamos essa marcação pelo CD117 em 29,4% dos casos. A imunoistoquímica mostrou positividade para células CD34 $>1\%$ e agrupamento das células CD34 respectivamente em 77,2% e 59% dos casos. Estes dados são compatíveis com estudos que relatam a alta positividade para pacientes portadores de NM-t (Orazi et al., 2007). Também em nossa casuística a positividade para as células CD117 $>1\%$ e agrupamentos de células CD117+ ocorreu respectivamente em 82,3% e 29,4% dos casos. De forma inesperada, não se observou associação destes marcadores imunoistoquímicos com a presença de *ALIPs* e com contagem de blastos em aspirado medular. Infelizmente a pequena quantidade de amostras histológicas de medula óssea não nos permitiu a análise multivariada. O agrupamento de células CD117+ foi variável de impacto na sobrevida dos pacientes, aqueles com presença de agrupamento tiveram mediana de sobrevida de apenas 1,7 mês. Apesar da presença de células CD34 $>1\%$ não ter revelado valor estatisticamente significativo, este dado também dever ser avaliado com cautela, pois a mediana de sobrevida não foi atingida para os pacientes portadores de CD34 $\leq 1\%$. Neste sentido imaginamos que a

imunoistoquímica para células CD34+ e CD117+ seja um melhor marcador de células precursoras do que a porcentagem de blastos no aspirado medular e que talvez possa ser utilizado em escore prognóstico. O nosso estudo demonstrou a imunoexpressão positiva do p53 em 33,3% dos casos, dado concordante com a literatura. A inativação do gene p53 tem sido detectado em até 70% nas NM-t vs 5-25% na SMD *de novo*, principalmente em casos clinicamente mais avançados (Christiansen, et al., 2001) (Hirai, 2005) (Raimondi 2003) (Pedersen-Bjegaard et al., 2007). A grande maioria (85,7%) dos pacientes que apresentaram imunoexpressão positiva para o p53 eram portadores de doenças oncohematológicas tratados previamente com alquilantes. Observou-se tendência ($p=0,092$) na associação da anormalidade cariotípica com presença da imunoexpressão positiva do p53, porém sem associação com complexidade cariotípica $p=(0,217)$ ou monossomia do cromossomo 7 $p=(0,262)$. Este último dado também deve ser avaliado com cautela devido a pequena quantidade de casos analisados. Houve também associação entre IPSS (subgrupo intermediário II + alto risco) com a imunoexpressão positiva de p53 $p=(0,054)$. Acreditamos também ser interessante o estudo comparativo do p53 entre testes genéticos (*FISH*) e imunoistoquímica.

A análise do cariótipo foi de grande importância no diagnóstico e prognóstico da SMD/NM secundária. Os nossos pacientes apresentaram alta taxa de anormalidades clonais (84,4%), resultados concordante com a literatura que relatam frequência de 80-95% desse tipo de anormalidade em pacientes portadores de NM secundária (Heim, 1992). Houve predomínio de anormalidades não balanceadas (96,3%). Os nossos pacientes apresentaram 44,4% de cariótipo complexo e 37% de monossomia do cromossomo 7, dados compatíveis com a literatura onde são relatadas alta frequência destas alterações nas NM secundárias (Heim, 1992) (Hake et al., 2007)

(Kröger et al., 2009). Dos dez pacientes que apresentaram monossomia do cromossomo 7, seis eram portadores de anemia aplástica e três utilizaram alquilantes (melfalano e ciclofosfamida) em terapia prévia. Não tivemos acesso ao tratamento prévio de uma paciente de câncer de mama. A frequência da monossomia do cromossomo 7 tem sido relatada como decorrente de uso de imunossupressores para tratamento de anemia aplástica, bem como do uso prévio de alquilantes (Rubin et al., 1991) (Maciejewsky & Selleri, 2004) (Pedersen-Bejaard et al., 2007). Observou-se um caso de anormalidade balanceada $t(3;21)$, onde a paciente utilizou alquilante (melfalano) para tratamento de mieloma múltiplo. Caso semelhante podemos observar no trabalho de Smith et al. (2003), com casuística de 306 pacientes portadores de SMD-t e LMA-t, onde um paciente que foi submetido a seis ciclos do esquema MOPP/ABVD para tratamento da doença de Hodgkin, apresentou $t(3;21)$ e $del(5q)$ em um mesmo clone. A translocação do cromossomo 21 (gene *AML1*) e o cromossomo 3 (gene *MDS-EVI-1*) resulta na fusão destes dois genes, com produção de proteína aberrante promovendo a desregulação da hematopoese. Este tipo de translocação têm sido descrito em SMD *de novo*, NM-t e LMC em crise blástica (Nimer, 2008). Por nossa casuística apresentar pacientes que foram tratados com inibidores de topoisomerase II, seria interessante também a pesquisa da integridade do gene *MLL* (11q23), através de técnicas moleculares, dado que o rearranjo *MLL* pode ser criptico à citogenética convencional. Essa anormalidade tem sido recorrente para este tipo de paciente (Leone et al., 2007). O cariótipo anormal se associou a pior sobrevida ($p=0,03$) e a complexidade cariotípica mostrou tendência marginal à pior sobrevida ($p=0,057$) quando comparada frente às demais anormalidades citogenéticas.

Aplicamos o *IPSS* [SMD *de novo* (Greenberg et al., 1997)] de maneira experimental para os nossos pacientes com a finalidade de estratificá-los e analisá-los estatisticamente. O *IPSS* subgrupo intermediário II + alto risco mostrou significância a pior sobrevida $p=(0,038)$, muito provavelmente pela presença de plaquetopenia e anormalidade cariotípica desses pacientes.

Em relação aos dados bioquímicos 41,7% dos pacientes apresentaram-se com níveis séricos de DHL superior a 480 U/L, 50% com níveis séricos de ferritina superior a 1000ng/mL e 22,7% com hipoalbuminemia. Observamos que a pior sobrevida se associou aos níveis elevados de DHL e ferritina. Não encontramos relatos na literatura com dados relacionados às NM secundárias, entretanto, na SMD *de novo*, níveis elevados de DHL sérico vem sendo associados à sobrevida curta (Alessandrino et al., 2001), sendo incluída como variável prognóstica no grupo de Dusseldorf (Aul et al., 1992). A elevação da ferritina sérica parece estar associada à pior evolução na SMD *de novo*, podendo estar relacionado com o número de transfusões prévias (Malcovati et al., 2005). Neste estudo a hipoalbuminemia não se correlacionou estatisticamente com pior sobrevida. Este dado discorda de estudo japonês realizado com pacientes portadores de NM-t, onde foi visto que a hipoproteinemia se associou a prognóstico mais desfavorável (Takeyama et al., 2000). Também nas SMD *de novo* estudadas em nosso serviço, a hipoalbuminemia foi um fator prognóstico desfavorável independente (Velloso, 1996).

Infelizmente não foi possível estabelecer o real valor prognóstico de todas as variáveis estudadas com significância na análise univariada. Entretanto, plaquetopenia, anormalidade citogenética e a não realização de TCTH alogênico se associaram à pior sobrevida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As NM secundárias são doenças infrequentes, que merecem especial atenção pela sua incidência crescente, representando um alto custo da cura.

As neoplasias secundárias representam uma das mais temíveis complicações decorrentes da cura de doenças neoplásicas prévias ou do prolongamento da sobrevida de pacientes portadores de outras doenças não-neoplásica pelo uso de imunossupressores.

Para o diagnóstico das NM secundárias, vários exames são complementares, porém em nosso estudo demonstramos a grande importância da biópsia de medula óssea e da análise citogenética. Particularmente, o estudo de células precursoras da medula óssea através da imunoistoquímica parece promissor para auxílio no diagnóstico e no prognóstico do paciente. Talvez este dado possa substituir a contagem de células blásticas no aspirado medular tão utilizada nas SMD *de novo*.

VII- CONCLUSÕES

1. A incidência de SMD secundária (10,2%), a mediana de idade (53 anos), o predomínio de doenças oncohematológicas, o surgimento de casos pós alquilantes e fludarabina e pós TCTH autólogo observados nesta casuística se assemelham aos relatados em outros estudos englobando casuísticas de SMD/NM secundárias a terapêutica.
2. Em 1/3 dos casos o aspirado medular mostrou-se de difícil avaliação e em 1/5 dos casos as displasias foram mínimas. Não se observou valor prognóstico de nenhum dos parâmetros avaliados pelo mielograma, incluindo a porcentagem de blastos, dados concordantes com outros autores.
3. Apesar da análise de apenas 22 casos, a biópsia medular mostrou-se exame essencial para diagnóstico e prognóstico das SMD/NM secundárias. A baixa incidência de hipocelularidade global (9,1%) e de *ALIPs* (23,8%) difere do citado por alguns autores. Houve tendência à associação da imunoexpressão positiva de p53 para o cariótipo anormal e *IPSS* de maior risco. Não se observou associação entre a presença de *ALIPs*, porcentagem de blastos na morfologia medular e células CD34+ e CD117+.
4. O estudo citogenético foi de grande importância no diagnóstico e prognóstico, com alta taxa de anormalidades clonais (84,3%), com predomínio de anormalidades não balanceadas.
5. Fatores associados à pior sobrevida incluíram: baixa contagem plaquetária, elevação de DHL e ferritina, presença de células CD117+ agrupadas, imunoexpressão positiva da p53, presença de anormalidades clonais, *IPSS* intermediário II ou alto risco.

6. A mediana de sobrevida de apenas 5,7 meses e a maior sobrevida dos pacientes submetidos ao TCTH alogênico é concordante com dados da literatura.
7. Apesar do *IPSS* não ter sido desenvolvido para as SMD secundárias, ele parece útil. Sugere-se a substituição da porcentagem de blastos do aspirado medular pela presença de células precursoras detectadas por imunoistoquímica.

VIII- ANEXOS

ANEXO A

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/08/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0405/07**, intitulado: **"ESTUDO MORFOLÓGICO E POR CITOGENÉTICA DA MEDULA ÓSSEA DE PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA SECUNDÁRIA NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO."** apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Elvira D. Rodrigues Pereira Velloso**

Pesquisador (a) Executante: **Roberta Sandra Da Silva Tanizawa**

CAPPesq, 07 de Agosto de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403
010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br /

secretariacappesq2@hcnet.usp.br

sol

ANEXO B - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Pc	sexo	Doença prévia	Diag d prévia	Tratamento da doença prévia		Diag da SMD/NM 2ª	idade	d prévia- SMD/NM 2ª	
					RT			Latência t(meses)	
1	M	plasmocitoma L3	15/12/1995	melfalano+ CCNU	S	26/06/2003	56	91,7	
2	M	Mieloma múltiplo IgG lambda	15/08/1989	melfalano	N	24/11/1997	51	100,8	
3	M	Mieloma múltiplo IgG lambda	09/04/1996	melfalano+ CCNU	S	29/11/2007	72	141,7	
4	F	Mieloma múltiplo IgG kappa	29/06/2002	melfalano+ doxorubicina	S	24/03/2008	58	69,8	
5	M	Mieloma múltiplo IgG kappa	15/07/1996	melfalano	S	24/04/2003	54	82,5	
6	M	Mieloma múltiplo IgG kappa	15/07/1995	melfalano+ CCNU	N	02/08/2004	67	110,2	
7	M	Mieloma múltiplo IgG kappa	06/01/1987	melfalano+ CCNU	N	06/07/1995	72	103,4	
8	F	Mieloma múltiplo IgG kappa	15/06/1999	melfalano	N	09/03/2007	88	94,1	
9	F	Mieloma múltiplo IgG kappa	15/11/2003	melfalano	N	07/02/2008	65	51,5	
10	F	Mieloma múltiplo IgG kappa	15/12/1992	melfalano	N	15/06/1995	66	30,4	
11	M	Amiloidose Primária	15/10/1998	melfalano	N	16/06/2003	76	56,8	
12	M	DH esclerose nodular	15/11/2001	CFM+procarbazona	S	14/05/2004	64	30,4	
13	M	LNH Linfoma Folicular	15/01/2002	clorambucil+CFM+ fosfato de fludarabina	S	05/02/2004	67	25	
14	F	LNH Linfoma Folicular	15/10/2005	CFM+fosfato de fludarabina	N	03/10/2007	60	23,9	
15	F	LNH Linfoma Folicular(1990)	01/06/1990	clorambucil+CFM+fosfato de fludarabina	N	08/11/2005	65	188	
		[Síndrome de Sjögren (1988)]							
16	M	LNH Linfoma de grandes céls B	15/03/2006	CFM+doxorubicina+ifosfamida+etoposide	N	26/02/2008	49	23,8	
17	M	LNH Linfoma de alto grau (Burkitt)	15/08/2001	CFM+doxorubicina+ifosfamida+etoposide	N	06/10/2005	32	50,4	
18	M	LNH Linfoma de Burkitt	15/11/2004	CFM+vincristina+metotrexato+adriamicina	S	12/07/2007	41	32,3	
19	M	LMA e transplante cardíaco	15/06/1989	protocolo para LMA	N	05/02/1999	17	117,4	
20	F	Câncer de mama	/	/	/	14/03/2001	69	-	
21	F	Câncer de mama	15/06/1990	CFM+metotrexato+ 5-fluorouracil	S	29/04/1995	60	59,3	

Pc	sexo	Doença prévia	Diag d prévia	Tratamento da doença prévia		Diag da	idade	d prévia- SMD/NM 2ª
					RT			
22	F	Câncer de mama	15/06/1989	/Sim para QT	S	19/06/1996	80	Latência t(meses) 85,4
23	F	Câncer de ovário (1991)	15/06/1991	QT câncer ovário + tamoxifeno + QT metástase pulmão	S	12/01/2006	63	177,5
		Câncer de mama (1998)						
24	M	Câncer de próstata	15/06/1994	Não para QT	S	09/01/1998	84	43,5
25	M	Rabdomiosarcoma	29/06/2005	CFM+etoposide+doxorubicina+carboplatina	S	06/12/2007	4	29,7
26	F	Síndrome de Behcet	15/06/1986	CFM +clorambucil +infiximab	N	28/05/2004	52	218,6
27	F	PAN (Poliarterite nodosa)	15/06/1985	CFM	N	26/06/2001	53	195,2
28	F	Retocolite ulcerativa	15/06/2000	azatioprina	N	04/04/2006	14	70,6
29	F	Lupus eritematoso sistêmico	15/03/1999	prednisona + CSA	N	27/06/2005	48	76,5
30	M	Transplante hepático	15/04/1998	/	N	24/08/2000	44	28,7
31	M	1º Transplante renal(1992)	15/06/1992	[CSA +azatioprina +prednisona] +EPO+G-CSF				
		e 2º Transplante renal em (2001)		[ATG+tacrolimus+azatioprina+prednisona]+EPO+G-CSF	N	31/07/2003	59	135,4
32	F	AAS	19/10/1994	CSA+G-CSF	N	10/02/2006	15	137,7
33	M	AA	15/06/1990	Andrógeno	N	04/06/1998	29	97
34	M	AAS	15/09/2000	CSA+GAT/GAL+G-CSF	N	02/06/2005	31	57,4
35	F	AAS(HPN)	15/06/1992	CSA+G-CSF	N	01/12/2003	29	139,5
36	M	AAS	15/03/1996	CSA+G-CSF	N	25/07/2000	24	53,1
37	F	AAS (HPN em 2001)	15/06/1987	CSA+GAT/GAL	N	18/08/2005	24	221,3
38	M	AAS Disqueratose	15/06/1979	Andrógeno	N	11/04/1997	19	217
39	F	AAS	15/09/2001	CSA+GAT/GAL+G-CSF	N	02/06/2005	26	45,2
40	F	Hipoplasia medular	15/05/1990	(...)	N	03/07/1997	24	86,9
41	M	AA(HPN em 15/05/2001)	22/12/1999	CSA	N	15/01/2007	21	86
42	M	AA	15/06/1979	CSA	N	11/03/1997	61	216

...../ Dado não disponível (...) Sem uso de medicação

ANEXO C- TRATAMENTO DA SMD/NM SECUNDÁRIA

pac	Diagnóstico SMD/NM 2ª	Tratamento da SMD/NM 2ª	Data do TCTH alogênico	Óbito	Último seguimento
1	26/06/2003	-		S	15/08/2003
2	24/11/1997	-		S	15/12/1997
3	29/11/2007	-		S	31/08/2008
4	24/03/2008	TCTH alogênico	28/05/2008	N	31/12/2008
5	24/04/2003	-		S	07/07/2003
6	02/08/2004	EPO + talidomida		S	15/11/2004
7	06/07/1995	-		S	11/07/1995
8	09/03/2007	talidomida		S	14/09/2007
9	07/02/2008	-		N	31/12/2008
10	15/06/1995	-		S	15/08/1995
11	16/06/2003	EPO + G-CSF + talidomida		S	06/07/2004
12	14/05/2004	EPO		S	29/10/2004
13	05/02/2004	-		S	07/02/2004
14	03/10/2007	EPO		S	16/01/2008
15	08/11/2005	-		S	27/12/2005
16	26/02/2008	TCTH alogênico	20/03/2008	S	16/06/2008
17	06/10/2005	TCTH alogênico	27/12/2005	N	31/12/2008
18	12/07/2007	TCTH alogênico	10/09/2007	N	31/12/2008
19	05/02/1999	EPO + G-CSF		S	02/08/1999
20	14/03/2001	-		S	13/08/2001
21	29/04/1995	-		S	05/07/1995
22	19/06/1996	-		S	10/01/1998
23	12/01/2006	-		S	23/02/2006
24	09/01/1998	EPO		S	27/04/1998
25	06/12/2007	-		N	31/12/2008
26	28/05/2004	TCTH alogênico + talidomida	05/04/2006	S	21/06/2006
27	26/06/2001	talidomida		S	12/07/2002
28	04/04/2006	TCTH alogênico	20/07/2006	N	31/12/2008
29	27/06/2005	-		S	21/08/2005
30	24/08/2000	EPO + G-CSF		S	13/05/2001
31	31/07/2003	EPO + G-CSF		S	01/08/2004
32	10/02/2006	PQT para LMA		S	26/10/2007
33	04/06/1998	TCTH alogênico	27/12/2000	S	15/09/2001

pac	Diagnóstico SMD/NM 2ª	Tratamento da SMD/NM 2ª	Data do TCTH alogênico	Óbito	Último seguimento
34	02/06/2005	PQT para LMA		S	25/07/2005
35	01/12/2003	PQT para LMA		S	30/12/2003
36	25/07/2000	-		S	06/08/2000
37	18/08/2005	-		S	15/01/2006
38	11/04/1997	-		N	31/12/2008
39	02/06/2005	PQT para LMA		S	02/01/2006
40	03/07/1997	-		N	31/12/2008
41	15/01/2007	TCTH alogênico	30/01/2007	N	31/12/2008
42	11/03/1997	-		N	31/12/2008

EPO: Eritropoetina

G-CSF: Fator de crescimento granulocítico

PQT: Poliquimioterapia

ANEXO D- DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Resultados obtidos dentro de um período de aceitação de até 30 dias a partir do diagnóstico

pac	DHL(U/L)	Albumina(g/dL)	Ferritina (ng/mL)
1	343	4,1	1012
3	344	3,4	220
4	392	4,5	331
8	338	3,1	571
9	366	3,8	NR
11	283	2,1	NR
12	389	4	1809
13	4310	3,9	NR
14	601	2,4	627
15	436	3,4	NR
16	375	3,5	1293
17	621	4,4	NR
18	292	4,1	465
20	1272	4,2	45
23	571	3,4	NR
27	476	4,3	165
28	288	3,6	NR
29	1242	3	NR
30	NR	3,1	NR
31	NR	NR	1051
32	NR	NR	632
34	739	3,7	7842
35	1300	NR	1148
36	2238	NR	4440
37	271	3,5	2182
38	274	NR	NR
39	609	3,7	NR
	Med=414	Med=3,6	Med=822

DHL mediana= 414 U/L (271-4310)

Albumina mediana= 3,6 g/dL (2,1-4,5)

Ferritina mediana= 822 ng/mL (45-7842)

ANEXO E- DADOS DO HEMOGRAMA

pac	Hb (g/dL)	VCM (fL)	leucócitos /μL	blastos (%)	neutrófilos /μL	eosinófilos /μL	basófilos /μL	monócitos /μL	plaquetas /μL
1	6,4	108,7	1.880	2	680	0	0	200	70.000
2	9,5	74,4	5.600	0	3.000	0	0	200	30.000
3	8,9	81,2	6.510	3	3.500	300	200	400	368.000
4	9,2	117,4	2.020	0	500	0	0	100	146.000
5	8,2	64,1	1.560	13	200	0	0	0	44.000
6	11,3	96,4	1.500	0	600	0	0	100	37.000
7	10	88	2.200	0	2.068	22	0	20	55.000
8	7,9	104,3	1.930	1	900	0	0	100	38.000
9	11	109,6	6.400	0	4077	70	12	760	65.000
10	8	77,1	2.000	0	700	32	116	160	52.000
11	6,4	112,5	2.440	0	1.200	0	0	300	32.000
12	11,5	96,9	4.360	0	1.500	200	0	400	48.000
13	5,8	82,5	7.920	0	2.000	0	100	200	7.000
14	7,6	81	5.160	0	4.100	400	0	400	68.000
15	11,4	93,2	2.060	0	1.300	0	0	200	148.000
16	9	93,1	1.190	7	100	0	0	0	22.000
17	13,2	110,8	13.350	0	7.900	700	0	1.700	33.000
18	9,5	111,1	2.600	6	1.200	0	0	200	110.000
19	7,4	108	2.100	0	500	0	0	80	29.000
20	9	91,4	12.300	0	10.800	100	0	600	65.000
21	10,9	93	1.600	0	590	0	32	80	115.000
22	8,4	96	1.500	0	100	0	0	100	42.000
23	11,5	92,8	1.470	0	200	0	0	200	11.000
24	10,2	98	13.000	0	8.710	390	260	130	44.000
25	11	85,4	4.600	0	920	46	0	140	78.000
26	9,9	120,4	3.740	2	1.758	0	0	780	32.000
27	10,3	99	6.800	0	5.000	0	0	300	52.000
28	7,1	90,8	4.570	0	800	0	0	900	31.000
29	8,8	93,9	890	11	200	0	0	0	26.000
30	7,7	99,1	2.100	0	600	0	0	300	33.000
31	7,3	85,5	2.490	0	1.200	0	0	200	247.000
32	6,9	81,9	2100	0	210	0	0	20	43.000
33	13,8	103,3	42.400	0	5.936	424	0	4.240	130.000
34	5,9	88,2	1.540	0	100	477	0	15	33.000
35	9,1	86,7	7.010	27	3.154	0	0	770	20.000

pac	Hb (g/dL)	VCM (fL)	leucócitos /μL	blastos (%)	neutrófilos /μL	eosinófilos /μL0	basófilos /μL	monócitos /μL	plaquetas /μL
36	8,5	101,9	5.300	2	3.180	0	0	320	30.000
37	10,5	90,5	2.320	0	181	0	0	520	40.000
38	5,9	83,8	3.700	0	1.594	144	33	300	140.000
39	9,3	95,9	27.640	51	8.292	1.382	276	830	57.000
40	10,6	91,8	4.500	0	2.407	225	36	380	176.000
41	6,6	103,7	2.780	0	1.223	0	0	110	21.000
42	14,7	107,2	5.200	0	1.606	26	52	340	41.000

ANEXO F - ASPIRADO/IMPRINT MEDULA ÓSSEA

Pc	data mielo /Alterações displásicas	qual	dil	celula//	G/E	blastos	SE	diserit	SG	disgr	pelger	Smega	dismeg	Int	linf	mon	eos	bas	plas	Sanel
1	22/07/2003	Av	N	Hipo	7/1	4	8	S dis	55	S ac	N	Hipo	Nav	.	19	9	1	1	3	Nav
	● Alterações megaloblastóides																			
	■ Neutrófilos anómalos																			
2	24/11/1997	Av	N	Normal	1/2	3	55	S dis	31	Smod	N	Hiper	S ac	.	3	1	5	1	1	4
	● Alterações megaloblastóides																			
	■ Assincronismo maturativo																			
	▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			
3	29/11/2007	Av	N	Hiper	2/1	5	31	S dis	54	Smod	S	Hiper	S ac	.	4	1	4	1	0	6
	● Pontilhado basófilo																			
	■ Neutrófilos pelgeróides																			
	▲ Megacariócitos pleomórficos																			
4	20/03/2008	Av	S	Hiper	1/2	18	40	S dis	22	S dis	S	Hipo	Nav	.	17	1	0	0	2	NR
	● Aumento de proeritroblastos																			
	■ Neutrófilos pelgeróides																			
5	24/04/2003	Av	N	Hiper	2/1	2	30	S dis	58	S ac	S	N	S ac	.	6	1	2	0	1	16
	● Alterações megaloblastóides																			
	■ Neutrófilos pelgeróides																			
	▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			
6	02/08/2004	Av	N	Hipo	.	21	3	Nav	39	Nav	Nav	Hipo	Nav	.	16	1	9	4	7	Nav

				G/E	blastos	SE	diserit	SG	disgr	pelger	Smega	dismeg	Int	linf	mon	eos	bas	plas	Sanel
Pc	data mielo	Alterações displásicas	qual	dil	celula//	%	•	%	■					%	%	%	%	%	%
7	05/07/1995	■ Neutrófilos anômalos	Av	S	N	4	14	N	64	S dis	N	Nav	.	14	0	2	0	2	10
8	26/04/2007	● Alterações megaloblastóides	Av	S	Hipo	22	14	S dis	28	S dis	N	Nav	.	27	2	3	0	4	NR
		■ Neutrófilos anômalos																	
9	30/10/2008	● Alterações megaloblastóides	Av	N	N	12	43	S dis	31	S dis	N	Hipo	.	8	3	1	0	2	Aus
		■ Neutrófilos displásicos																	
		▲ Megacariócitos hipolobado e micromegacariócitos																	
10	26/05/1995	● Alterações megaloblastóides	Av	N	Hiper	9	20	S dis	40	S dis	S	Hipo	.	9	7	5	0	10	Aus
		■ Neutrófilos pelgeróides																	
11	16/06/2003		Av	N	Hiper	4	57	N	22	N	N	N	.	9	2	5	0	1	Aus
12	17/05/2004	● Alterações megaloblastóides	Av	S	N	5	36	S mod	43	S dis	S	Hipo	.	13	1	1	0	1	Nav
		■ Neutrófilos pelgeróides																	
13	06/02/2004		Nav	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	NR
14	03/10/2007	● Vacuolização, eritroblastos binucleados, fragmentação nuclear	Av	N	Hiper	10	50	S ac	35	S mod	S	N	.	1	0	4	0	0	Aus
		■ Neutrófilos pelgeróides																	
		▲ Megacariócitos monolobados grandes																	
15	01/12/2005 (Imprint)	■ Neutrófilos anômalos	Av	N	Hipo	25	12	N	40	S dis	N	Hipo	.	21	1	0	0	1	NR

Pc	data mielo	Alterações displásicas			G/E	blastos	SE	diserit	SG	disgr	pelger	Smega	dismeg	Int	linf	mon	eos	bas	plas	Sanel
		qual	dil	celula//		%	%	●	%	■			▲		%	%	%	%	%	%
16	06/02/2008	Av	S	Hipo	1/1	11	36	S mod	33	S dis	N	Hipo	Nav	.	13	3	2	0	2	Aus
	● Alterações megaloblastóides																			
	■ Assincronismo maturativo																			
17	NR	NR																		NR
18	12/07/2007	Av	N	N	1/2	13	53	S mod	24	S disc	N	Hiper	S ac	.	5	1	2	1	1	Aus
	● Eritroblasto com lobulação nuclear																			
	■ Neutrófilos anômalos																			
	▲ Megacariócitos pequenos, hipolobados e micromegacariócitos																			
19	14/01/1999	Av	S	Hipo	3/1	3	19	S dis	54	N	N	N	N	.	16	0	4	0	4	NR
	● Alterações megaloblastóides																			
20	15/03/2001	Av	N	Hiper	1/1	4	34	S ac	49	S dis	N	N	S ac	.	5	1	4	1	2	16
	● Eritroblastos grandes e multinucleados																			
	■ Neutrófilos grandes																			
	▲ Megacariócitos pequenos, hipolobados e multinucleados																			
21	25/05/1995	Av	N	Hiper	1/1	2	49	S dis	39	S dis	N	N	N	.	7	1	1	1	0	10
	● Alterações megaloblastóides																			
	■ Assincronismo maturativo																			
22	29/10/1997	Nav	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	NR
23	12/01/2006	Nav	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	NR

Pc	data mielo	Alterações displásicas	qual	dil	celula//	G/E	blastos	SE	diserit	SG	disgr	pelger	Smega	dismeg	Int	linf	mon	eos	bas	plas	Sanel
24	09/01/1998		Av	N	Hiper	4/1	1	20	S mod	75	S ac	S	Hiper	S ac	.	2	0	2	0	0	Aus
		● Alterações megaloblastóides																			
		■ Neutrófilos pelgeróides																			
		▲ Megacariócitos pleomórficos e presença de "clusters"																			
25	06/12/2007		Av	N	Hipo	1/1	88	4	Nav	4	Nav	Nav	Hipo	Nav	.	3	0	0	1	0	NR
26	07/06/2004		Av	N	Hiper	2/1	7	32	S	54	S	S	N	S	.	5	1	0	0	1	30
		● Alterações megaloblastóides																			
		■ Neutrófilos pelgeróides																			
		▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			
27	19/03/2002		Av	N	Hiper	5/1	31	6	N	28	S dis	N	Hiper	S mod	.	12	18	4	0	1	Aus
		■ Neutrófilos hipogranulares																			
		▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			
28	30/05/2006		Av	N	Hiper	4/1	9	15	S dis	61	N	N	Hipo	N	.	10	1	2	0	1	Aus
		● Alterações megaloblastóides																			
29	28/06/2005		Av	N	Hiper	1/1	6	48	S ac	34	S dis	N	Hiper	S ac	.	8	1	1	1	1	NR
		● Eritroblastos gigantes multinucleares (PAS +)																			
		■ Neutrófilos anômalos																			
		▲ Megacariócitos pleomórficos e atípicos																			
30	15/08/2000		Av?	S*	Hipo	1/1	1	26	N	35	S mod	S	Nav	Nav	.	25	11	0	0	2	Aus
		*Diluição importante																			
		■ Neutrófilos pelgeróides																			

Pc	data mielo	Alterações displásicas	qual	dil	celula//	G/E	blastos	SE	diserit	SG	disgr	pelger	Smega	dismeg	Int	linf	mon	eos	bas	plas	Sanel
										%	■			▲		%	%	%	%	%	%
31	31/07/2003		Av	S	N	1/1	1	57	S dis	37	Smod	N	Hiper	N	.	3	2	0	0	0	Aus
		● Pontilhados basófilos																			
		■ Neutrófilos hipogranulares																			
32	05/04/2006		Av	S	Hiper	1/2	17	37	N	17	N	N	Hipo	Nav	.	27	0	1	1	0	NR
33	03/02/2000		Av	N	N	3/1	4	21	S mod	58	Smod	N	N	S mod	.	11	1	4	1	1	NR
		● Alterações megaloblastóides e lobulação nuclear																			
		■ Neutrófilos grandes																			
		▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			
34	02/06/2005		Av	S	Hipo	9/1	28	4	Nav	34	Smod	S	Hipo	Nav	.	14	2	16	1	1	NR
		■ Neutrófilos pelgeróides																			
35	01/12/2003		Av	N	N	1/1	32	22	S mod	31	N	N	Hipo	Nav	.	9	4	1	0	1	NR
		● Pontilhado basófilo																			
36	25/07/2000		Av	N	Hiper	1/1	7	42	S ac	41	Smod	N	Hipo	S mod	.	6	3	1	0	0	Aus
		● Eritroblastos com lobulação nuclear																			
		■ Assincronismo maturativo																			
		▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			
37	18/08/2005		Av	S	N	3/1	11	14	S dis	42	S dis	N	Hipo	S mod	.	23	4	4	1	1	Nav
		● Alterações megaloblastóides																			
		■ Neutrófilos grandes																			
		▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			

					G/E	blastos	SE	diserit	SG	disgr	pelger	Smega	dismeg	Int	linf	mon	eos	bas	plas	Sanel
Pc	data mielo /Alterações displásicas	qual	dil	celula//		%	%	•	%	■			▲		%	%	%	%	%	%
38	13/04/1999	Nav	.	.				.		.				.	.	.	.	.	.	NR
39	23/06/2005	Av	S	N	1/1	19	32	S dis	22	Smod	N	Hipo	S mod	.	10	1	15	1	0	NR
	● Alterações megaloblastóides																			
	■ Assincronismo maturativo																			
	▲ Megacariócitos pequenos e hipolobados																			
40	03/07/1997	Av	N	Hipo	4/1	1	17	S dis	73	N	N	Hipo	N	.	6	1	1	0	1	Aus
	● Alterações megaloblastóides																			
41	janeiro/2007// Imprint	Av	N	Hipo	1/1	5	42	N	34	N	N	Hipo	Nav	.	11	1	3	2	2	NR
42	29/06/2000	Av	N	N	1/1	2	35	S dis	45	N	N	Hipo	N	.	15	1	1	0	1	Aus
	● Alterações megaloblastóides																			Ferro presente

Pc: Nº do paciente

qual: Qualidade da amostra

dil: Presença de diluição

celula//: Celularidade Global

G/E: Relação Granulócitos/ Eritroblastos

SE: Série Eritrocítica

diserit: Diseritropoese

SG: Série Granulocítica

disgr: Disgranulopoeose

pelger: Presença de neutrófilos pelgeróides

Smega: Série Megacariocítica

dismega: Dismegacariopoeose

Int: Interstício

linf: Linfócitos

mon: Monócitos

eos: Eosinófilos

bas: Basófilos

plasm: Plasmócitos

S/N (Sim ou Não)

Sdis: Discreta

Smod: Moderada

Sac: Acentuada

Av: Avaliável

Nav: Não avaliável

NR: Não realizado

Aus: Ausente

ANEXO G - ANÁLISE DE BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA

Pc	Medida (cm)				Série Eritrocítica				Série Granulocítica				Série Megacariocítica			
		Celularidade Global		Dist I	Celular//	DM	DA	Celula//	DM	DA	Rel.	Eosin	Celularidade	DM	DA	Predominância (tipo de megacariócitos)
		D/N/A	(%)	S/N	D/N/A			D/N/A				N/A	D/N/A			
1	1,7	N	50	N	N	0	2+	N	2+	0	4/1	N	D	0	0	típicos
3	1,7	A	95	N	A	3+	3+	A	2+	0	1/1	N	A	3+	3+	pequenos, monolobados, hipolobados com agrupamento
4	1,9	A	70	N	A	0	0	A	0	0	1/1	N	A	3+	3+	hipolobado e monolobado
9	0,6	N	50	N	N	0	0	N	0	0	4/1	N	D	1+	1+	bilobado, monolado e micromegacariócito
13	1,4	A	80	N	A	0	0	A	3+	0	1/4	N	A	3+	2+	pequenos, monolobados, hipolobados e micromegacariócito
14	1	A	80	N	A	3+	3+	A	3+	3+	1/3	N	A	2+	2+	grandes, hipolobados, cromatina frouxa
15	1,4	N	40	N	N	0	0	N	2+	0	4/1	N	D	Nav	Nav	Nav
16	1,5	D	20	N	D	2+	2+	D	2+	3+	1/1	N	D	Nav	Nav	Nav
20	1	A	70	N	D	3+	2+	A	2+	0	5/1	N	N	2+	2+	pequenos, hipolobados, multinucleados e micromegacariócito
21	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav
22	1,5	A	50	N	A	0	0	A	2+	0	3/1	N	N	2+	0	hipolobado
23	1	A	80	N	A	3+	2+	A	2+	Alip	3/1	A	A	3+	3+	monolobados, hipolobados e picnóticos
27	1	D	40	S	N	0	2+	D	0	0	2/1	N	D	3+	2+	pequenos, hipercromáticos, mono, bi e multinucleados
30	1	A	70	N	D	0	0	A	0	0	3/1	N	A	2+	2+	pequenos, grandes, hipolobados e micromegacariócito
31	1,4	A	90	N	A	0	2+	A	2+	Alip	3/1	N	A	3+	3+	grandes , hipolobados, lobulação anômala e micromegacariócito
32	3,7	A	98	N	A	2+	2+	A	2+	Alip	3/1	N	N	1+	0	pequenos, picnóticos, monolobados e multinucleados
33	2,5	A	80	N	A	1+	2+	N	3+	Alip	1/3	N	D	2+	0	monolobado e multinucleado
34	1,1	N	70	N	D	Nav	Nav	A	0	0	10/1	A	D	Nav	Nav	Nav

					Série Eritrocítica				Série Granulocítica					Série Megacariocítica			
Pc	Medida (cm)	Celularidade Global		Dist I	Celular//	D/N/A	DM	DA	Celular//	DM	DA	G/E	Rel. Eosin N/A	Celularidade D/N/A	DM	DA	Predominância (tipo de megacariócitos)
		D/N/A	(%)														
36	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav
37	1,5	N	80	N	POUCO REPRESENTATIVO								Nav	N	1+	0	monolobado e multinucleado
38	1	A	99	N	A	0	2+	A	3+	3+	3/1	N		A	1+	3+	hipolobado, momolobado,multilobados grandes, multinucleados e micromegacariócito
39	0,8	A	90	N	N	0	2+	A	2+	0	4/1	N		N	2+	1+	monolobado e binucleado
40	1	N	70	N	D	0	0	A	0	1+	5/1	N		A	2+	2+	hipolobado e multinucleado
42	1,5	N	40	S	N	0	0	N	2+	A/lip	3/1	N		N	0	0	típicos

Pc: nº do paciente

Nav: Não Avaliável

Dist I: Distribuição irregular

Alip: Presença de Alips

Celular//: Celularidade

D/N/A: Diminuída ou Normal ou Aumentada

S/N: Sim ou Não

DM: Distúrbio de maturação

DA: Distúrbio arquitetural

Eosin: Eosinófilos

Continuação do ANEXO G – ANÁLISE DE BIÓPSIA DE MEDULA ÓSSEA

Células Mononucleares					Células						Estroma				
Pc	Linfo B	Linfo T	Nódulos linfóides	Plasmócito	CD34			CD117			p53	Fibrose	Vasos	Ferro	Perls
	I	I		%	I/Ag	MGC (S/N)	%	I/Ag	MGC (S/N)						
1	2+	2+	...	<5 Ipv	1-10	I	N	1-10	I	S	1+	1	0	1+	1+
3	2+	2+	1 nódulo	<5 Ipv	≤1	I	N	1-10	I	N	3+	2	0	0	0
4	3+	3+	2 nódulos	5-10 Ipv	1-10	IAG	N	1-10	I	N	2+	2	0	0	0
9	1+	1+	...	5-10 Ipv	≤1	I	N	≤1	I	N	0	1	0	2+	1+
13	1+	2+	...	<5 Ipv	≤1	I	N	>20	IAG	N	3+	2	0	1+	2+
14	1+	2+	...	<5 Ipv	1-10	I/AG	N	10-20	IAG	S	3+	2	0	0	0
15	1+	2+	...	<5 Ipv	>20	IAG	N	10-20	IAG	N	3+	2	0	0	0
16	1+	2+	...	5-10 Ipv	1-10	IAG	N	1-10	I	N	0	1	0	2+	0
20	1+	3+	1 nódulo	<5 Ipv	1-10	IAG	N	1-10	I	N	0	2	0	0	0
21	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav.	Nav
22	1+	2+	1 nódulo	<5 Ipv	1-10	IAG	N	≤1	I	N	0	2	0	0	0
23	1+	3+	7 nódulos	5-10 Ipv	1-10	IAG	N	Nav	Nav	Nav	0	3	0	1+	0
27	1+	2+	...	<5 Ipv	1-10	I	N	1-10	I	N	0	1	0	2+	0
30	1+	2+	1 nódulo	NR	1-10	I	N	NR	NR	NR	0	3	0	1+	NR

Células Mononucleares				Células						p53		Estroma			
Pc	Linfo B	Linfo T	Nódulos linfóides	Plasmócito	CD34+			CD117+				Fibrose	vasos	Ferro	Perls
	I	I		%	%	I/Ag	MGC (S/N)	%	I/Ag	MGC (S/N)	(0/3)	(0/4)		(0/3)	
31	1+	1+	...	<5 Ipv	1-10	IAG	N	1-10	I	S	0	2	0	1+	1+
32	1+	3+	...	5-10 Ipv	10-20	IAG	N	>20	IAG	N	3+	1	0	3+	2+
33	1+	1+	...	5-10 Ipv	10-20	IAG	N	Nav	Nav	Nav	0	2	0	1+	1+
34			1 nódulo	5-10 Ipv	>20	IAG	N	>20	IAG	N	0	1	0	2+	3+
36	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav	Nav
37	Nav	2+	...	<5 Ipv	1-10	I	N	Nav	Nav	Nav	Nav	1	0	2+	2+
38	1+	2+	...	<5 Ipv	≤1	I	N	1-10	I	N	0	2	0	0	0
39	1+	2+	...	<5 Ipv	>20	IAG		Nav	Nav	Nav	0	0	0	2+	3+
40	1+	1+	3 nódulos	<5 Ipv	1-10	IAG	N	≤1	I	S	0	2	0	0	0
42	1+	1+	4 nódulos	5-10 Ipv	≤1	I	N	1-10	I	S	0	Nav	0	0	0

Ipv: Isolados e perivasculares

I: Isolados

IAG: Isolados e agrupados

MGC (S/N): marcação de megacariócito (Sim ou Não)

Nav: Não avaliável

ANEXO H - PADRONIZAÇÃO DO VALOR DE CORTE PARA PESQUISA DA MONOSSOMIA DO CROMOSSOMO 7

Interpretação técnica dos resultados:

A sonda CEP 7 SpectrumGreen, SG CEP 7 (α satélite) é específica para região cromossômica 7p11.1-q11.1, locus gênico D7Z1. Este tipo de sonda detecta sequências específicas do DNA repetidas em “tandem”. A sonda CEP é diretamente marcada com fluoróforo da Vysis®, cor verde. Para minimizar a reação cruzada com outras seqüências repetitivas similares em outros cromossomos, a hibridização é realizada sob condições de alta adstringência. O padrão de hibridização para uma célula normal é de dois sinais verdes, enquanto para a monossomia do cromossomo 7, visualiza-se somente um sinal por célula.

Valor de corte para sonda CEP 7 (Vysis)

Foram realizados cinco testes, com amostras de MO de pacientes sabidamente não portadores de doenças onco-hematológicas. Analisaram-se 200 núcleos interfásicos de cada amostra, por cada um dos observadores. Sendo considerado o número de sinais típicos positivos (1 sinal verde) verificados em cada teste [observador 1 - (10,3,2,14,2); observador 2 - (2,9,5,8,4)]. Os resultados foram submetidos ao teste estatístico da função β inversa usando o Microsoft Excel (0,95; 15; 200). O valor de corte obtido foi 0,100383, o qual em valores percentuais é 10,03%. Considera-se como positivo para esta sonda o caso que apresente mais de 10,03% dos núcleos interfásicos apresentando apenas um sinal verde, indicando monossomia do cromossomo 7.

De acordo com os resultados obtidos em amostras controles, considerou-se como resultado positivo, quando na contagem, as amostras apresentaram somente um sinal verde por célula em mais de 10,03 % dos núcleos interfásicos (200 para cada paciente).

ANEXO I - IPSS

IPSS (Greenberg et al., 1997)

pac	blastos % (MO)	pontos	citopenias	pontos	cariótipos	pontos	escore	IPSS
1	4	0	3	0,5	D	1	1,5	INTERMEDIÁRIO-2
2	3	0	2	0,5	D	1	1,5	INTERMEDIÁRIO-2
3	5	0,5	1	0	D	1	1,5	INTERMEDIÁRIO-2
4	18	1,5	2	0,5	ATM	ATM	2	≥INTERMEDIÁRIO-2
5	2	0	3	0,5	D	1	1,5	INTERMEDIÁRIO-2
6	21	2	2	0,5	D	1	3,5	ALTO
7	4	0	1	0	NR	NR		...
8	22	2	3	0,5	D	1	3,5	ALTO
9	12	1,5	1	0	I	0,5	2	INTERMEDIÁRIO-2
10	9	0,5	3	0,5	NR	NR		...
11	4	0	3	0,5	D	1	1,5	INTERMEDIÁRIO-2
12	5	0,5	3	0,5	ATM	ATM		...
13	Nav	Nav	2	0,5	D	1	1,5	≥INTERMEDIÁRIO-2
14	10	0,5	2	0,5	D	1	2	INTERMEDIÁRIO-2
15	25	2	1	0	I	0,5	2,5	ALTO
16	11	1,5	3	0,5	F	0	2	INTERMEDIÁRIO-2
17	Nav	Nav	1	0	D	1		...
18	13	1,5	2	0,5	D	1	3	ALTO
19	3	0	3	0,5	ATM	ATM		...
20	4	0	2	0,5	D	1	1,5	INTERMEDIÁRIO-2
21	2	0	1	0	NR	NR		...
22	Nav	Nav	3	0,5	ATM	ATM		...
23	Nav	Nav	2	0,5	ATM	ATM		...
24	1	0	1	0	D	1	1	INTERMEDIÁRIO-1
25	88	2	2	0,5	D	1	3,5	não aplicável
26	7	0,5	3	0,5	I	0,5	1,5	INTERMEDIÁRIO-2
27	31	2	1	0	D	1	3	ALTO
28	9	0,5	3	0,5	D	1	2	INTERMEDIÁRIO-2
29	6	0,5	3	0,5	D	1	2	INTERMEDIÁRIO-2
30	0	0	3	0,5	I	0,5	1	INTERMEDIÁRIO-1
31	0	0	2	0,5	F	0	0,5	INTERMEDIÁRIO-1
32	17	1,5	3	0,5	D	1	3	INTERMEDIÁRIO-2
33	4	0	0	0	D	1	1	INTERMEDIÁRIO-1
34	28	2	3	0,5	D	1	3,5	ALTO
35	32	2	2	0,5	ATM	ATM		ALTO
36	7	0,5	2	0,5	D	1	2	INTERMEDIÁRIO-2
37	11	1,5	2	0,5	D	1	3	ALTO
38	Nav	Nav	2	0,5	F	0		...
39	19	1,5	2	0,5	D	1	3	ALTO
40	0	0	0	0	F	0	0	BAIXO
41	5	0,5	3	0,5	NR	NR		...
42	2	0	2	0,5	F	0	0,5	INTERMEDIÁRIO-1

Cariótipo: **F**-favorável **D**-desfavorável **I**-intermediárioATM: ausência total de metáfases **Nav**: não avaliável **NR** : não realizado

ANEXO J

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Análise univariada

variável	categoria	nº de casos	mediana de sobrevida (meses)	p(log-rank)
sobrevida global	com censura TCTH-alo	42	5,7	não aplicável
sobrevida global	sem censura TCTH-alo	42	6	não aplicável
Dados clínicos				
sexo	masculino	23	5,9	0,974
n=42	feminino	19	5,1	
idade	< 50	18	8,7	0,135
n=42	≥ 50	24	3,6	
doença prévia	oncohematológica	19	3,5	0,018
n=42	tumor sólido	6	3,6	0,833
	não neoplásica/ não			
	hematológica	6	12,2	0,651
	anemia aplástica	11	20,7	0,041
latência	< 85 meses	20	3,6	0,264
n=41	≥ 85 meses	21	9,2	
TCTH alogênico	não	34	5	0,007
n=42	sim	8	40	
tratamento prévio	QT	14	5,9	0,879
n=39	RT	1	3,6	0,599
	QT+RT	11	2,5	0,749
	TCTH-auto	5	5,9	0,309
	Imunossupressor	12	7,1	0,764
Bioquímica				
DHL	≤480 U/L	14	9,2	0,002
n=24	>480 U/L	10	1,7	
albumina	≥3,2 g/dL	17	5	0,624
n=22	<3,2 g/dL	5	6,3	
ferritina	≤1000ng/mL	8	6,3	0,037
n=16	>1000ng/mL	8	1,7	

Hemograma		nº de	mediana de	
variável	categoria	casos	sobrevida (meses)	p(log-rank)
hemoglobina	≥10 g/dL	15	5,6	0,29
n=42	<10 g/dL	27	5,9	
neutrófilos	≥1.800/μL	15	5,1	0,615
n=42	<1.800/μL	27	5,9	
plaquetas	≥100.000/μL	9	12,2	0,084
n=42	<100.000/μL	33	5,1	
blastos em SP	ausente	31	5,9	0,295
n=42	presente	11	2,4	
Aspirado medular				
celularidade global	hipocelular	11	5,9	0,853
n=37	normocelular	11	7,1	
	hipercelular	15	3,6	
celularidade	hipocelular	19	5,6	0,79
série megacariocítica	normocelular	9	5,1	
n=36	hipercelular	8	7,1	
displasia série megacariocítica	ausente	7	12,9	0,233
n=22	presente	15	5,1	
pseudo pelger	ausente	25	6,3	0,586
n=35	presente	10	3,6	
blastos em MO	<5%	14	5,1	0,825
n=37	≥5%	23	5,6	
eosinófilos	≤5,2%	34	5,9	0,243
n=37	>5,2%	3	3,5	
basófilos	≤1%	35	5,9	0,495
n=37	>1%	2	3,5	
plasmócitos	≤5%	35	5,9	0,139
n=37	>5%	2	2	

Histologia medular		nº de	mediana de	
variável	categoria	casos	sobrevida (meses)	p(log-rank)
tamanho do fragmento	<1,0 cm	2	7,1	0,771
n=22	≥1,0 cm	20	9,2	
celularidade global	hipocelular	2	12,7	0,948
n=22	normocelular	7	5	
	hipercelular	13	9,2	
celularidade	hipocelular	7	1,7	0,977
série megacariocítica	normocelular	6	7,1	
n=22	hipercelular	9	9,2	
distúrbio maturativo	não	2	1,7	0,608
série megacariocítica n=19	sim	17	12,2	
distúrbio arquitetural	não	6	19	0,464
série megacariocítica n=19	sim	13	9,2	
<i>ALIPs</i>	não	16	7,1	0,31
n=21	sim	5	20,7	
CD34	≤1%	5	>	0,181
n=22	>1%	17	7,1	
CD34	(1-10%)	12	8,7	0,676
N=17	>10%	5	7,1	
CD34 agrupadas	não	9	9,2	0,755
n=22	sim	13	7,1	
CD117	≤1%	3	19	0,172
n=17	>1%	14	9,2	
CD117	(1-10%)	9	12,3	0,081
n=14	>10%	5	1,7	
CD117 agrupadas	não	12	12,7	0,029
n=17	sim	5	1,7	
Proteína p53	negativo	14	12,7	0,056
n=21	positivo	7	3,5	
presença de nódulo linfóide	não	13	12,2	0,81
n=22	sim	9	9,2	
fibrose	<grau2	8	7,1	0,608
n=21	≥grau 2	13	9,2	

Citogenética		nº de	mediana de	
variável	categoria	casos	sobrevida (meses)	p(log-rank)
normal x anormal	normal	5	>	0,03
n=32	anormal	27	5	
complexo x outros	outros	15	8,7	0,057
n=27	complexo	12	3,5	
monossomia 7 x complexo	monossomia do 7	10	5	0,123
n=22	complexo	12	3,5	
IPSS	(baixo e intermediário I)	6	12,2	0,038
n=31	(intermediário II e alto)	25	5	

ANEXO K
ANÁLISE ESTATÍSTICA: Análise de Associação de Variáveis (Teste exato de Fisher)

Variável		Variável		Total	p=
		Citogenética			
		normal	anormal		
p53	negativo	5	7	12	0,092
	positivo	0	6	6	
n=18					
		Citogenética			
		complexo	outros		
p53	negativo	1	6	7	0,217
	positivo	3	3	6	
n=13					
		Citogenética			
		complexo	monossomia do 7		
p53	negativo	1	4	5	0,262
	positivo	3	2	5	
n=10					
		IPSS (risco)			
		baixo + intermediário I	intermediário II+ alto		
p53	negativo	5	6	11	0,054
	positivo	0	7	7	
n=18					
		CD34+			
		≤1%	>1%		
p53	negativo	3	11	14	0,557
	positivo	2	5	7	
n=21					
		CD117+			
		≤1%	>1%		
p53	negativo	3	7	10	0,176
	positivo	0	7	7	
n=17					
		ALIPS			
		não	sim		
p53	negativo	10	4	14	0,439
	positivo	6	1	7	
n=21					

Variável		Variável		Total	p=
		CD34+			
		≤1%	>1%		
<i>ALIPs</i>	não	4	12	16	0,728
	sim	1	4	5	
n=21					
		CD117+			
		≤1%	>1%		
<i>ALIPs</i>	não	3	11	14	0,604
	sim	0	3	3	
n=17					
		Blastos (MO)			
		<5%	≥5%		
<i>ALIPs</i>	não	4	9	13	0,162
	sim	3	1	4	
n=17					
		CD34+			
		≤1%	>1%		
Blastos(MO)	<5%	2	9	11	0,674
	≥5%	1	6	7	
n=18					
		CD34+ agrupadas			
		não	sim		
Blastos(MO)	<5%	4	7	11	0,583
	≥5%	3	4	7	
n=18					
		CD117+			
		≤1%	>1%		
Blastos(MO)	<5%	1	8	9	0,604
	≥5%	1	4	5	
n=14					
		CD117+ agrupadas			
		não	sim		
Blastos(MO)	<5%	5	4	9	0,126
	≥5%	5	0	5	
n=14					
		Doença prévia			
		oncohematológicas	outras		
Latência	<85 meses	11	9	20	0,22
	≥85 meses	8	13	21	
n=41					

Variável		Variável		Total	p=
		Doença prévia			
		tumor sólido	outras		
Latência	<85 meses	3	17	20	0,476
	≥85 meses	2	19	21	
n=41					
		Doença prévia			
		não neoplásicas/não hematológicas	outras		
Latência	<85 meses	3	17	20	0,645
	≥85 meses	3	18	21	
n=41					
		Doença prévia			
		anemia aplastica	outras		
Latência	<85 meses	3	17	20	0,093
	≥85 meses	8	13	21	
n=41					
Variável		Variável		Total	p=
		Tratamento prévio			
		somente QT			
		não	sim		
Latência	<85 meses	14	6	20	0,279
	≥85 meses	10	8	18	
n=38					
		Tratamento prévio			
		somente RT			
		não	sim		
Latência	<85 meses	19	1	20	0,526
	≥85 meses	18	0	18	
n=38					
		Tratamento prévio			
		QT+RT			
		não	sim		
Latência	<85 meses	13	7	20	0,307
	≥85 meses	14	4	18	
n=38					
		Tratamento prévio			
		QT+RT+TCTH			
		não	sim		
Latência	<85 meses	6	14	20	0,55
	≥85 meses	6	12	18	
n=38					

Variável		Variável		Total	p=
		Tratamento prévio			
		Imunossupressão			
		não	sim		
Latência	<85 meses	14	6	20	0,55
	≥85 meses	12	6	18	
n=38					
Variável		Variável		Total	p=
		CD34			
		≤1%	>1 %		
Frag BMO	≥1cm	4	16	20	0,411
n=22	<1 cm	1	1	2	
		CD117			
		≤1%	>1 %		
Frag BMO	≥1cm	2	14	16	0,176
n=17	<1 cm	1	0	1	
		Dist arquitetural série megacariócitos			
Variável		sim	não		
Frag BMO	≥1cm	11	6	17	0,574
n=19	<1 cm	2	0	2	
		P53			
		negativo	positivo		
Frag BMO	≥1cm	12	7	19	0,433
n=21	<1 cm	2	0	2	
		ALIPs			
		negativo	positivo		
Frag BMO	≥1cm	14	5	19	0,532
	<1 cm	2	0	2	
n=21					

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelhameed A, Pond GR, Mitsakakis N, Brandwein J, Chun K, Gupta V, et al. Outcome of Patients Who Develop Acute Leukemia or Myelodysplasia as a Second Malignancy After Solid Tumors Treated Surgically or With Strategies That Include Chemotherapy and/or Radiation. *Cancer*. 2008;112(7):1513-20.

Abu-Shakra M, Buskila D, Ehrenfeld, Conrad K, Shoenfeld Y. Cancer and autoimmunity: immune and rheumatic features in patients with malignancies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2001;60:433-440.

Alessandrino EP, Amadori S, Cazzola M, Locatelli F, Menucci C, Morra E, et al. Myelodysplastic syndromes: recent advances. *Haematologica*. 2001;86:1124-57.

Andersen MK, Johansson B, Larsen SO, Pedersen-Bjergaard J. Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Hematologica*. 1998;83:483-8.

Armitage JO, Carbone PP, Connors JM, Levine A, Bennett JM, Kroll S. Treatment-Related Myelodysplasia and Acute Leukemia in Non-Hodhkin's Lymphoma Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(5):897-906.

Aul C, Gatterman N, Heyll A, Germing G, Derigs G, Schneider W. Primary myelodysplastic syndromes analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia*. 1992;6:52-9.

Bagby GC, Lipton JM, Sloan EM, Schiffer CA. Marrow Failure. American Society of Hematology. *Hematology*. 2004;318-336

Barlogie B, Tricot G, Haessler J, van Rhee F, Cottler-Fox M, Anaisse E, et al. Cytogenetically defined myelodysplasia after melphalan-based autotransplantation for multiple mieloma linked to poor hematopoietic stem-cell mobilization: the Arkansas experience im more 300 patients treated since 1989. *Blood*. 2007; 111(1):94-100.

Batsakis JG, EL-Naggar AK. P53: Fifteen Years After Discovery. *Advances in Anatomic Pathology*. 1995;2(2):71-88.

Bauermeister DE. Quantitation of Bone Marrow Reticulin- Anormal Range. *AJCP*. 1971;56:24-31.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. The French-American-British (FAB) Co-operative Group. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 1982;51:189-99.

Bennett JM & Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica*. 2009; 94(2):264-68.

Bergsagel DE. Controversies in the treatment of plasma cell myeloma. *Postgraduate Medical Journal*. 1985;61:109-16.

Bortolheiro TC. Classificação morfológica das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). *Rev.Bras.Hematol.Hemoter*. 2006;28(3):194-197.

Bozina N, Bradamantee V, Lovric M. Genetic Polymorphism of Metabolic Eenzymes P450 (CYP) as a Susceptibility Factor for Drug Response, Toxicity, and Cancer Risk. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009;60:217-42.

Brown DC & Gatter KC. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. *Histopathology*. 1993;22:411-22.

Canellos GP. New Treatments for Advanced Hodgkin's Disease: An Uphill Fight Beginning Close to the Top. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;20(3):607-9

Chamberlain MC, Raizer J. Extended exposure to alkylator chemotherapy: delayed appearance of myelodysplasia. *J Neurooncol*. 2009;93:229-32.

Chang C, Storer BE, Scott BL, Bryant EM, Shulman HM, Flowers ME, et al. Hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndromes: similar outcomes in patients with de novo disease and disease following prior therapy or antecedent hematologic disorders. *Blood*. 2007 110(4):1379-87.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations With Loss of Heterozygosity of *p53* Are Common in Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia After Exposure to Alkylating Agents and Significantly Associated With Deletion or Loss of 5q, a Complex Karyotype, and Poor Prognosis. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(5):1405-13.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemia transformation. *Blood*. 2004;104(5):1474-81.

Daulny A, Tansey WP. Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin-proteasome system. *DNA Repair*. 2009;8:444-8.

DeVita VT, Chu Edward. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res*. 2008;68(21):8646-53.

Doll DC, & List AF. Myelodysplastic Syndromes. *West J Med*. 1989;151:161-67.

Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung N-KV. Association of *CYP3A4* genotype with treatment-related leukemia. *Medical Sciences*.1998;95:13176-81.

Fohlmeister I, Fischer R, Moöder B, Rister M, Schaefer HE. Aplastic anaemia and hypocellular myelodysplastic syndrome ; histomorphological, diagnostic, and prognostic features. *J Clin Patol*. 1985;38:1218-24.

Frankfurt O, Tallman MS. Growth factors in leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*. 2007;5(2):203-15.

Garside R, Pitt M , Anderson R , Rogers G , Dyer M , Mealing S, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of carmustine implants and temozolomide for the treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*. 2007;11(45).

Giles FJ, Hoeffler HP. Secondary myelodysplastic syndromes and leukemias. *Curr Opin Hematol*. 1994;1(4):256-60.

Godley LA, Larson RA. Therapy-related Myeloid Leukemia. *Semin Oncol*.2008; 35(4):418-29.

Gómez Raposo C, Pinto Marin A, Gonzalez Baron M. Colony-stimulating factors: clinical evidence for treatment and prophylaxis of chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(10):729-34.

Goodman & Gilman's The Farmacological basis of therapeutics – 9th ed/Joel G. Hardman, Alfred Goodman Gilman, Lee E. Limbird. 1996;51:1225-87.

Goodsell DS. The Molecular Perspective: Double-Stranded DNA Breaks. *The Oncologist*. 2005;10:361-2.

Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89: 2079-2088.

Gurion R, Gafter-Gvilli A, Paul M, Vidal L, Ben-Bassat I, Yeshurun M, et al. Hematopoietic growth factors in aplastic anemia patients treated with immunosuppressive therapy-systematic review and meta-analysis. *Hematologica*. 2009;94(5):712-9.

Hake CR, Graubert TA, Fenske TS. Does autologous transplantation directly increase the risk of secondary leukemia in lymphoma patients? *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(2):59-70.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization Classification of Neoplastic Disease of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*. 1999;17(12):3835-49.

Hasle H, Passmore SJ. Epidemiology of MDS and Myeloproliferative Disorders in Children. *Myelodysplastic and Myeloproliferative Disorders in Children*. Editors Luiz Fernando Lopes and Henrik Hasle – São Paulo: Lemar Livraria; Editora Marina and Tecmedd Editora, 2003;3:49-66.

Hawkins M, Wilson LMK, Stovall MA, Marsden HB, Potok MHN, Kingston JE, Chessells JM. Epipodophyllotoxins, alkylating agents, and radiation and risk of secondary leukaemia after childhood cancer. *BMJ*. 1992;304:951-8.

Heim S. Cytogenetics findings in primary and secondary MDS. *Leuk Res*. 1992;16(1):43-6.

Hein DW, Fretland AJ, Doll MA. Effects of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2 on metabolic activation (O-acetylation) of heterocyclic amine carcinogens. *Int J Cancer*. 2006;1119:1208-11.

Hellström-Lindberg E. Myelodysplastic Syndromes: An Historical Perspective. *Hematologica*. American Society of Hematology. 2008;42.

Hirai H. Molecular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome. *Jpn J Clin Oncol*. 2003;33(4):153-60.

Ho AYL, Pagliuca A, Kenyon M, et al. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia using fludarabine, busulphan and alemtuzumab (FBC) conditioning. *Blood*. 2004;104:1616-23.

Huebner G, Karthaus M, Pethig K, Freund M, Ganser A. Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia Secondary to Heart Transplantation. *Transplantation*. 2000;70(4):688-670.

Imashuku S, Hibi S, Bessho F, Tsuchida M, Nakarata T, Miyazaki S, et al. Detection of myelodysplastic syndrome /acute myeloid leukemia evolving from aplastic anemia in children treated with recombinant human G-CSF. *Haematologica*. 2003;88:136-41

ISCN 2009: An international system for human cytogenetic nomenclature, Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds) S Karger, Basel, Suíça, 2009.

Jandl JH. *Blood: Textbook of hematology*. Boston, Little Brown, 1987. p 1-48: Blood and bloodforming tissues.

Jesus G, Barcelos A, Neves C, Crespo J. Manifestações Reumáticas e Neoplasias. *Acta Reum Port*. 2006;31:305-21.

Josting A, Reiser M, Wickramanayake PD, Rueffer U, Draube A, Söhngen D, et al. *Leuk Lymphoma*. 2000;37(1-2):115-23.

Josting A, Wiedenmann S, Franklin J, May M, Sieber M, Wolf J, et al. Secondary Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in Patients Treated for Hodgkin's Disease: A report From the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(18):3440-6.

Josting A. Treatment of Advanced Stage Hodgkin Lymphoma. *Hematologica/edición espanhola*. 2005;90(1):273.

Kitagawa M, Yohida S, Kuwata T, Tanizawa T, Kamiyama R. p53 Expression in Myeloid Cells of Myelodysplastic Syndromes. Association with Evolution of Overt Leukemia. *American Journal of Pathology*. 1994;145(2):338-344.

Kleinbaum, DG. Survival analysis: a self-learning text. 1^a. ed. New York: Springer. 1996:324p.

Klymenko SV, Bink K, Trott KR, Bebeshko VG, Bazyka DA, Dmytrenko IV, et al. MLL Gene Alterations in Radiation-Associated Acute Myeloid Leukemia. *Experimental Oncology*. 2005;27(1):71-5.

Kogima S, Ohara A, Tsuchida M, Kudoh T, Hanada R, Okimoto Y, et al. Risk factors for evolution of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after immunosuppressive therapy in children. *Blood*. 2002;100(3):786-90.

Kröger N, Zander AR, Martinelli G, Ferrante P, Moraleda JM, Da Prada GA, et al. Low incidence of secondary myelodysplasia and acute myeloid leukemia after high-dose chemotherapy as adjuvant therapy for breast cancer patients: a study by the Solid Tumors Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Annals of Oncology*. 2003;14:554-8.

Kröger N, Brand R, Biezen AV, Zander A, Dierlamm J, Niederwieser D, et al. Risk factors for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia treated with allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2009;94(4):542-9.

Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM, et al. Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P):quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*. 1999;94:803-7.

Larson RA. Etiology and Management of Therapy-Related Myeloid Leukemia. *Hematology*. 2007;453-9.

Larson RA. Therapy-related myeloid neoplasms. [editorial]. *Haematologica*. 2009;94(4):454-8.

Laurenti L, Chiusolo P, Garzia MG, Zini G, Sora F, Piccirillo P, et al. Periodic morphologic, cytogenetic and clonality evaluation after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with lymphoproliferative malignancies. *Haematologica*. 2002;87(1):59-66.

Le Deley MC, Suzan F, Cutuli B, Delaloge S, Shansaldin A, Linassier C, et al. Anthracyclines, Mitoxantrone, Radioterapy, and Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Risk Factors for Leukemia and Myelodysplastic Syndrome after Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(3):292-300.

Lee SH, Erber WN, Tomonaga M, Peterson LC. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimes and reports. *Int. Jnl. Lab.Hem.* 2008;30:349-64

Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, Haferlach T, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W. Moderate increase of secondary hematologic malignancies after myeloablative radiochemotherapy and autologous stem-cell transplantation in patients with indolent lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(24):4926-33.

Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica*. 1999;84:937-45.

Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica*. 2007;92(10):1389-98.

Lopes LF, De Camargo B, Bianchi A. Os efeitos tardios do tratamento da câncer infantil. *Rev Ass Med Brasil*. 2000;46(3):277-84.

Lopes LF, Dias Neto E, Lorand-Metze I, Latorre MRDO, Simpson JG. Analysis of V λ /J β trans-rearrangements in paediatric patients undergoing chemotherapy. *British Journal of Haematology*. 2001;113:1001-8.

Lorand-Metze I. The Importance of Bone Marrow Histology in MDS. *Myelodysplastic and Myeloproliferative Disorders in Children*. 1st ed. Lemar 2003;6:92.

Luna-Fineman S, Shannon KM, Lange BJ. Childhood Monosomy 7: Epidemiology, Biology, and Mechanistic Implications. *Blood*. 1995;85(8):1985-99.

Maciejewski JP, Selleri C. Evolution of clonal cytogenetics abnormalities in aplastic anemia. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(3):433-40.

Magalhães SMM, Rocha Filho FD, Duarte FB, Ponte LP, Holanda RARR. Nódulos Linfóides na Medula Óssea de Pacientes Portadores de Síndrome Mielodisplásica - Relato de três casos. *J.Bras.Patol.* 1997;33(3):125-32.

Magalhães SMM, Rocha Filho FD, Ponte LP. Síndrome mielodisplásicas. *Diagnóstico e Tratamento.* 1999;4(3):17-21.

Majhail NS. Old and New Cancers after Hematopoietic-Cell Transplantation. American Society of Hematology. Hematology. 2008;142-9.

Malcovati L, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglini E et al. Prognostic Factor and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23(30):7594-7603.

McCarthy CJ, Sheldon S, Ross CW, McCune WJ. Cytogenetics Abnormalities and Therapy-Related Myelodysplastic Syndromes in Rheumatic Disease. *Arthritis & Rheumatism.* 1998;41(8):1493-6.

McLaughlin P, Estey E, Glassman A, Romaguera J, Samaniego F, Ayala A, et al. Myelodysplasia and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma with fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone (FND) plus rituximab and interferon alpha. *Blood.* 2005;105(12):4572-4575.

Melosky B, Karim M, Chui A, McBride M, Cameron, Yeung CK, et al. Lymphoproliferative Disorders After Renal Transplantation in Patients Receiving Triple or Quadruple Immunosuppression. *Journal of the American Society of Nephrology.* 1992;3:290-4.

Moraes ACR, Licínio MA, Pagnussat L, Del Moral JAG, Santos-Silva MC. Síndromes mielodisplásicas: Aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008. *Rev.Bras.Hematol.Hemot.* 2009;31(6):463-470.

Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR, et al. Therapy-related myeloid leukemias are observed in patients with chronic lymphocytic leukemia after treatment with fludarabine and chlorambucil: results of an intergroup study, cancer and leukemia group B 9011. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20:3878-84.

Moyer AM, Salavaggione OE, Hebbbring SJ, Moon I, Hildebrandt AT, Eckloff BW, et al. Glutathione S-Transferase T1 and M1: Gene Sequence Variation and Functional Genomics. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):7207-16.

Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008;93(11):1712-7.

Naschitz JE. Rheumatic syndromes: clues to occult neoplasia. *Current Opinion in Rheumatology*. 2001;13:62-6.

Niero-Melo L, Resende LSR, Gaiolla RD, Oliveira CT, Domingues MAC, Moraes Neto FA. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. *Rev.bras.hematol.hemoter*. 2006;28(3):167-174.

Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111(10):4841-51.

Nösslinger T, Reisner R, Koller E, Grüner H, Tüchler H, Nowotny H, et al. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classification on 431 unselected patients from a single institution. *Blood*. 2001;98(10):2935-41.

Ohara A, Kojima S, Hamajima N, Tsuchida M, Imashuku S, Ohta S, et al. Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia as a Late Clonal Complication in Children With Acquired Aplastic Anemia. *Blood*. 1997;90(3):1009-13.

Orazi A, Cattoretti G, Soligo D, Luksch R, Lambertenghi-Delilier G. Therapy-related Myelodysplastic Syndromes: FAB Classification, Bone Marrow Histology, and Immunohistology in the Prognostic Assessment. *Leukemia*. 1993; 7 (6): 838-47.

Orazi A. Histopathology in the Diagnosis and Classification of Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndromes, and Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases. *Pathobiology*. 2007;114:74-97.

Park MJ, Park YH, Ahn HJ, Choi W, Paik KH, Kim JM, et al. Secondary hematological malignancies after breast cancer chemotherapy. *Leukemia & Lymphoma*. 2005;46(8):1183-88.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic Pathways in the Pathogenesis of Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia. *Hematology*. 2007;392-7.

Pellegrini W, Facchetti F, Maroccolo D, Pelizzari AM, Capucci A, Rossi G. Expression of CD34 by megakaryocytes in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2000;85:1117-18.

Raimondi SC. Cytogenetics in MDS. *Myelodysplastic and Myeloproliferative Disorders in Children*. Editors Luiz Fernando Lopes and Henrik Hasle – São Paulo: Lemar Livraria; Editora Marina and Tecmedd Editora, 2003;8:120.

Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility – a review. *Gene*. 1995;159:113-121.

Rosner B. Fundamentals of Biostatistic. 2 ed. Boston, PWS Publishers, 1982 p.326-33, Hypothesis Testing categorical data.

Rubin CM, Arthur DC, Woods WG, Lange BJ, Nowell PC, Rowley JD, et al. Therapy-Related Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia in

Children: Correlation Between Chromosomal Abnormalities and Prior Therapy. *Blood*. 1991;78:2982-2988.

Rund D, Krichevsky S, Bar-Cohen S, Godschmidt N, Kedmi M, Malik E, et al. Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia*. 2005;19(11):1919-28.

Sacchi S, Marcheselli L, Bari A, Marcheselli R, Pozzi S, Luminari S et al. Secondary malignancies after treatment for indolent non-Hodgkin's lymphoma: a 16-year follow-up study. *Haematologica*. 2008;93(3):398-404.

San Miguel JF, Creixenti JB, Garcia-Sanz R. Treatment of multiple myeloma. *Haematologica*. 1999;84:36-58.

Schoch C, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-LMA): an analysis of 93 patients with t-LMA in comparison to 1091 patients with *de novo* LMA. *Leukemia*. 2004;18:120-5.

Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19-21.

See HT, Thomas DA, Bueso –Ramos C, Kavanagh J. Secondary leukemia after treatment with paclitaxel and carboplatin in a patient with recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(1):236-240.

Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2675-80.

Sevilla J, Rodriguez A, Hernandez-Maraver D, de Bustos G, Aguado J, et al. Secondary acute myeloid leukemia and myelodysplasia after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Ann Hematol.* 2002;81(1):11-5.

Singer JM , Hartley JM, Brennan C , Nicholson PW, Souhami RL. The pharmacokinetics and metabolism of ifosfamide during bolus and infusional administration: a randomized cross-over study. *British Journal of Câncer.* 1998 77(6), 978-84.

Singh NZ, Huo D, Anastasi J, Smith SM, Karrison T, Le Beau MM, Larson RA. Therapy-Related Myelodysplastic Syndrome. Morphologic Subclassification May Not Be Clinically Relevant. *Am J Clin Pathol.* 2007;127:197-205.

Scott BL, Sandmaier BM. Outcomes with Myeloid Malignancies. *Hematologica.* 2006;381-9.

Smith MA, Rubinstein L, Anderson JR, Arthur D, Catalano PJ, Freidlin B, et al. Secondary Leukemia or Myelodysplastic Syndrome After Treatment With Etoposide. *Journal of Clinical Oncology.* 1999;17(2):569-77.

Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, et al. Clinical-cytogenetic association in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood.* 2003;102:43-52.

Socié G. Could aplastic anaemia be considered a pre-leukaemic disorder? *Eur J Haematol.* 1996;57;60-3.

Sreekantaiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenetic Genome Res.* 2007;118:284-96.

Steensma DP & Bennett JM. The Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(1):104-30.

Sugimoto K, Hirano N, Toyoshima H, Chiba S, Mano H, Takaku F, et al. Mutations of p53 Gene in Myelodysplastic Syndromes (MDS) and MDS-Derived Leukemia. *Blood*. 1993;81(11):3022-26.

Tam CS, Seymour JF, Prince HM, Kenealy M, Wolf M, Januszewicz EH, Westerman D. Treatment-related myelodysplasia following fludarabine combination chemotherapy. *Hematologica*. 2006;91:1546-50.

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang D-E. Transcription Factors, Normal Myeloid Development, and Leukemia. *The American Society of Hematology*. 1997;489-519.

Takeyama K, Seto M, Uike N, Hamajima N, Ino T, Mikuni C. Therapy-Related Leukemia and Myelodysplastic Syndrome: A Large-scale Japanese Study of Clinical and Cytogenetic Features as Well as Prognostic Factors. *International Journal of Hematology*. 2000;71:144-52.

Teramura M, Mizoguchi H. Special Education. Aplastic Anemia. *Oncologist*. 1996;1(3):187-9.

Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research*. 2007;31:727-36

Vardiman JW, Arber DA, Brunning RD, Larson RA, Matiutes E, Baumann I, et al. *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissue: Therapy-related myeloid neoplasms*. Geneva 2008;127-9.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-2302.

Varela BJ, Chuang C, Woll JE, Bennett JM. Modifications in the classification of primary myelodysplastic syndromes: the addition of a scoring system. *Hematol.Oncol.* 1985;3:55-63.

Velloso EDRP. Síndromes mielodisplásicas *de novo*: Fatores preditivos para sobrevida e transformação leucêmica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.

Voso MT, Fabiani E, D'alo F, Guidi A, Di Ruscio A, Sica S, et al. Increased risk of acute myeloid leukaemia due to polymorfisms in detoxification and DNA repair enzymes. *Annals of Oncology.* 2007;18:1523-28.

Williams WJ. Examination of the bone marrow. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. *Ed Hematology.* 3ed. New York, Mgraw-hill, 1983:p25-32.

Wintrobe's CLINICAL HEMATOLOGY, 9th ed. Richard Le G, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. LEA & FEBIGER. Philadelphia. London.1993, p 2303.

Yoshida Y. Characteristics and Pathology of Myelodysplastic Syndrome. *The Oncologist.* 1996;1:284-287.

Young NS, Abkowitz JL, Luzzatto L. New Insight sinto the Pathophysiology of Acquired Cytopenias. American Society of Hematology. *Hematology.* 2000;18-38.

Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.* 2006;108(8):2509-2519.

Young NS. Pathophysiologic Mechanisms in Acquired Aplastic Anemia. . American Society of Hematology. *Hematology.* 2006;72-7.

Yunis JJ, Sawyer JR, Ball DW. The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man. *Chromosoma*. 1978;67:293-307.