

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Karine Poletto

PRINCIPAIS INDICAÇÕES PARA O EXAME DE MEDULA ÓSSEA NO SERVIÇO
DE HEMATOLOGIA E TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA DO HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Porto Alegre
Julho de 2010

Karine Poletto

PRINCIPAIS INDICAÇÕES PARA O EXAME DE MEDULA ÓSSEA NO SERVIÇO
DE HEMATOLOGIA E TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA DO HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre** em Ciências Médicas.

Orientadora: Dra. Lúcia Silla

Porto Alegre
Julho de 2010

Meus sinceros agradecimentos...

... aos meus Pais, que nos muitos momentos difíceis, foram incansáveis no propósito
de me fazer ver que jamais devo desistir dos meus sonhos;

... à Dra. Lúcia Silla, pelo aprendizado, pelos conhecimentos compartilhados e acima
de tudo por ter acreditado em mim;

... aos atenciosos e queridos amigos da Unidade de Hematologia do HCPA, que
foram e sempre serão meus verdadeiros Colegas. Muito obrigada pela acolhida e
pelo carinho;

... às verdadeiras amizades... aquelas pessoas, com as quais sei que posso dividir
tudo e contar sempre. Obrigada, pois são vocês que fazem a vida valer à pena!

*“[...] tudo o que é visível é passageiro,
tudo o que invisível é eterno [...]”
(2Cor 4, 16-18)*

RESUMO

O Exame de Medula Óssea (EMO) permite avaliação citológica da medula, sendo útil no diagnóstico e monitoramento de desordens hematológicas, quando exames mais simples não são suficientes para esclarecer o quadro clínico. Investigação clínica e laboratorial completa deve ser realizada para garantir que a indicação apropriada exista. São requeridas pelo menos duas colorações (Romanowsky e Azul da Prússia), onde devem ser avaliadas a qualidade da amostra, celularidade global da mesma, contagem diferencial de células nucleadas, relação Mielóide/Eritróide bem como cuidadosa avaliação quantitativa e qualitativa das três linhagens hematopoéticas (Granulocítica, Eritróide e Megacariocítica). O EMO fornece informações relevantes no diagnóstico e monitoramento de Leucemias/Linfomas, Mieloma Múltiplo (MM), Síndrome Mielodisplásica (SMD), Aplasia medular, doença metastática na Medula Óssea (MO), infecções em HIV positivos, febre de origem desconhecida e investigação de citopenias. Tendo em vista a classificação da OMS de 2008 para neoplasias mielóides e leucemias agudas cabe ressaltar a importância de unir achados citogenéticos, dentre os quais se destacam atualmente as mutações gênicas FLT3, KIT, NPM1 e CEBPA, aos achados morfológicos, imunofenotípicos, citocímicos e clínicos, alcançando desta forma marcadores diagnósticos e prognósticos precisos que servem como guia para um tratamento eficaz. Este estudo tem por objetivo identificar as principais indicações para o EMO no HCPA bem como verificar a acurácia das mesmas. Foram analisados 400 pacientes submetidos ao EMO na Unidade de Hematologia do HCPA no período de Janeiro a Dezembro de 2009, tendo sido resgatados todos os resultados do Aspirado de Medula Óssea bem como dados clínicos e laboratoriais relevantes obtidos do prontuário médico. Verificou-se que cerca de metade dos pacientes submetidos ao EMO em nosso centro são para controle de tratamento, o que está de acordo com as características do mesmo, o qual é referência regional para tratamento de doenças malignas. Nos pacientes que realizam o exame com propósito diagnóstico as indicações principais são suspeita de Leucemia e MM. Nos 260 pacientes com suspeita de doença hematológica primária observou-se confirmação da mesma em 61% dos casos, nos 39% restantes foram encontradas alterações qualitativas e/ou quantitativas (29%), MO normal (7%) e amostra insuficiente/diluída (3%). Dos pacientes que fizeram o exame com propósito diagnóstico 20.5% não fizeram biópsia. Com relação à acurácia da indicação, encontrou-se que 7 pacientes (2%) provavelmente não deveriam ter sido submetidos a este procedimento. Ressaltamos a importância de realizar em todos os casos Aspirado e Biópsia de MO simultaneamente uma vez que seus achados devem ser correlacionados e se a Biópsia for omitida o patologista pode não obter a informação máxima requerida.

Palavras chave: Aspirado de Medula Óssea; Biópsia de Medula Óssea; Principais indicações; Diagnósticos.

ABSTRACT

The Bone Marrow Examination (BME) permits cytological assessment of Marrow, being useful in the diagnosis and monitoring of hematological disorders, when simpler tests are not sufficient to clarify the clinical picture. Are required at least two colors (Romanowsky and Prussian blue), it should be evaluated the quality of the sample, the same overall cellularity, differential count of nucleated cells, myeloid:erythroid (M:E) ratio and careful evaluation quantitative / qualitative from the three lineages of hematopoietic (granulocytic, erythrocytic and megakaryocytic). The BME provides information relevant to diagnosis and follow-up of leukemia/lymphoma, multiple myeloma (MM), myelodysplastic syndrome (MDS), marrow aplasia, bone marrow (BM) metastatic disease, infections in HIV positive, pyrexia of unknown origin and investigation of cytopenias. The 2008 classification of the World Health Organization (WHO) to the myeloid neoplasms and acute leukemia highlight the importance of joint cytogenetic findings - bring out currently FLT3, KIT, NPM1 and CEBPA gene mutations - to the morphologic, immunophenotypic, cytochemical and clinical findings reaching this way accurate diagnostic and prognostic markers that serve as a guide to effective treatment. This study aims to identify the main indications for the BME at HCPA and to verify their accuracy. It were analyzed 400 patients submitted to BME in the Hematology Unit of HCPA in the period January to December 2009, having been rescued the bone marrow aspirate results as well as all relevant clinical and laboratory data obtained from the medical records. It was found that about half of patients submit BME in our center are to control treatment, which agrees with the characteristics of it, it is a regional referral center for treatment of malignancies. In patients who perform the test with diagnostic purpose the main indications were suspected leukemia and MM. In 260 patients with suspected primary hematological disease 61.2% turned out to be the case, the remaining 38.8% had quantitative and/or qualitative BM alterations (29.6%), normal MO (6.5%) and insufficient sample or diluted (2.7%). Of the patients who took the exam with diagnostic purpose 20.5% had no biopsy. With respect to accuracy of indication, it was found that 7 patients (2%) probably should not have undergone this procedure. We emphasize the importance of performing in all cases aspirate and biopsy since their findings must be correlated and furthermore if the biopsy is omitted the pathologist can not get the maximum information required.

Keywords: Bone marrow aspiration; bone marrow biopsy; frequent indications; diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciação e maturação Granulocítica e Eritrocítica.....	13
Figura 2: Linfoblastos de LLA-L3 com vacualização citoplasmática característica. ...	35
Figura 3: Promielócitos em LMA-M3 com granulações citoplasmáticas grosseiras proeminentes.....	37
Figura 4: Nucléolos evidentes no núcleo de plasmoblastos em Mieloma Múltiplo. ...	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 HEMATOPOESE.....	11
2.1.1 Hematopoese da Linhagem Mielóide – Mielopoese	12
2.1.1.1 Granulócitos	12
2.1.1.2 Monócitos	14
2.1.2 Hematopoese da Linhagem Eritróide – Eritropoese	15
2.1.3 Megacariopoese	17
2.1.4 Linfopoese	18
2.1.4.1 Linfócitos B.....	18
2.1.4.2 Linfócitos T	19
2.2 COLETA, PREPARO E ANÁLISE DA MEDULA ÓSSEA	20
2.2.1 Coleta e Preparo do Aspirado de Medula Óssea.....	20
2.2.2 Adequação da Amostra do Aspirado de Medula Óssea	22
2.2.3 Avaliação da Celularidade do Aspirado de Medula Óssea.....	23
2.2.4 Contagem Diferencial de Células Nucleadas no Aspirado de Medula Óssea	24
2.2.5 Avaliação de Estoques de Ferro no Aspirado de Medula Óssea	25
2.2.6 Laudo do Aspirado de Medula Óssea.....	26
2.2.7 Coleta, Preparo e Laudo de Biópsia de Medula Óssea	28
2.2.8 Imunofenotipagem	29
2.2.8.1 Neoplasias Linfóides Maduras	29
2.2.8.1.1 Neoplasias linfóides maduras de linfócitos B	29
2.2.8.1.2 Neoplasias linfóides maduras de linfócitos T.....	30
2.2.8.2 Mieloma Múltiplo (MM)	31
2.2.8.3 Doença Mieloproliferativa Crônica (DMC)	31
2.2.8.4 Leucemias Agudas	32
2.2.8.5 Síndrome Mielodisplásica (SMD)	33

2.3 PRINCIPAIS INDICAÇÕES PARA O EXAME DE MEDULA ÓSSEA.....	33
2.3.1 Suspeita de Leucemia.....	33
2.3.1.1 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA).....	33
2.3.1.2 Leucemia Mielocítica Aguda (LMA).....	36
2.3.1.3 Leucemia Mielóide Crônica (LMC).....	39
2.3.1.4 Leucemia Linfóide Crônica (LLC).....	41
2.3.2 Suspeita De Mieloma Múltiplo (MM).....	44
2.3.3 Suspeita de Síndrome Mielodisplásica (SMD).....	46
2.3.4 Investigação de Anemia.....	49
2.3.4.1 Anemia Megaloblástica.....	50
2.3.5 Investigação de Trombocitopenia.....	51
2.3.5.1 Púrpura Trombocitopênica Idiopática.....	52
2.3.6 Investigação de Pancitopenia.....	53
2.3.6.1 Aplasia Medular.....	54
2.3.6.2 Infecção pelo HIV.....	55
2.3.7 Doenças Menos Comuns.....	56
2.3.7.1 Mielofibrose Primária (MFP).....	56
2.3.7.2 Policitemia Vera (PV).....	57
2.3.7.3 Trombocitemia Essencial (TE).....	57
2.3.7.4 Amiloidose Sistêmica.....	57
3 OBJETIVOS.....	59
3.1 OBJETIVO GERAL.....	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ARTIGO CIENTÍFICO.....	69

1 INTRODUÇÃO

A medula óssea contém em torno de um trilhão de células e produz aproximadamente 200 bilhões de glóbulos vermelhos, 100 milhões de glóbulos brancos e 400 milhões de plaquetas por dia em permanente equilíbrio com o consumo destes elementos figurados no sangue periférico [1].

O exame da medula óssea (EMO) fornece dados semiquantitativos e qualitativos do estado de hematopoese e da normalidade das células sanguíneas precursoras de todas as linhagens [2]. Aspirado e Biópsia de medula óssea são procedimentos bem aceitos para avaliar a celularidade da medula e a natureza das células presentes [1]. O material coletado é utilizado principalmente para permitir a análise citológica da medula, mas também serve para realização de análise imunofenotípica, citogenética e outras análises especializadas. O EMO deve ser executado por indivíduos treinados, cientes das indicações, contra-indicações e riscos do procedimento. É necessário saber se o paciente está recebendo ou recebeu alguma medicação que pode influenciar na contagem sanguínea e citologia da medula, como drogas que tem um efeito adverso sobre a medula óssea ou citoquinas que são prescritas para estimular a hematopoese [3].

A medula deve ser examinada quando a história clínica, os testes laboratoriais ou o esfregaço sanguíneo sugerem a possibilidade de uma desordem hematológica primária ou secundária que não pode ser esclarecida somente com avaliação do sangue periférico, e análise morfológica ou estudos especiais da medula podem auxiliar na conclusão diagnóstica [2-4]. Embora seguras, as técnicas de aspiração e biópsia de medula devem ser executadas com a idéia clara de como esses resultados podem ser úteis no diagnóstico diferencial ou fornecer dados para o tratamento da patologia [2]. Coleta e processamento ótimos das amostras de aspirado e biópsia são críticos para garantir a obtenção de um nível máximo de informação diagnóstica. A combinação de amostras diagnósticas excelentes, testes auxiliares apropriados e conhecimento do contexto clínico constituem a melhor forma para distinguir entre reações comuns e processos neoplásicos que envolvam a medula óssea e evitar falhas diagnósticas nesta diferenciação [5]. Aspirado e biópsia de medula são complementares [5-7].

Dentre as indicações para o EMO, além de diagnóstico e avaliação de tratamento de doenças malignas como Leucemias, Linfomas e Mieloma Múltiplo, também estão Síndrome Mielodisplásica, Amiloidose, Mastocitose, doenças Metastáticas, Anemia aplástica, pesquisa de infecções oportunistas em pacientes HIV positivos e febre de origem desconhecida [1, 3, 6, 8].

O Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é referência estadual para o tratamento de doenças hematológicas benignas e malignas, assim como para a realização de transplante autólogo e alogênico, aparentado e não aparentado. O HCPA é também referência para o tratamento de cânceres sólidos e para portadores de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O EMO é, portanto, uma ferramenta diagnóstica utilizada assiduamente.

Este estudo visou definir as patologias para as quais o EMO é mais frequentemente indicado no HCPA; a acurácia das indicações e a sua resolutividade diagnóstica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HEMATOPOESE

O Sistema Hematopoético (SH) é caracterizado por constante *turnover* de células em um esforço contínuo de reparação para manter as populações de leucócitos, plaquetas e eritrócitos em níveis normais. Em resposta a estímulos apropriados, como hipóxia, sangramento ou infecção, pode haver um aumento substancial na produção de tipos celulares específicos. O SH é mantido pela presença da Célula-tronco (*stem cell*) hematopoética, definida como uma célula com a capacidade de se auto-renovar, bem como produzir progênie destinada a se diferenciar [9].

Durante a vida fetal a hematopoese ocorre inicialmente em ilhotas sanguíneas do saco vitelínico (até o segundo mês) e posteriormente no fígado e no baço (do segundo ao sétimo mês). Desde então, esta função é progressivamente assumida pela medula óssea de praticamente todos os ossos da criança, enquanto no adulto ocorre predominantemente no esterno, ossos da bacia, costelas e nas vértebras [2, 10].

Fígado e baço também podem reassumir a função hematopoética fetal, o que é denominado hematopoese extramedular. A presença de tecido hematopoético ativo fora da medula óssea é denominada metaplasia mielóide, que pode ser um fenômeno compensatório ou indicar uma proliferação primária (neoplásica). Em crianças, a metaplasia mielóide compensatória (ou reacional) é mais comum, mas em adultos a observação de tecido mielóide fora da medula óssea é geralmente indicativo de processo neoplásico [10].

De maneira geral, o exame citológico das células da medula óssea é realizado utilizando-se Coloração de Romanowsky (May-Grunwald Giemsa ou Wright Giemsa), a qual confere a cor azulada a estruturas basofílicas e rósea a estruturas acidofílicas [2].

2.1.1 Hematopoese da Linhagem Mielóide – Mielopoese

Em meados de 1960, alguns pesquisadores desenvolveram técnicas de cultura *in vitro* para células hematopoéticas e descobriram os fatores estimuladores de colônias (Colony Stimulator Factor – CSF). Logo, ficou entendido que estes fatores são produzidos endogenamente e liberados durante neutropenia, infecção ou após administração de endotoxinas.

Subseqüentemente, avanços rápidos na biologia molecular permitiram a clonagem de genes para estes fatores de crescimento e seus receptores. Experimentos com modificações genéticas alvo (*knock-out*) em camundongos, mostraram claramente que o fator estimulador de colônias granulocítico (G-CSF) e seus receptores são essenciais para a manutenção de níveis normais de neutrófilos no sangue [11]. Além disso, G-CSF demonstrou exercer um papel crítico na leucocitose causada por infecção bacteriana [12].

Terapeuticamente, o desenvolvimento de fatores estimulantes de colônia como agentes terapêuticos tem tido impacto maior na hematologia e oncologia prática. Ambos, G-CSF e o fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), têm efeitos farmacológicos múltiplos, incluindo aumento na atividade proliferativa de células progenitoras, encurtando o tempo da produção de neutrófilos e maturação na medula, acelerando a liberação e maturação de células da medula para o sangue, aumentando também a produção dos grânulos neutrofílicos, e estimulando a liberação de proteases [13].

Uma única Unidade Formadora de Colônia (UFC) altamente diferenciada pode aparentemente gerar monócitos e neutrófilos (UFC-GM), ao passo que outras geram eosinófilos (UFC-Eo), basófilos (UFC-Baso), eritrócitos (UFC-E) e megacariócitos (UFC-Meg) [9].

2.1.1.1 Granulócitos

O termo granulócito é usado para precursores e formas maduras de leucócitos caracterizados por grânulos neutrofílicos, eosinofílicos ou basofílicos em

seu citoplasma. A tendência global durante a diferenciação é uma diminuição gradual no tamanho do núcleo, aumento da cromatina nuclear maciça e diminuição da capacidade proliferativa à medida que a célula amadurece o que é caracterizado pelo aumento progressivo de grânulos no citoplasma (Figura 1) [2].

Observa-se uma sequência no processo maturativo dos granulócitos: Mieloblasto – célula grande com 2 a 5 nucléolos, com núcleo ocupando a maior parte da célula; Promielócito – com grânulos grandes e proeminentes no citoplasma (granulação primária) além de área clara de golgi; Mielócito – em geral com núcleo excêntrico, nucléolos não visíveis e granulação secundária no citoplasma, a qual pode ser neutrofílica (fina, de cor liláz), eosinofílica (grande, laranja-avermelhado) ou basofílica (grande, azul-escura); Metamielócito – com menor basofilia e núcleo indentado; Bastão – com núcleo em ferradura; e finalmente, Polimorfonucleares (segmentados) – com núcleo multilobulado, onde eosinófilo maduro tem somente dois lóbulos, enquanto que a média de lóbulos no neutrófilo é de 3 a 4 e o núcleo do basófilo é freqüentemente obscurecido pela abundante quantidade de grânulos [1, 2, 9].

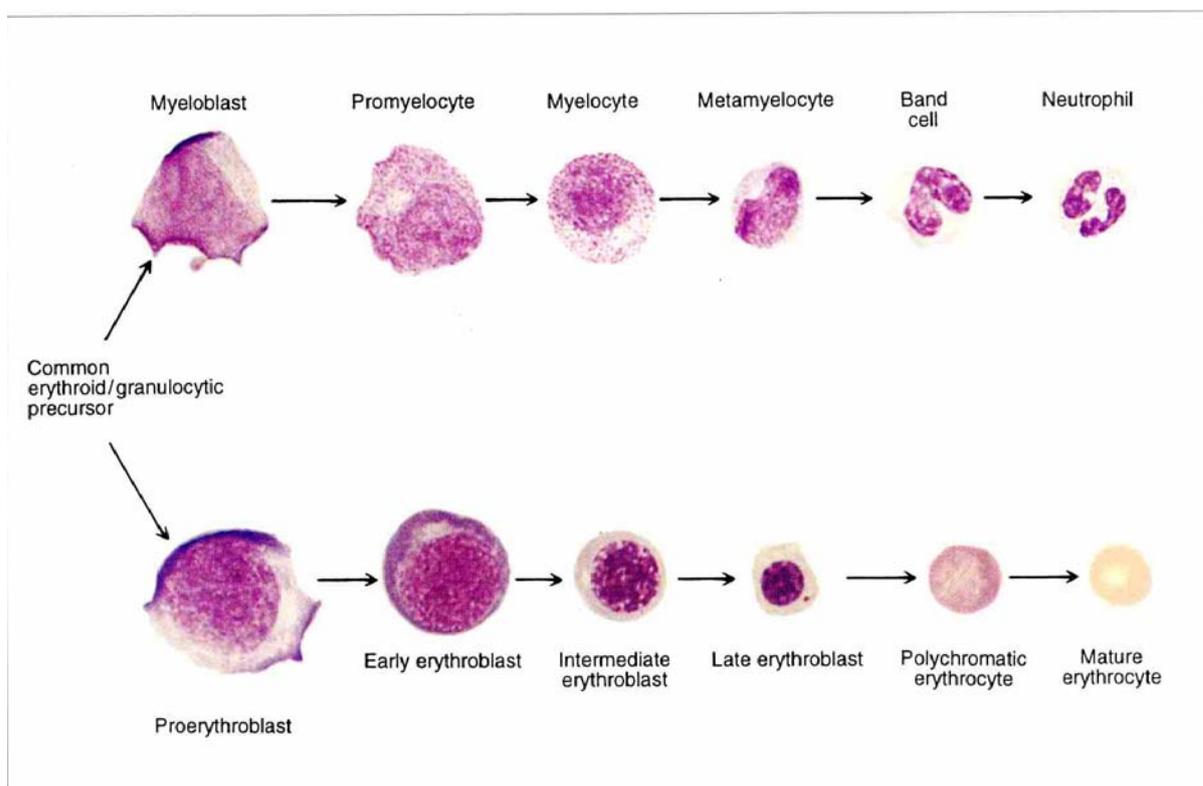


Figura 1: Diferenciação e maturação Granulocítica e Eritrocítica.

Fonte: Bain BJ, Bain BJ. Bone marrow pathology. 3rd ed. Oxford ; Malden, MA: Blackwell Science 2001 [29].

Klebanoff (2005) demonstrou que a mieloperoxidase, já conhecida por ser liberada dos grânulos durante a fagocitose, está envolvida na geração de peróxido de hidrogênio e propôs que esta é a substância antimicrobiana potencialmente crítica gerada dentro dos neutrófilos. Experimentos adicionais esclareceram que outras oxidases, como NADPH oxidase, também tem um papel importante na geração de peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio [14].

Experimentos posteriores demonstraram que o peróxido de hidrogênio interage com mieloperoxidase e um haleto, predominantemente de cloro, para gerar dentro do fagossoma o ácido hipocloroso, uma potente substância antibacteriana. Apesar dos fagócitos terem outros mecanismos microbicidas, incluindo peptídeos antimicrobianos e proteases, a fagocitose com geração de espécies de oxigênio reativas de ácido hipocloroso, é ainda considerado o mecanismo crítico de defesa contra maioria dos patógenos invasores [13].

As moléculas antigênicas assim digeridas e espalhadas no espaço extracelular são fagocitadas por macrófagos/histiócitos ou células dentríticas e por estas apresentadas aos linfócitos compondo a primeira fase da resposta imunológica celular [9, 10].

2.1.1.2 Monócitos

Monócitos na medula normal são idênticos morfológicamente aqueles no sangue periférico, com citoplasma abundante (levemente basófilo) e núcleo irregular com chanfraduras. Pró-monócitos têm cromatina mais delicada, nucléolo visível, freqüentemente poucos grânulos finos, e citoplasma um pouco mais basofílico, Monoblastos têm núcleo arredondado, nucléolos aparentes e citoplasma escasso [2, 9].

Fagócitos monocucleares no sangue e tecidos sobrevivem por mais tempo que neutrófilos. Esta característica dos fagócitos é clinicamente muito importante. Ela protege pacientes de riscos de infecções fatais quando a produção de neutrófilos está transitoriamente interrompida, como ocorre na quimioterapia do câncer, reações idiossincráticas a drogas e transplante de células tronco hematopoéticas [13].

Os macrófagos (histiócitos) são derivados de monócitos, mas são maiores, chegando a atingir 20 a 30 µm de dimensão. O núcleo é oval com cromatina reticular delicada e um ou dois pequenos nucléolos. O citoplasma varia de azul acinzentado a pálido e descolorido e freqüentemente contém células fagocitadas, restos celulares degenerados e vacúolos. Células vermelhas intactas são raramente visíveis dentro dos histiócitos medulares. No entanto, a ativação descontrolada de células histiocíticas leva a uma Síndrome Hemofagocítica associada com uma variedade de condições neoplásicas, virais e reativas [2].

2.1.2 Hematopoese da Linhagem Eritróide – Eritropoese

Paralelamente à seqüência ordenada de aparecimento da hematopoese no saco vitelino, baço, fígado e medula, ocorrem uma série de mudanças nas variedades de hemoglobina que são sintetizadas. As células do fígado, baço e medula produzem hemoglobina fetal. A hemoglobina adulta pode ser detectada *in vivo* por volta da 11ª semana de gestação, embora a produção de hemoglobina A seja apreciável apenas nas últimas seis semanas de gestação. A mudança de cadeia gama para a beta está praticamente completa no momento do nascimento [9].

Durante a diferenciação eritróide, o núcleo progressivamente torna-se menor e a cromatina nuclear mais condensada, bem como a capacidade de proliferação celular diminui, enquanto que o citoplasma gradualmente perde a coloração azul transmitida pelo RNAm, substituindo-a com a coloração rosa da hemoglobina (Figura 1) [2].

Na seqüência do processo maturativo dos eritrócitos são observados: Pró-eritroblastos - são grandes e o núcleo ocupa quase toda a célula; Eritroblasto basofílico – é menor e o núcleo ocupa parte menor da célula, com citoplasma bastante basofílico; Eritroblasto policromatófilo - citoplasma cinza devido ao aumento da quantidade de hemoglobina; Eritroblasto ortocromático – núcleo menor e picnótico e citoplasma vermelho como do eritrócito maduro; Policromatófilos - são células vermelhas maduras anucleadas que ainda contém RNAm residual para transmitir uma leve cor acinzentada ao citoplasma. A cor cinza do citoplasma é

devido à combinação de RNA e hemoglobina citoplasmáticos; Eritrócito é a célula vermelha anucleada [2, 10].

Ilhotas eritropoéticas são nichos especializados nos quais os precursores eritróides proliferam, diferenciam-se e perdem o núcleo. Estes subcompartimentos são compostos de eritroblastos circundando um macrófago compondo o “ninho eritróide”, o número de eritroblastos por ilhota na medula humana varia de 5 até mais de 30, tendo como componente chave o macrófago central [15, 16]. Atualmente tem-se uma compreensão molecular melhorada dos processos operacionais dentro dos ninhos eritróides, incluindo adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, *feedbacks* regulatórios positivos e negativos e função do macrófago central. Estas ilhotas são raramente vistas em aspirados de medula óssea, pois são prontamente destruídas durante a preparação do esfregaço [15].

Interessantemente, e ao contrário do que ocorrem com os megacariócitos, as ilhotas eritróides localizam-se não somente nas regiões adjacentes aos sinusóides da medula óssea, mas também espalhadas por toda a medula. Nota-se que as ilhotas não adjacentes, contêm significativamente mais proeritroblastos enquanto que as ilhotas vizinhas a sinusóides têm eritroblastos diferenciados mais acidófilicos. Este dado aumenta a intrigante possibilidade de que as ilhotas podem ser estruturas móveis que migram em direção aos sinusóides quando seus eritroblastos tornam-se mais diferenciados [17].

Historicamente, a Emp (proteína macrofágica eritroblástica), foi a primeira molécula identificada em ambas as membranas, de macrófagos e de eritroblastos, a qual parece ser capaz de formar uma ligação macrófago/eritroblasto [18]. Durante a diferenciação do macrófago no fígado fetal *in vitro*, a Emp parece ocupar diferentes locais intracelulares nos macrófagos imaturos, enquanto que nas células maduras está amplamente presente na superfície celular, executando papel crítico na eritropoese [19]. A CD163a é outra glicoproteína de adesão macrofágica, a qual funciona como um receptor para complexos hemoglobina/haptoglobina. *In vitro*, CD163 aumenta a expansão eritróide, mas não altera a diferenciação [20].

Os macrófagos centrais não somente ancoram os eritroblastos dentro das ilhotas e provem interações que afetam a proliferação e diferenciação eritróide, como também executam outras funções, realizam a fagocitose do núcleo quando este é expelido dos eritroblastos [15]. Outra função originalmente proposta para macrófagos centrais é a transferência de ferro diretamente para progenitores

eritróides. Estudos recentes sugerem que a ferritina é sintetizada pelos macrófagos, secretada via exocitose, e subsequentemente tomada pelos eritroblastos. Após endocitose, o ferro liberado da ferritina por acidificação e proteólise, é usado pelo eritroblasto para síntese da heme [21].

Anormalidades na diferenciação macrofágica podem levar as perturbações na função do ninho eritróide. Dois importantes fatores para regulação da diferenciação e função macrofágica são a proteína supressora de tumor retinoblastoma (*Rb protein*) e a proteína paladina associada ao citoesqueleto [22].

2.1.3 Megacariopese

Megacariócitos são células grandes (30 a 150 μm) com coloração escura e núcleo irregularmente lobulado. O citoplasma é azul com textura de “algodão doce”, e as células mais maduras contém muitos grânulos roxo-avermelhados. Circundando cerca de metade dos megacariócitos existem plaquetas deles derivadas [2]. A Trombopoietina é o fator de crescimento que regula primariamente a megacariopese. Estimula a proliferação e diferenciação das células progenitoras de megacariócitos e aumenta a produção de plaquetas. As células megacariocíticas são as menores em número (menos de 1% das células nucleadas), mas são as maiores de todas as células hematopoéticas [23].

A maturação megacariocítica é única e caracterizada pela endomitose (divisão nuclear sem divisão citoplasmática), resultando em um aumento gradual na segmentação nuclear e conteúdo de DNA [23].

Megacariócitos normais devem ser distinguidos de osteoclastos, os quais são maiores, tem granulação citoplasmática similar, mas são multinucleados ao contrário dos primeiros, cujo núcleo é segmentado. Megacariócitos maduros em condições de aumento da destruição e utilização periférica de plaquetas, freqüentemente tem seu citoplasma reduzido, sugerindo “exaustão” por lançamento prematuro de plaquetas, mas este não é um achado diagnóstico definitivo [1].

2.1.4 Linfopoese

Estudos em 1960 e 1970 demonstraram que linfócitos B e T são responsáveis primariamente pelas funções básicas de produção de anticorpos e respostas imunes mediadas por células, respectivamente [24].

Os tecidos linfóides podem ser classificados em 2 grupos: Os primários, também chamados de órgãos regenerativos, e os secundários ou órgãos periféricos. Os primários são os tecidos onde os linfócitos expressam, pela primeira vez, os receptores antigênicos e onde adquirem a maturidade fenotípica e funcional. Nos mamíferos, os órgãos primários são a medula óssea e o timo. A medula óssea, além de originar todos os linfócitos é o local onde ocorre a maturação das células B, enquanto a diferenciação dos linfócitos T ocorre no timo. Os órgãos linfóides secundários ou periféricos incluem os linfonodos, baço, o tecido linfóide associado às mucosas e pele [10]. O número de precursores de células B na medula é maior em crianças, onde eles podem ser tão freqüentes quanto elementos mielóides e eritróides, e diminuem com a idade [1, 2].

2.1.4.1 Linfócitos B

O desenvolvimento das células B abrange estágios contínuos que iniciam nos órgãos linfóides primários com subsequente maturação funcional em órgãos linfóides secundários. O ponto final protetivo e funcional é a produção de anticorpos por plasmócitos terminalmente diferenciados [24].

Células plasmocitárias normais variam um pouco no tamanho, mas geralmente tem de 12 a 16 μm de diâmetro. Elas são redondas ou ovais. O núcleo é pequeno, redondo, localizado excentricamente, e corado densamente de púrpura. A cromatina é maciça e grosseira. Nucléolos não são visíveis. O citoplasma é azul profundo, freqüentemente com zona perinuclear clara. Formas binucleadas podem ser encontradas em medula normal [2].

A expressão de RCB (receptor de célula B) é requisito para desenvolvimento e sobrevivência das células B na periferia.

Pelo menos 10 fatores de transcrição distintos regulam os estágios precoces de desenvolvimento do linfócito B, sendo *E2A*, *EBF* e *Pax5* particularmente importantes na promoção da diferenciação da linhagem B [25].

Nos últimos 25 anos, aproximadamente 10 moléculas de superfície específicas de células B foram identificadas por tecnologia de anticorpos monoclonais. A nomenclatura “clusters of differentiation” (CD) facilitou a classificação dos anticorpos monoclonais gerados contra epítopos de superfície celular de leucócitos. A maioria destas moléculas regula o desenvolvimento e função das células B, facilita a comunicação com o ambiente extracelular, ou provê um contexto celular para interpretar os sinais RCB [24].

Células B de memória persistem após o estímulo antigênico, rapidamente expandindo durante respostas secundárias, e podendo diferenciar-se em plasmócitos secretores de anticorpos. De uma forma similar aos estágios precoces de desenvolvimento de célula B no fígado fetal e na medula adulta, o desenvolvimento dos plasmócitos é fortemente regulado por fatores de transcrição, mais notavelmente pelo *Bcl-6* e *BLIMP -1* [26].

2.1.4.2 Linfócitos T

Populações funcionalmente distintas de linfócitos T expressam diferentes proteínas de membrana. Estas proteínas servem como marcadores fenotípicos de diferentes populações linfocitárias. Por exemplo, a maioria dos linfócitos T-auxiliares expressam uma proteína de superfície denominada CD4, e em sua maioria os linfócitos T-citotóxicos (CTLs) expressam outro marcador, denominado CD8. CD4 e CD8 são glicoproteínas da superfície dos linfócitos T que são expressas em subgrupos mutuamente exclusivos de linfócitos T maduros com padrões distintos de restrição do MHC (*major histocompatibility complex*). CD4 e CD8 servem como moléculas acessórias, por facilitarem as interações dos linfócitos T com as APCs (células apresentadoras de antígenos), ou do CTLs com as células-alvo [10].

Em 1986, foram identificados dois subtipos de células T CD4 ativadas, Th1 e Th2, as quais eram diferentes uma da outra na sua função e no padrão de produção

de citocinas. Hoje, pelo menos 4 subclasses de célula T CD4 são conhecidas, Th1, Th2, Th17 e Treg [10, 27].

As células Th1 produzem IL2 (interleucina 2) e IFN- γ (interferon-gama), desenvolvem-se quando a célula apresentadora de antígeno (APC) secreta Interleucina 12 (IL12) e são importantes por promover resposta contra patógenos intracelulares. As células Th2 produzem Interleucinas 4, 5 e 13, desenvolvem-se na presença de Interleucina 4 (IL4) e promovem resposta humoral contra patógenos extracelulares. As células Th17 produzem Interleucina 17 (IL17) e podem estar associadas com doenças auto-imunes [27].

As Células T reguladoras (Tregs) são células T CD4 positivas que possuem o fator de transcrição Foxp3 ativo e, conseqüentemente, secretam IL-10 e TGF-beta (Transforming growth factor beta). As que secretam mais IL-10 que TGF-beta são chamadas de Th3 e as que secretam mais TGF-beta que IL-10, de Tr1. Essas células podem ser induzidas pelo contato com o antígeno (Treg induzidas) ou já saírem do timo com esse perfil (Treg naturais). A sua ação é inversa à das células Th17, levando à supressão das respostas imunes que gerem lesão tecidual. Em resumo, as Tregs têm um papel supressor da resposta imune [28].

2.2 COLETA, PREPARO E ANÁLISE DA MEDULA ÓSSEA

2.2.1 Coleta e Preparo do Aspirado de Medula Óssea

A coleta de 10 a 20 mL do aspirado é realizada preferencialmente na crista ilíaca e as distensões devem ser preparadas imediatamente após o procedimento. Após serem fixadas e coradas (colorações de Romanowsky, Azul da Prússia e estudos citoquímicos) primeiramente deve-se proceder pesquisa de grumos e precursores hematopoéticos no aspirado, os quais vão determinar se a amostra está adequada para análise ou se há contaminação com sangue periférico [2,4,7,28].

A avaliação microscópica em menor aumento é ideal para determinação da celularidade global da amostra, contagem de megacariócitos e pesquisa de células malignas. Já a observação com óleo de imersão em maior aumento é adequada

para avaliação qualitativa das três linhagens celulares bem como para contagem diferencial de células nucleadas e determinação da relação Mielóide/Eritróide [1-3, 6].

Para a coleta do aspirado, é recomendado o uso de seringa plástica de 10-20 mL e o volume aspirado não deve ultrapassar 2 mL. Com o aumento do volume de medula aspirada, há uma diluição progressiva da amostra por sangue periférico, cuja resistência a aspiração é menor. A quantidade de aspirado deve ser proporcional a quantidade de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) no tubo para minimizar artefatos induzidos pelo mesmo. [30] Uma segunda seringa deve ser utilizada para testes complementares como citometria de fluxo, análise citogenética, estudos moleculares ou cultura de MO.

Se ocorrer amostra caracterizada como “medula seca”, termo conhecido em inglês como “*dry tap*”, ou se não forem obtidos grumos (fragmentos), o aspirado pode ser repetido em um ângulo um pouco diferente ou em outro local, neste caso o exame obrigatoriamente deve ser acompanhado de biópsia de medula óssea, seguido de “*in print*”, para que se obtenha o diagnóstico. Os aspirados para citometria de fluxo devem ser colocados em tubo com heparina sódica [6].

As distensões da medula óssea devem ser preparadas imediatamente após a aspiração. Uma gota do aspirado é colocada em cada lâmina. O esfregaço é feito usando um distensor com as bordas chanfradas de forma que a largura deste distensor é menor que a lâmina com a amostra. O distensor é colocado junto à gota do aspirado em um ângulo de aproximadamente 30 graus, puxado para traz para fazer contato com a gota, permitindo que a mesma se espalhe ao longo da linha de contato com a lâmina e em seguida ele é impelido para frente em uma ação suave. [6, 31] Outra técnica é a de grumos esmagados (*squash slides*) nela, uma gota da MO contendo grumos é colocada no centro da lâmina e uma segunda lâmina é colocada em cima da primeira, sendo que o peso da segunda lâmina é suficiente para esmagar os grumos, as lâminas são separadas uma da outra na direção do eixo longo da lâmina [6].

Cortes de coágulo podem prover informações adicionais e podem ser utilizados se a biópsia não tiver sido realizada ou se existir suspeita de que a mesma não esteja adequada. O estudo histológico de cortes de coágulo pode ser usados para avaliar a celularidade da medula óssea (MO), morfologia de megacariócitos ou infiltrados tumorais e também para imunohistoquímica (IHC) ou Hibridização

fluorescente “*in situ*” (FISH). Os cortes de coágulo devem ser descritos como as amostras de biópsia [6, 30]. O coágulo é colocado em tubo contendo fixador apropriado e processado usando o mesmo método de amostras de biópsia, exceto pela descalcificação, que não é necessária [5, 6].

Do aspirado de MO, usualmente são feitas pelo menos seis distensões, fixadas com metanol absoluto livre de acetona, onde: duas são coradas por Coloração de Romanowsky (May-Grunwald Giemsa ou Wright Giemsa); outras duas coram-se por coloração de Azul da Prússia, restando ainda duas lâminas para estudo Citoquímico (Mielperoxidase/ Esterases não específicas), Imunohistoquímica ou FISH [6, 23]. Da mesma forma, as lâminas de grumos esmagados (*squash slide*) também fixadas com metanol absoluto livre de acetona são coradas por coloração de Romanowsky e Azul da Prússia [31].

2.2.2 Adequação da Amostra do Aspirado de Medula Óssea

Para o melhor conforto do paciente, a crista íliaca posterior é geralmente o local preferido para a aspiração [3, 6].

Primeiramente é importante observar se a amostra está adequada para o diagnóstico. O melhor indicador de que a agulha penetrou a cavidade medular e a medula foi retirada com êxito é, como já foi ressaltado, a presença de grumos no aspirado e precursores hematopoéticos no aspirado (megacariócitos, células vermelhas nucleadas) elementos não encontrados na distensão do sangue periférico [2].

A aspiração inadequada da MO pode ocorrer devido à falha técnica de aspiração - a mais comum delas pela aspiração de volume excessivo e consequente diluição da amostra, ou por espaço medular fibrótico ou hiper celular, geralmente leucêmico (medula seca) [5].

Segundo Hyun (1986), são possíveis causas para ocorrência de “medula seca”: falhas técnicas; desordens mieloproliferativas com mielofibrose e osteoesclerose; mielofibrose/osteoesclerose secundária devido a tumores; compactabilidade celular da medula (leucemias agudas, linfomas, discrasias plasmáticas); reticuloendoteliose leucêmica; granulomas. Como recomendações

para estes casos: repetir a aspiração por um profissional experiente se existirem falhas técnicas; fazer biópsia (com “*in prints*”) sobretudo se houver suspeita de mielofibrose/osteoesclerose ou reticuloendoteliose leucêmica; repetir a aspiração se houver suspeita de compactibilidade celular da medula/granuloma [7].

Na ausência de grumos, megacariócitos ou outros precursores hematopoéticos, a amostra deve ser reportada como sangue periférico. Na ausência de grumos, mas na presença de megacariócitos ou outros precursores celulares, a amostra deve ser reportada com uma amostra de MO diluída e uma avaliação qualitativa pode ser realizada [6].

2.2.3 Avaliação da Celularidade do Aspirado de Medula Óssea

O padrão ouro para celularidade global da medula é o exame de uma amostra de medula adequada obtida pela biópsia. A celularidade normal (percentual de espaço medular não ósseo ocupado por células hematopoéticas) da crista ilíaca medular diminui de 80% na infância para 50 a 30% entorno dos 30 anos, com diminuição adicional após os 70 anos [2], portanto este valor deve ser interpretado levando em conta a idade do paciente [1].

A medida da celularidade é menos fidedigna em preparações de aspirado, pois a arquitetura do tecido foi perturbada e a amostra é inevitavelmente misturada com variados graus de sangue periférico. Além disso, células que são abundantes na medula óssea, mas fortemente aderentes a elementos de suporte do tecido, podem ser sub-representadas no aspirado. O problema interpretativo mais comum é uma estimativa falsamente baixa da celularidade baseada no aspirado devido à diluição com sangue periférico durante a aspiração, enquanto que uma amostra de aspirado celular com grumos adequados de medula concorda com a celularidade da biópsia [1, 2]. Aspirados obtidos de adultos com mais de 30% de linfócitos são provavelmente misturados com sangue periférico [2].

As lâminas de medula óssea devem ser examinadas sob aumento menor para determinar o número e a celularidade dos grumos, número de megacariócitos e para procurar por agrupamentos de células malignas. O exame em menor aumento também permite a detecção de osteoclastos, osteoblastos, células de Gaucher,

folículos linfóides e granulomas. A lâmina toda deve ser examinada, incluindo as partículas, e a amplificação maior deve ser empregada para estudo de anormalidades descobertas [1]. Aumento focal de células de uma mesma linhagem em particular deve ser notado [3]. Após a pesquisa em menor aumento, as lâminas devem ser examinadas sob amplificação com óleo de imersão para determinar os vários tipos celulares hematopoéticos presentes e avaliar a adequação da diferenciação em cada linhagem (Granulocítica, Eritróide e Megacariocítica) [2].

2.2.4 Contagem Diferencial de Células Nucleadas no Aspirado de Medula Óssea

As distenções devem ser analisadas de maneira sistemática de forma que nenhuma informação relevante seja omitida [3]. A contagem diferencial de células nucleadas (DCN) da medula deve ser feita para avaliar a atividade hematopoética, comparar as proporções das diferentes linhagens com os valores de referência e também para quantificar células anormais, se presentes. As células da medula devem ser contadas em uma área onde estejam bem distribuídas com detalhes citológicos bons, e onde haja um número menor de células lisadas [6].

Dependendo da indicação do Medulograma, DCN mais detalhado não é necessário, por exemplo, se a suspeita clínica for deficiência de ferro ou anemia megaloblástica. No entanto, se as características forem de leucemia aguda ou Síndrome Mielodisplásica (SMD) a porcentagem precisa de tipos celulares é requerida para diagnóstico da doença, portanto contagem diferencial de pelo menos quinhentas células em no mínimo duas lâminas deve ser realizada e todos os tipos celulares devem ser enumerados [2, 3, 6]. Quando o DCN não for essencial para o diagnóstico, pelo menos 300 células devem ser contadas [6]. A contagem diferencial deve abranger células blásticas, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonados, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, mastócitos, promonócitos e monócitos, linfócitos, plasmócitos e eritroblastos. O DCN não deve incluir megacariócitos, macrófagos, osteoblastos, osteoclastos, células estromais, células lisadas ou células não hematopoéticas tais como células de tumor

metastático. Agregados linfóides, se presentes, não devem ser incluídos nesta contagem, mas sua presença deve ser notificada [2, 6].

Mielócitos e precursores tardios são normalmente quase tão abundantes quanto neutrófilos maduros. Prómielócitos são infreqüentes (menos de 10% dos elementos mielóides), e blastos devem ser em número menor que 5% das células hematopoéticas não linfóides na medula [1].

Contagens diferenciais e proporção M/E (mielóide/eritróide) são consideradas guias para caracterizar a medula como um todo. No aspirado, a proporção Mielóide/Eritróide é freqüentemente calculada para dar a celularidade relativa destas duas linhagens maiores. Este valor normalmente deve ficar entre 2:1 e 4:1. Uma diminuição da proporção M/E pode ser interpretada como hipocelularidade mielóide ou hipercelularidade eritróide, dependendo da celularidade global da medula [2]. A média mielóide/eritróide deve ser calculada pela expressão da média de todos granulócitos, monócitos e seus precursores (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, eosinófilos, promonócitos) por eritroblastos (em todos os estágios de maturação) [6].

Entre um mês e um ano de idade há um aumento nos precursores linfóides e uma diminuição nos precursores eritróides e granulocíticos. Após um ano a contagem diferencial na medula varia pouco até 18 meses. [2] O número total de células contadas no DCN deve ser expresso no laudo. A contagem obtida deve ser comparada com médias normais publicadas para DCN em adultos ou em crianças e neonatos. [6]

As características citológicas associadas com a diferenciação das três linhagens hematopoéticas (Granulocítica, Eritróide e Megacariocítica) são centrais para avaliar a medula óssea [1].

2.2.5 Avaliação de Estoques de Ferro no Aspirado de Medula Óssea

O exame da medula deve incluir avaliação de estoques de ferro, especialmente se o paciente está anêmico. Cora-se a distensão da medula por técnica de Azul da Prússia. Os macrófagos medulares são avaliados pelo estoque de ferro, e os eritroblastos são examinados para presença de grânulos de ferro no citoplasma (sideroblastos) [2]. Estoques de ferro podem ser graduados

subjetivamente como ausentes, reduzidos, normais, aumentados ou marcadamente aumentados [6].

O número total de sideroblastos (normal, reduzido ou aumentado) deve ser relatado e a frequência e localização (citoplasmático ou perinuclear) dos grânulos sideróticos deve ser avaliada. Sideroblastos em anel são definidos pela presença de cinco ou mais grânulos sideróticos circulando um terço ou mais do núcleo. Pelo menos 100 eritroblastos devem ser avaliados para porcentagem de sideroblastos em anel, se presentes [2, 6].

Uma distensão de MO com estoques aumentados de ferro deve ser usada como controle positivo. Cortes de biópsia são menos fidedignos que o aspirado para avaliação de estoques de ferro, uma vez que a decalcificação remove estoques de ferro, podendo ocorrer perda deste no processamento do tecido [5, 6].

O estudo de Stuart-Smith (2005) realizou uma comparação entre os resultados da Coloração de Perls' em amostras de biópsia descalcificadas com ácido fórmico e resultados da Coloração de Perls' em amostras de aspirado, comprovando que há perda de ferro durante o processo de decalcificação da amostra de biópsia, uma vez que 44% das amostras do estudo tiveram presença de ferro no aspirado e ausência do mesmo na biópsia. Porém este estudo mostrou também que a coloração para Ferro na biópsia pode ser útil nos casos em que amostras de Aspirado estão inadequadas para avaliação do ferro e quando não há hemossiderina evidente na coloração de Hematoxilina-Eosina da biópsia [32].

2.2.6 Laudo do Aspirado de Medula Óssea

A celularidade dos grumos de MO deve ser avaliada pela análise de várias partículas na distensão. Esta pode ser descrita como acelular, reduzida, normal, aumentada ou marcadamente aumentada [33].

Comentários quantitativos e qualitativos devem ser feitos para as três linhagens celulares: eritróide, mielóide e megacariocítica. É importante a avaliação do número (aumentado, normal ou diminuído), da maturação e morfologia, devendo ser descrito se estiverem anormais. Também é importante relatar o número de linfócitos e plasmócitos, bem como a morfologia destes [3]. Deve-se relatar o

resultado da contagem diferencial de células nucleadas e respectivos percentuais, além do resultado da Relação Mielóide/Eritróide [6].

Quando o número de macrófagos está aumentado, isto deve ser mencionado, além de anormalidades em sua morfologia. Aumento no número de mastócitos e qualquer característica morfológica atípica ou agregada devem ser notados. Células atípicas ou agregadas células estranhas a MO (tumor metastático) devem ser descritos e a presença de número significativo de células lisadas também deve ser documentada. Os resultados dos estoques de ferro e outras investigações citoquímicas devem ser reportados [30].

Alguns autores advogam que para uma completa avaliação diagnóstica, o laudo do aspirado deve incluir os resultados da contagem sanguínea, por exemplo, concentração da hemoglobina, contagem total e diferencial de glóbulos brancos e contagem de plaquetas, além de comentários sobre a distensão. A adequação do aspirado deve ser mencionada no laudo, se há presença de grumos na distensão ou se o aspirado resultou em “medula seca” ou hemodiluída”. Achados relevantes de citometria de fluxo, se disponíveis, devem ser sumarizados no laudo do aspirado. Quando resultados de estudos genéticos moleculares são conhecidos e tiverem impacto sobre o diagnóstico, estes devem ser comentados [6, 30].

O aspecto do aspirado e da biópsia de medula devem sempre ser correlacionados e se houverem discrepâncias maiores, a razão precisa ser explicada [29].

A conclusão do laudo do aspirado de MO deve relatar o diagnóstico ou diagnóstico diferencial, com referência nas diretrizes do consenso internacional quando aplicável. Achados maiores podem ser sumarizados. Se o aspirado foi executado para monitoramento de doença os achados devem ser comparados com laudos prévios de MO. Se o aspirado foi executado para confirmar um diagnóstico clínico e o resultado foi negativo, isto deve ser relatado. Deve-se utilizar um código de doença apropriado de acordo com a terminologia do SNOMED (*Systematized Nomenclature of Medicine*) ou ICD (*International Classification of Diseases*) [6].

2.2.7 Coleta, Preparo e Laudo de Biópsia de Medula Óssea

Com relação à coleta, o comprimento do material em um adulto deve ter pelo menos 2 cm. As amostras de biópsia podem ser fixadas por diferentes métodos. Pode-se usar formalina neutra tamponada por 6 horas. Outros fixadores comumente utilizados incluem zinco formaldeído, B5 (cloreto de mercúrio, acetato de sódio e formalina), AZF (ácido acético-zinco-formalina), IBF (formalina isotônica tamponada), Bounin's fixador (ácido pícrico, ácido acético e formaldeído), ou formaldeído e glutaraldeído. O tempo de fixação varia dependendo do fixador usado, de no mínimo 1 hora até no máximo 24 horas. Estão disponíveis diferentes métodos de descalcificação. Soluções comumente usadas são EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), ácido fórmico, ácido acético, ácido pícrico ou agentes descalcificantes comerciais. O tempo de descalcificação varia de 15 minutos a 72 horas, dependendo de ambos, o tipo de agente descalcificante bem como do tamanho da amostra de biópsia [6]. Após a descalcificação a amostra de biópsia é embebida em parafina e cortada com micrótono [34]. A espessura recomendada dos cortes é de 2 a 3 cm. Os cortes de biópsia devem ser corados por Hematoxilina-eosina (H&E). Pode ser feita uma coloração adicional de Giemsa além da H&E. O Giemsa é útil para identificar plasmócitos, mastócitos, células linfóides, eosinófilos e para distinguir entre mieloblastos e proeritroblastos [6]. Um corte pode ser corado para reticulina por método de impregnação de prata [35].

No laudo deve-se descrever a aparência e adequação macroscópica da biópsia, além da qualidade e integridade da amostra. O padrão e percentual da celularidade, e quaisquer áreas necróticas, fibróticas ou hemorrágicas devem ser relatadas. Deve-se descrever a arquitetura da medula. A composição celular deve ser relatada em termos de localização, proporções relativas, morfologia e padrão de diferenciação para linhagens eritróide, mielóide, megacariocítica, linfócitos, plasmócitos e macrófagos [29, 36]. Células anormais, se presentes, devem ser descritas. A conclusão deve sumarizar os achados e o diagnóstico, com referência as diretrizes do consenso internacional, se aplicável [37]. Um código de doença apropriado pode ser utilizado. Recomenda-se uma conclusão global que integre os achados de ambos, amostra de aspirado e de biópsia [6].

2.2.8 Imunofenotipagem

A Imunofenotipagem pela Citometria de Fluxo permanece como ferramenta indispensável para diagnóstico, classificação, estadiamento e monitoramento de neoplasias hematológicas. Melhorias na instrumentação e disponibilidade dos anticorpos e fluorocromos permitem identificar diferentes populações de células normais e reconhecer fenótipos aberrantes, mesmo quando presentes em pequena proporção das células analisadas [38, 39]. A escolha das linhagens celulares a serem estimadas e dos antígenos a serem avaliados é baseada no tipo de amostra e informações clínicas tais como, indicação para o exame, história clínica, achados morfológicos, histórico de outros testes anteriores de citometria e resultados de outros exames laboratoriais [38].

2.2.8.1 Neoplasias Linfóides Maduras

As neoplasias de células linfóides maduras incluem leucemia linfocítica crônica (LLC) e linfoma não Hodgking (LNH). Este grupo de doenças é reconhecido por um fenótipo similar às células linfóides maduras normais (por exemplo, imunoglobulina de superfície das células B maduras), e falta de características antigênicas de imaturidade, tais como expressão de TdT e CD34. Estas neoplasias podem ser divididas em T, B e NK [37].

2.2.8.1.1 Neoplasias linfóides maduras de linfócitos B

As células linfóides B neoplásicas podem ser distinguidas de células normais pela identificação de fenótipos anormais como restrição de imunoglobulina de cadeia leve e expressão de fenótipos aberrantes [38]. Ao contrário da maioria das populações normais e reativas, as neoplasias de células B maduras geralmente representam um clone simples de células que expressam somente uma classe de

imunoglobulina de cadeia leve (kappa ou lambda) [40]. Outra característica encontrada é a aparente perda de intensidade para imunoglobulina de superfície [41].

Fenótipo aberrante é a presença de antígenos que normalmente não são expressos pelas células B (como antígenos mielóides CD13 e CD33). Notavelmente, a expressão de CD5 em células B é frequentemente referida como um fenótipo aberrante, porém existem pequenas populações de células B normais maduras CD5⁺. Por isso, a interpretação da expressão de CD5 por células B requer avaliação de outras anormalidades, incluindo restrição de imunoglobulina de cadeia leve e intensidade alterada da expressão de CD20, CD22 e CD79b [38].

Expressão de bcl-2 anormalmente aumentada (a qual é detectada por imunohistoquímica) pode ser encontrada na maioria dos linfomas foliculares, em alguns linfomas difusos de células B grandes e em algumas LLA-B. Em contrapartida, o Linfoma de Burkitt é geralmente CD10⁺ e bcl-2⁻ [42].

Para avaliação de neoplasias de células B maduras, é útil considerar a expressão de CD5 e CD10: em geral, populações CD5⁺ e CD10⁻ podem indicar LLC-B (FMC7⁻) e Leucemia Pro-linfocítica (que também pode ser CD5⁻, CD10⁻ e CD23⁻), as populações CD5^{+/-} e CD10⁻ podem indicar Linfoma folicular (bcl-2⁺) e Linfoma de Burkitt (bcl-2⁻), enquanto que populações CD5⁻ e CD10⁻ que expressam também CD103 são fortemente indicativas de Tricoleucemia [43-45].

2.2.8.1.2 Neoplasias linfóides maduras de linfócitos T

As neoplasias de célula T maduras podem ser identificadas frequentemente na imunofenotipagem pela expressão de antígenos aberrantes associada à perda dos antígenos CD5 e CD7 [46]. Normalmente as células T CD4⁺ do sangue periférico, são em sua maioria CD26⁺ (mais de 70%), por outro lado, as células CD4⁺ neoplásicas da Síndrome de Sézary demonstram uma diminuição na intensidade do CD26 e são geralmente CD7⁻ [47, 48].

A avaliação de combinação de CD7, CD26, CD3 e CD4 deve ser correlacionada com achados clínicos e morfológicos para estabelecer diagnóstico de malignidade [38].

Entre as neoplasias linfóides maduras com fenótipo de célula T, a expressão de CD4 e CD8 pode ser usada para formular possibilidades diagnósticas, onde: CD4⁺ e CD8⁻ = Síndrome de Sézary (CD7⁻, CD26⁻); CD4⁺ e CD8^{+/-} = Linfoma pró-linfocítico de Células T (usualmente com perdas fenotípicas significantes), Linfoma/Leucemia de células T do adulto (CD7⁻, CD25⁺); CD4⁻ e CD8^{+/-} = Leucemia linfocítica granular de grandes células T, Leucemia Linfocítica de células T Hepatoesplênica e Enteropatia associada à Leucemia Linfocítica de células T [46].

2.2.8.2 Mieloma Múltiplo (MM)

Dois antígenos são normalmente usados para identificar plasmócitos normais: CD38 (de alta intensidade) e CD138. Além disso, usualmente os plasmocitomas demonstram fenótipo anormal com CD19⁻ e CD20⁻, o que os diferencia dos plasmócitos normais da medula e das neoplasias de células B [49]. Expressão anormal de CD28 foi demonstrada em aproximadamente metade dos pacientes com MM, bem como a perda de CD27 ocorre em proporção similar de pacientes, estando frequentemente associada com progressão da doença. Aproximadamente 20% dos plasmocitomas demonstram expressão de CD117 [50].

A característica mais útil na distinção entre Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI) e MM é a identificação de proporção significativa de células plasmocíticas fenotipicamente normais associadas com células clonais. Embora plasmócitos não neoplásicos possam estar presentes em alguns casos de MM, eles representam uma pequena proporção do total de células nestes casos [51].

2.2.8.3 Doença Mieloproliferativa Crônica (DMC)

A imunofenotipagem tem um papel menos definido para diagnóstico de DMC. Anormalidades na expressão de antígenos mielóides foram descritas, particularmente em mielofibrose idiopática crônica, e podem auxiliar na distinção de

proliferações hematopoéticas reativas. Além disso, a contagem de blastos permanece importante na distinção entre fase crônica e fase acelerada na Leucemia Mielóide Crônica (LMC) [38].

2.2.8.4 Leucemias Agudas

Blastos frequentemente diferem da maioria das células maduras pela expressão de marcadores de imaturidade e falta de antígenos expressos por células maduras. Por exemplo, mieloblastos manifestam marcadores de imaturidade como CD117 e CD34, e falta de marcadores de maturação como CD11b, CD15 e CD16 [38].

Células linfóides B imaturas podem ser diferenciadas das células maduras pela expressão de CD34, TdT, CD10 e ausência de imunoglobulina de superfície e CD20. Já células linfóides T imaturas são identificadas pela expressão de CD34, TdT, CD1a ou perda da expressão de CD3 de superfície [38].

Na distinção entre Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e Leucemia Mielóide Aguda (LMA), é importante considerar que LMA geralmente expressa antígenos característicos de diferenciação neutrofílica e monocítica tais como CD13, CD15, CD33, CD64, CD117 e mieloperoxidase [52]. Na LLA, CD19 tem alta sensibilidade e especificidade para detecção de células da linhagem B e CD3 citoplasmático para detecção de células da linhagem T.

Nas LMA o estudo imunofenotípico tem grande valor na identificação de diferenciação megacariocítica (LMA-M7) com expressão de CD41 e CD61. Enquanto na Leucemia eritróide pura (LMA-M6), há expressão de CD235a (glicoforina A) ou CD 36 na ausência de CD64, mieloperoxidase e outros antígenos mielóides associados. Embora estudos de citometria de fluxo sejam capazes de avaliar diferenciação monocítica (LMA M4/M5), o estudo citoquímico permanece como parte importante do esquema de classificação atual da OMS (Organização Mundial da Saúde) [53].

2.2.8.5 Síndrome Mielodisplásica (SMD)

Com relação às células progenitoras mielóides CD34⁺, podem ocorrer às seguintes alterações fenotípicas: aumento ou diminuição da expressão de células CD34; expressão de CD11b e / ou CD15; perda da expressão do CD13, CD33, ou HLA-DR; expressão dos antígenos linfóides (CD5, CD7, CD19, ou CD56); diminuição da expressão do CD45. Além disso, podem ocorrer anormalidades nas células precursoras eritróides como: expressão anormal do CD45, expressão do CD34, expressão anormal do CD71 e/ou CD117 e/ou CD235 [52, 54].

2.3 PRINCIPAIS INDICAÇÕES PARA O EXAME DE MEDULA ÓSSEA

2.3.1 Suspeita de Leucemia

Na suspeita de Leucemia Aguda o aspirado de medula permite fazer melhor prognóstico da doença conforme a taxa de displasia. A análise citogenética é mais bem sucedida utilizando células da medula, da mesma forma que é importante ter uma linha de base para comparar com os aspirados de medula durante o tratamento [3].

Avanços atuais na farmacogenética conduzem à idéia de que o tratamento futuro de pacientes com leucemia provavelmente será baseado em terapia individualizada (farmacogenômicos), baseada nas características genéticas de suas células malignas e na sua própria composição genética única [55].

2.3.1.1 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)

A LLA – desordem maligna de células progenitoras linfóides – afeta ambos, crianças e adultos, com pico de prevalência entre 2 a 5 anos de vida. Em crianças, o

desenvolvimento de tratamentos efetivos tem levado a cura em mais de 80% dos casos [56].

Os eventos patogênicos precisos que levam ao desenvolvimento da LLA são desconhecidos. Há trabalhos, por exemplo, afirmando que o alto peso ao nascimento é um fator de risco para LLA em crianças [57]. Existe ainda uma extensa lista de relatos conflitantes ou isolados que podem estar relacionados com risco aumentado desta doença, incluindo, ocupação dos pais, histórico reprodutivo materno, uso de álcool e tabaco, dieta materna, uso pré-natal de vitaminas, exposição a pesticidas e solventes e exposição a campos magnéticos de alta frequência. Poucos casos (<5%) são associados com síndromes genéticas predisponentes tais como Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia [58]. O foco atual da pesquisa sobre a patobiologia da LLA é a compreensão das alterações genéticas que frequentemente ocorrem, seus efeitos na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, visando elaborar tratamentos alvo-seletivos contra produtos genéticos alterados destes clones leucêmicos [59].

Pela classificação da FAB, baseada na morfologia celular, temos: LLA L1: Células pequenas, homogêneas, cromatina densa, nucléolo pequeno ou ausente e citoplasma escasso; LLA L2: células grandes e heterogêneas, cromatina heterogênea, nucléolo proeminente, citoplasma escasso; LLA L3 = Células grandes, cromatina granular, um ou mais nucléolos proeminentes, citoplasma vacuolizado e abundante (Figura 2) [10].

Em torno de 25% dos casos de LLA de célula B – forma mais freqüente da doença – abriga a fusão genética TEL-AML1 gerada pela translocação cromossômica t(12,21)(p13;q22) [56]. Achados em camundongos estabeleceram o gene *Tel* como importante regulador do desenvolvimento celular hematopoético, essencial para hematopoese definitiva. Da mesma forma, o gene *Aml1* é essencial para hematopoese embrionária definitiva. A presença da proteína da fusão TEL-AML1 em progenitores de células B parece conduzir a células pré-leucêmicas com propriedades de sobrevivência e auto-renovação alteradas [60].

Mais de 50% dos casos de LLA de célula T tem mutações que envolvem NOTCH1, gene que codifica um receptor transmembrana, o qual regula o desenvolvimento normal das células T [61]. Cerca de 15% das LLAs em crianças e 25% das LLAs e adultos são de células T [10].

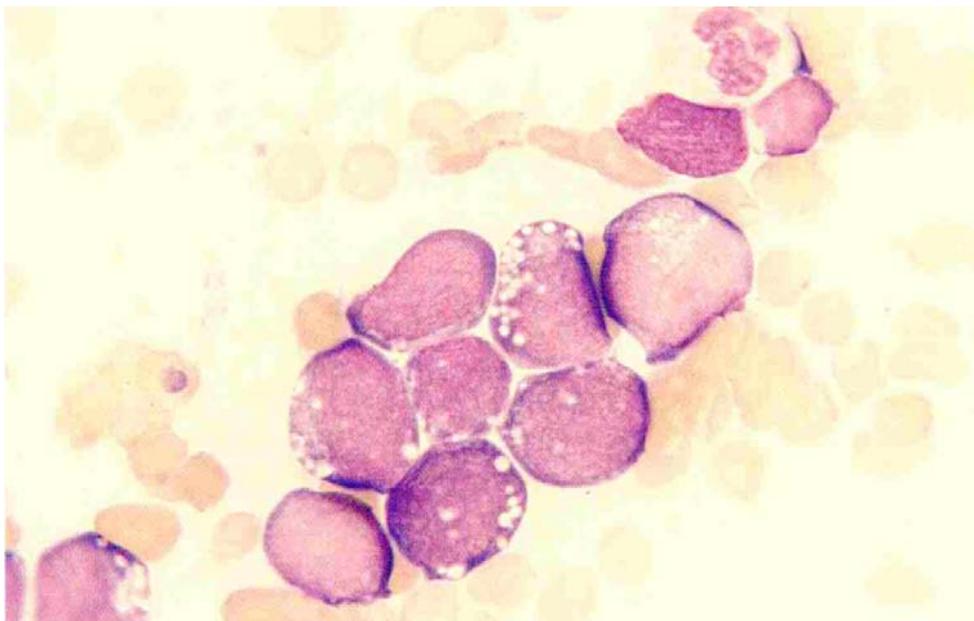


Figura 2: Linfoblastos de LLA-L3 com vacualização citoplasmática característica.
Fonte: McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas of haematology. 5th ed. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 1988. [65]

Em adultos, a translocação cromossômica mais freqüente é a t(9;22), ou cromossomo Philadelphia. A BCR-ABL tem um alvo terapêutico atrativo, onde fármacos inibidores da ABL quinase têm se mostrado efetivos contra estas leucemias BCR-ABL⁺ [62].

Em geral, a presença do cromossomo Philadelphia, t(4;11) com fusão MLL-AF4 e hipoploidia (<44 cromossomos por célula leucêmica) conferem piores resultados, enquanto que hiperploidia (>50 cromossomos), fusão TEL-AML e trissomia 4, 10 e 17 são associadas com prognóstico favorável [63].

A imunofenotipagem é essencial para estabelecer o diagnóstico correto e definir a linhagem celular envolvida. Expressão de antígenos mielóides aberrantes tem sido detectada em aproximadamente metade das LLAs [56].

A contagem de leucócitos tem prognóstico variável, contudo aumento das contagens confere piores resultados, especialmente em pacientes com LLA de célula B [64]. A idade ao diagnóstico tem um forte efeito prognóstico. Crianças de 1 a 9 anos têm resultados melhores que crianças com menos de 1 ano e adolescentes. Os resultados do tratamento em adultos são piores [56].

2.3.1.2 Leucemia Mielocítica Aguda (LMA)

O diagnóstico de LMA requer presença de 20% de blastos do total de células contadas no sangue periférico ou na medula. Nas leucemias mielomonocíticas e monocíticas os promonócitos são considerados como blastos para fins diagnósticos [66]. De acordo com a classificação FAB, as LMAs são separadas em 8 grupos.

A LMA com diferenciação mínima (FAB-M0) é uma leucemia aguda com células blásticas uniformes, sem grânulos citoplasmáticos, com Bastão de Auer, e reação citoquímica negativa para Mieloperoxidase (MPO) e Sudan Black [2, 66].

As LMAs que são MPO positivas e esterase não específica negativas pela citoquímica e que mostram menos de 10% de células com maturação são designadas como LMA sem maturação (FAB-M1) [1, 66].

A LMA com maturação (FAB-M2), é definida citoquimicamente de forma semelhante a M1, mas com 10% ou mais de células mostrando maturação. LMA com t(8;21) é comum em crianças e adultos, somando aproximadamente 8% dos casos de LMA. Os blastos são grandes com um contexto de maturação mielóide. Na medula os blastos têm ocasionais Bastonetes de Auer e ocasionais grânulos grandes de cor salmão. Estas células expressam CD34, DC13, CD33 e MPO, com típica expressão aberrante de CD19 fraco [10]. Mutações KIT são comuns (20-25%) e em adultos parecem ter pior prognóstico [10, 67].

LMA promielocítica (FAB-M3) compreende 5 a 8% dos casos de LMA. É mais comum em adultos jovens. O reconhecimento do pronto diagnóstico é essencial devido à alta incidência de risco de CIVD. A t(15;17) (q22;q21) resulta na fusão do gene promielocítico (PML) no cromossomo 15 com o gene do receptor do ácido retinóico (RARA) do cromossomo 17. Duas variantes morfológicas são conhecidas – a hipergranular ou típica e a hipogranular - tendo características genéticas e imunohistoquímicas distintas [68]. A LMA-M3 hipergranular ou típica representa 60 a 70% dos casos. Os promielócitos anormais têm numerosos grânulos citoplasmáticos grandes vermelho ou púrpura (Figura 3), frequentemente obscurecendo o contorno do núcleo. A maioria dos casos contém múltiplos Bastonetes de Auer. A imunofenotipagem mostra perda da expressão de HLA-DR e CD34, com forte expressão de CD33 e variável expressão de CD13 [69]. A forma hipogranular ou microgranular da LMA-M3 apresenta-se com leucocitose e numerosos promielócitos

anormais, os quais possuem granulação citoplasmática fina. As reações de MPO e Sudan Black são fortemente positivas nas células anormais de ambas variantes. A variante hipogranular mostra expressão de CD13 e CD33 similar a hipergranular, mas mostra diminuição de expressão de HLA-DR e CD34. Expressão aberrante de CD2 é mais comum na LMA-M3 hipogranular [70]. Mutações FLT3 são comuns na LMA-M3 e estão presentes em aproximadamente 40% dos pacientes, sendo a maioria mutações de duplicação tandem internas (ITD). FLT3-ITD na leucemia promielocítica, está fortemente associada com variante hipogranular [68]. Casos menos freqüentes com características morfológicas, imunofenóticas e clínicas de leucemia promielocítica tem uma variante de translocação citogenética que envolve o gene RARA no cromossomo 17, mas não o gene PML no cromossomo 15. É importante reconhecer estes casos, pois apesar de terem muitas das características típicas da LMA-M3, algumas variantes RARA não respondem a terapia com ácido trans-retinóico (ATRA) [71]. Finalmente, o diagnóstico da leucemia promielocítica deve ser rápido, o início da terapia não deve esperar pela confirmação genética quando os achados clínicos, morfológicos ou de citometria de fluxo sugerem o diagnóstico [72].

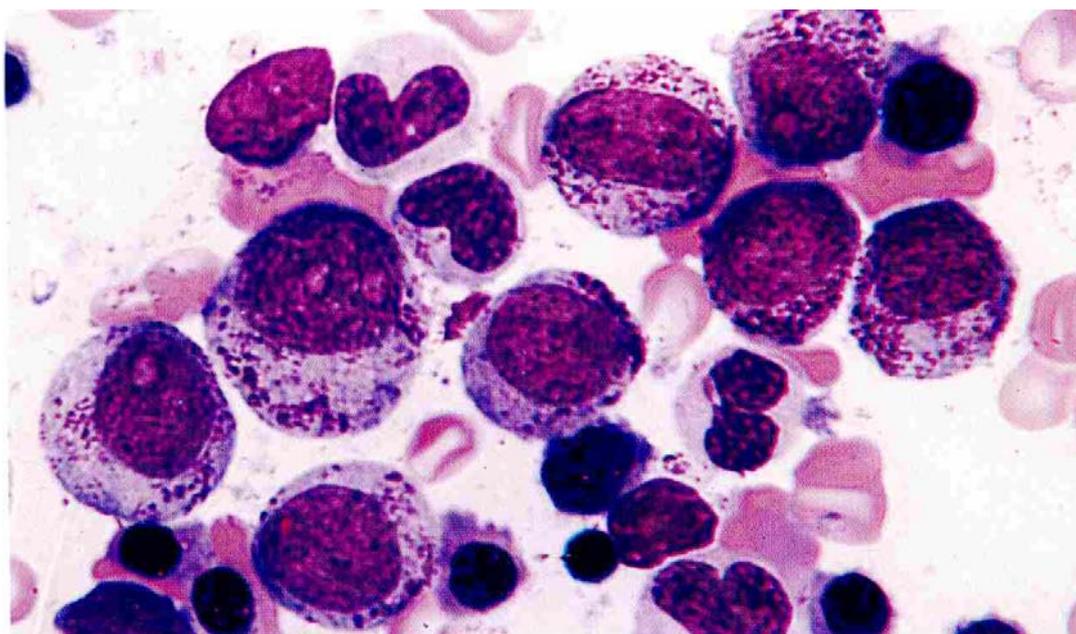


Figura 3: Promielócitos em LMA-M3 com granulações citoplasmáticas grosseiras proeminentes.

Fonte: McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas of haematology. 5th ed. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 1988. [65]

LMA com inv(16) ou t(16;16) tem uma característica morfológica de LMA com eosinófilos anormais na medula óssea (FAB-M4Eo). Mieloblastos, monoblastos e promonócitos típicos são vistos no sangue periférico e na medula. O imunofenótipo revela múltiplas populações, incluindo populações de blastos imaturos expressando CD34 e/ou CD117, e grupos de células exibindo diferenciação granulocítica (CD13, CD33, CD15, MPO) ou monocítica (CD4, CD11b, CD11c, CD14, CD64, CD36). Co-expressão aberrante de CD2 tem sido descrita, mas não é específica deste subtipo de LMA [66]. Mutações Kit estão presentes em aproximadamente 30% dos casos e tem impacto prognóstico negativo em adultos. Remissões moleculares são possíveis e tem boa correlação com remissão a longo prazo [73].

A leucemia aguda mielomonocítica (FAB-M4) é estearase não específica positiva, refletindo diferenciação monocítica, com 20% a 80% de células blásticas na medula. Quando mais de 80% dos blastos são estearase não específicos positivos, é diagnóstico de LMA monocítica ou monoblástica (FAB-M5) [66].

Na LMA eritrocítica (FAB-M6), por definição, os precursores eritróides devem representar 50% ou mais das células da medula óssea [66].

A leucemia megacariocítica aguda (FAB-M7) com t(1;22) é uma forma rara de LMA infantil. A média de idade ao diagnóstico é 4 meses e 80% dos casos são diagnosticados no primeiro ano de vida. A apresentação clínica é usualmente mascarada com um tumor sólido e hepatoesplenomegalia e/ou lesões esqueléticas, algumas vezes sem envolvimento na medula óssea. Os blastos no sangue e medula mostram características típicas de megacarioblastos, com pequena quantidade de citoplasma agranular e presença de “botão” típico, formando uma projeção citoplasmática. A imunoreatividade a antígenos megacariocíticos, CD41 e CD61, é normalmente presente [74].

A detecção de t(8;21), inv(16), t(16;16), ou t(15;17), é diagnóstica de leucemia aguda mesmo quando blastos representam menos de 20% na MO ou sangue periférico [66].

A Classificação da FAB provê uma terminologia útil comum para LMAs, porém limitada no significado biológico, prognóstico e terapêutico. A classificação da OMS de 2001 incorporou achados citogenéticos e moleculares e introduziu importantes correlações prognósticas. A classificação da OMS de 2008 expandiu o número de entidades com translocações cromossômicas recorrentes e incluiu duas entidades

provisórias caracterizadas por mutações genéticas, a LMA com mutação NPM1 e LMA com mutações CEBPA [75].

Entre as LMA citogeneticamente normais (LMA-CN), as mutações FLT3 são presentes em aproximadamente um terço dos casos, abrangendo todos os subtipos da classificação FAB, sendo mais comum na LMA sem diferenciação (FAB M1) [76, 77].

A estratificação do risco da LMA nos grupos de prognóstico favorável, intermediário e pior prognóstico é baseada na citogenética e nos *status* de mutação gênica (FLT3, KIT, NPM1 e CEBPA) o qual é utilizado para identificar quais pacientes seriam beneficiados com transplante de células tronco alogênico [78].

LMA com mutação no gene NPM1 é encontrada em aproximadamente 50% dos pacientes adultos com LMA de cariótipo normal (LMA-CN) e 20% dos pacientes pediátricos com LMA e cariótipo normal [79]. Aproximadamente 40% dos pacientes com mutação NPM1 são também FLT3-ITD positivos [66]. A mutação NPM1 em LMA-CN é associada com prognóstico favorável na ausência da mutação FLT3-ITD. Em adultos a maioria dos casos com mutação NPM1 mostra diferenciação monocítica (FAB-M5a), enquanto que em crianças a maioria dos casos mostra morfologia FAB M1, M2 ou M4 [80].

Mutações de ponto no gene CEBPA são detectadas em 13% dos casos de LMA-CN em adultos e 17-20% dos casos em crianças. Anormalidades FLT3 são incomuns em LMA com mutações CEBPA. Na ausência de fatores prognósticos adversos, LMA com mutações CEBPA tem prognóstico favorável [81].

2.3.1.3 Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

A LMC corresponde a 15-20% das leucemias em adultos. Embora possa ocorrer em qualquer idade, a maioria dos pacientes são diagnosticados após a quarta década de vida [82, 83].

Ao diagnóstico, os pacientes tipicamente apresentam medula hiperclular, leucocitose, desvio a esquerda, eosinofilia, basofilia, trombocitose e esplenomegalia. Quarenta por cento dos pacientes com LMC são inicialmente assintomáticos. Fadiga

é observada em diferentes graus em 80% dos pacientes e aproximadamente 40% apresentam esplenomegalia e anorexia [82, 83].

O cromossomo Philadelphia (presente em 95% dos casos de LMC), ocorre como consequência da fusão do gene *abl* do cromossomo 9 com o gene *bcr* do cromossomo 22, originando o oncogene ABL/BCR. A respectiva oncoproteína codificada por esta fusão possui atividade constitutiva tirosino quinase, promovendo divisão celular e inibição da apoptose [84] alterando a capacidade de proliferação e sobrevivência destas células.

Interessantemente, o ponto de quebra no cromossomo 22 pode variar, levando a produção de proteínas BCR-ABL com diferentes tamanhos: 190 KDa (quilodaltons), 210 KDa ou 230 KDa [85]. A p210 é a forma mais comum associada à LMC, sendo a p230 menos frequente. Contudo, a p190 é frequentemente encontrada na LLA. Isto pode ser especialmente útil na distinção entre pacientes com LLA e pacientes com LMC em crise blástica [82].

Outras translocações provavelmente causam atividade aberrante adicional que direciona a progressão desta doença. Algumas das anormalidades citogenéticas mais comuns incluem trissomia do 8, isocromossomo 17q, e aparecimento de Ph adicional. O isocromossomo 17q é gerado por divisão defeituosa, na qual o braço curto do cromossomo 17 é perdido e o braço longo é duplicado. Esta é uma das anormalidades cromossômicas mais comuns na LMC e que pode ter um papel importante na progressão da doença [86].

O curso natural da LMC pode ser dividido em 3 fases: Fase Crônica, Fase Acelerada e Crise Blástica.

Na Fase Crônica o sangue periférico tipicamente mostra leucocitose, com desvio a esquerda e neutrofilia absoluta, onde o desvio a esquerda pode ser marcado, mas o percentual de células blásticas e promielócitos circulantes é menor que 10% [10]. A maioria dos pacientes apresenta anemia normocítica. A MO é hiper celular com relação mielóide: eritróide aumentada, na maioria das vezes com basofilia e eosinofilia [87].

Na Fase acelerada podem surgir sintomas constitucionais (suor noturno, perda de peso, prurido). Com o passar do tempo, as células leucêmicas adquirem defeitos adicionais considerados responsáveis pela transição para fase acelerada e Crise blástica. De fato, a resistência a terapia é geralmente a primeira manifestação da fase acelerada [88]. De acordo com os critérios da OMS o diagnóstico de Fase

Acelerada é feita a partir dos seguintes parâmetros: 10-19% de mieloblastos no SP (sangue periférico) ou MO, >20% de basófilos, trombocitopenia persistente (<100.000/uL), trombocitose persistente (>100.000/uL), aumento de leucócitos e do tamanho do baço não responsivos ao tratamento e ainda, surgimento de anormalidades cromossômicas adicionais, como citado anteriormente – trissomia do 8, isocromossomo 17q e aparecimento de Ph adicional [86, 89].

O diagnóstico de Crise Blástica é feito com base em uma contagem de células blásticas >20% no sangue periférico (SP) ou MO, bem como em presença de proliferação extra-medular de células blásticas [83].

Na ausência de tratamento específico, o paciente pode permanecer na Fase Crônica por 2 a 5 anos, a fase Acelerada dura em torno de um ano e a média de sobrevida após entrar em Crise Blástica é de 3 a 6 meses [82].

O único tratamento curativo é o Transplante de Medula Óssea (TMO), todas as outras formas de terapia são não curativas, embora algumas delas como mesilato de imatinibe – inibidor da tirosina quinase – possa resultar em remissão citogenética prolongada [90, 91].

Dez anos atrás, a LMC era geralmente fatal para maioria dos pacientes dentro de 5 anos, sendo curável em casos de TMO bem sucedido. Atualmente, esta patologia pode ser controlada com o uso de terapias orais, as quais podem aliviar e estabilizar a doença por anos. Este progresso tornou-se possível através de descoberta de terapias alvo com foco na patogênese molecular conhecida [82].

2.3.1.4 Leucemia Linfóide Crônica (LLC)

A Leucemia Linfóide Crônica (LLC) é predominantemente uma doença de indivíduos mais velhos, na qual a maioria dos pacientes apresenta mais de 50 anos ao diagnóstico. Além disso, a doença frequentemente tem uma progressão lenta [92].

Agregados linfóides benignos podem ocorrer na MO em uma variedade de condições reativas e também são mais provavelmente encontrados em indivíduos mais velhos [93]. Condições associadas com presença de agregados linfóides benignos incluem doenças auto-imunes e infecções por HIV, bem como neoplasias

mielóides, tais como SMD e doenças mieloproliferativas. Nestes casos, o excesso de agregados de célula B ou aberrações fenotípicas tais como co-expressão anormal de CD5 ou CD43 em células B, auxilia na confirmação de população linfóide neoplásica [5].

O sintoma mais comum presente na LLC é o aumento dos linfonodos, enquanto que número menor de pacientes relata sintomas como febre, perda de peso e sudorese noturna e 25% dos pacientes são assintomáticos. Dentre os achados físicos mais comuns estão linfadenopatia (87%), esplenomegalia (54%), e hepatomegalia (14%). A maioria dos pacientes assintomáticos são identificados com base na presença de linfocitose absoluta em hemograma de rotina [10, 94].

Dentre os critérios diagnósticos para LLC estão a linfocitose no SP com duração superior a 2 meses, MO com celularidade normal ou aumentada com linfocitose >30%, população de linfócitos B positivos, os quais demonstram monoclonalidade pela presença de um único tipo de cadeia leve de imunoglobulina, Kappa ou Lambda, bem como positividade para os marcadores CD5, CD19, CD23, CD20, CD21 e CD24. Expressão de CD38 e proteína zeta associada (ZAP-70) são achados imunofenotípicos de importância prognóstica [92, 94].

Também é possível obter informação prognóstica adicional pela pesquisa citogenética de anormalidades cromossômicas, tais como del[17p], del[11q22-23], del[13q14] e trissomia do 12 [94].

Doenças importantes a serem excluídas são Leucemia/Linfoma de Células do Manto, Tricoleucemia e Leucemia pro-linfocítica. Leucemia/linfoma de Células do Manto são distinguidas da LLC pela negatividade de CD23 e presença de t(11;14). Tricoleucemia e Leucemia pro-linfocítica são morfologicamente diferentes da LLC e sem expressão de CD5 [94].

Há quase trinta anos, os sistemas de estadiamento clínico desenvolvidos por Rai e Binet estratificaram os portadores de LLC em três grupos de risco: baixo (Rai 0, Binet A), intermediário (Rai I/II, Binet B) e alto (Rai III/IV, Binet C), apresentando uma mediana de sobrevida estimada em >10 anos, 5 a 7 anos e 1 a 3 anos, respectivamente.

O sistema proposto por Ray inclui presença de linfadenopatia, esplenomegalia, anemia e trombocitopenia como marcadores de progressão da doença, em estágios de 0 a 4 [95]; já o Sistema proposto por Binet fundamenta-se no número de áreas de envolvimento linfóides e a presença de anemia ou

trombocitopenia em estágios que vão de A a C [96]. Entretanto, ainda que tenham sido um bom parâmetro para decisão terapêutica na prática médica, nenhum destes sistemas é capaz de aferir precisamente o prognóstico de um paciente com LLC. Esta limitação inerente aos sistemas de estadiamento clínico deu início a uma busca por marcadores clínicos e biológicos que aprimorassem a predição evolutiva dos portadores de LLC.

Vários marcadores biológicos são associados com a forma mais agressiva da LLC. Estes incluem rápida duplicação da linfocitose, achados citogenéticos, Beta-2-microglobulina e Timidina quinase séricas alteradas, expressão de CD38 e ZAP70 [97-100]. O limiar para considerar como CD38 positivo é a expressão deste em mais de 30% das células pela citometria de fluxo. Esta positividade foi associada por alguns com sobrevida significativamente mais curta [100].

A ausência de mutações de imunoglobulina de cadeia pesada (IgVH), também está associada com alto risco para progressão precoce da doença [99]. Porém o teste para detecção de mutações IgVH não está amplamente disponível.

A expressão da molécula de sinalização intracelular ZAP70 é altamente preditiva de pacientes com progressão mais rápida da doença e morte. Triagens prospectivas estão sendo feitas para determinar se o tratamento mais agressivo de pacientes com LLC ZAP70+ poderia melhorar os resultados clínicos [101]. A determinação da expressão de ZAP70 por citometria de fluxo intracelular é de difícil interpretação e reprodutibilidade, portanto a análise de ZAP70 permanece como ferramenta diagnóstica de uso clínico incerto [94].

Várias mudanças citogenéticas são associadas com pior sobrevida. A característica mais desfavorável é a deleção do 17p, a qual está presente em 7% dos pacientes. Deleção 11q está associada com risco intermediário [102]. Mudanças citogenéticas associadas com prognóstico favorável incluem deleção 13q14, presente em aproximadamente metade dos pacientes e trissomia do 12, presente em 16% dos pacientes [94]. O desenvolvimento da deleção 17p é associado com anormalidades no gen supressor de tumor p53 e ocorre provavelmente como uma evolução clonal após o diagnóstico inicial [103].

O diagnóstico da LLC geralmente pode ser feito sem dificuldade a partir das características do sangue periférico e da imunofenotipagem. Por isso, o aspirado de medula não é essencial particularmente em pacientes mais velhos, nos quais o

tratamento pode nunca tornar-se necessário. A biópsia é indicada se for o caso, antes de iniciar o tratamento [3].

2.3.2 Suspeita De Mieloma Múltiplo (MM)

O Mieloma múltiplo (MM) é caracterizado pela infiltração (acima de 10%) de plasmócitos malignos na MO (Figura 4), demonstração de fenótipos anormais e/ou clonalidade, associados à presença de paraproteína no soro ou urina, lesões ósseas osteolíticas, além de características clínicas como doença renal e imunodeficiência [38, 104, 105].

Dosagem de paraproteína aumentada, muitas vezes descoberta acidentalmente, durante investigação de anemia ou outros sintomas, freqüentemente leva ao EMO [5].

Geralmente plasmócitos são raros na MO normal, porém seus níveis podem aumentar em desordens reativas, tais como infecções e doenças auto-imunes, as quais também podem ter paraproteínas associadas [106]. O padrão plasmocitário é útil nestas situações, pois os plasmócitos em condições reativas normalmente ocorrem em torno de vasos sanguíneos e em pequenos agrupamentos e não em grandes agregados ou longe da estrutura vascular [107].

O *International Myeloma Working Group* estabeleceu critérios para distinguir MM assintomático (sem necessidade de tratamento imediato) da doença ativa, quando o tratamento é essencial. Os principais indicadores para tratamento são sinais de dano em órgãos tais como insuficiência renal, anemia, hipercalcemia e lesões ósseas [108].

O compartimento não celular da MO é composto por fluído e proteínas da matriz extracelular. A adesão de células do mieloma múltiplo a proteínas da matriz extracelular – colágeno, fibronectina, laminina – desencadeia sobrevivência celular e resistência a drogas [109]. No compartimento celular da MO, as células do MM interagem com células hematopoéticas e não hematopoéticas, o que causa supressão imune e lesões líticas [104].

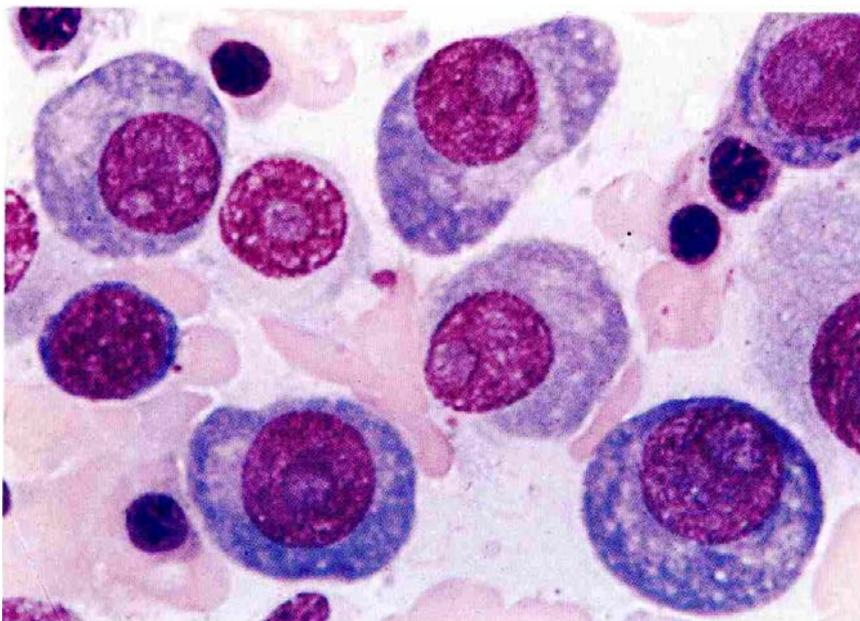


Figura 4: Nucléolos evidentes no núcleo de plasmoblastos em Mieloma Múltiplo.

Fonte: McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. Atlas of haematology. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 1988. [65]

O microambiente medular da MO é afetado por osso cortical funcionalmente diferenciado. As lesões ósseas osteolíticas e osteoporose estão associadas com dor óssea e fraturas. Estas complicações são causadas pela formação e atividade osteoclástica aumentadas e diminuição do número de osteoblastos [110].

Alguns pacientes apresentam níveis anormalmente elevados de proteínas no sangue ou na urina, sem demonstrar nenhum outro sintoma. Nestes casos o nível de paraproteína em geral não ultrapassa 3,0 g/dL de proteína M sérica, presença de menos de 10% de plasmócitos na medula óssea e ausência de lesões de órgão alvo. Essa condição é chamada de Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI). Os pacientes com GMSI podem desenvolver mieloma múltiplo, mas a GMSI por si só não é prejudicial e não requer tratamento, somente visitas periódicas ao médico [111, 112].

Estudos oncogenômicos mostram que existem poucas diferenças entre GMSI e MM, o que reforça o papel essencial do microambiente da medula óssea no desenvolvimento, manutenção e progressão do MM [111].

No estudo de Elis et al. (2006) cujo objetivo foi avaliar a necessidade de exame de medula óssea (EMO) em pacientes com MGSI, foram analisados 57 pacientes assintomáticos, sem lesões ósseas, que apresentavam níveis séricos anormais de proteína monoclonal. O EMO foi executado em 30 destes 57 pacientes: onde, 18 foram normais, 8 apresentaram excesso de plasmócitos morfológicamente

normais e 6 apresentaram excesso de plasmócitos com atipias morfológicas. No entanto, em apenas 2 destes 6 pacientes foi estabelecido diagnóstico de MM. Este grupo foi acompanhado por um período de 22 meses e somente 2 desenvolveram a doença. Segundo os autores, estes achados sugerem que o EMO não deve ser executado rotineiramente em pacientes com características clínicas e laboratoriais de MGSI [112].

No estudo de Ocqueteau et al. (1998), com objetivo de avaliar se os plasmócitos no MGUs e no MM são fenotipicamente diferentes, foram analisados e comparados por Citometria de fluxo 76 pacientes com MGSI, 65 pacientes com MM e 10 pacientes controles. Observou-se que no MGSI há claramente duas populações distintas de plasmócitos: população A (33%): CD19⁺ e CD56⁻. População B (67%): CD56 fortemente positivo e CD19⁻. Estudos de clonalidade confirmam a natureza clonal da população B e a origem policlonal da população A. Embora a presença de plasmócitos policlonais residuais seja um achado constante no MGUs, é um evento raro no MM. Somente 1,5% dos pacientes com MM tem mais de 3% de plasmócitos normais, enquanto 98% dos pacientes com MGSI tem mais de 3% de plasmócitos normais. Portanto, o número de plasmócitos policlonais residuais é um poderoso parâmetro para diagnóstico diferencial de MGSI e MM [51].

2.3.3 Suspeita de Síndrome Mielodisplásica (SMD)

O termo Síndrome Mielodisplásica, é usado para descrever um grupo heterogêneo de desordens que são caracterizadas por hematopoese desordenada e não efetiva, displasia morfológica, citopenias periféricas e falha progressiva da medula óssea. A SMD transforma-se em LMA em aproximadamente 30% dos casos [113].

Os pacientes sofrem de morbidades associadas às citopenias que resultam em risco de infecção aumentado, anemia dependente de transfusão e sangramentos. Organomegalia e linfadenopatia são menos comuns [114].

Os achados típicos e que refletem a apoptose intramedular são a hiperplasticidade da medula com displasia uni ou multilinhagem levando a pancitopenia periférica. Hipocelularidade da MO é incomum, podendo ser

conseqüência de SMD devido a tratamento quimioterápico e deve ser diferenciada de anemia aplástica [115].

A morfologia da série vermelha é frequentemente normocítica ou macrocítica. Achados periféricos tais como macroovalócitos, eliptócitos, dacriócitos estomatócitos ou acantócitos são comuns e representam anormalidades nas proteínas do citoesqueleto das hemáceas. Leucopenia está presente em 50% dos pacientes. A morfologia dos granulócitos frequentemente mostra segmentação reduzida (anormalidade pseudo Pelger-Huet), também podem apresentar granulação reduzida ou ausente. Apesar da trombocitopenia, os megacariócitos estão em número normal ou aumentado podendo apresentar anormalidade morfológica [7]. “Micromegacariócitos”, apesar de não específicos, são sugestivos de mielodisplasia [1].

O grupo FAB (French-American-British) propôs uma classificação das SMDs, a qual foi publicada em 1976 e revisada em 1982 e compreende cinco grupos (

Tabela 1).

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS), propôs uma revisão da classificação morfológica da FAB. Esta revisão incluiu uma diminuição no percentual de blastos requerido para fazer diagnóstico de LMA de 30% para 20%, causando a eliminação da subcategoria de Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t). Além disso, a Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) foi reclassificada de subcategoria de SMD para subcategoria de desordem mielodisplásica/mieloproliferativa [37].

A displasia envolvendo precursores de células brancas e megacariócitos foi base para uma nova categoria denominada: Citopenia refratária com displasia multilinhagem sem sideroblastos em anel (CRDM) ou com sideroblastos em anel (CRDM-SA). Pacientes desta categoria tem mudanças patológicas não restritas às células vermelhas com pelo menos 10% de displasia em duas ou mais linhagens e menos de 5 % de blastos na medula óssea [114].

Houve uma divisão da Anemia refratária com excesso de blastos em AREB-1 E AREB-2. Houve também um acréscimo de duas novas categorias: a Síndrome mielodisplásica inclassificável e Síndrome Mielodisplásica com deleção 5q isolada [54].

Tabela 1: Classificação da FAB para SMD.

Classificação	Sangue periférico	Medula óssea
Anemia refratária (AR)	citopenias e < 1% de blastos	blastos < 5% celularidade variável atipias diversas
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	anemia blastos < 1%	blastos < 5% sideroblastos em anel > 15%
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	pancitopenia blastos < 5%	blastos 5-20% hipercelular com atipias nas 3 séries
Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t)	pancitopenia blastos > 5%	blastos 21-30% bastonetes de Auer
Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)	blastos < 5% monócitos > 1.000/uL	blastos < 20%

Fonte: Zago MA. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu 2001 [10].

A média de sobrevida após o diagnóstico de SMD varia de poucos meses a mais de 10 anos, este prognóstico variável reafirma a importância do sistema de classificação pra prever a resposta ao tratamento e os resultados clínicos para cada paciente individualmente.

Mufti et al. (2008) descreve em seu estudo uma revisão e redefinição dos critérios morfológicos para classificação de SMD baseado no *International Working Group on Morphology of SMD (IWGM-MDS)*, onde ficaram estabelecidas como recomendações: (i) definição clara de blastos granulares e agranulares; (ii) promielócitos displásicos diferenciados de promielócitos citologicamente normais e de células blásticas granulares; (iii) contagem de número suficiente de células para dar percentual preciso de blastos; (iv) sideroblastos em anel definidos como sendo eritroblastos nos quais exista no mínimo 5 grânulos sideróticos cobrindo pelo menos um terço da circunferência do núcleo [113].

Quando realizada a contagem diferencial na medula, a porcentagem de mieloblastos deve ser determinada pela contagem de pelo menos 500 células nucleadas, considerando que contagem de número adequado de células é de importância crítica para classificação de pacientes cuja contagem de blastos fica próxima do limite entre categorias de SMD de diferente significado prognóstico [75].

As anomalias cromossômicas em SMD são clonais, não ocorrem ao acaso e constituem-se, em geral, na perda de material genético, o que sugere a inativação de genes supressores tumorais necessários para o desenvolvimento de células

mielóides normais. As mais freqüentes na SMD, envolvem os cromossomos: 5, 7, 8, 11, 13, 17, 20, 21 e X [116].

Aconselha-se que o cariótipo seja repetido periodicamente, pois cerca de 30% dos pacientes desenvolvem alterações adicionais com o passar do tempo e 12% dos casos, de início, com cariótipo normal adquirem anomalias subseqüentes, e em conseqüência, demonstram prognóstico desfavorável comparados com aqueles que permanecem com o cariótipo imutável [117].

A avaliação da MO para alterações displásicas permanece como padrão ouro para diagnóstico de SMD. No entanto, características morfológicas similares podem ser vistas em deficiência nutricional (vitamina B₁₂ ou Folato), infecção, exposição tóxica, medicações e alguns fenômenos imunes mediados [1, 54].

2.3.4 Investigação de Anemia

Níveis baixos de hemoglobina e hematócrito justificam cuidadosa avaliação, incluindo índices hematimétricos, análise das distenções do sangue periférico, contagem de reticulócitos, níveis séricos de bilirrubina, ferro, vitamina B₁₂ e folato, e em casos de anemia refratária ou inexplicada, exame de MO e dosagem de níveis de eritropoetina [118].

O EMO é necessário conforme o grau e duração da anemia e como descrito acima, deve incluir o conhecimento do resultado do hemograma e da análise da distensão do sangue periférico, bem como, geralmente o hematologista já deve ter excluído anemia por deficiência de ferro, folato e vitamina B₁₂ e possíveis efeitos de drogas e/ou infecções [5].

A importância do aspirado de medula óssea na investigação da anemia microcítica não é bem reconhecido. Contudo, falso diagnóstico de anemia de doença crônica como sendo deficiência de ferro não é infrequente em pacientes que estão sendo submetidos a algum tipo de perda sanguínea crônica. Se os resultados dos testes bioquímicos forem duvidosos pode ser importante realizar o EMO [3].

Tipicamente, em muitos casos de anemia não esclarecida a suspeita é de SMD. O que torna importante o diagnóstico de exclusão, pois displasias morfológicas típicas de SMD podem ser vistas em uma série de condições reativas:

efeito de álcool, drogas ou toxinas, deficiências carenciais (vit. B₁₂, folato) bem como hemoglobinopatias [119]. Ao contrário da SMD que exibe uma desorganização da estrutura da hematopoese, os processos reativos da medula tipicamente mantêm uma segregação das ilhotas eritróides e mielóides [5].

Além da SMD, outras neoplasias apresentam-se com anemia, como Linfoma e Mieloma Múltiplo. A Tricoleucemia deve ser considerada, pois o padrão de infiltração intersticial pode ser súbito nos estágios precoces da doença e as “Hairy Cells” podem ser raras no sangue periférico e no aspirado. A imunohistoquímica com CD20 e DBA44 é muito útil nestas situações [119].

Envolvimento por Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN) pode apresentar-se com anemia progressiva, a qual pode ser excluída com imunofenotipagem do sangue periférico para CD 55 e CD 59 [5].

2.3.4.1 Anemia Megaloblástica

Não é incomum um aspirado de medula ser executado na suspeita de anemia megaloblástica. No entanto é aceitável excluir esse exame se as características do sangue periférico forem totalmente típicas e se as dosagens de vitamina B₁₂ e ácido fólico forem sugestivas do estado de deficiência. Por outro lado, o aspirado de medula é ainda indicado se o diagnóstico não estiver claro e se o paciente necessitar de tratamento urgente [3].

Um estudo realizado na Índia avaliou todos os pacientes com suspeita de Anemia Megaloblástica (HB<10 e VCM>95) presentes em um hospital pelo período de seis meses. A anemia megaloblástica foi detectada em 175 pacientes. Verificou-se que a patologia pôde ser diagnosticada por completo pela contagem sanguínea, índices hematimétricos, exame da distensão do sangue periférico, dosagens da vitamina B₁₂ e do ácido fólico, além da presença de sintomas característicos como fadiga, anorexia, gastrite, palpitações e os sinais da doença como palidez, glossite e icterícia branda. O estudo concluiu que o EMO não foi essencial para o diagnóstico [120].

2.3.5 Investigação de Trombocitopenia

Como principais causas de plaquetopenia estão: Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI), Púrpura do recém-nascido, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Leucemia e Doenças infecciosas (Toxoplasmose, Vírus Epstein Barr, Citomegalovirus, Rubéola, Hepatites e HIV). Como causas menos freqüentes estão: as plaquetopenias por aumento de destruição: por drogas, pós-transfusional, hipertireoidismo, anemia hemolítica-microangiopática, Síndrome hemolítico-urêmica, hiperesplenismo; e as plaquetopenias por defeito na produção: amegacariocitose, Síndrome de Wiscott-Aldrich, Aplasia medular, Osteoporose, Mielofibrose, Neuroblastomas [121].

Trombocitopenia isolada é menos comum como manifestação presente em SMD ou leucemia aguda [122]. O papel do patologista é determinar se número de megacariócitos é normal ou aumentado e excluir mudanças displásicas diagnósticas de SMD [5].

O diagnóstico de PTI deve ser por exclusão das demais causas de trombocitopenia, portanto, é importante lembrar, que várias situações podem ser responsáveis por este quadro: na gravidez, onde as plaquetas diminuem de 10 a 30%; em grandes hemorragias; em muitas doenças virais; em quadros de esplenomegalia; em quadros de coagulação intravascular disseminada (CIVD); em tratamentos de quimioterapia e radioterapia; na Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT); e em doenças da medula como leucemias agudas [10].

A distinção entre PTI e outras causas de consumo de plaquetas tais como, seqüestro esplênico, Coagulação Intravascular disseminada (CIVD) e PTT, não pode ser feito com base somente na medula [5].

A situação inversa, de aumento anormal de plaquetas – Trombocitose reativa – pode ocorrer em deficiência de ferro, infecções ou como um fenômeno paraneoplásico; Os megacariócitos em doenças mieloproliferativas são quase sempre anormais morfológicamente, em contraste com as doenças reativas onde o número de megacariócitos está aumentado, mas sua morfologia é normal [123].

2.3.5.1 Púrpura Trombocitopênica Idiopática

A PTI é uma das desordens hematológicas mais comuns entre pacientes pediátricos e frequentemente com histórico de infecção viral nos meses antecedentes. O exame físico revela petéquias mucocutâneas e hematomas, em áreas não expostas a trauma; porém fígado, baço e linfonodos não estão aumentados. Sangramentos, na maioria das vezes, com manifestações hemorrágicas leves a moderadas, limitadas à pele e mucosas. São mais comuns sangramento de mucosa oral e nasal; hematúria e enterorragia são menos frequentes. O exame físico mostra bom estado geral, afebril, sem dores. A contagem de células sanguíneas é normal, exceto pela trombocitopenia, cuja severidade é variável [124]. Nesta patologia a depuração habitual das plaquetas no fígado e no baço é acelerada quando as plaquetas estão revestidas por auto-anticorpos da classe IgG, os quais se ligam a receptores Fc expressos em macrófagos teciduais, tratando-se, portanto, de uma doença auto-imune, na qual as plaquetas são destruídas por anticorpos contra suas glicoproteínas de membrana [125]. Como consequência, na maioria dos indivíduos produz-se um aumento compensatório na produção de plaquetas na medula óssea, ao passo que, em outros, a produção diminui por destruição intramedular das plaquetas por macrófagos, podendo haver anticorpos diretos contra megacariócitos, resultando em diminuição ou ausência de megacariócitos na medula [125, 126].

Baseado nas características clínicas e laboratoriais e quando não há outras características atípicas do quadro de PTI, o diagnóstico pode ser feito sem necessidade de procedimentos invasivos. Na prática, no entanto, existe uma forte tradição de confirmar o diagnóstico clínico pelo EMO. Este, caracteristicamente mostra celularidade normal, com número de megacariócitos normal ou aumentado e maturação normal das linhagens mielóide e eritróide [127].

Em crianças, a *American Society of Haematology* (ASH), sugere que a aspiração da medula em geral não é necessária na suspeita de PTI. O *British Paediatric Haematology Group* recomenda o EMO para casos em que não houve remissão da doença após duas ou três semanas de tratamento. Em adultos com trombocitopenia crônica severa ou moderada, a investigação é indicada para

estabelecer um diagnóstico, mesmo quando o tratamento imediato parece não ser necessário [3].

Ahmad et al. (2007) realizou um estudo, cujo objetivo foi determinar a necessidade do EMO em crianças com PTI em apresentação inicial. Neste estudo foram incluídas todas as crianças internadas na unidade pediátrica do Children Hospital em Islamabad de janeiro de 1999 a Dezembro de 2003, com suspeita de PTI e solicitação de Medulograma. Como resultado, 52 pacientes tiveram diagnóstico final de PTI, um paciente com hipoplasia megacariocítica e um paciente com Anemia Aplástica. Concluiu-se que o exame de medula óssea não deve ser parte da rotina elaborada para diagnóstico de PTI em crianças e deve ser reservado para aquelas crianças que tem características clínicas e laboratoriais atípicas [128].

Conforme Halperin (1988), o aspirado de medula óssea pode ser limitado seguramente àqueles pacientes com características atípicas de PTI ou como exame preliminar nos pacientes que vão iniciar terapia com esteróides. Em seu estudo onde foram revisados prontuários de 127 crianças com PTI presumida e encontrou-se que o exame de medula óssea levou a diagnóstico diferente em apenas 5 deles (3.9%). Interessantemente, estes 5 pacientes apresentaram-se com características clínicas e laboratoriais atípicas de PTI aguda [127].

As razões mais fortes para os patologistas executarem rotineiramente o EMO em pacientes com esta suspeita são exclusão de leucemia e exclusão de anemia aplástica (AA). Contudo, McIntosh (1982) observou que trombocitopenia isolada não é uma característica presente na leucemia aguda [129]. Similarmente, Halperin (1988), demonstrou que a trombocitopenia não é um achado isolado na Anemia aplástica, pois de 50 pacientes com AA estudados, 98% tinham pelo menos uma anormalidade adicional na contagem completa de células sanguíneas [127].

2.3.6 Investigação de Pancitopenia

Segundo Kumar (2001) na investigação de pancitopenia, o aspirado de medula freqüentemente não obtém uma amostra adequada, enquanto que a biópsia é usualmente diagnóstica, logo, aspirado e biópsia devem ser executados simultaneamente em pacientes pancitopênicos. Neste estudo, onde foram

analisados todos os casos de pancitopenia vistos no período de 6 anos em 2 centros, obteve-se total de 166 casos, sendo que as 4 maiores causas de pancitopenia foram: anemia aplástica (49 casos), anemia megaloblástica (37 casos), leucemia aleucêmica ou linfoma (30 casos) e hiperesplenismo (19 casos) [130].

Pode ser difícil distinguir entre Anemia Aplástica (AA) e SMD-hipoplásica (SMD-h) devido a semelhanças clínicas, citológicas e histológicas entre estas duas desordens.

Alguns trabalhos mostram que o Fator de Necrose Tumoral – Alfa (TNF- α) exerce um papel importante no desenvolvimento da AA. Kasahara et al. (2002) investigou a análise da expressão do receptor de TNF (TNFR) como ferramenta para diferenciar AA de SMD-h. A análise por Citometria de Fluxo revelou que as *Stem Cells* (CD34⁺) da MO de pacientes com AA possuem uma expressão marcadamente maior de TNFR do que pacientes com SMD-h, propondo assim o uso da quantificação da expressão de TNFR em *Stem Cell* na MO como método para diferenciar as duas patologias [131].

Infecções virais, dentre as quais se destaca o HIV, podem levar a pancitopenia [118].

Lúpus Eritematoso Sistêmico e outras doenças auto-imunes podem causar pancitopenia marcada. Mudanças histológicas na medula incluem atrofia serosa/transformação gelatinosa, graus variados de fibrose reticulínica, linfocitose, plasmocitose e displasia morfológica [106].

2.3.6.1 Aplasia Medular

As Síndromes/Anemias Aplásticas são um grupo diverso de desordens caracterizadas pela inabilidade da medula óssea de produzir um número adequado de células sanguíneas. A maioria dos casos (~70%) é categorizada como Idiopáticos, onde a etiologia primária é desconhecida. Em aproximadamente 15-20% dos casos a doença é herdada, por exemplo, na Disqueratose congênita (DC), na Anemia de Fanconi (AF) e na Síndrome Shwachman-Diamond (SDS). De 10 a 15% destas patologias são secundárias a radiação, drogas, vírus ou doenças auto-imunes [132, 133].

Na AF os indivíduos afetados podem ter uma ou mais anormalidades somáticas incluindo dermatológicas, esqueléticas, genitourinárias, gastrointestinais, cardíacas e anormalidades neurológicas [134]. Existe uma considerável heterogeneidade genética na AF com 13 subtipos atualmente conhecidos e os respectivos genes responsáveis por estes subtipos devidamente identificados [135].

A DC é uma síndrome caracterizada pela tríade de pigmentação anormal da pele, distrofia ungueal e leucoplasia de mucosas [136]. Os subtipos de DC reconhecidos são recessivo ligado ao X, autossômico dominante e autossômico recessivo, sendo as principais causas de morte a imunodeficiência e complicações pulmonares [132].

A SDS é reconhecida como uma desordem autossômica recessiva caracterizada por insuficiência pancreática exócrina, falha na medula óssea e outras anormalidades somáticas. A insuficiência pancreática aparece precocemente na infância, outras características clínicas comuns são baixa estatura, abdômen protuberante e erupção cutânea [137].

2.3.6.2 Infecção pelo HIV

Mesmo na ausência de outros processos patológicos a morfologia da MO é invariavelmente anormal, onde anemia, neutropenia e trombocitopenia são todas comuns durante o curso da doença. A etiologia destas citopenias é frequentemente multifatorial e pode incluir: os efeitos diretos do HIV-1; efeitos mediados por produtos genéticos virais; malignidades e infecções oportunitas; ou terapias normalmente utilizadas para tratamento do HIV [118].

A depleção progressiva dos linfócitos T CD4⁺ é a marca do avanço da doença e eventualmente leva à profunda imunossupressão. A lise celular direta induzida pelo vírus ocorre através da fusão celular de CD4-gp120, resultando na morte celular. Apesar das células B não serem diretamente infectadas pelo HIV-1, é interessante notar que ativação policlonal pode ser induzida *in vitro* pela exposição das células B a proteína do envelope gp41 [138]. Os mecanismos propostos para neutropenia, incluem o efeito do HIV nas células progenitoras mielóides e desregulação do microambiente medular. Além disso, os níveis de G-CSF estão

diminuídos em pacientes infectados com HIV quando comparados com controles saudáveis [118].

Dentre as causas mais comuns de anemia nos HIV positivos, está a infecção micobacteriana. Infecção por Parvovírus B19 também provoca efeito marcado na eritropoese. Anemia por deficiência de ferro pode resultar da perda crônica de sangue e sangramento gastrointestinal devido a infecções parasitárias. A enteropatia no HIV, infecções intestinais bacterianas ou virais podem alterar a absorção de nutrientes levando a prejuízos na absorção de vitamina B12 e folato. Alguns agentes terapêuticos (como o AZT) podem afetar especificamente a eritropoese [118].

A destruição imune-mediada das plaquetas é a causa comum de trombocitopenia. Anticorpos específicos contra as plaquetas são direcionados à glicoproteínas gpIIb ou gpIIIa, indicando a mesma forma de seqüestro de plaquetas da PTI. Interessantemente, há também evidências de que glicoproteínas do envelope do HIV, gp160/120 dividem epítomos com gpIIa/IIIb das plaquetas: anticorpos reativos cruzados contra gp160/120 podem contribuir pra destruição imune das plaquetas [139].

2.3.7 Doenças Menos Comuns

2.3.7.1 Mielofibrose Primária (MFP)

São critérios maiores para diagnóstico de MFP: (i) Proliferação e atipia megacariocítica geralmente acompanhada por fibrose reticulínica ou colágena; (ii) Ausência dos critérios para PV, LMC BCR-ABL1⁺ e SMD; (iii) presença de mutação JACK2 V617F ou outro marcador clonal, ou ainda na ausência de marcador clonal sem evidência de fibrose secundária a infecção, doença auto-imune (DAI) ou outra condição inflamatória crônica [140]. Como critérios menores estão: (i) Leucoeritroblastose; (ii) Lactado desidrogenase (LDH) sérica aumentada; (iii) Anemia; (iv) Esplenomegalia palpável [141].

Para diagnóstico de MFP é necessário presença dos 3 critérios maiores somado a 2 critérios menores.

2.3.7.2 Policitemia Vera (PV)

São critérios maiores para diagnóstico de PV: (i) Hemoglobina sérica acima de 18.5 g/dL para homens e acima de 16.5 g/dL pra mulheres; (ii) presença de mutação JAK2 V617F [141]. São critérios menores para diagnóstico de PV: (i) Biópsia com hiperplasticidade (panmielose); (ii) Eritropoetina sérica baixa; (iii) formação de colônia eritróide endógena *in vitro* [123].

Para diagnóstico de PV é necessário presença de 2 critérios maiores somado a 1 critério menor ou presença do primeiro critério maior somado a 2 critérios menores.

2.3.7.3 Trombocitemia Essencial (TE)

São critérios maiores para diagnóstico de TE: (i) Contagem de plaquetas maior ou igual a 450 mil/ μ L; (ii) Biópsia com proliferação da série megacariocítica com megacariócitos maduros e maiores, sem aumento significativo das séries granulocítica e eritróide; (iii) ausência dos critérios para PV, MFP, SMD ou LMC BCR-ABL1⁺; (iv) Presença de mutação JAK2 V617F ou outro marcador clonal, ou na ausência deste, sem evidência de trombocitose reativa [141, 142].

O diagnóstico de TE requer o encontro dos 4 critérios maiores.

2.3.7.4 Amiloidose Sistêmica

Amiloidose sistêmica primária é uma doença dos plasmócitos, com produção e depósito extracelular de proteína amilóide, principalmente em rins e coração, podendo ocorrer também no fígado, medula óssea e língua. Associa-se ao MM em 10-20% dos casos. As manifestações clínicas são devidas à deposição de proteína amilóide nos diversos órgãos e sistemas, levando à hepatomegalia, neuropatia periférica, síndrome do túnel do carpo, macroglossia e disfunção cardíaca e renal.

Na pele, ocorrem pápulas ou placas, alopecia, oncodistrofia, equimoses e sangramento fácil, por infiltração amilóide dos capilares cutâneos. O diagnóstico é clínico e histopatológico. A amiloidose sistêmica primária apresenta evolução muito variável, tendo prognóstico geralmente muito ruim, principalmente quando associada ao MM. O tratamento é pouco satisfatório, com poliquimioterapia. O óbito ocorre por insuficiência cardíaca e renal [143].

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as principais indicações para o Exame de Medula Óssea no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e as patologias mais comumente encontradas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Determinar a frequência do diagnóstico de doenças hematológicas primárias através do exame de medula óssea.
- ii. Especificar quais são as patologias mais comumente diagnosticadas pelo exame de medula óssea.
- iii. Verificar o acerto nas indicações do exame de medula óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hoffman R. Hematology : basic principles and practice. 4th ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone 2005.
- [2] Beutler E, Williams WJ. Williams hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division 2001.
- [3] Bain BJ. Bone marrow aspiration. Journal of clinical pathology. 2001 Sep;54(9):657-63.
- [4] Grindem CB, Neel JA, Juopperi TA. Cytology of bone marrow. The Veterinary clinics of North America. 2002 Nov;32(6):1313-74, vi.
- [5] Hasserjian RP. Reactive versus neoplastic bone marrow: problems and pitfalls. Archives of pathology & laboratory medicine. 2008 Apr;132(4):587-94.
- [6] Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. International journal of laboratory hematology. 2008 Oct;30(5):349-64.
- [7] Hyun BH. Bone marrow examination: adventures in diagnostic hematology. Yonsei medical journal. 1986;27(2):100-5.
- [8] Trehwitt KG. Bone marrow aspiration and biopsy: collection and interpretation. Oncology nursing forum. 2001 Oct;28(9):1409-15; quiz 16-7.
- [9] Wintrobe MM, Lee GR. Wintrobe's clinical hematology. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1993.
- [10] Zago MA. Hematologia : fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu 2001.
- [11] Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. Blood. 1994 Sep 15;84(6):1737-46.
- [12] Gregory AD, Hogue LA, Ferkol TW, Link DC. Regulation of systemic and local neutrophil responses by G-CSF during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. Blood. 2007 Apr 15;109(8):3235-43.
- [13] Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood. 2008 Aug 15;112(4):935-45.
- [14] Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. Journal of leukocyte biology. 2005 May;77(5):598-625.
- [15] Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood. 2008 Aug 1;112(3):470-8.
- [16] Lee SH, Crocker PR, Westaby S, Key N, Mason DY, Gordon S, et al. Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. The Journal of experimental medicine. 1988 Sep 1;168(3):1193-8.
- [17] Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, Tsukahara S, Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science. 2003 Apr;65(4):449-52.
- [18] Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. Blood. 1994 Nov 15;84(10):3494-504.

- [19] Soni S, Bala S, Kumar A, Hanspal M. Changing pattern of the subcellular distribution of erythroblast macrophage protein (Emp) during macrophage differentiation. *Blood cells, molecules & diseases*. 2007 Jan-Feb;38(1):25-31.
- [20] Fabriek BO, Polfliet MM, Vloet RP, van der Schors RC, Ligtenberg AJ, Weaver LK, et al. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5223-9.
- [21] Leimberg MJ, Prus E, Konijn AM, Fibach E. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *Journal of cellular biochemistry*. 2008 Mar 1;103(4):1211-8.
- [22] Iavarone A, King ER, Dai XM, Leone G, Stanley ER, Lasorella A. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature*. 2004 Dec 23;432(7020):1040-5.
- [23] Farhi DC. *Pathology of bone marrow and blood cells*. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott William & Wilkins 2009.
- [24] LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1570-80.
- [25] Nutt SL, Kee BL. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):715-25.
- [26] Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews*. 2005 Mar;5(3):230-42.
- [27] Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1557-69.
- [28] La Cava A. Natural Tregs and autoimmunity. *Front Biosci*. 2009;14:333-43.
- [29] Bain BJ, Bain BJ. *Bone marrow pathology*. 3rd ed. Oxford ; Malden, MA: Blackwell Science 2001.
- [30] McFadden S, Briggs C, Davis B, Jou J, Machin S. The reformed International Council for Standardization in Hematology (ICSH). *International journal of laboratory hematology*. 2008 Apr;30(2):89-90.
- [31] Lewis SM, Bain BJ, Bates I, Dacie JVS. *Dacie and Lewis practical haematology*. 10th ed. ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone 2006.
- [32] Stuart-Smith SE, Hughes DA, Bain BJ. Are routine iron stains on bone marrow trephine biopsy specimens necessary? *Journal of clinical pathology*. 2005 Mar;58(3):269-72.
- [33] Foucar K. *Bone marrow pathology*. 2nd ed. Chicago: ASCP Press 2001.
- [34] Brown D, Gatter K. *Bone marrow diagnosis : an illustrated guide*. 2nd ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub. 2006.
- [35] Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005 Aug;90(8):1128-32.
- [36] Orazi A, O'Malley DP, Arber DA. *Illustrated pathology of the bone marrow*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press 2006.
- [37] Jaffe ES, World Health Organization. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon Oxford: IARC Press ; Oxford University Press (distributor) 2001.
- [38] Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):3941-67.
- [39] Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematology neoplasia: medical indications. *Cytometry*. 2007;72 Suppl 1:S5-13.

- [40] Kroft SH. Monoclones, monotypes, and neoplasia pitfalls in lymphoma diagnosis. *American journal of clinical pathology*. 2004 Apr;121(4):457-9.
- [41] Li S, Eshleman JR, Borowitz MJ. Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B-cell lymphoma. *American journal of clinical pathology*. 2002 Aug;118(2):229-34.
- [42] Ray S, Craig FE, Swerdlow SH. Abnormal patterns of antigenic expression in follicular lymphoma: a flow cytometric study. *American journal of clinical pathology*. 2005 Oct;124(4):576-83.
- [43] Asplund SL, McKenna RW, Doolittle JE, Kroft SH. CD5-positive B-cell neoplasms of indeterminate immunophenotype: a clinicopathologic analysis of 26 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Dec;13(4):311-7.
- [44] Meyerson HJ, MacLennan G, Husel W, Cocco A, Tse W, Lazarus HM, et al. D cyclins in CD5+ B-cell lymphoproliferative disorders: cyclin D1 and cyclin D2 identify diagnostic groups and cyclin D1 correlates with ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of clinical pathology*. 2006 Feb;125(2):241-50.
- [45] Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Assessment of CD10 in the diagnosis of small B-cell lymphomas: a multiparameter flow cytometric study. *American journal of clinical pathology*. 2002 Feb;117(2):291-300.
- [46] Cady FM, Morice WG. Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Clinics in laboratory medicine*. 2007 Sep;27(3):513-32, vi.
- [47] Jones D, Dang NH, Duvic M, Washington LT, Huh YO. Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood. *American journal of clinical pathology*. 2001 Jun;115(6):885-92.
- [48] Foucar K. Mature T-cell leukemias including T-prolymphocytic leukemia, adult T-cell leukemia/lymphoma, and Sezary syndrome. *American journal of clinical pathology*. 2007 Apr;127(4):496-510.
- [49] Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *American journal of clinical pathology*. 2004 Apr;121(4):482-8.
- [50] Bataille R, Jigo G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau JL, Moreau P, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006 Sep;91(9):1234-40.
- [51] Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *The American journal of pathology*. 1998 Jun;152(6):1655-65.
- [52] Wood BL. Myeloid malignancies: myelodysplastic syndromes, myeloproliferative disorders, and acute myeloid leukemia. *Clinics in laboratory medicine*. 2007 Sep;27(3):551-75, vii.
- [53] Dunphy CH, Orton SO, Mantell J. Relative contributions of enzyme cytochemistry and flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of acute myeloid leukemias with a monocytic component and of flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of absolute monocytoses. *American journal of clinical pathology*. 2004 Dec;122(6):865-74.
- [54] 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 Jun;31(6):727-36.

[55] Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):464-8.

[56] Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1030-43.

[57] Hjalgrim LL, Westergaard T, Rostgaard K, Schmiegelow K, Melbye M, Hjalgrim H, et al. Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *American journal of epidemiology*. 2003 Oct 15;158(8):724-35.

[58] Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer investigation*. 2005;23(1):60-75.

[59] Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature clinical practice*. 2006 Aug;3(8):448-57.

[60] Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science (New York, NY)*. 2008 Jan 18;319(5861):336-9.

[61] Grabher C, von Boehmer H, Look AT. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):347-59.

[62] Druker BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Advances in cancer research*. 2004;91:1-30.

[63] Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3189-97.

[64] Landau H, Lamanna N. Clinical manifestations and treatment of newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in adults. *Current hematologic malignancy reports*. 2006 Sep;1(3):171-9.

[65] McDonald GA, Paul J, Cruickshank B. *Atlas of haematology*. 5th ed. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 1988.

[66] Heerema-McKenney A, Arber DA. Acute myeloid leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2009 Aug;23(4):633-54.

[67] Shimada A, Taki T, Kubota C, Itou T, Tawa A, Horibe K, et al. N822 mutation of KIT gene was frequent in pediatric acute myeloid leukemia patients with t(8;21) in Japan: a study of the Japanese childhood AML cooperative study group. *Leukemia*. 2007 Oct;21(10):2218-9.

[68] Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, et al. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3768-76.

[69] Kussick SJ, Stirewalt DL, Yi HS, Sheets KM, Pogosova-Agadjanyan E, Braswell S, et al. A distinctive nuclear morphology in acute myeloid leukemia is strongly associated with loss of HLA-DR expression and FLT3 internal tandem duplication. *Leukemia*. 2004 Oct;18(10):1591-8.

[70] Lin P, Hao S, Medeiros LJ, Estey EH, Pierce SA, Wang X, et al. Expression of CD2 in acute promyelocytic leukemia correlates with short form of PML-RARalpha

transcripts and poorer prognosis. *American journal of clinical pathology*. 2004 Mar;121(3):402-7.

[71] Sainty D, Liso V, Cantu-Rajoldi A, Head D, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Group Francais de Cytogenetique Hematologique, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies*. *Blood*. 2000 Aug 15;96(4):1287-96.

[72] Lo-Coco F, Ammatuna E, Montesinos P, Sanz MA. Acute promyelocytic leukemia: recent advances in diagnosis and management. *Seminars in oncology*. 2008 Aug;35(4):401-9.

[73] Paschka P. Core binding factor acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology*. 2008 Aug;35(4):410-7.

[74] Athale UH, Kaste SC, Razzouk BI, Rubnitz JE, Ribeiro RC. Skeletal manifestations of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002 Oct;24(7):561-5.

[75] Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2008.

[76] Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2008 May 1;358(18):1909-18.

[77] Baldus CD, Mrozek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *British journal of haematology*. 2007 Jun;137(5):387-400.

[78] Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology*. 2008:1-11.

[79] Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, Brown P, et al. NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):439-42.

[80] Chen W, Rassidakis GZ, Li J, Routbort M, Jones D, Kantarjian H, et al. High frequency of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia with prominent nuclear invaginations ("cuplike" nuclei). *Blood*. 2006 Sep 1;108(5):1783-4.

[81] Liang DC, Shih LY, Huang CF, Hung IJ, Yang CP, Liu HC, et al. CEBPalpha mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005 Mar;19(3):410-4.

[82] Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *Am J Health Syst Pharm*. 2007 Dec 15;64(24 Suppl 15):S4-9.

[83] Sillaber C, Mayerhofer M, Agis H, Sagaster V, Mannhalter C, Sperr WR, et al. Chronic myeloid leukemia: pathophysiology, diagnostic parameters, and current treatment concepts. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2003 Aug 14;115(13-14):485-504.

[84] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3343-56.

[85] Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*. 2002 Dec 9;21(56):8652-67.

- [86] Mitelman F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 1993;11 Suppl 1:11-5.
- [87] Thiele J, Kvasnicka HM, Fischer R. Bone marrow histopathology in chronic myelogenous leukemia (CML)--evaluation of distinctive features with clinical impact. *Histology and histopathology*. 1999 Oct;14(4):1241-56.
- [88] Nair C, Chopra H, Shinde S, Barbhaya S, Kumar A, Dhond S, et al. Immunophenotype and ultrastructural studies in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 1995 Oct;19(3-4):309-13.
- [89] Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Annals of internal medicine*. 1999 Aug 3;131(3):207-19.
- [90] Goldman JM, Druker BJ. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*. 2001 Oct 1;98(7):2039-42.
- [91] O'Dwyer ME, Druker BJ. STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *The lancet oncology*. 2000 Dec;1:207-11.
- [92] O'Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1995 Jan 15;85(2):307-18.
- [93] Rywlin AM, Ortega RS, Dominguez CJ. Lymphoid nodules of bone marrow: normal and abnormal. *Blood*. 1974 Mar;43(3):389-400.
- [94] Abbott BL. Chronic lymphocytic leukemia: recent advances in diagnosis and treatment. *The oncologist*. 2006 Jan;11(1):21-30.
- [95] Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219-34.
- [96] Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguat H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):198-206.
- [97] Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *British journal of haematology*. 1986 Mar;62(3):567-75.
- [98] Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1732-7.
- [99] Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1410-6.
- [100] Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, Bone ND, Dewald GW, Hanson CA, et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2001 Dec;115(4):854-61.
- [101] Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4944-51.
- [102] Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
- [103] Thornton PD, Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Atkinson S, Kaczmarek P, Morilla RM, et al. Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J*. 2004;5(1):47-54.

- [104] Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009 Jul 25;374(9686):324-39.
- [105] Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *Lancet*. 2004 Mar 13;363(9412):875-87.
- [106] Diebold J, Molina T, Camilleri-Broet S, Le Tourneau A, Audouin J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy review. *Histopathology*. 2000 Sep;37(3):199-211.
- [107] Kass L, Kapadia IH. Perivascular plasmacytosis: a light-microscopic and immunohistochemical study of 93 bone marrow biopsies. *Acta haematologica*. 2001;105(2):57-63.
- [108] Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British journal of haematology*. 2003 Jun;121(5):749-57.
- [109] Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*. 2000 Sep 7;19(38):4319-27.
- [110] Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):3992-6.
- [111] Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1745-57.
- [112] Elis A, Radnay J, Shapiro H, Itzhaky D, Manor Y, Lishner M. Should bone marrow examination be routinely performed for the diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance? *Isr Med Assoc J*. 2006 Dec;8(12):840-2.
- [113] 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 Nov;93(11):1712-7.
- [114] Koppel A, Schiller G. Myelodysplastic syndrome: an update on diagnosis and therapy. *Current oncology reports*. 2008 Sep;10(5):372-8.
- [115] Bowen D, Culligan D, Jowitt S, Kelsey S, Mufti G, Oscier D, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*. 2003 Jan;120(2):187-200.
- [116] Olney HJ, Le Beau MM. Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*. 2007 Apr;31(4):427-34.
- [117] Swolin B, Rodjer S, Westin J. Therapy-related patterns of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome post polycythemia vera: single center experience and review of literature. *Annals of hematology*. 2008 Jun;87(6):467-74.
- [118] Evans RH, Scadden DT. Haematological aspects of HIV infection. *Bailliere's best practice & research*. 2000 Jun;13(2):215-30.
- [119] Castello A, Coci A, Magrini U. Paraneoplastic marrow alterations in patients with cancer. *Haematologica*. 1992 Sep-Oct;77(5):392-7.
- [120] Khanduri U, Sharma A. Megaloblastic anaemia: prevalence and causative factors. *The National medical journal of India*. 2007 Jul-Aug;20(4):172-5.

- [121] Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *The New England journal of medicine*. 2002 Mar 28;346(13):995-1008.
- [122] Sashida G, Takaku TI, Shoji N, Nishimaki J, Ito Y, Miyazawa K, et al. Clinico-hematologic features of myelodysplastic syndrome presenting as isolated thrombocytopenia: an entity with a relatively favorable prognosis. *Leukemia & lymphoma*. 2003 Apr;44(4):653-8.
- [123] Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A. Bone marrow histopathology in myeloproliferative disorders--current diagnostic approach. *Seminars in hematology*. 2005 Oct;42(4):184-95.
- [124] Baronci C, Pansini V, Funaro D, Coletti V, Caruso R, De Rossi G. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) in children. *Pediatric blood & cancer*. 2006 Oct 15;47(5 Suppl):665-7.
- [125] Tarantino MD. The treatment of immune thrombocytopenic purpura in children. *Current hematology reports*. 2006 Mar;5(1):89-94.
- [126] Katsumata Y, Suzuki T, Kuwana M, Hattori Y, Akizuki S, Sugiura H, et al. Anti-c-Mpl (thrombopoietin receptor) autoantibody-induced amegakaryocytic thrombocytopenia in a patient with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2003 Jun;48(6):1647-51.
- [127] Halperin DS, Doyle JJ. Is bone marrow examination justified in idiopathic thrombocytopenic purpura? *American journal of diseases of children (1960)*. 1988 May;142(5):508-11.
- [128] Ahmad Z, Durrani NU, Hazir T. Bone marrow examination in ITP in children: is it mandatory ? *J Coll Physicians Surg Pak*. 2007 Jun;17(6):347-9.
- [129] McIntosh N. Is bone marrow investigation required in isolated childhood thrombocytopenia? *Lancet*. 1982 Apr 24;1(8278):956.
- [130] Kumar R, Kalra SP, Kumar H, Anand AC, Madan H. Pancytopenia--a six year study. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2001 Nov;49:1078-81.
- [131] Kasahara S, Hara T, Itoh H, Ando K, Tsurumi H, Sawada M, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anaemia by bone marrow stem cell expression of the tumour necrosis factor receptor. *British journal of haematology*. 2002 Jul;118(1):181-8.
- [132] Dokal I, Vulliamy T. Inherited aplastic anaemias/bone marrow failure syndromes. *Blood reviews*. 2008 May;22(3):141-53.
- [133] Tamary H, Alter BP. Current diagnosis of inherited bone marrow failure syndromes. *Pediatric hematology and oncology*. 2007 Mar;24(2):87-99.
- [134] Tischkowitz M, Dokal I. Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *British journal of haematology*. 2004 Jul;126(2):176-91.
- [135] Levitus M, Roomians MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, et al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2498-503.
- [136] Vulliamy T, Dokal I. Dyskeratosis congenita. *Seminars in hematology*. 2006 Jul;43(3):157-66.
- [137] Dror Y, Freedman MH. Shwachman-diamond syndrome. *British journal of haematology*. 2002 Sep;118(3):701-13.
- [138] Chirmule N, Kalyanaraman VS, Saxinger C, Wong-Staal F, Ghayeb J, Pahwa S. Localization of B-cell stimulatory activity of HIV-1 to the carboxyl terminus of gp41. *AIDS research and human retroviruses*. 1990 Mar;6(3):299-305.
- [139] Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Rosillo MC, Cano A, Rodriguez T, Vicente V. Association of autoantibodies against platelet glycoproteins Ib/IX and IIb/IIIa, and

platelet-reactive anti-HIV antibodies in thrombocytopenic narcotic addicts. *British journal of haematology*. 1996 May;93(2):464-71.

[140] Gianelli U, Vener C, Raviele PR, Moro A, Savi F, Annaloro C, et al. Essential thrombocythemia or chronic idiopathic myelofibrosis? A single-center study based on hematopoietic bone marrow histology. *Leukemia & lymphoma*. 2006 Sep;47(9):1774-81.

[141] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.

[142] Sacchi S, Vinci G, Gugliotta L, Rupoli S, Gargantini L, Martinelli V, et al. Diagnosis of essential thrombocythemia at platelet counts between 400 and 600x10⁹/L. Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Croniche(GIMMC). *Haematologica*. 2000 May;85(5):492-5.

[143] Palladini G, Perfetti V, Merlini G. Therapy and management of systemic AL (primary) amyloidosis. *Swiss Med Wkly*. 2006 Nov 11;136(45-46):715-20.

ARTIGO CIENTÍFICO

BONE MARROW EXAMINATION IN A HEMATOLOGY AND BONE MARROW TRANSPLANTATION UNIT IN SOUTHERN BRAZIL.

Karine Poletto^{1,4} and Lúcia Silla^{1,2,3,4}

1. Laboratory for Culture, cellular and molecular analysis of Hematopoietic cells – Center for Experimental Research, Hospital de Clinicas de Porto Alegre
2. Hematology and Bone Marrow Transplantation – Hospital de Clinicas de Porto Alegre
3. School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.
4. Post Graduation in Medicine: Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul.

Mailing address

Karine Poletto

Laboratório de Cultura e Análise Molecular de Células Hematopoéticas

Centro de Pesquisa Experimental - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350.

CEP 90035-903- Porto Alegre/RS

Telephone: (51) 3359.8317

E-mail: kb.poletto@gmail.com

Abstract

Introduction: Bone marrow examination (BME) should be preceded by evaluation of clinical and haematological features to ensure appropriate indication. Our study aim was to characterize the profile of hematologic diseases for which a BME is most often requested and determine the accuracy of BME indication. **Methods:** We analyzed 400 BME in the Hematology Unit of a tertiary hospital in southern Brazil. All the relevant clinical and laboratory data were obtained from medical records. **Results:** In total, about half of patients (48.7%) a BME was done to evaluate treatment outcome. Of the consecutive 327 patients who underwent the exam with diagnostic purpose, the most frequent indications and diagnosis were Leukemia and Multiple Myeloma (MM). Of these, 67 (20.5%) had only aspirate, biopsy was not done. Of the 260 patients with suspected primary hematologic diseases, 159 (61.2%) turned out to be the case. Only 2% of the cases BME indication was questionable. **Conclusions:** The most frequent indication for BME in our Institution is to access treatment result, followed by Leukemia and MM, which is in agreement with the characteristics of our center. An accurate indication for BME was found in 98% of the cases. Core bone marrow biopsy should be reinforce.

Running Title: Bone Marrow Examination in Southern Brazil.

Key words: Bone marrow aspiration, bone marrow biopsy, bone marrow evaluation, diagnosis, frequent indications.

Introduction

Bone marrow smears examination yields semi-quantitative and qualitative information about the hematopoietic tissue. Being the latter a semisolid organ in a dynamic state with peripheral blood and other organs of the lymphopoietic system, it is essential for its correct evaluation that the bone marrow aspirate smears cytology be combined with the histology aspects of a trephine biopsy specimen obtained at the same time. Additionally, to ensure a correct usage of these diagnostic tools, a peripheral blood smears examination is important to obtain the maximal level of diagnostic information of primary or secondary hematopoietic tissue involvement in several diseases (Beutler & Williams, 2001).

Bone marrow examination (BME) can be easily performed most of the times, but being an invasive procedure, it can represent a fearful experience to the patient causing some degree of pain or, at least, discomfort. Routinely, over most for children, it is done under sedation (Trehwitt, 2001). Since most of the hematologic conditions, particularly anemia, can be diagnosed without the need for BME, the indication of it has to be preceded by a completed clinical and laboratory investigation in such a way that BME should be reserved for the hematopoietic abnormality that can not be diagnosed otherwise (Grindem, Neel & Juopperi, 2002). In the setting of malignant hematopoietic disease, BME also can yield additional information such as immunophenotypic, cytogenetic and/or molecular characteristics as well as represent a tool to access treatment response and state of remission from both cytological and/or molecular information (Bain, 2001).

Amongst the routine indications for BME, and apart from malignant diseases such as leukemias, lymphomas and multiple myeloma when it is indicate for

diagnosis, staging and treatment response assessment, there are suspect myelodysplastic syndromes, amiloidosis, mastocytosis, bone marrow metastatic diseases, aplastic anemia; drug effect, virus and/or opportunistic infection in AIDS, and fever of unknown origin. BME is also indicated as a tool to investigate numeric and/or morphological alterations in the peripheral blood cells which could not be diagnosed otherwise (Lee *et al.*, 2008; Trewhitt, 2001; Bain, 2001; Hoffman, 2005).

This study aimed to investigate the main indications for BME in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a tertiary University Hospital in southern Brazil, and a regional reference for the treatment of benign and malignant hematologic diseases, and autologous, related and unrelated allogeneic bone marrow transplantation. Additionally, this hospital facility is also a reference for the treatment of HIV positive/AIDS patients. We also wanted to know the accuracy for the BME indication as a diagnostic tool as well as its technical quality.

Materials and Methods

This was a prospective descriptive study including 400 patients submitted to BME in the Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit at HCPA, from January to December of 2009. The mean age of the studied population was 45.9 ranging from 2 months to 97 years with 66 patients under 14 years of age, and there were 208 males. The first author revised all peripheral blood smears, bone marrow aspirate and biopsy, when available, as well as all the relevant clinical and laboratory data for the diagnosis or exclusion of a hematologic condition, obtained from the medical records. Descriptive analysis was performed using percentage, absolute and relative frequencies, utilizing SPSS version 18.

Results

Of the first 150 patients studied 73 (48.7%) were submitted to BME to evaluate treatment outcome and remission status. In the remaining 77 (51.3%) patients the BME was indicated for diagnostic purposes. All the subsequent 250 patients examined belonged to the latter group. In total, 327 (250+77) patients submitted to BME in the time period of the study, were for diagnostic purpose.

The BME indications for the entire group of 327 patients are listed in Table 1. As can be seen, and in accordance with the profile of patients seen in our Institution, 146 (44.6 %) patients were suspected of having either a malignant hematologic condition or bone marrow metastatic involvement. Leukemia and Multiple Myeloma were the most frequent indications representing 34.3% of the cases. Leucopenia, polycythemia, suspected amiloidosis, myelofibrosis, essential thrombocytemia and hypereosinophilic syndrome were the least frequent indications for a diagnostic BME, comprising only 6.0% of the cases.

Of the 327 patients submitted to a diagnostic BME, 33 (10.1%) had their bone marrow (BM) examined to rule out infections diseases and 34 (10.4%) solid tumor/lymphoma metastasis; of the 260 with suspected primary hematologic diseases, 159 (61.2%) turned out to be the case (Table 2). In the remaining 101 patients in whom a primary hematologic disease was not confirmed, 77 (29.6%) had a reactive BM represented by quantitative and/or qualitative alterations or a secondary hematological involvement, and 17 (6.5%) had a normal BM, been most of the cases (6 patients) monoclonal gamopathyes submitted to BME to rule out MM. Only 7 (2.7%) cases with suspect primary hematological disease had either a bloody

or dry tap BM aspirate, without a concurrent biopsy (Figure 1) and a diagnosis could be not be made.

Of the 327 patients submitted to a diagnostic BME a biopsy was not obtained in 67 (20.5%) patients, of those 36 (54%) and 21 (31%) a primary hematological disease was confirmed or ruled out, respectively. The remaining 10 cases (15%) had a bloody or dry tap BM aspirate and a diagnosis could not be made (data not shown). Of particular interest, around half of suspect cases of aplastic anemia, only a bone marrow aspirate was examined (Table 1).

Finally, for the 73 patients who had a BME to evaluate treatment results, 35 (47.9%) were examined with a bone marrow smears only (data not shown).

Of the entire 327 patients there were 66 cases with a dry or bloody tap bone marrow aspirate. Of these, 56 had a concurrent biopsy and it was possible to confirm a BM involvement in 16 and rule it out in 31 of these patients (24 with normal and/or reactive and 7 with a hypocellular BM). An obvious technical problem occurred in the 24 patients with normal or reactive bone marrow biopsy. In 19 patients a diagnosis could not be made (10 cases without a concurrent biopsy and 9 with an insufficient bone marrow biopsy). Although this number corresponds to only 5.8% of the entire group of patients submitted to BME with diagnosis purposes, it is important to point out that they did not benefited from it.

As for the accuracy of the BME indication we found that in only seven patients (2%) out of the 327 patients submitted to BME for diagnosis purposes, a diagnostic could have been done without it, since they had either a serological diagnosis of viral disease (3), megaloblastic anemia (2), iron deficiency anemia (1) or a wrong hypothesis of MM (1).

Discussion

In this study we were able to show that the most frequent indication for BME (48.7% of the cases) in our Institution is to access treatment results. Being an active Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit and a regional reference for the treatment of malignant diseases, this was an expected finding and it is in accordance to the most frequent indication observed at the Massachusetts General Hospital (Boston) where Hasserjian (2008) showed that 63% of the BME performed in that Institution was to access treatment results (Hasserjian, 2008).

Leukemias (33.3%) and Multiple Myeloma (MM) (23.3%) were the most frequent hematological diseases diagnosed (Table 2). Al-Ghazaly describing the most frequent hematologic disease diagnosed by BME in 627 patients older than 14 years of age at a general hospital in Yemen, also found leukemia to be the most frequent finding (Al-Ghazaly *et al.*, 2006). The same was true for the study done in Senegal (37.8%) (Diop *et al.*, 2004). In both studies, however, anemia appeared as the second most frequent disease found in their group of patients. In our group of patients anemia was the final diagnose in 10 (6.3%) of the cases. Al-Ghazaly attributed the high number of anemias observed in their study to the high incidence of tropical infections diseases as well as the lack of laboratory facilities to fully investigate micronutrient deficiency (Al-Ghazaly *et al.*, 2006). We should point out, though, that being in a sub-tropical area of Brazil, infections diseases such as Malaria or other endemic tropical diseases are virtually absent in our population, and we do routinely perform B12 vitamin and folic acid serum concentration measurements. On the other hand, the high percentage of MM observed in our

series can be explained by the fact that in our Institution there is an active Multiple Myeloma Clinic.

In our series, there was a suspected primary hematologic disease in 260 of the patients submitted to BME, which was confirmed in 159 (61.2%). Diop studying 1000 patients in Dakar, Senegal, with similar age and sex distribution as our group, found 42% of their patients suspected of having a primary hematological disease to be the case. In their study, 34% of the patients turned out to have secondary hematological involvement; 21% had a normal BM and in 3% a bloody or dry non diagnostic BME, was found (Diop *et al.*, 2004). Of our 260 cases the corresponding percentage was 29.6%, 6.5%, and 2.6%, respectively (Figure 1). Although in a smaller group of patients, only in 3 out of 17 of our patients with the finding of a normal BM, there was no indication for BME.

As for the accuracy of indication, in 327 patients who underwent a BME for diagnostic purpose, only seven cases (2%) most probably should not be submitted to such a procedure.

Although most patients in our study were submitted to biopsy and aspirate, in 67 cases of a suspected primary hematological disease, metastasis, and infection, a biopsy was not performed (Table 1). We highlight the possibility that useful diagnostic information could have been provided by histology. As for the patients submitted to BME for treatment result assessment, the lack of biopsy specimen, in almost half of the cases, could not rule out a subtle, localized malignant infiltration. Collection and processing of excellent samples of bone marrow aspirate and biopsy are critical to ensure the highest level of diagnostic information can be obtained. These tests are complementary, their findings must be correlated and together provide a comprehensive assessment of the bone marrow. Performing aspirate and biopsy

together can maximize positive findings, since the more tissue you have, the more likely you will be able to detect pathologic alterations (Hasserjian, 2008; Lee *et al.*, 2008; Hyun, 1986). When you collect the aspirated, we know exactly the material that was removed, but no knowledge of the material that remained inside. Therefore, if the biopsy is omitted the pathologist can not obtain maximum information required (Farhi, 2009; Frisch & Bartl, 1999).

In conclusion, the most frequent indication for BME in our Institution is to access treatment results. For diagnostic purposes, acute leukemia followed by MM are the leading pathologies in accordance to our Institution tertiary nature. An accurate Indication for BME was found in 98% of the cases. Finally, in 19 patients (5.8%) with technical problems and/or the absence of a concurrent biopsy, a diagnosis could not be made. We should enforce the biopsy in all BME since it not only gives valuable information about diagnosis and treatment results, but also can jeopardize the BME efficacy itself.

Table 1. Indication for diagnostic BME at the hematology and bone Marrow Transplant Unit at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Indication	n	%	% cum	Without BMB
Leukemia	58	17,7	17,7	15
Multiple Myeloma	54	16,5	34,3	09
Solid tumor metastasis/lymphoma	34	10,4	44,6	04
Infections disease	33	10,1	54,7	02
Anemia	30	9,2	63,9	10
ITP	28	8,6	72,5	07
Cytopenias	26	8,0	80,4	04
MDS	25	7,6	88,1	04
Aplasia	19	5,8	93,9	09
Leukopenia	5	1,5	95,4	03
Polycythemia	5	1,5	96,9	00
Amiloidosis	3	0,9	97,9	00
Essencial Thrombocythemia	3	0,9	98,8	00
Myelofibrosis	3	0,9	99,7	00
Hyperesosinophylic Syndrome	1	0,3	100,0	00
Total	327	100	100	67

Suspected bone marrow disease or involvement in 327 new patients. BMB: Bone Marrow Biopsy. ITP: Idiopathic Thrombocytopenic Purpura; MSD: Myelodisplastic Syndrome.

Table 2. Primary hematological diseases diagnosed at the Hematology and Bone Marrow Transplant Unit at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Diagnosis	n	%
Leukemia ^a	53	33.3
Multiple Myeloma	57	23.3
MDS	24	15.1
ITP	14	8.8
Anemias ^b	10	6.3
Aplasia	08	5.1
Polycythemia	05	3.1
Myelofibrosis	04	2.5
Essencial Thrombocythemia	03	1.9
Hyperesosinophylic Syndrome	01	0.6
Total	159	100

a: 25 patients with AML, 17 with ALL, 07 with CML and 04 with CLL. b: 04 iron deficiency anemia, 03 megaloblastic anemia, 02 anemia of chronic disease and 1 thalassemia trait.

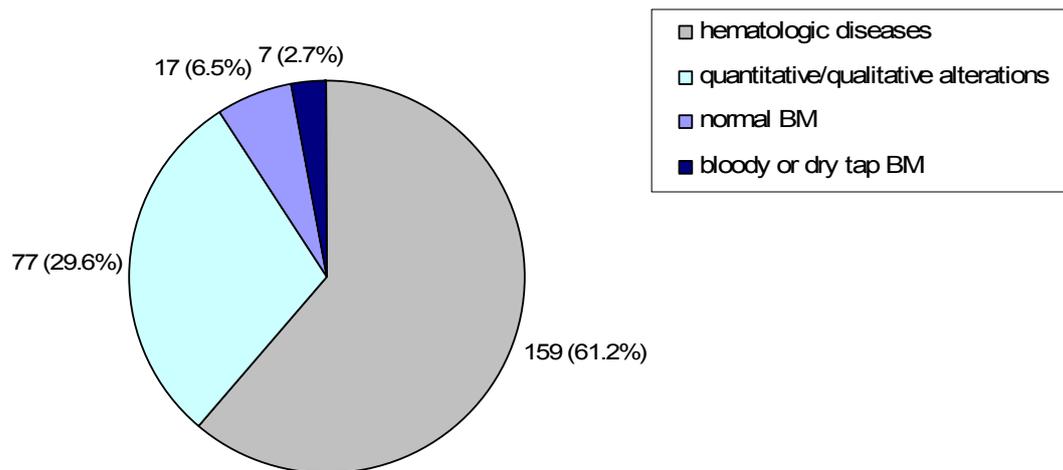


Figure 1. BME results in 260 patients with suspected primary hematologic diseases

References

- Al-Ghazaly J., Al-Selwi A. H., Abdullah M., Al-Jahafi A. K., Al-Dubai W. & Al-Hashdi A. (2006) Pattern of haematological diseases diagnosed by bone marrow examination in Yemen: a developing country experience. *Clin Lab Haematol*, 28, 376-81.
- Bain B. J. (2001) Bone marrow aspiration. *J Clin Pathol*, 54, 657-63.
- Beutler E. & Williams W. J. (2001) *Williams hematology*, New York, McGraw-Hill, Medical Publishing Division.
- Diop S., Ndoura A., Toure Fall A. O., Thiam D. & Diakhat, L. (2004) [Bone marrow aspiration in diagnosis of hemopathies in Dakar, Senegal]. *Dakar Med*, 49, 106-9.
- Farhi D. C. (2009) *Pathology of bone marrow and blood cells*, Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott William & Wilkins.
- Frisch B. & Bartl R. (1999) *Biopsy interpretation of bone and bone marrow : histology and immunohistology in paraffin and plastic*, London New York, Arnold ; Copublished in the USA by Oxford University Press.
- Grindem C. B., Neel J. A. & Juopperi T. A. (2002) Cytology of bone marrow. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 32, 1313-74, vi.
- Hasserjian R. P. (2008) Reactive versus neoplastic bone marrow: problems and pitfalls. *Arch Pathol Lab Med*, 132, 587-94.
- Hoffman R. (2005) *Hematology : basic principles and practice*, Edinburgh, Elsevier Churchill Livingstone.
- Hyun B. H. (1986) Bone marrow examination: adventures in diagnostic hematology. *Yonsei Med J*, 27, 100-5.
- Lee S. H., Erber W. N., Porwit A., Tomonaga M. & Peterson L. C. (2008) ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*, 30, 349-64.
- Trewhitt K. G. (2001) Bone marrow aspiration and biopsy: collection and interpretation. *Oncol Nurs Forum*, 28, 1409-15; quiz 1416-7.