

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISANDRO LIMA RIBEIRO

**ANÁLISE CITOLÓGICA E HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES
PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI E SUA RELAÇÃO COM ACHADOS DE
CITOGENÉTICA CONVENCIONAL**

CURITIBA

2015

LISANDRO LIMA RIBEIRO

**ANÁLISE CITOLÓGICA E HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES
PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI E SUA RELAÇÃO COM ACHADOS DE
CITOGENÉTICA CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração: Hemato-oncologia pediátrica.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini
Coorientadora: Dr.^a Lígia Niero-Melo**

CURITIBA

2015

Parecer

A Banca Examinadora, instituída pelo colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o Mestrando

Lisandro Lima Ribeiro

em relação ao seu trabalho de Dissertação de Mestrado intitulado:


“ANÁLISE CITOLÓGICA E HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI E SUA RELAÇÃO COM ACHADOS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL”

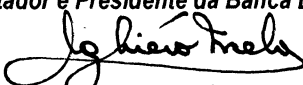
é de parecer favorável à *Aprovação* do acadêmico, habilitando-a ao título de

Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente,

Área de concentração em *Hemato-Oncologia Pediátrica*

Curitiba, 17 de dezembro de 2015.


Professor Doutor Ricardo Pasquini
Professor Senior e Emerito do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e SCA da UFPR
UFPR; *Orientador e Presidente da Banca Examinadora.*


Doutora Lígia Niêro-Melo
Professora Assistente da UNESP Júlio Mesquita Filho, FM de Botucatu-SP e Citomorfologista no STMO de Jaú-SP; *Co-Orientadora.*


Doutor Luiz Fernando Lopes
Diretor Geral da Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos - FACISB - SP, *Primeiro Examinador.*


Doutora Carmem Maria Sales Bonfim
Professora Colaboradora da Universidade Federal do Paraná-UFPR; *Segunda Examinadora.*


Professor Doutor Nelson Augusto Rosário Filho
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFPR.

À Christie, meu grande amor, pelo apoio incondicional em todos os momentos e decisões difíceis da vida e às minhas filhas, Beatriz e Sophia, pela bondade e compaixão já demonstrado desde pequenas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e Adolescente do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade concedida, em especial à Dra. Monica Lima por acreditar na concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini, agradeço pelos ensinamentos e horas dedicadas à correção desta tese. Sua ordenação, clareza e perspicacia foram de grande aprendizado durante a sua orientação neste trabalho.

À Dr.^a Ligia Niero Melo, coorientadora desta tese, agradeço aos agradáveis dias de aprendizagem em morfologia de medula óssea que foram de grande enriquecimento hematológico. Além de excelente professora tornou-se uma grande amiga para mim.

À Dr.^a Carmem Maria Sales Bonfim, grande amiga e incansável insentivadora. Sua paixão pelos pacientes e pela ciência fazem de você um grande exemplo a ser seguido. É uma honra fazer parte do seu time!

À Dr.^a Daniela Piloneto, pela amizade e companheirismo no atendimento ao paciente com Anemia de Fanconi.

Ao Dr. Marco Antonio Bitencourt e à Assistente Social Marlene Dias, pelos ensinamentos sobre o atendimento ao paciente com Anemia de Fanconi.

Às amigas Dr.^a Gisele e Dr.^a Samantha, agradeço pelo apoio e compreensão pelos períodos de ausência das atividades de trabalho para realização desta tese. Sou muito feliz por trabalhar com vocês.

Ao Ricardo Peterlle, pela disposição e horas dispensadas na análise estatística desta tese.

À Data-Manager Heliz Neves, pela atenção e constante disponibilidade em fornecer as informações do banco de dados do STMO HC-UFPR.

À amiga Beatriz Battistella Nadas, pela ajuda na formatação das figuras e das tabelas deste trabalho e pelos agradáveis meses de trabalho no DRAS, Secretaria Municipal de Saúde. Com você aprendi muito sobre a operacionalidade do SUS.

Ao laboratório de Citogenética, pela realização das análises citogenéticas com toda dedicação e destreza. Obrigado por atender aos pedidos “emergenciais” das sextas-feiras.

Ao Serviço de Patologia, pela disponibilização das lâminas de histologia de medula óssea dos pacientes com Anemia de Fanconi deste trabalho.

Ao Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC-UFPR: médicos, enfermeiros, secretários, administradores, assistentes sociais, nutricionistas, psicólogos, terapeuta ocupacionais, farmacêuticos, biólogos, e bioquímicos. Muito bom fazer parte deste time!

Ao Instituto TMO - Associação Alírio Pfiffer, pelo apoio na formação de vários médicos, enfermeiros e demais profissionais do STMO do HC-UFPR.

Ao *St Jude Children's Research Hospital - International Outreach Program*, pelo auxílio financeiro ao diagnóstico dos pacientes com Anemia de Fanconi.

À Dr.^a Leniza Costa Lima, à Dr.^a Erica Yamauchi e ao Dr. Ricardo Blum, pela amizade e carinho.

Aos novos amigos do departamento de Redes da Prefeitura Municipal de Curitiba que me acolheram com tanto carinho nessa nova fase da vida profissional. Agradeço pela compreensão e apoio na realização deste trabalho.

Aos meus sogros, Dr. Hans Graf e Dr.^a Ruth Graf, pessoas especiais de bondade incessável, com vocês conheci o amor pela medicina. Vocês tem o dom de guiar e orientar todos ao seu redor.

Aos meus irmãos, Ulysses, Perseu, Luciana, Hércules, Silvana e Hermes, por sempre estarem presentes na minha vida. Amo muito vocês!

A minha mãe, Lucia, por me ensinar a ser forte e perseverante. Sua integridade e compaixão guiaram meu caminho.

Aos pacientes e suas famílias, pela confiança e carinho depositada em nosso serviço.

RESUMO

Anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome de falência medular hereditária caracterizada por anormalidades congênitas, falência progressiva de medula óssea e elevada predisposição a Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Aguda e tumores sólidos. Os critérios morfológicos para caracterizar SMD na AF, assim como o significado das anormalidades clonais, não estão bem estabelecidos na literatura. Este estudo visou estabelecer critérios para definir a dispoese característica da AF, além de correlacionar estes achados com o grau de citopenias e citogenética convencional. Foram analisadas 58 amostras procedentes de 55 pacientes com AF, no período de janeiro de 2008 a junho de 2010. Foram excluídos cinco casos devido ao material insuficiente para análise da MO. Os pacientes foram procedentes do ambulatório de AF do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. A mediana de idade na avaliação da MO foi de 9,5 anos (variou de 3,3 anos a 28 anos). Os pacientes foram classificados conforme os critérios morfológicos utilizados pelo Serviço de Hematologia da Universidade de Minnesota para classificação da SMD na AF em: SMD, não-SMD ou SMD *borderline*. A citopenia estava presente na forma leve em 47% (n = 27) das amostras, moderada em 24% (n = 14) e grave em 29% (n = 17). Quando comparado os pacientes não-SMD com SMD ou SMD *borderline*, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grau de citopenia (p = 0,51). A celularidade da MO foi normal em 10 amostras, hipocelular em 29 e aplásica em 14 amostras, significativamente maior nos pacientes com SMD e SMD *borderline* (p < 0,01). A diseritropoese foi presente em 68% dos casos (n = 36), a disgranulocitopose em 41% (n = 22) e a dismegacariocitopose foi encontrada em apenas 15% (n = 7). A SMD foi confirmada em 20% dos pacientes (n = 13), sendo a citopenia refratária com displasia multilinhagem (n = 10) o tipo mais frequente de SMD seguida da anemia refratária com excesso de blastos tipo-1 (n = 3). A SMD *borderline* foi detectada em nove amostras. A presença de alteração clonal na citogenética convencional foi correlacionada com a evidência morfológica de SMD e SMD *borderline* (p < 0,01). A presença de disgranulocitopose foi o maior indicativo da presença de SMD em nossa casuística. A raridade de MO hiperclular e da presença de blastos sugere que a classificação da SMD para AF seja diferente da proposta pela OMS em 2008 para pacientes com falência medular hereditária. Este é o primeiro estudo brasileiro que analisa as alterações morfológicas da medula óssea dos pacientes com AF, não submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH). A avaliação detalhada da citologia e histologia da medula óssea (MO) de 58 amostras incluídas neste estudo pode ser considerada uma das maiores casuísticas reportadas na literatura devido a raridade desta doença.

Palavras-chave: Anemia de Fanconi. Síndrome Mielodisplásica. Morfologia.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is an inherited bone marrow failure syndrome characterized by congenital abnormalities, progressive bone marrow failure and a high predisposition to myelodysplastic syndrome (MDS), Acute Myeloid Leukemia and solid tumors. The morphologic criteria for characterizing MDS in FA patients, as well as the meaning of clonal abnormalities are not well established in the literature. This review aimed to establish criteria for defining the characteristic dysplasia of FA, and to correlate these findings with the degree of cytopenia and conventional cytogenetic. The 58 samples from 55 patients with FA were analyzed from January 2008 to June 2010. Five cases were excluded because of insufficient material for analysis of bone marrow (BM). Patients were coming from the FA clinic of the Federal University of Parana *Hospital de Clínicas*. The median age at the assessment of BM was 9.5 years (ranging from 3.3 years to 28 years). Patients were classified according to the morphological criteria used by the Minnesota University Hematology Service for MDS classification in FA in MDS, non-MDS or MDS borderline. The cytopenia was mild in 47% (n = 27) of the samples, moderate in 24% (n = 14) and severe in 29% (n = 17). When compared, non-MDS patients vs. MDS and/or MD borderline, there was no statistically significant difference in the degree of cytopenia (p = 0.51). The cellularity of BM was normal in 10 samples, hypocellular on 29 and aplastic in 14 samples, and was significantly higher in patients with MDS and MDS borderline (p < 0.01). The dyserythropoiesis was present in 68% of cases (n = 36), dysgranulopoiesis in 41% (n = 22) and dysmegakaryopoiesis was found in only 15% (n = 7). MDS was confirmed in 20% of patients (n = 13), refractory cytopenia with multilineage dysplasia being the most frequent type of MDS (n = 10), then refractory anemia with excess blasts-1 (n = 3). The MDS borderline has been detected in nine samples. The presence of clonal abnormalities in conventional cytogenetics was correlated with morphological evidence of MDS and MDS borderline (p < 0.01). The presence of dysgranulopoiesis was the most indicative of the presence of MDS in our series. The rarity of BM hypercellular and the presence of blasts suggests that the classification of MDS for FA is different from the proposal by WHO in 2008 for patients with inherited bone marrow failure. This is the first Brazilian study evaluating the morphological changes in the bone marrow of patients with AF, not undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). A detailed assessment of the BM of cytology and histology of 58 samples included in this study can be considered one of the largest series reported in the literature because of the rarity of this disease.

Keywords: Fanconi Anemia. Myelodysplastic Syndrome. Morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA MOLECULAR AF DE REPARAÇÃO DE DNA	19
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EVOLUÇÃO CLONAL EM MO DE ANEMIA DE FANCONI	20
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FISIOPATOLOGIA DAS SMD	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HEMATIMÉTRICAS E MOLECULARES	42
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DA CITOPENIA	43
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DADOS HEMATIMÉTRICOS DE ACORDO COM A PRESENÇA DE SMD	52
TABELA 4 - ACHADOS MORFOLÓGICOS DE DISERITROPOESE	53
TABELA 5 - ACHADOS MORFOLÓGICOS DE DISGRANULOCITOPROESE	54
TABELA 6 - ACHADOS MORFOLÓGICOS DE DISMEGACARIOCITOPROESE	54
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DA SMD.....	55
TABELA 8 - ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS	56
TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E ACHADOS DE CITOGENÉTICA EM PACIENTES AF	56

LISTA DE QUADRO

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DA SMD, CONFORME OMS.....	31
--	----

LISTA DE SIGLAS

Add	- adicional
AF	- Anemia de Fanconi
ALIP	- <i>Abnormal localization of immature precursors</i>
AR	- Anemia refratária
AREB-1	- Anemia refratária com excesso de blastos tipo 1
AREB-2	- Anemia refratária com excesso de blastos tipo 2
ARSA	- Anemia refratária com sideroblastos em anel
BM	- Bone marrow
CA	- Câncer
CGH	- Hibridação genômica comparativa
CNT	- Células nucleadas totais
CRDM	- Citopenia refratária com displasia multilinhagem
CRDU	- Citopenia refratária com displasia unilinhagem
CRI	- Citopenia refratária da infância
CTH	- Célula tronco hematopoética
DE	- Esterase
DEB	- Diepoxibutano
FAB	- Classificação French-American-British
FISH	- Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
FMO	- Falência de medula óssea
HSCT	- <i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
IFAR	- <i>International Fanconi Anemia Registry</i>
LMA	- Leucemia Mielóide Aguda
LMMJ	- Leucemia Mielomonocítica Juvenil
MDS	- <i>Myelodysplastic syndrome</i>
MF	- Malformações
MO	- Medula óssea
MPO	- Mieloperoxidase neutrofílica
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAS	- Ácido pediódico de Schiff
RDW	- <i>Red cell distribution width</i>

SMD - Síndrome Mielodisplásica
SP - Sangue periférico
TCTH - Transplante de células tronco hematopoéticas
VCM - Volume corpuscular médio
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo principal	15
1.1.2 Objetivos secundários.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 HETEROGENEIDADE GENÉTICA.....	18
2.2 DEFEITO ATRIBUÍDO À CÉLULA TRONCO HEMATOPOÉTICA.....	19
2.3 ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS CLONAIS NA ANEMIA DE FANCONI	20
2.4 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA	22
2.5 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA SMD, SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) - 2008	25
2.5.1 Citopenia refratária com displasia unilinhagem	26
2.5.2 Anemia refratária com sideroblastos em anel.....	27
2.5.3 Citopenia refratária com displasia multilinhagem	28
2.5.4 Anemia refratária com excesso de blastos	29
2.5.5 Síndrome mielodisplásica inclassificável	30
2.5.6 SMD com deleção do braço longo do cromossomo 5	30
2.6 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA NA INFÂNCIA.....	31
2.7 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA NA ANEMIA DE FANCONI	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 TIPO DO ESTUDO	40
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	40
3.3 CASUÍSTICA.....	40
3.4 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA.....	41
3.5 ANÁLISE DOS DADOS HEMATIMÉTRICOS DO SANGUE PERIFÉRICO	42
3.6 ANÁLISE DA MEDULA ÓSSEA.....	43
3.7 CATEGORIAS DE SMD.....	50
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
4 RESULTADOS	52
4.1 ANÁLISE DOS VALORES HEMATIMÉTRICOS.....	52

4.2 ANÁLISE DE MEDULA ÓSSEA.....	52
4.3 CLASSIFICAÇÃO DA SMD	55
4.4 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICES	73
ANEXOS	85
PRODUÇÃO ACADÊMICA.....	88

1 INTRODUÇÃO

Anemia de Fanconi (AF) é uma doença genética rara, caracterizada por anormalidades congênitas, fragilidade cromossômica e falência progressiva da medula óssea (SHIMAMURA; ALTER, 2010). Pertence ao grupo das raras síndromes de falência medular congênita com alta predisposição ao câncer. É uma doença de herança primariamente recessiva, com exceção do grupo *FANCB*, cuja herança é ligada ao cromossomo X. Já foram descritas mutações em mais de 16 genes, cujos produtos participam na via de reparação do DNA. A maioria dos pacientes diagnosticados com AF apresenta anormalidades físicas, tais como: baixa estatura, alteração de pigmentação cutânea (manchas café-com-leite, manchas hiper/hipopigmentadas), anormalidades de primeiro quirodáctilo, ausência de rádio, microcefalia, microftalmia, anomalias renais estruturais, dentre várias (D'ANDREA, 2003; SOULIER, 2011; ALTER, 2014).

A maioria dos pacientes com AF desenvolve falência de medula óssea durante a primeira década de vida, mas geralmente o diagnóstico é firmado apenas após o aparecimento de pancitopenia (SHIMAMURA; ALTER, 2010). A falência de medula óssea é o principal fator de risco de morte precoce nesses pacientes, geralmente relacionada ao excesso de apoptose de células tronco hematopoéticas (CTH) (ALTER, 2014). Essa tendência pró-apoptótica e instabilidade genética promovem a seleção clonal da CTH e evolução para Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA) em vários pacientes (BAGBY *et al.*, 2004). O tratamento curativo para o envolvimento hematológico é o transplante de células tronco hematopoético com chance de cura de 90% quando o paciente é jovem, em fase de aplasia e possui doador compatível (BONFIM *et al.*, 2007). Mas se o paciente apresenta LMA/SMD, a sobrevida em 5 anos após a realização de um TCTH diminui para 43% (AYAS *et al.*, 2013).

Numa análise de 754 pacientes com AF realizada pelo *International Fanconi Anemia Registry*, a incidência cumulativa de falência de medula óssea aos 40 anos de idade foi de 90% enquanto 33% dos pacientes apresentaram doenças hematológicas malignas (LMA ou SMD) e 28% desenvolveram tumores sólidos. A probabilidade de um paciente com AF desenvolver SMD ou LMA até os 40 anos de idade é de 30 a 40% (BUTTURINI *et al.*, 1994; KUTLER *et al.*, 2003). Tanto a SMD

como a LMA são os principais eventos de mau prognóstico clínico em pacientes com AF (ALTER *et al.*, 2000).

A SMD é um desafio diagnóstico na AF, devido à presença frequente de achados que podem mimetizar a SMD, tais como diseritropoese e hipocelularidade associada à dispoese (MUFTI *et al.*, 2008). Mesmo entre patologistas experientes, é difícil estabelecer um consenso sobre algumas características morfológicas para os pacientes com AF, como, por exemplo, a transformação megaloblástica em precursor eritroide ou hipogranularidade em neutrófilos, características estas também observadas na SMD. O surgimento de clones anormais, observados na análise citogenética da medula óssea de pacientes com AF, pode ter papel relevante no desenvolvimento de SMD (CIOC *et al.*, 2010).

Nem a classificação atual da Organização Mundial da Saúde - OMS, (*World Health Organization – WHO*), nem a classificação pediátrica de SMD estabeleceram critérios qualitativos e (ou) quantitativos para discriminação entre SMD e aplasias constitucionais (CANTÙ RAJNOLDI *et al.*, 2005; HASLE, 2007; SWERDLOW *et al.*, 2008; HASLE; NIEMEYER, 2011).

Assim a busca para se estabelecer um limite mais nítido entre AF e SMD, na medida da aquisição de maior conhecimento fisiopatológico das doenças primárias da medula óssea, se faz cada vez mais premente e necessária para a prática clínica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo principal

Identificar alterações morfológicas e histológicas na medula óssea de pacientes portadores de Anemia de Fanconi, visando contribuir para fortalecer os critérios para definir a dispoese própria desta doença.

1.1.2 Objetivos secundários

- Verificar como se comportam os achados morfológicos de acordo com o grau das citopenias;
- Verificar como se comportam os achados morfológicos de acordo com a citogenética convencional;
- Contribuir para a melhor caracterização da classificação da SMD na AF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em 1927, o pediatra suíço Guido Fanconi descreveu uma família na qual três meninos apresentavam anormalidades físicas ao nascimento e morreram de uma condição que se assemelhava à anemia perniciosa. Foi na década de 60 que cientistas, inspirados pelas considerações teóricas de Guido Fanconi, demonstraram relação da AF com instabilidade cromossômica, falência de medula óssea e predisposição ao câncer (LOBITZ; VELLEUER, 2006).

Das mais importantes descobertas para caracterização da AF foram a instabilidade cromossômica espontânea e a hipersensibilidade das células de pacientes com AF ao efeito indutor de quebras cromossômicas dos agentes clastogênicos como mitomicina C e diepoxibutano (DEB). Com base nessas características, foram desenvolvidos testes de quebras cromossômicas como o teste de sensibilidade ao DEB, que é um método citogenético utilizado como método de referência para o diagnóstico de AF (AUERBACH; ROGATKO; SCHROEDER-KURTH, 1989; AUERBACH, 2009).

AF pode ser diagnosticada em todas as raças e grupos étnicos, com incidência de 1:100.000 indivíduos nascidos vivos na maioria das populações estudadas (KUTLER *et al.*, 2003). A frequência de portadores na população dos EUA foi estimada em 1:181 (ROSENBERG *et al.*, 2011).

Os pacientes com AF apresentam heterogeneidade clínica marcante. Em uma importante análise sobre achados clínicos em AF pelo IFAR, uma variedade de malformações (MF) congênitas foi relatada em aproximadamente dois terços dos pacientes, enquanto um terço deles não as apresentou (KUTLER, 2003). As MF congênitas podem ser classificadas como extensas quando envolvidos ao menos três locais anatômicos, devendo estar presente ao menos um órgão interno (Exemplo: baixa estatura, malformações de rádio e malformações renais - rim único, rim em ferradura, rim pélvico). Já as malformações congênitas limitadas são assim classificadas quando menos de três locais anatômicos estão envolvidos, geralmente encontradas após a realização do diagnóstico devido à falência de medula óssea, por meio do teste de DEB (Exemplo: alterações de pigmentação da pele - manchas hipo/hipercrômicas, hipoplasia tenar, microcefalia e microftalmia) (GUARDIOLA *et al.*, 2000; AUERBACH, 2009). Hoje sabe-se que as MF congênitas dos pacientes com AF podem variar de nenhuma a muitas e podem inclusive envolver quaisquer

sistema/órgão. Anormalidades envolvendo SNC, trato digestório e sistema esquelético (em adição ao defeito do rádio) foram adicionadas ao fenótipo original da AF. Existe uma variabilidade expressiva mesmo entre irmãos diagnosticados com AF (AUERBACH, 2009; NEVELING *et al.*, 2009).

2.1 HETEROGENEIDADE GENÉTICA

Os pacientes com AF apresentam também uma grande heterogeneidade genética, que pode ser evidenciada em estudos de hibridização celular e de complementação com a definição dos subtipos genéticos da AF (BERWICK *et al.*, 2007; NEVELING *et al.*, 2009; PILONETTO *et al.*, 2009).

Os genes envolvidos na AF correspondem a uma importante via que atua na reparação de DNA. As proteínas por eles geradas têm papel importante na manutenção da estabilidade do genoma e reparação do DNA, quando este é exposto a agentes indutores de ligações cruzadas. Oito proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM) e os fatores FAAP24 e FAAP100 formam um complexo nuclear central, necessário para a monoubiquitinação da proteína FANCD2 (DE WINTER; JOENJE, 2009; HODSON; WALDEN, 2012).

Quando um dano ao DNA é induzido por agentes clastogênicos, a monoubiquitinação da FANCD2 ocorre durante a fase S do ciclo celular, e este complexo ativado interage com outras proteínas envolvidas na reparação do DNA, tais como: FANCD1, BRCA2, BRCA1 e RAD51 (Figura 1) (DE WINTER; JOENJE, 2009; SOULIER, 2011).

O mecanismo preciso pelo qual a via da AF promove a reparação do DNA ainda não é conhecido. As mutações gênicas mais frequentes nos pacientes com AF são as encontradas nos genes: FANCA, FANCC e FANCG, correspondendo aproximadamente a 85% de todos os pacientes. Já foram descritos 16 subtipos genéticos de AF. Todos os genes são herdados de maneira autossômica recessiva, exceto pelo raro grupo de pacientes do FANCB, cujos genes localizam-se no cromossomo X (ALAN; D'ÁNDREA, 2011; SOULIER, 2011).

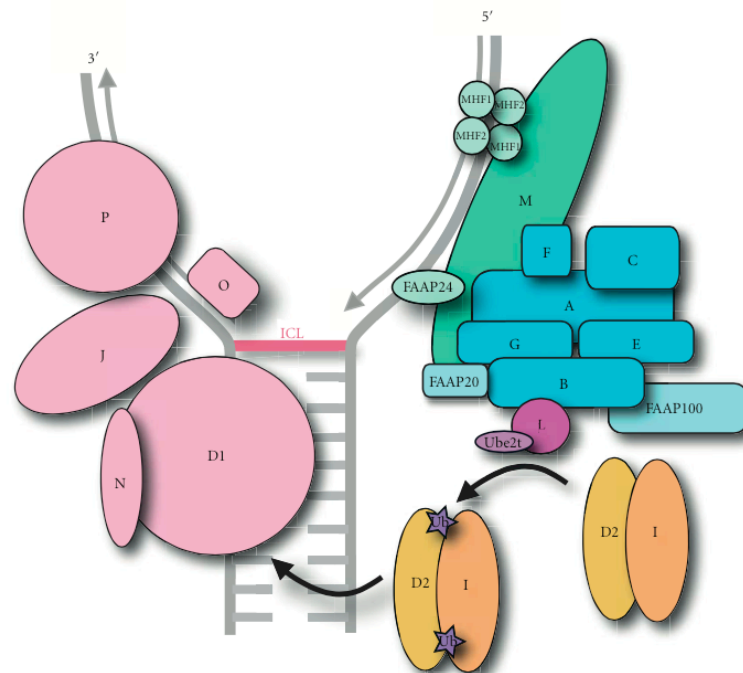


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA MOLECULAR AF DE REPARAÇÃO DE DNA

FONTE: Adaptado de Hodson e Walden (2012)

NOTA: Durante a replicação do DNA, ligação intercadeia cruzada (ICL) bloqueiam a progressão da forquilha de replicação. A proteína FANCM reconhece a formação da ligação cruzada e associa-se a cromatina, facilitada pelas histonas MHF1 e MHF2 em verde. Neste momento as demais proteínas formadoras do complexo principal de proteínas AF, em azul são recrutadas para o sítio danificado do DNA, associadas às proteínas FANCT e FANCL em púrpura com atividade E2 ubiquitina conjugasse e E3 ubiquitina ligase, respectivamente. Uma vez estabelecido o complexo principal este leva a monoubiquitinação do complexo intermediário, formado pelas proteínas FANCI e FANCD2 em laranja e amarelo. O complexo ID intermediário recruta e dirige as demais proteínas em rosa que atuam diretamente no reparo do DNA.

2.2 DEFEITO ATRIBUÍDO À CÉLULA TRONCO HEMATOPOÉTICA

A maioria dos pacientes com AF desenvolve falência de medula óssea (FMO) progressiva. As manifestações hematológicas iniciais incluem macrocitose seguida de plaquetopenia, com progressão para pancitopenia, que pode revelar-se entre os sete e nove anos de idade. Raramente a pancitopenia é detectada ao nascimento, porém, ao redor dos 40 anos de idade, aproximadamente 90% dos pacientes apresentam alterações hematológicas. A aplasia grave constitui-se na maior causa de óbito na primeira década de vida para esses pacientes.

Como na AF há envolvimento das três linhagens hematopoéticas, acredita-se que a FMO seja atribuída a um defeito na CTH. Também foi demonstrado haver depleção e hipocelularidade das CTH CD34+ desde a fase intrauterina

(AUERBACH, 2009; CASTELLA *et al.*, 2011; CECCALDI *et al.*, 2012; GARAYCOECHEA; PATEL, 2013).

Dentro do contexto de instabilidade cromossômica e hematopoese ineficaz, as células dos pacientes com AF sofrem grande pressão seletiva durante a vida, o que pode levar a uma proliferação crônica que resulta em aquisição de novos subclones e evolução para leucemia (Figura 2) (SOULIER, 2011).

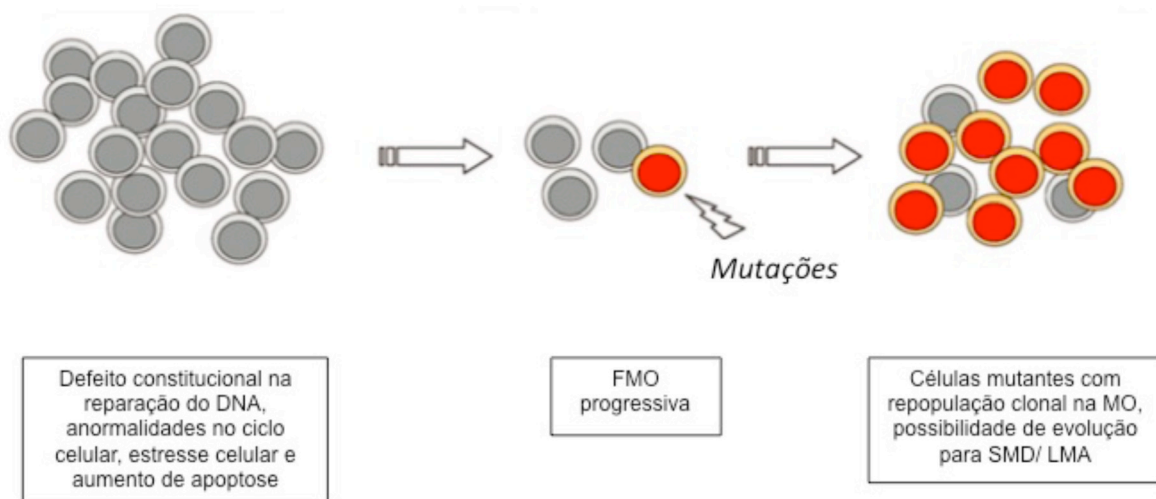


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EVOLUÇÃO CLONAL EM MO DE ANEMIA DE FANCONI

FONTE: Adaptado de Soulier (2011)

2.3 ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS CLONAIIS NA ANEMIA DE FANCONI

Em análise de citogenética convencional, anormalidades citogenéticas são denominadas clonais quando duas ou mais metáfases apresentam a mesma anormalidade (AUERBACH *et al.*, 1991). Clones citogenéticos emergentes e persistentes, em MO de pacientes com AF, têm relevância no desenvolvimento da SMD na AF (BUTTURINI *et al.*, 1994). Relatos de literatura indicam uma flutuação dos clones citogenéticos nesses pacientes, com desaparecimento, reaparecimento, troca por novo clone ou adição de novos clones à citogenética. As aberrações clonais adquiridas mais frequentemente observadas na citogenética convencional nesses pacientes são: ganho em porção do braço longo do cromossomo 1; monossomia do cromossomo 7; deleção do braço longo do cromossomo 5. A deleção do braço longo do cromossomo 7 ou monossomia do cromossomo 7 foi

associada ao pior prognóstico e à evolução para LMA (BUTTURINI *et al.*, 1994; ALTER *et al.*, 2000).

Numa coorte de 41 pacientes com AF, Alter *et al.*, em 2000, avaliaram citogenética e morfologia para SMD separadamente quanto ao risco de morte. Vinte pacientes apresentaram morfologia para SMD e 16 deles citogenética com anormalidade clonal. Dez casos apresentaram clones citogenéticos na primeira análise, incidência de 30%; seis outros casos desenvolveram um clone no exame subsequente, totalizando 16 casos ou taxa cumulativa de 48%. Quinze casos foram submetidos a mais de uma análise citogenética. Houve flutuação de clones em 10 casos. Dentre os 16 pacientes com clones citogenéticos, sete deles morreram em mediana com 3 anos (1 - 7 anos) após o aparecimento do clone. Os outros nove casos vivos, com clone citogenético, foram seguidos em mediana por 2 anos (1,5 - 7 anos). A probabilidade de sobrevida após detecção de um clone foi então de 0,4 comparada a 0,94 sem o clone citogenético (ALTER *et al.*, 2000).

Estudos atuais utilizam a citogenética molecular como ferramenta diagnóstica para anormalidades clonais, na busca de associação com SMD/LMA em pacientes com AF (CIOCCO *et al.*, 2010; QUENTIN *et al.*, 2011; MEYER; NEITZEL; TÖNNIES, 2012). O ganho do braço longo do cromossomo 3 (3qG) é um achado observado recentemente, revelado pelas técnicas de citogenética molecular (hibridação *in situ* fluorescente - FISH e hibridação genômica comparativa - CGH), fato este não observado antes pela citogenética convencional, provavelmente devido ao tamanho pequeno de material cromossômico translocado (TÖNNIES *et al.*, 2003). Prováveis laudos de citogenética convencional com anormalidades cromossômicas descritas como material adicional de origem desconhecida, "add", na realidade, podem representar ganho 3q (CIOCCO *et al.*, 2010). A identificação do 3qG também parece ser importante para o diagnóstico de AF. É infrequente a associação entre 3qG e LMA em pacientes não portadores de AF; quando ocorre esta associação, sugere-se realização do DEB teste (CIOCCO *et al.*, 2010).

Um grupo de hematologistas alemães, da Universidade de Humboldt - Berlin, estudaram 132 amostras de MO de 53 pacientes com AF com cariótipo constitucional normal em linfócitos T de sangue periférico, 25 pacientes apresentaram aberrações clonais observadas a partir da técnica de CGH. Dezoito pacientes (72%) revelaram trissomia parcial ou tetrassomia do braço longo do cromossomo 3, indicando alta incidência desta aberração em sua amostra. Oito dos 18 pacientes com o ganho 3q

apresentaram também monossomia do cromossomo 7 adicional. Este clone resultante de uma cópia extra do braço longo do cromossomo 3, em pacientes AF, teve associação com LMA e SMD, de importante impacto prognóstico (TÖNNIES *et al.*, 2003).

Mheta *et al.* analisaram amostras de MO de 77 pacientes AF, pela técnica de citogenética molecular de FISH. Esses autores utilizaram sondas específicas para os cromossomos 1, 3 e 7 (1q25, 1p36, 3q27, CEP7 e 7q31). Dentre os 77 pacientes, treze apresentaram SMD ou LMA. Os portadores de aberrações cromossômicas envolvendo cromossomos 3 (n=5/13) e 7 (n=8/13) apresentaram um risco maior de desenvolvimento de SMD e LMA (MHETA *et al.*, 2010).

O maior estudo de SMD em AF, em coorte de 119 pacientes, demonstrou que a maioria das anormalidades clonais encontradas (77,8%) envolveu cromossomos 1, 3 e 7 (1qG, 3qG e ou -7/7qL), associadas a maior ocorrência de SMD. Não houve, entretanto, associação significativa entre a anormalidade cromossômica específica e o achado morfológico específico de SMD: disgranulocitopoese, dismegacariocitopoese ou diseritropoese (CIOCI *et al.*, 2010).

Utilizando tecnologia de arranjo de alta densidade de DNA para polimorfismo nucleotídico único (SNP), bem como CGH em pacientes com AF com SMD e LMA, encontrou-se padrão específico de anormalidades genômicas. Uma anormalidade crítica *RUNX1/AML1*, no braço longo do cromossomo 21, foi descrita pela primeira vez como parte deste padrão específico na AF. Na análise de 57 amostras de DNA de MO de pacientes com AF, detectaram-se anormalidades envolvendo 3qG, deleção do 7/7q e *RUNX1* estreitamente relacionadas à SMD/LMA (QUENTIN *et al.*, 2011).

2.4 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Síndromes mielodisplásicas são doenças hematopoéticas clonais caracterizadas por citopenias, hematopoese ineficaz, dispoese e risco aumentado de evolução para LMA (HASLE, 2007).

A síndrome mielodisplásica é doença do idoso, com mediana de idade ao diagnóstico de 65 - 75 anos; menos de 10% dos pacientes têm idade abaixo de 50 anos. Há discreto predomínio do sexo masculino, exceto na SMD com deleção do

5q. A incidência de SMD aumenta com a idade, sendo que 86% dos pacientes são diagnosticados em idade acima de 60 anos (mediana de 76 anos). Baseado nos dados da *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), a incidência de SMD em pacientes mais jovens, com idade abaixo de 40 anos, é estimada em 0,14 por 100.000 habitantes, mas aumenta para 36 casos por 100.000 em pacientes com 80 anos ou mais (BABUSHOK; BESSLER, 2015).

A(s) causa(s) das SMD é(são) estabelecida(s) em apenas 15% dos casos, podendo ser primária ou secundária. É denominada SMD secundária quando ocorre em indivíduo com evento pre-existente e passível de causalidade, tais como: fatores ambientais (incluindo uso prévio de quimioterapia, especialmente agentes alquilantes e análogos de purina); radioterapia e tabaco; fatores ocupacionais (exposição ao benzeno e, ou pesticidas/herbicidas/fertilizantes); síndromes de falência medular congênitas; SMD familiar e anemia aplástica adquirida (HASLE, 2011; HASLE; NIEMEYER, 2011; ADÈS; ITZYKSON; FENAUXP, 2014; BABUSHOK; BESSLER, 2015). É denominada primária ou "*de novo*" quando o surgimento ocorre sem condição pre-existente associada. Geralmente, a forma primária é multifatorial e associada a dano genético acumulado, adquirido com a idade (HASLE, 2011).

Como evento funcional, a hematopoese ineficaz na SMD resulta de aumento na suscetibilidade de apoptose de progenitores mieloides, levando a citopenias, apesar de a MO se apresentar hipercelular na grande maioria dos casos (RAZA *et al.*, 1995; ADÈS; ITZYKSON; FENAUXP, 2014). Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos poderiam assim ser descritos (Figura 3):

- Sinais apoptóticos intrínsecos, como produto da alteração gênica clonal, fariam com que a(s) célula(s) lesada(s) não respondesse(m) mais aos estímulos normais de morte celular (ADÈS; ITZYKSON; FENAUXP, 2014);
- Mutações gênicas de transcrição ao RNA poderiam se desdobrar em alteração da diferenciação celular (ADÈS; ITZYKSON; FENAUXP, 2014);
- Mudanças epigenéticas (por hipermetilação ou acetilação aberrantes em DNA e, ou histonas, respectivamente) inibiriam a expressão de controladores do ciclo celular, bem como dos mecanismos de reparação do DNA (SHEN *et al.*, 2010);
- Sinais apoptóticos extrínsecos, relacionados a mecanismos imunes e de microambiente da MO, cujos nichos dos diferentes setores hematopoéticos passariam a ser morfologicamente ectópicos, traduzindo resposta

inadequada a citocinas/adесinas/fatores de crescimento normais (BLAU *et al.*, 2011; ADÈS; ITZYKSON; FENAUXP, 2014).

Desregulação imune pode ser evidenciada pelos achados de expansão clonal de célula T, especialmente em pacientes com MO hipoplásica. Este evento pode também ser evidenciado pelo uso de algumas drogas imunomoduladoras, para tratamento da SMD, pois atuam como modificadores do microambiente e do compartimento imune (KORDASTI *et al.*, 2007).

A progressão para LMA ocorre por mudança de diminuição de evento apoptótico e aumento de atividade proliferativa dos progenitores clonais. A transformação leucêmica pode ocorrer por expansão oligoclonal, monoclonal ou ainda expansão de minoria de subclones (ADÈS; ITZYKSON; FENAUXP, 2014; ZHANG; LANCET; ZHANG, 2015).

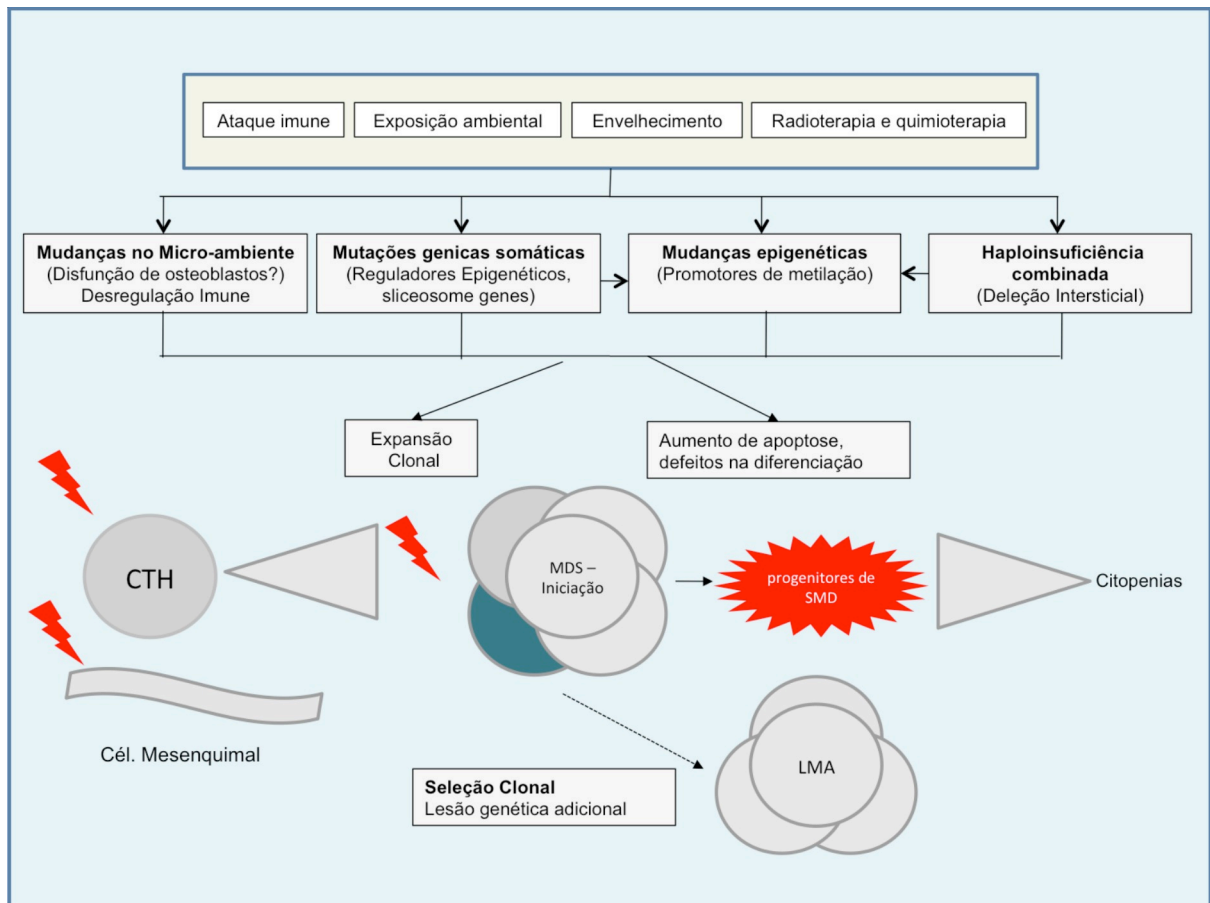


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FISIOPATOLOGIA DAS SMD

FONTE: Adaptado de Adès, Itzykson e Fenauxp (2014)

O plano geral para diagnóstico morfológico das SMD deve contemplar, em quadro clínico suspeito, achados laboratoriais no sangue periférico (hemograma completo) e avaliação da medula óssea em citologia e histologia. Associam-se a estes achados: citogenética de MO e citometria de fluxo de MO para confirmação diagnóstica, classificação morfológica e estratificação terapêutica (CANTÙ RAJNOLDI *et al.*, 2005; NIERO-MELO *et al.*, 2006; SWERDLOW *et al.*, 2008; HASLE; NIEMEYER, 2011).

2.5 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA SMD, SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) - 2008

Em 1997, um grupo de clínicos e hematologistas com experiência em morfologia de MO, reunidos com apoio da Organização Mundial de Saúde, iniciou estudos para uma nova classificação das SMD. A primeira classificação da OMS associou imunofenotipagem e genética aos parâmetros clínicos, morfológicos e citoquímicos utilizados na classificação FAB (*French-American-British*). A classificação é refinada constantemente com base em estudos clínicos e laboratoriais, sendo realizada sua última atualização em 2008, conforme resumido no quadro 1 (BORTOLHEIRO, 2006; SWERDLOW *et al.*, 2008; HASLE; NIEMEYER, 2011).

A classificação morfológica da OMS é baseada principalmente na porcentagem de blastos na medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), no tipo e grau de dispoese e na presença de sideroblastos em anel, à citologia (SWERDLOW *et al.*, 2008).

Em sangue periférico (SP) avalia-se:

- 1) Citopenia(s) sustentada(s) por 4-8 semanas;
- 2) Setor eritroide: em geral VCM acima de 100 fl, dimorfismo (dupla população), macrocitose ovalocítica, anisocitose, policromasia, poiquilocitose, pontiado basofílico, eritroblastos;
- 3) Setor granulocítico: hipogranulação e hipossegmentação (formas pelgeroides), degranulação (grosseiras e mal definidas), fragmentação da cromatina, presença de blastos (mas em número < 20%);
- 4) Monocitose (> 1000/mm³) ou promonócitos, vacuolizações ou formas grandes e (ou) bizarras;

- 5) Setor plaquetário: megaplaquetas, formas hipogranulares ou plaquetose (na síndrome 5q-).

Na caracterização da dispoese de MO deve-se reconhecer atipia em citologia quando há perda da uniformidade das células, individualmente, em relação à sua contrapartida normal, valendo-se do corte de 10% ou mais de atipia na linhagem em questão, quando da análise morfológica. Os achados de diseritropese, disgranulocitopose e dismegacariocitopose devem ser graduados em **grau 0** (ausência de displasia), **grau 1** (< 5% de displasia), **grau 2** (5 - 9% de displasia) ou **grau 3** (displasia em 10% ou mais).

Diseritropese é evidenciada principalmente por: alterações nucleares, como pontes internucleares, cariorrexis, multinuclearidade e alterações megaloblastoides. Características citoplasmáticas incluem sideroblastos em anel, vacuolização e positividade para ácido periódico de Schiff (PAS em padrão difuso ou granular) (NIERO-MELO *et al.*, 2006; SWERDLOW *et al.*, 2008).

Disgranulocitopose é caracterizada por: hipolobulação nuclear (pseudo Pelger-Hüet) e hipersegmentação, citoplasma hipogranular e presença de grânulos pseudo Chediak-Higashi (NIERO-MELO *et al.*, 2006; SWERDLOW *et al.*, 2008).

Dismegacariocitopose é caracterizada pela presença de micromegacariócitos com hipolobulação nuclear, megacariócitos de tamanho variado com núcleo não lobulado ou ainda presença de múltiplos núcleos separados no mesmo megacariócito (NIERO-MELO *et al.*, 2006; SWERDLOW *et al.*, 2008).

2.5.1 Citopenia refratária com displasia unilinhagem

Citopenia refratária com displasia unilinhagem (CRDU) é definida como displasia de uma única linhagem mielóide associada a uni ou bicitopenia em sangue periférico. CRDU pode ser: anemia refratária, neutropenia refratária, trombocitopenia refratária. Preconiza-se que exista $\geq 10\%$ de dispoese da linhagem mielóide envolvida para caracterizar este tipo de SMD. As citopenias são definidas pela presença de: hemoglobina < 10g/dL, contagem absoluta de neutrófilos menor que $1,8 \times 10^9/L$ e contagem de plaquetas abaixo de $100 \times 10^9/L$. Entretanto, níveis acima desses valores não excluem SMD; uma vez presente dispoese com alteração clonal em citogenética, o

diagnóstico de SMD é firmado (BRUNNING, *et al.*, 2008). Embora o tipo de citopenia corresponda, em geral, ao tipo de dispoese encontrada na mesma linhagem, como exemplo de anemia e diseritropoese, esta relação não é obrigatória e nem mais frequente (NIERO-MELO, *et al.*, 2006).

Antes da definição diagnóstica de CRDU, deve-se estar atento à exclusão das possíveis causas não clonais de dispoese, como toxicidade por drogas, uso de fator de crescimento de colônia de granulócitos, infecções virais, causas imunológicas, doenças congênitas, deficiências vitamínicas e deficiência de elementos essenciais como cobre. Há relatos de citopenia grave e displasia de MO devido ao uso abusivo da suplementação com zinco (BRUNNING, *et al.*, 2008).

Se não houver anormalidade citogenética detectável no início do quadro, deve-se manter observação por um período de seis meses antes do diagnóstico definitivo da SMD, a não ser que surjam critérios morfológicos mais específicos ou apareçam anormalidades citogenéticas clonais durante esse período de observação.

A presença de blastos em sangue periférico exclui o diagnóstico de CRDU. Paciente com achado de CRDU, 1% de blastos no SP e menos que 5% de blastos em MO, em duas avaliações sucessivas, deve ser categorizado como SMD inclassificável devido à incerteza da biologia desta correlação (BRUNNING, *et al.*, 2008).

Anormalidades clonais na citogenética podem estar presentes em mais de 50% dos casos de anemia refratária. As anormalidades clonais encontradas podem ser variadas e auxiliam na confirmação do diagnóstico desta SMD. Entre as anormalidades encontradas, incluem-se: deleção do braço longo do cromossomo 20; trissomia do cromossomo 8; e anormalidades envolvendo cromossomo 5 e (ou) 7. O número de casos com trombocitopenia refratária e neutropenia refratária relatados na literatura é muito pequeno para definir associações a anormalidades citogenéticas (BRUNNING, *et al.*, 2008).

2.5.2 Anemia refratária com sideroblastos em anel

Sideroblasto em anel representa um precursor eritróide com acúmulo anormal de ferro no interior das mitocôndrias formando os grânulos ao redor no núcleo. São definidos pela presença de 5 ou mais grânulos ao redor de 1/3 ou mais

do núcleo do eritroblasto ou arco de 1/3 ou mais ao redor da circunferência nuclear (HASSERJIAN *et al.*, 2008).

Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) é um tipo de SMD caracterizada por anemia, diseritropoese e sideroblastos em anel presentes em proporção de 15% ou mais dos precursores eritroides da MO. Não há displasia significativa nas demais linhagens. Mieloblastos podem estar presentes em menos de 5% das células nucleadas da MO, mas ausentes no SP (HASSERJIAN *et al.*, 2008).

Os pacientes apresentam anemia normocrômica macrocítica ou normocrômica normocítica. As hemácias no SP podem apresentar padrão dismórfico com população maior de hemácias normocrômicas e outra população menor hipocrômica.

Citologia de MO evidencia aumento de precursor eritroide com diseritropoese, incluindo: lobulação nuclear e característica megaloblastoide. Encontram-se macrófagos abundantes com hemossiderina em seu interior (siderófagos). Os mieloblastos, quando presentes na MO, estão em número menor do que 5% das células nucleadas totais. Na coloração de Perls há evidência de sideroblastos em 15% ou mais dos eritroblastos. A histologia de MO pode ser normocelular ou hipercelular com proliferação eritroide. Os megacariócitos são normais em número e na morfologia (HASSERJIAN *et al.*, 2008).

Causas não neoplásicas de sideroblastos em anel devem ser excluídas: etilismo, exposição a toxinas (benzeno), drogas (isoniazida), administração de zinco, deficiência de cobre e anemia sideroblástica congênita (HASSERJIAN *et al.*, 2008).

Anormalidades citogenéticas clonais estão presentes em 5-20% dos casos de ARSA e quando presentes geralmente envolvem um único cromossomo (HASSERJIAN *et al.*, 2008).

2.5.3 Citopenia refratária com displasia multilinhagem

Citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDM) é um tipo de SMD definida pela presença de uma ou mais citopenias associadas à dispoese em duas ou mais linhagens mielóides: eritróide, granulocítica ou megacariocítica. Pode apresentar menos de 1% de blastos em SP e menos de 5% de blastos em MO; bastonetes de Auer estão ausentes e o número de monócitos no SP deve ser menor do que $1 \times 10^9/L$. A

dispoese deve estar presente em 10% ou mais das células das linhagens envolvidas (BRUNNING, *et al.*, 2008).

Casos com displasia multilinhagem, mas com presença de 2 a 4% de blastos no SP, com < 5% de blastos em MO e ausência de bastonetes de Auer, devem ser classificados como anemia refratária com excesso de blastos tipo 1 (AREB-1). Casos com 1% ou menos de blastos em SP e 5% ou menos de blastos em MO, mas presença de bastonetes de Auer, devem ser classificados como anemia refratária com excesso de blastos tipo 2 (AREB-2); alguns casos de CRDM podem apresentar mais de 15% de sideroblastos em anel, mas a presença de blasto impõe-se como critério dominante (BRUNNING, *et al.*, 2008).

As anormalidades citogenéticas mais frequentemente encontradas na CRDM são: trissomia do cromossomo 8, monossomia do cromossomo 7, del (7q), monossomia do cromossomo 5, del (5q), del (20q) e cariótipo complexo. Podem estar presentes em mais de 50% dos pacientes com CRDM (BRUNNING, *et al.*, 2008).

2.5.4 Anemia refratária com excesso de blastos

É um tipo de SMD na qual há presença de 5 a 19% de mieloblastos na MO ou 2-19% de blastos no SP. Devido à diferença entre sobrevida e incidência na evolução para LMA, duas categorias foram reconhecidas: AREB-1 (5 - 9% blastos em MO ou 2 - 4% blastos em SP) e AREB-2 (10 - 19% de blastos em MO ou 5 - 19% de blastos no SP). A presença de bastonetes de Auer qualifica a SMD como AREB-2, independente da porcentagem de blastos. No hemograma frequentemente se observa envolvimento das três linhagens mielóides. A análise de MO geralmente apresenta-se hiper celular. A granulocitopoese é frequentemente aumentada mostrando graus variáveis de dispoese. Os megacariócitos tendem a *cluster* com dimegacariocitopoese quase sempre presente. Na biópsia de MO há uma tendência a deslocamento do setor eritróide e megacariocítico para a área paratrabecular, habitualmente ocupada pelo setor granulocítico. Os blastos na AREB frequentemente formam *cluster* ou agregados que, em geral se localizam longe do osso trabecular e estruturas vasculares: *abnormal localization of immature precursors* (ALIP), marcados na imunohistoquímica com CD34. Aproximadamente 25% dos casos de AREB-1 e 33%

dos casos de AREB-2 progridem para LMA. A sobrevida é de aproximadamente 16 meses para AREB-1 e 9 meses para AREB-2 (ORAZI *et al.*, 2008).

Uma porcentagem variável de casos de AREB (30 - 50%) apresentam anormalidades citogenéticas clonais, incluindo trissomia do cromossomo 8, monossomia do 5, deleção do braço longo do cromossomo 5 (5q-), monossomia do 7, deleção do 7 (7q) e deleção do 20 (20q). Cariótipo complexo também pode estar presente nesta SMD (ORAZI *et al.*, 2008).

2.5.5 Síndrome mielodisplásica inclassificável

É o tipo de SMD que, inicialmente, não apresenta os critérios morfológicos necessários para ser classificada como qualquer outro tipo de SMD. Há três possibilidades diagnósticas de SMD inclassificável:

- 1) Pacientes com achados morfológicos de CRDU ou CRDM que apresentam 1% de blastos em SP.
- 2) Casos de CRDU associado à pancitopenia no SP; na CRDU, o paciente deve apresentar uni ou bicitopenia.
- 3) Pacientes com citopenia persistente e presença de 1% de blastos em SP e menos de 5% na MO apresentando dispoese em menos de 10% das células em uma ou mais linhagens (ORAZI *et al.*, 2008).

2.5.6 SMD com deleção do braço longo do cromossomo 5

É caracterizada por anemia com ou sem outra citopenia associada à trombocitose, na qual a única anormalidade citogenética associada é a del (5q). Mieloblastos podem estar presentes, mas em número abaixo de 5% das células nucleadas totais da MO e menos de 1% no SP. Os mieloblastos não apresentam bastonetes de Auer. Ocorre frequentemente em mulheres, na faixa etária dos 60 anos de idade (HASSERJIAN *et al.*, 2008).

TIPO	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
Citopenia refratária com displasia unilinhagem (anemia refratária; neutropenia refratária; trombocitopenia refratária)	Uma ou duas citopenias; nenhum ou blastos <1%	≥10% de displasia de uma linhagem, <5% de blastos e <15% SA
Anemia refratária com sideroblasto em anel	Anemia; ausência de blastos	≥15% SA; displasia eritroide isolada e <5% blastos
Citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDM)	citopenia(s) <1% blastos, monocitos <1x10 ⁹	Displasia em ≥10% das células de duas ou mais linhagens, <5% de blastos com ou sem ≥15% SA
Anemia refratária com excesso de blastos – 1 (AREB-1)	Bi ou pancitopenia Blastos <5%	Displasia uni ou multilinhagem 5% - 9% de blastos
Anemia refratária com excesso de blastos – 2 (AREB-2)	Bi ou pancitopenia Blastos 5% a 19% Monócitos, 1000/mm ³	Displasia uni ou multilinhagem 10% - 19% de blastos
Síndrome mielodisplásica inclassificável	pancitopenia; <1% blastos	Displasia <10% das células em uma ou mais linhagens acompanhada por anormalidade citogenética; <5% blastos
SMD associada a del(5q)	Anemia; plaquetas normais ou aumentadas; nenhum ou raros blastos (<1%)	Megacariócitos em número normal ou aumentado com núcleo hipolobulado; <5% blastos; anormalidade citogenética del(5q); ausência de bastonetes de Auer

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DA SMD, CONFORME OMS

FONTE: Adaptado de Adès, Itzykson e Fenauxp (2014)

2.6 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA NA INFÂNCIA

A SMD e a doença mieloproliferativa são muito raras em crianças. Correspondem a menos de 5% de todas as neoplasias hematológicas malignas em pacientes menores de 14 anos de idade, com incidência anual de 1 a 8 por milhão de crianças em idade entre 0 e 14 anos. Há distribuição igual em relação ao sexo com mediana de idade ao diagnóstico variando entre 6 e 8 anos de idade (HASLE; NIEMEYER, 2011).

Há diferenças significativas entre a SMD da criança e a do adulto, incluindo características morfológicas, achados de citogenética e fatores prognósticos específicos. A classificação da OMS, assim como a FAB, foi criada para pacientes adultos e não reconheceu características especiais para a SMD na criança. A classificação da FAB teve impacto prognóstico na criança e facilitou a comunicação entre pediatras, mas falhou em relação a características morfológicas específicas e associação a síndromes genéticas. Em 2001, a classificação de SMD da OMS incorporou achados de citogenética associados à morfologia e alterou o número de blastos de 30 para

20% na distinção entre SMD e LMA, embora não haja dados indicando que o número de blastos de 20% ao diagnóstico de LMA tenha melhor significado que o tradicional 30%. O subtipo anemia refratária com sideroblastos em anel da OMS é extremamente raro em crianças e a síndrome 5q- é ausente na pediatria. O significado de displasia multilinhagem em crianças também é desconhecido (MUFTI *et al.*, 2008; NIEMEYER; BAUMANN, 2011; BAUMANN *et al.*, 2012).

A primeira alteração pediátrica da classificação da OMS para SMD, em 2003, subdividiu SMD em citopenia refrataria da infância (blastos < 2% no SP e blastos < 5% na MO), anemia refratária com excesso de blastos (blastos 2 - 19% no SP e (ou) blastos 5 - 19% na MO), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (blastos em SP e (ou) MO entre 20 - 29%) (HASLE *et al.*, 2003).

A última versão da classificação da OMS para doenças hematológicas malignas, em 2008, dividiu a SMD e a doença mieloproliferativa da criança em três grupos: SMD, leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) e leucemias mielóides da síndrome de Down, excluída da classificação de SMD da criança (BAUMANN, *et al.*, 2008).

A SMD na infância, que apresenta dois a 19% de blastos no SP ou cinco a 19% de blastos na MO, deve ser categorizada segundo os critérios diagnósticos de AREB do adulto, excluindo-se o subtipo AREB em transformação. O número de blastos analisado isoladamente não é suficiente para diferenciação entre SMD e LMA; deve ser analisado conjuntamente a características clínicas, curso natural da doença, morfologia, imunofenótipo e citogenética (MUFTI *et al.*, 2008).

A anemia isolada, principal manifestação hematológica da anemia refratária em adultos, é incomum em crianças, que apresentam frequentemente plaquetopenia, neutropenia ou ambas. A hipocelularidade de MO é mais observada na criança com SMD quando comparada à MO de adultos com SMD. Assim, na última classificação da OMS em 2008, criou-se a entidade denominada Citopenia Refrataria da Infância (CRI).

A CRI é definida como citopenia persistente com possibilidade de presença de blastos, mas em porcentagem menor que 2% no SP e menor que 5% na MO. Deve haver dispoese em duas ou mais linhagens mielóides ou dispoese em uma única linhagem com contagem de 10% de dispoese. Em relação à linhagem megacariocítica, deve avaliar-se o maior número possível, mas sua ausência não exclui o diagnóstico de CRI. Embora a dispoese faça parte dos critérios diagnósticos na definição morfológica desta SMD, ela é apenas um dos critérios morfológicos para se firmar o diagnóstico

de CRI. A adequada avaliação da histologia é indispensável ao diagnóstico, pois 75% das crianças apresentam hipocelularidade de MO (BAUMANN, *et al.*, 2008).

CRI é o subtipo mais frequente de SMD na criança, corresponde a 50% dos casos; o diagnóstico pode ser visto em todas as faixas etárias e de frequência igual em meninos e meninas. Cerca de três quartos dos pacientes apresentam contagem de plaquetas abaixo de 150 mil/ μ L; neutropenia está presente na metade dos casos e anemia, em menos da metade dos pacientes com CRI (NIEMEYER; BAUMANN, 2011).

A distinção entre os subtipos CRDM e CRI com dispoese de duas ou mais linhagens não foi estabelecida na SMD da criança. A recomendação atual é que crianças que apresentam critérios diagnósticos para CRDM sejam classificadas como CRI até que estudos mostrem se existe diferença prognóstica conforme o número de linhagens envolvidas (NIEMEYER; BAUMANN, 2011).

Pacientes com monossomia do cromossomo 7 ou cariótipo complexo têm uma elevada probabilidade de progressão quando comparados a pacientes com outras anormalidades ou cariótipo normal, sendo considerado um fator prognóstico importante na SMD avançada da infância. Há relatos de citopenia com monossomia do cromossomo 7 em lactentes com desaparecimento espontâneo. Em contraste a esta anormalidade citogenética, a trissomia do cromossomo 8 ou cariótipo normal tem um curso de doença longo e estável (SWERDLOW *et al.*, 2008).

O sistema de escore prognóstico internacional para SMD (*International Prognostic Scoring System – IPSS*) é baseado em número de blastos, citopenia e citogenética. A criança apresenta características de alto risco com maior frequência quando comparada ao adulto. Na criança, a presença de plaquetopenia e blastos > 5% na MO está associada com pior sobrevida, enquanto citopenia de 2 ou 3 linhagens e anormalidade citogenética na maioria dos casos não traz informação prognóstica. Adolescentes e pacientes com cariótipo complexo apresentam pior prognóstico. Então, o IPSS fornece informações limitadas para SMD da infância (HASLE; NIEMEYER, 2011).

Deve-se distinguir a apresentação da SMD da infância entre primária ou *de novo* da secundária. Em crianças uma variedade de doenças não hematológicas pode dar origem a SMD secundária, mimetizando CRI como: infecção viral, deficiência nutricional, doenças metabólicas. Na ausência de marcadores citogenéticos, o curso

clínico deve ser analisado cuidadosamente antes de firmar o diagnóstico de CRI (BAUMANN, *et al.*, 2008).

Os diagnósticos diferenciais mais frequentes são: anemia aplástica adquirida, síndromes de falências de medula óssea hereditárias e hemoglobinúria paroxística noturna. Devido à hipocelularidade, pode haver dificuldade na distinção entre CRI e anemia aplástica adquirida na infância. Na anemia aplástica adquirida, há presença de número aumentado de adipócitos nos espaços medulares com células mieloides esparsas; há ausência de ilhotas eritroblásticas, ausência de dispoese granulocítica ou micromegacariócitos. Ao contrário da anemia aplástica adquirida do adulto, na criança não se observam características megaloblásticas da MO (MUFTI *et al.*, 2008; BAUMANN *et al.*, 2012).

As síndromes de falência medular congênitas como Anemia de Fanconi, Disceratose congênita, síndrome de Schwachman-Diamond, púrpura amegacariocítica mostram uma sobreposição de características morfológicas com a CRI. Por isso deve-se analisar conjuntamente a exame físico minucioso, história clínica, achados laboratoriais e alterações de citogenética (convencional e molecular) antes de se firmar o diagnóstico de CRI (SWERDLOW *et al.*, 2008; BABUSHOK; BESSLER, 2015).

Enquanto a forma de SMD esporádica está associada ao idoso, a SMD em crianças, jovens e adultos de meia-idade está associada à exposição a agentes citotóxicos e às Síndromes de predisposição genética (SMD secundária). Em adição às Síndromes de Falência Medulares clássicas como AF e Disceratose congênita (DC), houve surgimento, nos últimos anos, das síndromes de predisposição familiar a SMD/LMA, causadas por mutações dos genes *GATA2*, *RUNX1*, *CEBPA* e *SRP72* (BABUSHOK; BESSLER, 2015).

O diagnóstico de uma síndrome de predisposição genética em um paciente com SMD pode ter implicações práticas imediatas como: decisão do melhor tratamento da SMD (como indicação precoce de um TCTH e definição do regime de condicionamento a ser utilizado para este procedimento e seleção do melhor doador); definição de predisposição ao câncer (CA) e quais tipos de CA mais frequentemente associados à síndrome em questão objetivando prevenção e diagnóstico precoce; realização do aconselhamento genético para paciente e sua família (BABUSHOK; BESSLER, 2015).

É sabido que algumas síndrome de falência medular hereditária, como AF, apresentam maior citotoxicidade às terapias quimioterápica e radioterápica. Sendo

assim, devido ao risco relacionado à toxicidade do tratamento se terapia inapropriada, todo diagnóstico de SMD em criança ou adultos abaixo de 50 anos de idade sem história de tratamento químico ou radioterápico prévio, deve ter investigação direcionada para síndromes genéticas de falência medular e de predisposição familiar, utilizando testes para AF, DC e haploinsuficiência *GATA2*. Com aumento da integração de testes moleculares e sequenciamento *next-generation* na prática clínica, espera-se que mais adultos sejam diagnosticados com SMD associado a síndromes de predisposição familiar (BABUSHOK; BESSLER, 2015).

2.7 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA NA ANEMIA DE FANCONI

O número de publicações sobre SMD na AF é escasso, com quase uma década de diferença entre as três publicações relevantes sobre os achados morfológicos desta associação. Dados de incidência de SMD em AF são esparsos e variam de 11 a 34% dependendo da idade da população analisada (BUTTURINI *et al.*, 1994; ALTER *et al.*, 2000; CIOC *et al.*, 2010). Os critérios morfológicos para caracterizar a SMD na AF não estão bem estabelecidos na literatura (ALTER *et al.*, 2000; CIOC *et al.*, 2010).

Butturini *et al.* (1994) definiram SMD apenas na presença de mieloblastos em 5 a 30% das CNT na MO ou 5 a 20% das CNT no SP; este critério foi estabelecido para afastar a subjetividade do observador ao diagnóstico da SMD. Com a MO com características de dispoese, os casos foram pontuados, mas não classificados como SMD. A SMD foi diagnosticada em 8,7% dos pacientes (n = 34). A SMD foi a manifestação hematológica inicial em 13 casos. A mediana de idade ao se detectar a SMD foi de 13 anos. Relataram risco de desenvolver SMD ou LMA até os 40 anos de idade, de 52% (37 a 67%) (BUTTURINI *et al.*, 1994).

Alter *et al.* (2000) analisaram a MO de 41 pacientes com AF, objetivando caracterizar a morfologia da SMD como variável independente, sugerindo como preditor isolado mais importante para prognóstico adverso. Dois hematologistas analisaram a MO para diminuir a subjetividade do estudo. As características morfológicas da SMD foram analisadas conforme achados específicos para cada linhagem. Os achados de diseritropoese foram: megaloblastose, multinuclearidade, fragmentação nuclear, aumento

de eritroblastos imaturos e sideroblastos em anel. Os achados de disgranulocitopoese foram: aumento de formas imaturas, hipo ou hipergranulação e hipossegmentação. Os achados de dismegacariocitopoese foram: megacariócitos pequenos, hipo ou hiperlobulados ou aumento na razão núcleo citoplasma.

A dispoese foi considerada como critério maior para SMD, quando ao menos duas linhagens apresentassem no mínimo 20% de dispoese nas CNT; O critério intermediário foi estabelecido quando apenas uma linhagem apresentasse dispoese. Critérios menores foram estabelecidos se na análise de colorações específicas da MO apresentasse: negatividade para mieloperoxidase neutrofílica (MPO); positividade de estearase (DE); positividade para ácido periódico de Schiff (PAS) ou presença de sideroblasto em anel em número $\geq 15\%$. O diagnóstico morfológico de SMD foi firmado apenas na presença de um critério maior ou um intermediário associado a um menor. Como nesse estudo não foi possível analisar MPO, DE ou PAS, foi considerado diagnóstico morfológico de SMD apenas quando a dispoese esteve presente em duas linhagens.

A idade da primeira avaliação da MO dos 41 pacientes com AF variou de 2,5 anos a 37 anos; A SMD morfológica esteve presente em 32% dos pacientes com AF (n=13); A SMD foi observada na primeira análise da MO em apenas três casos. O intervalo entre o diagnóstico e o aparecimento da SMD variou de 1 a 7 anos (mediana de 2 anos). Entre os 28 casos restantes que não apresentaram SMD, o seguimento foi perto de dez anos (mediana de 4 anos). Oito dos 13 casos de AF (62%) com SMD morfológica, morreram dentro de cinco anos da detecção da SMD morfológica; apenas dois dos 28 casos sem SMD morreram dentro do primeiro ano de seguimento (7%). A probabilidade de sobrevida em cinco anos após a presença da SMD morfológica foi de apenas 0,09, já na ausência da SMD, a probabilidade de sobrevida foi de 0,92. A taxa de morte por SMD foi significativamente maior quando comparada ao grupo sem SMD ($p = 0,001$). Os resultados sugeriram que a presença de SMD morfológica foi associada a pior prognóstico e foi mais importante que a presença do clone citogenético. Quando os pacientes apresentaram ambos, SMD morfológica e clone citogenético, o prognóstico foi ainda pior (ALTER *et al.*, 2000).

Apenas um estudo detalhou a classificação morfológica para a SMD na AF: Cioc *et al.* utilizaram a classificação da OMS de 2008, modificando alguns aspectos morfológicos direcionados ao paciente com AF e correlacionaram com achados da citogenética molecular, objetivando diagnosticar a SMD em uma coorte de 119

pacientes com AF. Consideraram achados de diseritropoese na presença de: lobulação nuclear, pontes intercitoplasmáticas, cariorrexis e fragmentação nuclear, ponte intercromatínica (internuclear), multinuclearidade, núcleo megaloblastoide, assincronismo núcleo-citoplasma e presença de vacuolização eritroblástica. A disgranulocitopose foi considerada quando presentes: deficiência ou ausência de granulação secundária, hipossegmentação nuclear (pseudo-Pelger-Huët) e hipersegmentação. Estando o paciente em uso de fator de crescimento de granulócitos (G-CSF), os achados de defeito na segmentação nuclear em associação a citoplasma hipergranular foram documentados, mas não pontuados, uma vez identificada a relação destes achados ao uso de G-CSF. Os blastos na MO foram graduados em: **0**, abaixo de 1%, **1**, presentes entre 1 e 4%, **2**, entre 5 e 9%; e **3**, entre 10 e 19%. A identificação de blastos circulantes sem a presença de blastos na MO dos pacientes em uso de G-CSF não foi considerada evidência de SMD. Em relação à dismegacariocitopose incluíram microformas com núcleos não lobulados ou bilobulados ou vários tamanhos com núcleos não lobulados ou ainda múltiplos (CIOC *et al.*, 2010).

Graduaram dispoese segundo critérios da OMS modificados. Como a presença da diseritropoese é um achado frequente na AF, para o setor eritroide, os **graus 0, 1 e 2** seguiram o mesmo *cutoff* (ponto de corte) da OMS. Diseritropoese **grau 3** foi definida pela presença de 10 - 49% de dispoese nas células eritroides e **grau 4** com 50% ou mais de dispoese neste setor. Para linhagem granulocítica e megacariocítica, achados de dispoese foram codificados e graduados como: **grau 0**, ausência de dispoese; **grau 1**, dispoese presente nas células em número abaixo de 5%; **grau 2**, na presença de 5 a 9% de dispoese celular; **grau 3**, presença de dispoese em 10% ou mais de células analisadas. Para graduação de dispoese ao menos 200 precursores eritróides e 100 neutrófilos (e precursores) foram analisados (CIOC *et al.*, 2010).

As categorias diagnósticas foram estabelecidas em: não-SMD, SMB *borderline* e SMD. Quando presente, a SMD foi classificada de acordo com critérios da OMS. A diseritropoese isolada foi considerada para o diagnóstico de SMD (Anemia Refratária) em AF se **grau 4**. Nenhum diagnóstico de SMD foi baseado exclusivamente na presença de diseritropoese. A presença de diseritropoese **grau 3** (> 10%) foi utilizada como parte de critério para classificar SMD. A categoria *borderline* foi utilizada para casos nos quais achados morfológicos de MO foram marginais: **grau**

1 a 3 de diseritropoese acompanhados de **grau 1 a 2** de disgranulocitopoese ou **grau 2** de dismegacariocitopoese, mas sem aumento de blastos (CIOC *et al.*, 2010).

A diseritropoese foi encontrada em 93,7% dos 111 casos analisados; os achados mais comuns foram: núcleo de contorno irregular, pontes nucleares e cariorrexis; em 72 (69,2%) dos 104 casos, a diseritropoese foi a única linhagem envolvida por dispoese. Dezoito pacientes apresentaram **grau 3** de dispoese. **Grau 4** detectado em 2 pacientes; ambos com mais de 15% de SA e 1 deles ainda teve dismegacariocitopoese associada. Aumento de SA foi detectado em 21 casos (18,9%): 15 pacientes tiveram 1 a 6% de SA e 6 tiveram 17 - 42% de SA (CIOC *et al.*, 2010).

Em 23 casos (20,7%) houve dismegacariocitopoese caracterizada por: microformas hipolobuladas ou normolobuladas. Dismegacariocitopoese **grau 1** foi identificada em cinco casos, **grau 2** em cinco casos e **grau 3** em 13 casos (CIOC *et al.*, 2010).

Disgranulocitopoese foi detectada em 15 pacientes (13,5%): **grau 1** em quatro, **grau 2** em dois e **grau 3** em nove casos. Os achados mais frequentes de dispoese neste setor foram: hipogranularidade ou ausência de grânulos nos neutrófilos e precursores e hipossegmentação neutrofílica (pseudo-Pelger-Huët). Dos nove casos com aumento do número de blastos, cinco apresentaram 1,5 a 3% de blastos, três tiveram 5 - 7% e 1 com 18%. Um paciente apresentou 4% de blastos circulantes, sem uso de G-CSF e **grau 3** de disgranulocitopoese, mas ausência de blastos na MO (CIOC *et al.*, 2010).

Dos 111 casos, 23 (20,7%) foram diagnosticados com SMD e cinco (4,5%) SMD *borderline*. Em 83 casos os achados morfológicos foram insuficientes para diagnosticar SMD e foram classificados como não-SMD. Síndrome mielodisplásica foi subclassificada em: Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM) em 13 casos; Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo 1 (AREB-1) em quatro casos; Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo 2 em um paciente e Anemia Refratária com SA em três casos e SMD Inclassificável em dois casos (CIOC *et al.*, 2010).

Anormalidade clonal esteve presente em 36 pacientes (32,4%). A presença de anormalidade clonal foi altamente associada ($p < 0,001$) com a presença de SMD, dos 23 casos de SMD, 22 (95%) apresentaram anormalidade clonal; quatro dos cinco casos com SMD *borderline* apresentaram anormalidade clonal. A presença do clone anormal foi associada a um risco de 73 vezes para SMD e 26 vezes para os casos de

SMD *borderline*; nos 83 pacientes sem SMD, 73 (88%) não apresentaram anormalidade clonal. A relação entre SMD e anormalidade clonal diferiu significativamente entre os diferentes parâmetros morfológicos: 100% dos pacientes com qualquer grau de disgranulocitopoese ou aumento de blastos na MO apresentaram anormalidade cromossômica ($p < 0,01$) comparado a 83% dos pacientes com dismegacariocitopoese ($p < 0,01$), 71% dos casos com SA ($p < 0,01$) e 33% dos casos com diseritropoese ($p = 0,97$); não houve associação significativa entre anormalidade específica de citogenética com achado específico da morfologia de SMD ou SMD *borderline* (CIOC *et al.*, 2010).

Yoshimi *et al.*, em 2013, analisaram retrospectivamente uma coorte de 117 crianças com morfologia de CRI, com MO hipo/normocelular e citogenética normal ou inadequada para análise; as crianças foram provenientes do *European Working Group of MDS in Children* (EWOG-MDS) e o propósito do estudo foi estimar a prevalência da AF nesta coorte. Encontraram 17 crianças (14,5%) com CRI portadoras de AF. Sete pacientes (6%) foram diagnosticados com AF por apresentarem fenótipo da síndrome e apenas um paciente foi diagnosticado por ter um irmão com AF; nove pacientes (8%) foram diagnosticados pelo DEB teste na presença de citopenia. Concluíram que a realização do DEB teste é mandatória para crianças que têm CRI (YOSHIMI *et al.*, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DO ESTUDO

Estudo observacional descritivo quantitativo com coleta de dados retrospectiva e prospectiva, que incluiu pacientes com AF procedentes do ambulatório de AF do HC-UFPR, Curitiba-PR, no período de janeiro 2008 a junho de 2010. Foram selecionados aleatoriamente para a realização da análise de MO (citologia e histologia) apresentando ou não citopenia.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Ter o diagnóstico de Anemia de Fanconi, confirmado pelo teste de hipersensibilidade cromossômica ao diepoxibutano (DEB teste) e/ou estudo de mutações;
- Não ter sido submetido a transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) antes da realização da análise de MO;
- Ter disponíveis o material de MO para avaliação morfológica (citologia e histologia) e os dados de citogenética convencional realizados da mesma amostra de MO;
- Ter disponíveis os dados hematimétricos no mesmo momento da análise de MO.

3.3 CASUÍSTICA

O Ambulatório de Anemia de Fanconi do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná realiza mais de 300 atendimentos por ano, com uma média de 30 pacientes com AF novos/ano.

Cinquenta e cinco pacientes foram elegíveis ao estudo. Os pacientes foram encaminhados ao Ambulatório de Anemia de Fanconi por apresentarem alterações hematológicas, malformações congênitas consistentes com AF e história familiar da doença. Informações clínicas e demográficas foram obtidas dos prontuários, autorizadas pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC-UFPR.

Foi realizada análise retrospectiva de citologia (mielograma) e histologia (biópsia de MO) de 58 amostras de medula óssea de 55 pacientes AF no período de janeiro de 2008 a junho de 2010.

A pesquisa atendeu aos preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Saúde. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, de acordo com Resolução n.º 196, de 10 de outubro de 1996, e n.º 251, de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. O estudo foi liberado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

3.4 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

O momento da avaliação da MO ocorreu ao diagnóstico em 18 amostras e o restante durante a evolução da doença. A mediana de idade na avaliação da MO foi de 9,5 anos (variou de 3,3 anos a 28 anos). Quarenta e sete pacientes apresentaram citopenias em graus variáveis ao diagnóstico; 17 deles plaquetopenia isolada. Onze pacientes apresentaram hemograma normal ao diagnóstico, destes, oito pacientes foram diagnosticados com AF pela suspeita clínica devido à baixa estatura e a estigmas genéticos da síndrome; em três casos o diagnóstico foi firmado pelo fato de os pacientes terem irmão afetado pela mesma doença (probando).

As características clínicas, hematimétricas e moleculares estão contidas na Tabela 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HEMATIMÉTRICAS E MOLECULARES

VARIANTES	PACIENTES	
	n	%
Idade		
<10 anos	30	56,3
≥10 anos	25	43,7
Sexo		
Feminino	25	45,5
Masculino	30	54,5
Consanguinidade ⁽¹⁾		
Ausente	40	72,7
Presente	15	27,3
Número de malformações ⁽²⁾		
Limitadas	38	69,0
Extensas	17	31,0
Citopenia		
Ausência de citopenia	1	1,7
Citopenia leve	27	46,5
Citopenia moderada	13	22,4
Citopenia grave	17	29,4
Subtipos genéticos da AF		
Não identificado na triagem	28	51,0
FANCA	23	41,8
FANCG	3	5,4
FANCC	1	1,8

FONTE: O autor (2015)

(1) Dados sobre consanguinidade foram obtidos da história clínica dos prontuários;

(2) Malformações congênitas foram classificadas em limitadas quando < que três locais anatômicos estavam envolvidos e como malformações extensas quando ≥ três locais estavam envolvidos, devendo envolver pelo menos um órgão interno (GUARDIOLA *et al.*, 2000).

3.5 ANÁLISE DOS DADOS HEMATIMÉTRICOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Todos os pacientes do estudo realizaram hemograma no mesmo dia da coleta de medula óssea. Esses hemogramas foram analisados pelo laboratório de Hematologia do HC-UFPR, por meio dos analisadores SIEMENS^R modelo XE-2100D e XT-2000i, durante os anos de 2008 e 2009; em 2010 utilizou-se analisador SIEMENS^R modelo Advia 2120. As lâminas foram revisadas pelos bioquímicos e técnicos com competência nesta área, já treinados, seguindo as normas-padrão do aparelho.

Para o presente estudo foram analisados os dados hematimétricos referente a citopenias, porcentagem de reticulócitos, monócitos e eventual presença de blastos. O RDW, porcentagem de variação de volumes das hemácias (do inglês, *Red Cell Distribution Width*: RDW), foi utilizado para a quantificação da anisopoiquilocitose, que foi graduada em: grau 1 (RDW = 15 - 16); grau 2 (RDW = 17 - 20); grau 3 (RDW > 20).

A citopenia foi classificada em três categorias, de acordo com o nível de hemoglobina, contagem absoluta de neutrófilos e contagem de plaquetas definidas na Tabela 2.

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DA CITOPENIA

	CLASSIFICAÇÃO		
	Leve	Moderado	Grave
Contagem absoluta de neutrófilos/ μL	≥ 1000	< 1000	< 500
Contagem de plaquetas, $10^3/\mu\text{L}$	≥ 50	< 50	< 30
Hemoglobina, g/dL	≥ 8	< 8	< 8

FONTE: Adaptado de Cioc *et al.* (2010)

3.6 ANÁLISE DA MEDULA ÓSSEA

Para realização do procedimento de coleta de MO, os pacientes foram primeiramente submetidos à sedação com midazolam intravenoso na dose de 0,1-0,2mg/kg e cetamina intravenosa na dose de 1-2mg/kg; posicionados em decúbito lateral com flexão dos joelhos; submetidos à antisepsia de crista ilíaca posterior, em área pertinente; receberam anestesia local com lidocaína 2% sem vasoconstritor, contemplando pele e periósteo.

Realizou-se primeiramente a aspiração do espaço medular, com agulha própria. Do material aspirado, coletaram-se primeiramente 1ml de MO para realização das extensões (esfregaço). A seguir, coletou-se mais 5ml, em agulha heparinizada (5.000UI/ml), para análise de citogenética convencional.

Num segundo tempo, a biópsia de MO foi realizada pela agulha de Jamshidi, através do mesmo orifício de entrada, mas alocou-se mais distante ao lado do local aspirado, assegurando que o fragmento de MO não fosse da área aspirada. Coletou-se fragmento cilíndrico (ao redor de 2mm de diâmetro e 20 - 30mm de comprimento) de osso medular por meio desta agulha, alocando-o em frasco contendo formalina a 10% e processado no serviço de Patologia para preparo (fixação/descalcificação/corte) do material e confecção das lâminas, segundo a rotina do Departamento de Patologia.

As lâminas da extensão receberam a coloração de Wright – Giemsa e para avaliação de ferro medular realizado coloração de Perls (hemossiderina) no laboratório de Hematologia do HC-UFPR (Anexo 2).

A análise deste material foi padronizada baseado em uma lista de achados morfológicos que se encontra no formulário. O objetivo desta padronização foi disciplinar a análise setorizada no sentido de evitar a subjetividade. Este formulário foi construído segundo experiência pessoal da Professora Ligia Niero-Melo que possui longa e reconhecida experiência em morfologia. O registro da análise das extensões atendeu à sequência a seguir:

- a) qualidade da coloração das extensões no sentido de avaliar a potencialidade de um exame acurado;
- b) representatividade do material: presença de, no mínimo, três espículas grandes (pequenos fragmentos de partículas de MO mais densamente povoadas) ou cinco espículas pequenas, com trilhas (pela carreira de células mais densamente colocadas e que se segue às espículas);
- c) celularidade: foi definida como aplásica, hipocelular, normocelular ou hipercelular;
- d) número de células avaliado e que representou a amostra; no caso, como as amostras são *per se* hipocelulares, foram avaliadas em toda sua extensão;
- e) reconhecimento de **atipia em citologia**: quando há perda da uniformidade das células, individualmente, em relação à sua contrapartida normal (isto é, reconhecimento de uma célula como pertencente a determinado setor e estágio maturativo, mas esta mostra-se diferente do contexto tido como desenvolvimento normal e fisiológico). Foi considerada presença de atipia quando houve $\geq 10\%$ de células com algum grau de atipia na linhagem em questão. Os achados de diseritropese, disgranulocitopose e dismegacariocitopose foram graduados em **grau 0** (ausência de displasia), **grau 1** ($< 5\%$ das células do setor), **grau 2** (entre 5 - 9% das células do setor) ou **grau 3** ($\geq 10\%$ das células do setor).
- f) o Setor Eritróide foi avaliado considerando-se a ocorrência $\geq 10\%$ de:
 - **Celularidade**, definida entre: hipoplásica, normoplásica ou hiperplásica e sua relação numérica com granulócitos (RGE);
 - **Retardo maturativo**: quebra da maturação normal, definida pelo grau de hemoglobinizacão; ou seja, considera-se normal quando há hemoglobinizacão sequencial entre os estágios de eritroblastos basofílicos – menos hemoglobinizados, e ortocromáticos – mais hemoglobinizados, com predomínio de formas menos

hemoglobinizadas. O retardo maturativo quebra esta sequência, com acúmulo em fases basofílica/policromática;

- **Assincronismo maturativo núcleo-citoplasmático:** não há correspondência entre a atrasada condensação/picnose da cromatina, e a avançada hemoglobinação citoplasmática (cromatina fina com perda da da basofilia citoplasmática);
 - **Formas megaloblastoides:** corresponde a aumento do tamanho celular, acompanhado de cromatina menos grumosa (núcleo em "fatia de salame hamburguês"), mas com citoplasma em maturação.
 - **Mitoses anômalas:** mitoses cuja formação de fuso é perdida, visualizando-se formas bizarras (despolarizadas);
 - **Multinuclearidade:** eritroblastos bitrinucleares;
 - **Apoptose:** visualizada quando há eritroblastos "agonizantes" (núcleos em degeneração tipo hidrópica, com projeções citoplasmáticas tipo "*blebs*" e (ou) fragmentos nucleares em formação crescente junto à membrana nuclear; cariorrexis);
 - **Falhas de hemoglobinação:** visualizadas como "espaços em branco" dentro do citoplasma do eritroblasto, mas que não têm configuração de vacúolos;
 - **Vacuolização citoplasmática;**
 - **Pontes internucleares, fragmentos nucleares** (visualizados como fragmentos de cromatina que não fazem corpo com a maior porção do núcleo);
 - **Formas bizarras, atípicas, aberrantes** (visualizadas como eritroblastos nitidamente anormais na sua estrutura e maturação);
 - **Sideroblastos em anel:** considerados quando exibem ≥ 5 grânulos de hemossiderina ao redor do núcleo ou arco de 1/3 da circunferência do núcleo do eritroblasto, analisados segundo a presença ou ausência.
- g) o Setor Granulocítico foi avaliado considerando-se a ocorrência $\geq 10\%$ de:
- **Retardo maturativo:** quebra da maturação normal (maturação normal é definida pelo grau de sequência ordenada qualitativa e quantitativamente entre: mieloblastos_MB; promielócitos_PMC; mielócitos_MC; metamielócitos_MMC; bastonetes_bast;

segmentados_seg; ou seja, considera-se normal quando há sequência entre os estágios de granulócitos neutrófilos na ordem acima discriminada), com predomínio de formas menos maduras, considerando-se o tempo de trânsito medular de bastonetes e segmentados. O retardo maturativo quebra esta sequência, com acúmulo em fases mais imaturas (MB-PMC_MC_MMC);

- **Assincronismo maturativo entre núcleo-citoplasma:** definido por ocorrência de nucléolos em metamielócitos; granulação primária em mielócitos;
- **Alterações megaloblastoides (Tempka-Braün):** definidas por: aumento de tamanho em fase de mielócitos e metamielócitos; bastonetes gigantes com carga tetraploide de duplicação nuclear;
- **Degranulações:** hipogranularidade e (ou) distribuição heterogênea;
- **Formas pelgeroides ou pseudo-Pelger-Hüet:** hipossegmentação ou segmentação em espelho; hipogranulação;
- **Donut cells** (células em rosca);
- **Com ou sem bastonetes ou corpo de Auer** (fusão de grânulos em células imaturas e atípicas);
- **Blastos com citoplasma granulocítico e núcleo monocitóide:** correspondem a formas "mistas", ou seja, têm citoplasma claramente granulocítico e núcleo claramente monocitóide, em geral com grande massa de cromatina e nucléolos pequenos;
- **Outras formas imaturas, bizarras, atípicas, aberrantes:** correspondem a formas grandes, com núcleos bizarros, pleomórficos, imaturos, que não "respeitam" as características de uma linhagem bem formada; ou seja, têm formas aberrantes e anômalas;
- **Com ou sem eosinofilia**, mas com granulações grosseiras e displásicas;
- **Mieloblastos tipos I, II ou III**, deve-se observar:
 - Podem coexistir no mesmo paciente e na mesma amostra;
 - Contagem de blastos em mínimo de 200 células da celularidade total, exceto quando a série eritroide for $\geq 50\%$ da celularidade da amostra;
 - Blastos tipo I: são menores, possuem alta relação núcleo-citoplasmática (RNC), cromatina reticulada, fina, não condensada,

- 1-3 nucléolos notórios, citoplasma diáfano, basofilia discreta, sem grânulos, sem bastonete Auer; têm menos que 5 grânulos azurófilos;
- Blastos tipo II: em geral maiores que o I, mas de menor RNC, discreta granulação primária (azurófila), cromatina mais condensada, 1-3 nucléolos notórios e Golgi proeminente; têm entre 5 e 20 grânulos azurófilos;
- Blastos tipo III: são semelhantes aos do tipo II, mas com granulação azurófila mais abundante (≥ 20 grânulos), sem granulação secundária (metacromática) e sem zona de Golgi (ou "hof" perinuclear, para diferenciar de promielócitos).

- h) o Setor Megacariocítico foi avaliado considerando-se a ocorrência $\geq 10\%$ dos quatro tipos de atipias, a saber:
- Núcleos fragmentados: hipersegmentados e sem aparente ligação entre os lobos;
 - Bilobados;
 - Monoformas grandes ou pequenas: formas sem lobulação;
 - Microformas: igual a 2 vezes o tamanho do neutrófilo, ou seja, 20-30 μm .

Notas:

1) A contagem foi realizada em pelo menos 10 megacariócitos, quando possível. Quando houve intensa hipoplasia deste setor e não foram vistos megacariócitos em número de 10 ou mais, avaliou-se dispoese nas raras formas existentes, comparando-se à histologia, para melhor caracterização.

2) Deve-se diferenciar microformas de megacarioblastos.

O setor imuno-estromal foi avaliado considerando-se a presença de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, mastócitos, osteoblastos, osteoclastos, hematogônias e sombras celulares.

O preparo das lâminas da histologia iniciou-se com a fixação do cilindro de osso medular em formol a 10% no máximo por 24 horas; descalcificou-se com ácido fórmico a 8%, durante a noite (12 horas). Lavou-se em água corrente e foram incluídas em parafina para posterior corte em micrótomos apropriados. A Hematoxilina-Eosina (HE) e a impregnação pela prata (reticulina) foram as colorações utilizadas.

O método utilizado para a realização da citogenética de MO foi cultivo celular de curta duração seguido de hipotonização. Uma interpretação citogenética consistente requer a presença de ao menos 20 metafases analisadas. As anormalidades encontradas foram caracterizadas de acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005 (ISCN)*.

As lâminas da histologia revisadas, procedentes da biópsia de MO, foram processadas pelo laboratório de anatomia patológica do HC-UFPR.

Para análise de celularidade na histologia, estabeleceu-se a proporção entre parênquima e gordura (% gordura *versus* % tecido medular na amostra total) e foram consideradas:

- **Hipoplasia** – tecido/gordura abaixo de 1/3 (menos de 30% de tecido medular;
- **Normal** – 1/3 abaixo do tecido/gordura menor que 1/1 (tecido medular entre 30 e 50%);
- **Hiperplasia** – tecido/gordura maior que 1/1 (tecido medular mais que 50%).

Na histologia da MO, foram considerados e analisados:

- a) **Tamanho** do fragmento ósseo;
- b) **Representatividade do material**: todos os cortes analisados deveriam ter pelo menos cinco espaços intertrabeculares – EIT (espaços entre as trabéculas, compreendendo: endóstio, sinusóide central e o parênquima entre eles), excetuando-se áreas paracortical, cartilagem ou artefatuadas pelo corte;
- c) **Celularidade global e setorial**: distribuição de celularidade hetero ou homogênea nos diversos EIT (ou seja, quando houve áreas claramente aplásicas, alternadas com áreas claramente hiper celulares);
- d) **Ectopias**: correspondem aos nichos que não são os fisiológicos (eritroblastos e megacariócitos de localização paratarabecular; granulócitos imaturos de localização central); podem se apresentar como agrupamento de células imaturas de localização anormal (ALIP- **A**bnormal **L**ocalization of **I**mmature **P**recursors: são mieloblastos e (ou) promielócitos em número ≥ 5 células, agrupadas ao redor de capilar central; não se deve confundir com focos eritroides megaloblásticos);

- e) **Atipias:** Foi considerada presença de atipia quando se observaram nichos ectópicos e células com algum grau de atipia na linhagem em questão, embora a morfologia tenha melhor representatividade na análise da citologia. Os achados de diseritropese, disgranulocitopose e dismegacariocitopose foram graduados em **grau 0** (ausência de displasia), **grau 1** (< 5% das células do setor), **grau 2** (entre 5 - 9% das células do setor) ou **grau 3** (\geq 10% das células do setor);
- f) **Estroma:** avaliado segundo a presença de fibrose, ectasia vascular, componente reativo com edema, hemorragia, plasmocitose, linfocitose, macrófagos (com ou sem hemossiderina) etc.;
- g) **Retardo maturativo eritroide:** presença de focos de pro-eritroblastos para-endosteais (ectópicos);
- h) **Setor megacariocítico:** avaliação quanto à hipoplasia, normoplasia, hiperplasia morfológicas: microformas, monoformas, formas bilobadas, lobos fragmentados; podem estar agrupadas em clusters paratrabeculares (nichos ectópicos);
- i) **Alterações megaloblastoides:** eritroides e (ou) granulocíticas, quanto ao tamanho e características de maturação;

Na ocorrência de disparidade de representação de MO, entre citologia (mielograma) e histologia (biópsia), considerou-se sempre o seguinte critério:

- se ambos os materiais não eram suficientemente representativos, o caso era excluído;
- na ocorrência de mielograma altamente representativo, mas sem a correspondência na BMO, ou na ocorrência de histologia bastante representativa, mas sem a correspondência no mielograma, considerou-se que: se a citologia traduzisse os critérios analisados, ou seja, se aquilo que se via era inquestionável, considerou-se suficiente este material; da mesma maneira se a histologia fosse representativa com material inquestionável, considerou-se suficiente o material, mesmo com citologia insuficiente.

3.7 CATEGORIAS DE SMD

A análise quantitativa da dispoese seguiu os critérios da OMS ou *World Health Organization* – WHO (SWERDLOW *et al.*, 2008) para SMD, que gradua linhagem granulocítica e megacariocítica em: **grau 0** (ausente), **grau 1** (abaixo de 5%), **grau 2** (5 - 9%) e **grau 3** ($\geq 10\%$). Para graduação de dispoese, foram avaliados no mínimo 200 eritroblastos e pelo menos 100 precursores granulocíticos. Todos os megacariócitos presentes foram avaliados. Como diseritropoese é achado frequente na AF, os critérios foram modificados para quatro níveis, a saber: **grau 0**: dispoese ausente; **grau 1**: com dispoese menor que 10%; **grau 2**: dispoese entre 10 e 30%; **grau 3**: acima de 30%.

Os achados morfológicos foram distribuídos em três categorias conforme Cioc *et al.* (2010):

- 1) não-SMD: ausência de disgranulocitopose, dismegacariocitopose ou diseritropose grau 3.
- 2) SMD *borderline*: quando os achados morfológicos de medula óssea foram sugestivos de SMD, mas não atingiram o valor de corte para o diagnóstico. Foi definida como grau 1 a 2 de diseritropose acompanhado por disgranulocitopose grau 1 ou grau 2, ou dismegacariocitopose grau 2, mas ausência de aumento de blastos;
- 3) SMD: se havia presença de ao menos 10% de dispoese nas células da linhagem mieloide, ao menos 15% de sideroblastos em anel, ao menos 2% de blastos em sangue periférico ou ao menos 5% de blastos em medula óssea. A Diseritropose isolada foi considerada diagnóstico de SMD só quando foi grau 3. Nenhum diagnóstico de SMD foi baseado exclusivamente na presença de diseritropose grau 1 ou 2.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis qualitativas estão descritas por frequências e percentuais. As variáveis quantitativas por meio de médias, medianas, valor mínimo e valor máximo.

A associação entre variáveis qualitativas dicotômicas foi avaliada pelo teste exato de Fisher e pelo teste Qui-quadrado, de acordo com as frequências observadas. O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, não paramétrico, foi utilizado para comparar variáveis contínuas assimétricas, enquanto o teste t de Student para variáveis contínuas simétricas.

Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o software R version 3.0.2 (ARANGO, 2003; R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS VALORES HEMATIMÉTRICOS

A citopenia estava presente na forma leve em 27 amostras, moderada em 13 e grave em 17. Um paciente apresentou hemograma normal no momento da análise da MO. Em 18 amostras a hemoglobina foi $\leq 10\text{g/dL}$, sendo sete delas $\leq 8\text{g/dL}$; a macrocitose estava presente na maioria dos pacientes ($n = 54$) com $\text{VCM} > 90 \text{ fL}$. Anisopoiquilocitose, indicada pelo RDW, foi evidenciada em 33 pacientes (57%) graduados em: grau 1 com $\text{RDW} = 15 - 16 \text{ fL}$ ($n = 22$), grau 2 com $\text{RDW} = 17 - 20 \text{ fL}$ ($n = 5$) e grau 3 com $\text{RDW} > 20 \text{ fL}$ ($n = 6$). Trombocitopenia inferior a $50.000/\mu\text{L}$ foi encontrada em 29 amostras, sendo 16 delas abaixo de $30.000/\mu\text{L}$. Neutropenia estava presente em 28 amostras, 12 delas abaixo de $500/\mu\text{L}$. Nenhum paciente apresentou blastos em sangue periférico.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MEDIANAS DOS DADOS HEMATIMÉTRICOS DE ACORDO COM A PRESENÇA DE SMD

DADOS HEMATIMÉTRICOS	SMD/SMD BORDERLINE (n=22)	NÃO-SMD (n=33)	VALOR DE p
Hb g/dL	11,4 (7,9 – 14)	10,5 (5,9 – 13,8)	0,38
VCM fL	100 (91 – 109)	100,9 (87,8 – 112,9)	0,63
RDW fL	15,7 (12,5 – 24,2)	14,5 (12,3 – 23,1)	0,41
Leucócitos/ μL	3450 (1790 – 11370)	3590 (1340 – 6800)	0,68
Neutrófilos/ μL	1182(135 – 4939)	967 (112 – 3029)	0,69
Monócitos/ μL	196 (0 – 1705)	230 (13 – 643)	0,68
Plaquetas/ μL	52 (9 – 285)	42 (6 – 217)	0,48

FONTE: O autor (2015)

Nota: Teste de Mann-whitney.

4.2 ANÁLISE DE MEDULA ÓSSEA

Foram analisadas 58 amostras de citologia e histologia de medula óssea de 55 pacientes. Foram excluídos cinco casos devido a material insuficiente para análise na citologia ou na histologia por número insuficiente de espaços intertrabeculares. As amostras foram coletadas em momentos diferentes da evolução da doença: 18 pacientes realizaram análise ao diagnóstico da AF, nos outros pacientes a amostra

foi obtida durante o seguimento ambulatorial em fases diversas da AF. A mediana de tempo entre o diagnóstico e a realização da avaliação da MO foi de 519 dias (variou de 1 dia a 3429 dias).

A celularidade da MO foi normal em 10 amostras, hipocelular em 29 e aplásica em 14. Não foram encontrados pacientes com MO hipercelular neste estudo. Na análise da distribuição de parênquima e de gordura na MO foi demonstrado que 64% (n = 16) dos pacientes que apresentaram distribuição heterogênea também apresentaram morfologia para SMD/SMD *borderline*. Já os pacientes com distribuição homogênea, 78% (n = 22) deles não apresentaram SMD.

Diseritropose estava presente em 68% dos casos (n = 36); sendo grau 1 em 17, grau 2 em 17 e grau 3 em apenas dois casos. Os achados morfológicos mais frequentes foram (Tabela 4): pontes intercelulares, apoptose, anisopoiquilocitose e falha de hemoglobinação. Dentre as alterações nucleares, encontraram-se: pontes internucleares, multinuclearidade e núcleo foliar. A dispoese isolada na linhagem eritroide foi de 26,4% (n = 14), sendo diseritropose grau 2 em três casos e grau 1 em 11 casos.

TABELA 4 - ACHADOS MORFOLÓGICOS DE DISERITROPOESE

ACHADOS MORFOLÓGICOS	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	TOTAL
Multinuclearidade	6	2	-	8
Ponte internuclear	11	2	-	13
Núcleo foliar	6	2	1	9
Núcleo "fatia salame"	5	2	-	7
Falhas de Hemoglobinação	6	8	1	15
Células em apoptose	16	8	5	29
Mitoses atípicas	5	2	-	7
Ponte Intercelular	19	10	1	30
Howell-Jolly	3	2	-	5
Ponteados basófilos	5	1	-	6
Macrocitose oval	2	3	-	5
Dácrio-elíptico-esquiso	2	1	-	3
Dimorfismo	1	1	-	2
Policromasia	12	8	3	23
Anisocitose	8	6	2	16

FONTE: O autor (2015)

Sideroblastos anelares (SA) estavam presentes em quatro pacientes em número inferior a 5%, todos com diseritropose (MDS *borderline* em 2 pacientes, Não-SMD em 1, AREB-1 em 1). Sideroblastos não anelares foram observados em três pacientes (1-3%), também na presença de diseritropose (Não-SMD, AREB-1, CRDM).

Disgranulocitopoese foi detectada em 41% das amostras (n = 22) sendo: grau 1 em 8, grau 2 em 3 e grau 3 em 11 amostras. Os achados morfológicos mais frequentes foram assincronismo núcleo-citoplasmático, presença de neutrófilos hipossegmentados ou pseudo-Pelger-Hüet, hipogranularidade e apoptose (Tabela 5). A presença de blastos foi encontrada em seis pacientes, mas apenas três deles tinham um número de blastos entre 5 e 6%, classificados como AREB-1; outros quatro casos apresentaram contagem entre 1 e 3% de blastos.

TABELA 5 - ACHADOS MORFOLÓGICOS DE DISGRANULOCITOPOESE

ACHADOS MORFOLÓGICOS	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	TOTAL
Assincronismo N/C ⁽¹⁾	5	9	3	17
Hof perinuclear	2	1	-	3
Apoptose	6	4	1	11
Pseudo Pelger-Hüet	8	4	3	15
Células em rosca	5	1	-	6
Vacuolizações	7	-	1	8
Polilobocitose	8	2	1	11
Blastos (I,II,III)	3	3	-	6
Hipogranularidade	8	5	-	13

FONTE: O autor (2015)

NOTA: (1) N/C: núcleo/citoplasma.

Dismegacariocitopoese foi verificada em apenas 7 (15%) amostras de MO, sendo grau 1 em três, grau 2 em cinco e grau 3 em uma amostra. Os achados morfológicos mais frequentes foram: megacariócitos hipogranulares, hipolobulados, microformas e monofomas.

TABELA 6 - ACHADOS MORFOLÓGICOS DE DISMEGACARIOCITOPOESE

ACHADOS MORFOLÓGICOS	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	TOTAL
Hipolobulados	1	1	-	2
Mnofomas	-	2	-	2
Microformas	-	1	-	1
Fragmentados	2	2	-	4
Hipogranulares	3	2	-	5
Plaquetas agranulares	-	-	-	-
Megaplaquetas	-	-	-	-
Megacarioblastos	-	-	-	-

FONTE: O autor (2015)

4.3 CLASSIFICAÇÃO DA SMD

A SMD foi confirmada em 13 amostras, 20% pacientes (n = 11), sendo classificados como citopenia refratária com displasia multilineagem (CRDM) em 10 amostras e AREB-1 em três. Dois pacientes foram submetidos a duas coletas, portanto duas amostras e duas análises. Coincidentemente, ambos foram classificados com AREB-1 na primeira análise e na segunda passaram para CRDM. O intervalo entre as avaliações de MO destes dois pacientes foi de 4 meses e 1 ano e 6 meses. SMD *borderline* foi detectada em nove amostras. Um terceiro paciente foi submetido a uma segunda análise após 1 ano de seguimento clínico, passou de não-SMD para SMD *borderline* com MO hipocelular.

Os casos que não atingiram critérios para SMD ou SMD *borderline* foram categorizados como não-SMD, sendo: 14 casos com aplasia medular, 15 casos com MO hipocelular e 2 casos com MO normocelular.

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DA SMD

VARIANTES	SMD/SMD BORDERLINE	N-SMD	VALOR DE p
Idade	10,00 (±5,46)	10,16 (±3,70)	0,47 ¹
Sexo (M/F)	10/10	20/13	0,63 ²
Consanguinidade (P/A)	4/16	10/23	0,52 ³
Malformações (L/E)	13/7	23/10	0,76 ³
Citopenia			
Ausência	1	0	
Citopenia leve	10	13	0,50 ³
Citopenia moderada	4	8	
Citopenia grave	5	12	
Subtipos genéticos			
Não identificado na triagem	13	16	
FANCA	5	16	0,14 ³
FANCG	1	1	
FANCC	1	0	

FONTE: O autor (2015)

NOTA: M = masculino; F = feminino; P = presente; A = ausente; L = limitadas; E = extensas.

¹ teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ² teste de Qui-quadrado de Pearson ³ teste exato de Fisher

4.4 CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL

Cinquenta e oito amostras de MO foram submetidas à análise citogenética pelo laboratório de citogenética do HC-UFPR. Destas, 47 apresentaram cariótipo

normal e nove amostras apresentaram anormalidade clonal (Tabela 8). Em duas amostras não foi possível a análise devido à ausência de metáfases.

TABELA 8 - ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS

AMOSTRAS	SMD	CARIÓTIPO ALTERADO
6	MI*	46,XY,der(16)t(1;16)(q12q24)[5]/46,XY [15]
10	CRDM	46,XY,dup(1)(q12q32)[6]/46,XY[14]
16	CRDM	46,XX,del(6)(q22)[2]/46,XX[20]
22	SMD <i>Borderline</i>	47,XY,+21[4]/46,XY[16]
25	CRDM	39~46,XY,dup(2)(q23q33)[6]/46,XY[14]
32	CRDM	47,XX,+1[17]/49~57,sl,...[3]
38	SMD <i>Borderline</i>	39~46,XY,+1,der(1;14)(p10;q10)[10]/43~46,sl,add(18)(p10)[10]
44	SMD <i>Borderline</i>	46,XY,-14,+mar[2]/42~46,XY[18]
58	N-SMD*	46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[17]

FONTE: O autor (2015)

NOTA: MI: material insuficiente; N-SMD: ausência de SMD.

Dentre os nove casos com anormalidade clonal, sete apresentavam SMD/SMD *borderline* (CRDM = 4; SMD *borderline* = 3); apenas um caso apresentava anormalidade clonal sem sinal de dispoese em MO. A presença de anormalidade clonal foi associada com a presença de SMD ($p = 0,01$) (Tabela 9).

TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E ACHADOS DE CITOGENÉTICA EM PACIENTES AF

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO	CITOGENÉTICA	
	Anormal	Normal
SMD (n= 13)	4	9
SMD <i>borderline</i> (n= 9)	3	6
Não-SMD (n= 28)	1	27

FONTE: O autor (2015)

NOTA: SMD: Síndrome mielodisplásica.

Teste exato de Fisher: $p = 0,01$

5 DISCUSSÃO

A dificuldade em definir a SMD em pacientes com AF é claramente demonstrada na literatura internacional (BUTTURINI *et al.*, 1994; ALTER, 2000; CIOC *et al.*, 2010; METHA, 2010; QUENTIN, 2011). Atualmente os principais centros envolvidos no diagnóstico e tratamento da AF procuram estabelecer a melhor caracterização morfológica para uma correta definição desta condição que pode contribuir para decisões terapêuticas mais apropriadas para cada caso (CIOC *et al.*, 2010; METHA, 2010; QUENTIN, 2011).

Este é o primeiro estudo brasileiro que analisa as alterações morfológicas da medula óssea dos pacientes com AF, não submetidos a TCTH. A análise das 58 amostras incluídas neste estudo pode ser considerada uma das maiores casuísticas reportadas na literatura devido a raridade desta doença. Como a subjetividade é um problema constante na avaliação morfológica da SMD, particularmente árdua no contexto das síndromes de falência medulares hereditárias, torna-se difícil estabelecer os limites da normalidade (SWERDLOW *et al.*, 2008; CANTÙ *et al.*, 2005; HASLE H, 2007). Neste sentido, este estudo contribuiu com o detalhamento da dispoese da MO por um formulário que destaca todos os possíveis achados da morfologia disciplinando o olhar do hematologista. Nos últimos 15 anos apenas dois outros estudos abordaram este tema, fato que valoriza o presente trabalho, com este número expressivo de pacientes, contribuindo para a padronização da análise morfológica e melhor entendimento da SMD na AF (ALTER *et al.*, 2000; CIOC *et al.*, 2010).

A classificação da OMS é a mais utilizada entre os hematologistas para o diagnóstico da SMD. Como esta classificação é mais genérica, ela não se atém as particularidades morfológicas específicas encontradas nas síndromes de falência medula hereditárias (SWERDLOW *et al.*, 2008).

O presente estudo adotou os critérios morfológicos utilizados pelo Serviço de Hematologia da Universidade de Minnesota para classificação da SMD na AF. Nos quais a presença de ao menos 10% de dispoese em uma linhagem mielóide foi critério para classificar a SMD, exceto no caso da diseritropoese isolada ser exigido ao menos 50% de dispoese (grau 4). Utilizamos a classificação de SMD *borderline* para os pacientes que apresentaram dispoese marginal.

A avaliação da histologia proporcionou análise mais fidedigna da celularidade da MO além de contribuir para uma melhor avaliação da distribuição do parênquima e da gordura na MO. A presença do padrão heterogêneo da distribuição do parênquima e da gordura foi significativamente maior nos pacientes com SMD e SMD *borderline* ($p < 0,01$). Em importante estudo sobre classificação e diferenciação de SMD hipocelular e anemia aplástica grave da infância, Baumann *et al.* demonstraram que existe padrão de distribuição celular desigual entre parênquima e gordura na SMD hipocelular assim como encontrado neste estudo (BAUMANN *et al.*, 2012). Na presente análise, a celularidade da MO foi normal em 19% das amostras e hipocelular em 54% e significativamente maior nos pacientes com SMD e SMD *borderline* ($p < 0,01$). Entretanto, não houve MO hiper celular nesta casuística, da mesma maneira que Cioc *et al.* demonstraram em seu estudo, onde apenas dois pacientes com SMD/SMD *borderline* apresentaram MO hiper celular. Então, MO hiper celular *per se* não parece ser critério adequado para SMD em pacientes com AF, especialmente devido a citopenias estarem presentes ao diagnóstico desta síndrome (CIOC *et al.*, 2010).

A diseritropoese, amplamente conhecida na AF, estava presente em 70% dos casos. Ela foi caracterizada por assincronismo entre núcleo e citoplasma, multinuclearidade ou binuclearidade de células eritróides e presença de fragmentação nuclear, como já relatados na literatura (ALTER *et al.*, 2000; CIOC *et al.*, 2010). Somente a diseritropoese encontrada em mais de 10% dos elementos foi considerada como um dos componentes para diagnóstico da SMD. A diseritropoese grau 4 isolada não foi encontrada em nosso estudo, assim como demonstrado estar presente em raros casos reportados na literatura (ALTER *et al.*, 2000; CIOC *et al.*, 2010).

A disgranulocitopose foi detectada em 41% das amostras, estando presente na maioria dos casos de SMD graduada em grau 3 (84%). Todos os pacientes com SMD *borderline* apresentaram disgranulocitopose marginal, ou seja, dispoese abaixo de 10% das células desta linhagem. Os achados morfológicos mais frequentes foram: assincronismo núcleo-citoplasma, pseudo-Pelger-Hüet, apoptose e hipogranularidade neutrofílica. Cioc *et al.* relataram disgranulocitopose, tendo como achado mais frequente hipogranularidade neutrofílica seguida de hipossegmentação nuclear (pseudo-Pelger-Hüet), presentes em 15% dos pacientes com AF (CIOC *et al.*, 2010). No presente estudo, a disgranulocitopose foi encontrada somente nos pacientes com SMD e SMD *borderline*, tornando-se um importante indicador da presença de SMD.

Em nossa casuística, apenas três casos atingiram número de blastos entre 5 e 6% permitindo-os serem classificados como AREB-1. O aumento de blastos, embora ser critério confiável, não foi achado morfológico frequente nos pacientes com AF e SMD, por isso usá-lo como exigência para o diagnóstico de SMD poderia ser restritivo. Mesmo na classificação da OMS para SMD da infância, AREB representa uma minoria de casos. Cioc *et al.* também encontraram apenas quatro pacientes com AREB-1 (HASLE *et al.*, 2003; SWERDLOW *et al.*, 2008; CIOC *et al.*, 2010; NIEMEYER e BAUMANN, 2011).

A dismegacariocitopose, esteve presente em apenas 15% dos pacientes do nosso estudo, semelhante aos achados da literatura (CIOC *et al.*, 2010). Foi caracterizada pela análise histológica por distribuição paratrabecular dos megacariócitos e pela presença de microformas isoladas ou em *cluster*. Na citologia, os achados morfológicos de dismegacariocitopose mais frequentes foram: Hipogranularidade celular, megacariócitos fragmentados seguido de monofomas e hipolobulação nuclear.

Dos 13 pacientes que preencheram critério diagnóstico para SMD, todos apresentaram diseritropose grau 3. Onze casos apresentaram disgranulocitopose grau 3 associado a diseritropose grau 3. Em apenas dois casos a dismegacariocitopose foi grau 3 associado a disgranulocitopose grau 2 e diseritropose grau 3. Todos os pacientes classificados como SMD apresentaram diseritropose acima de 10% associado a pelo menos 10% de dispoese nas linhagens granulocítica ou megacariocítica. Então, apesar de considerarmos 10% de dispoese na linhagem mielóide como critério diagnóstico, todos os pacientes classificados como SMD apresentaram ao menos 20% de dispoese envolvendo mais de uma linhagem celular. Alter *et al.*, em 2000, consideraram SMD morfológica na AF quando a dispoese estivesse presente em duas linhagens com ao menos 20% das células alteradas nas linhagens mielóides (ALTER *et al.*, 2000; CIOC *et al.*, 2010; HASLE, 2011).

A SMD foi diagnosticada morfológicamente em 20% dos pacientes, sendo a CRDM o subtipo mais comum desta série de casos. Encontramos apenas três casos de AREB-1. A displasia unilinhagem acometendo ao menos 10% da linhagem e restrita a linhagem granulocítica ou megacariocítica não foi encontrada neste estudo. No estudo de Cioc *et al.*, a SMD foi diagnosticada em 20,7% dos pacientes utilizando os mesmos critérios. Também encontraram como tipo mais frequente de SMD a CRDM seguido de AREB-1. Encontraram apenas 3 casos com tipo ARSA. A incidência de SMD em pacientes com AF na literatura é restrita a poucos estudos e

variou de 11 a 34%, porém diferem em relação a idade e fase da doença quando a amostra foi obtida (SCHAISON *et al.*, 1983; BUTTURINI *et al.*, 1994; ALTER, 2000; CIOC *et al.*, 2010).

A SMD *borderline* foi encontrada em nove casos (15%), todos apresentaram diseritropoese associado a disgranulocitopose abaixo de 10% das células de cada linhagem, apenas três casos apresentaram também disgranulocitopose e a citogenética convencional mostrou anormalidade clonal em três deles. Cioc *et al.* diagnosticaram 5 pacientes com SMD *borderline* em sua análise (4,5%) e quatro deles apresentaram anormalidade clonal em citogenética molecular. Nestes pacientes com SMD *borderline*, os achados marginais de disgranulocitopose ou dismegacariocitopose se somados a diseritropoese frequente, totalizariam os 10% de dispoese mielóide obrigatório para o diagnóstico de CRI da classificação da OMS de 2008, ou seja, SMD *borderline* seria um correspondente da CRI. Então, a detecção de um menor grau de dispoese em linhagem granulocítica e megacariocítica, deve ser correlacionada com resultado de citogenética e pode ter impacto significativo no monitoramento e nas decisões terapêuticas destes pacientes.

O aumento da contagem de blastos, juntamente da presença de MO hiperclular e anormalidade clonal persistente são os critérios propostos pela OMS em 2008 para diagnóstico de SMD nas falências medulares congênitas. Nossos achados de poucos casos de AREB-1 e nenhum paciente com SMD apresentando MO hiperclular, corroboram com Cioc *et al.* e sugerem que a classificação OMS de 2008 para SMD deva ser baseada em critérios diferentes para pacientes com AF (SWERDLOW *et al.*, 2008; CIOC *et al.*, 2010; HASLE; NIEMEYER, 2011).

Em nossa casuística, a presença de alteração clonal foi correlacionada com a evidência morfológica de SMD e SMD *borderline* ($p < 0,01$). Na análise de citogenética convencional, aproximadamente 20% dos paciente apresentaram alteração clonal envolvendo duas ou mais metáfases, a maioria deles pertencentes ao grupo com morfologia para SMD e SMD *borderline*.

Nove pacientes deste estudo apresentaram anormalidade citogenética clonal, sete deles foram classificados como SMD ou SMD *borderline*. A anormalidade envolvendo cromossomo 1 estava presente em quatro casos. Estas anormalidades deste cromossomo (duplicação de seguimento, rearranjo estrutural, trissomia ou trissomia parcial) são sabidamente frequentes na AF (AUERBACH and ALLEN, 1991; MAAREK, 1996; ALTER, 2000; METHA, 2010; CIOC, 2010; QUENTIN, 2011).

Também se encontrou anormalidade cromossômicas envolvendo cromossomos 2, 6 e 14 nos pacientes com SMD ou SMD *borderline* neste estudo. Estas anormalidades já foram descritas na literatura e associadas ao diagnóstico de SMD (ALTER *et al.*, 2000). A trissomia do cromossomo 21 esteve presente em um paciente com SMD *borderline*. Quentin *et al.*, em 2011, incluíram uma lesão críptica (translocação, deleção ou mutação) envolvendo *RUNX1/AML1* (gene supressor tumoral, localizado no cromossomo 21) a um padrão específico de anormalidades genômicas envolvendo cromossomo 3 e 7, associando-as ao desenvolvimento de SMD e leucemia em pacientes com AF (QUENTIN *et al.*, 2012).

Anormalidades envolvendo cromossomos 1, 3, 7 e 21 são as mais frequentes encontradas na AF, sendo definida por vários autores como um padrão específico de anormalidades citogenéticas que ocorrem na SMD associado a AF (METHA, 2010; CIOC *et al.*, 2010; QUENTIN, 2011). Na nossa casuística o número de anormalidades citogenéticas encontrado foi pequeno; este fato pode ser atribuído a ausência do estudo de citogenética molecular. Nenhum caso deste estudo apresentou anormalidade envolvendo cromossomo 3 nem 7. Estudos recentes mostram alta incidência de anormalidade clonal envolvendo cromossomo 3 e 7 nos pacientes com AF e SMD, associada a pior prognóstico (TONNIES *et al.*, 2003; CIOC *et al.*, 2010; QUENTIN *et al.*, 2011; MEYER *et al.*, 2012). O ganho do braço longo do cromossomo 3 (3qG) ocorre comumente como pequeno pedaço de material cromossômico translocado para outro cromossomo ou como um marcador supranumerário pequeno que não pode ser definido pelo bandeamento G da citogenética convencional. Assim, a citogenética molecular, utilizando técnica de FISH ou CGH, é a melhor maneira de se detectar esta anormalidade (METHA *et al.*, 2010; CIOC *et al.*, 2010).

Dentre os pacientes com SMD e SMD *borderline* comparados aos sem SMD, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa em relação a idade. Apenas dois pacientes foram submetidos a mais de uma análise da MO durante o período do estudo, impossibilitando avaliação de flutuação ou período de latência dos clones citogenéticos conforme o avançar da idade. No presente estudo aproximadamente metade dos pacientes (54,5%) eram crianças com idade abaixo de 10 anos no momento da avaliação da MO por isso não há representatividade de pacientes mais velhos nesta casuística. Cioc *et al.* demonstraram maior mediana de idade nos pacientes com SMD e SMD *borderline*. Butturini *et al.*, demonstraram um risco de desenvolver SMD e LMA de 52% até os 40 anos de idade. Demonstraram também

que a presença de clone citogenético aumenta significativamente com a idade. O risco de identificá-los aos 30 anos de idade é próximo de 70% nos pacientes com AF e falência medular (BUTTURINI *et al.*, 1994).

Quando comparado os pacientes não-SMD com os pacientes com SMD e SMD *borderline*, não encontramos diferença estatisticamente significativa em relação a idade, ao sexo, a consanguinidade, a intensidade de malformações congênitas ou ao subtipo genético neste estudo. Este tipo de correlação não foi investigado nos principais artigos sobre SMD na AF (ALTER *et al.*, 2000; METHA *et al.*, 2010; CIOC *et al.*, 2010; QUENTIN *et al.*, 2011).

Os principais achados morfológicos presentes na MO dos pacientes com AF reportados na literatura são similares, destacando-se a importância da presença da disgranulocitopoese para a definição da SMD (CIOC *et al.*, 2010). Entretanto, os critérios morfológicos para o diagnóstico de SMD na AF ainda não estão consolidados como indicadores de uma evolução desfavorável conforme os subtipos de SMD. Entretanto, há fragilidade na definição dos critérios para o diagnóstico de SMD na AF, bem como do impacto prognóstico dos tipos de SMD. Não foram realizados estudos prospectivos para determinação dos clones de pior prognóstico ou do período de latência destes clones e sua correlação com achados morfológicos da SMD na AF.

A análise cuidadosa e sistematizada da morfologia praticada neste estudo contribui para melhor caracterização da dispoese na Anemia de Fanconi e também valida a classificação proposta por Cioc *et al.* para melhor caracterização da SMD morfológica na AF. A maioria das publicações sobre este tema foi feita por serviços de TCTH que não realizam o seguimento clínico pré transplante, impossibilitando um estudo prospectivo adequado (MHETA *et al.*, 2010; CIOC *et al.*, 2010). As características do ambulatório de AF do HC-UFPR permitem que se expandam a análise morfológica em vários momentos da evolução clínica desta população de pacientes, associadas a estudo de citogenética convencional e molecular bem como identificação dos subtipos de AF no sentido de caracterizar situações ainda não definidas.

6 CONCLUSÕES

1. A análise morfológica da MO nesta casuística, através da histologia e citologia, demonstrou a presença de disgranulocitopose em 40% das amostras, dismecacariocitopose em 15% e diseritropose em 68%. A MO foi hipocelular em 54% das amostras e normocelular em 19%. Os achados de dispoese nesta casuística não foram associados com hiperplasia da MO e apenas dois casos apresentaram a presença de blastos entre 5 e 10%.
2. Quando comparado o grupo de pacientes não-SMD com grupo SMD ou SMD *borderline*, não houve diferença em relação ao grau de citopenias.
3. A presença de alteração clonal foi correlacionada com a evidência morfológica de SMD/SMD *borderline*. Entretanto, deve-se analisar a citogenética em diferentes tempos para certificar-se que o clone é permanente.
4. A presença de disgranulocitopose foi o maior indicativo da presença de SMD em nossa casuística. Não houve disgranulocitopose nos pacientes não-SMD.

REFERÊNCIAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **Lancet**, v.383, n.9936, p.2239-2252, 2014.
- ALAN, D.; D'ÁNDREA, M. D. The Fanconi Anemia and Breast Cancer Suscetibility Pathways. **The New England Journal of Medicine**, v.362, n.20, p.1909-1919, 2011.
- APPELBAUM, F. R.; BARRALL, J.; STORB, R.; RAMBERG, R.; DONEY, K.; SALE, G. E.; THOMAS, E. D. Clonal cytogenetic abnormalities in patients with otherwise typical aplastic anemia. **Experimental Hematology**, v.15, n.11, p.1134-1139, 1987.
- ALTER, B. P. Fanconi anemia and the development of leukemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.27, n.3-4, p.214-221, 2014.
- ALTER, B. P.; CARUSO, J. P.; DRACHTMAN, R. A.; UCHIDA, T.; VELAGALETI, G. V. N.; ELGHETANY, M. T. Fanconi anemia: myelodysplasia as a predictor of outcome. **Cancer Genetics And Cytogenetics**, v.117, n.2, p.125-131, 2000.
- ARANGO, H. C. **Bioestatística teórica e computacional**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- AUERBACH, A. D. Fanconi anemia diagnosis and the diepoxybutane (DEB) test. **Experimental Hematology**, v.21, n.6, p.731-733, 1993..
- AUERBACH, A. D. Fanconi anemia and its diagnosis. **Mutation Research - Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v.668, n.1-2, p.4-10, 2009.
- AUERBACH, A. D.; ALLEN, R. G. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.51, n.1, p.1-12, 1991.
- AUERBACH, A. D.; ROGATKO, A.; SCHROEDER-KURTH, T. M. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. **Blood**, v.73, n.2, p.391-396, 1989.
- AUL, C.; GIAGOUNIDIS, A.; GERMING, U.; GANSER, A. Evaluating the prognosis of patients with myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol**, v.81, n.9, p.485-497, 2002.

AYAS, M.; SABER, W.; DAVIES, S. M.; HARRIS, R. E.; HALE, G. A.; SOCIE, G.; LERADEMACHER, J.; THAKAR, M.; DEEG, H. J. J.; AL-SERAIHY, A.; BATTIWALLA, M.; CAMITTA, B. M.; OLSSON, R.; BAJWA, R. S.; BONFIM, C. M.; PASQUINI, R.; MACMILLAN, M. L.; GEORGE, B.; COPELAN, E. A.; WIRK, B.; AL JEFRI, A.; FASTH, A. L.; GUINAN, E. C.; HORN, B. N.; LEWIS, V. A.; SLAVIN, S.; STEPENSKY, P.; BIERINGS, M.; GALE, R. P. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Fanconi Anemia in Patients With Pretransplantation Cytogenetic Abnormalities, Myelodysplastic Syndrome, or Acute Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.31, n.13, p.1669-1676, 2013

BABUSHOK, D. V.; BESSLER, M. Genetic predisposition syndromes: when should they be considered in the work-up of MDS? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.28, n.1, p.55-68, 2015.

BAGBY, G. C.; LIPTON, J. M.; SLOAND, E. M.; SCHIFFER, C. A. Marrow failure. Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. **Education Program**, p.318-336, 2004.

BAUMANN, I.; FÜHRER, M.; BEHRENDT, S.; CAMPR, V.; CSOMOR, J.; FURLAN, I.; DE HAAS, V.; KERNDRUP, G.; LEGUIT, R. J.; DE PAEPE, P.; NOELLKE, P.; NIEMEYER, C.; SCHWARZ, S. Morphological differentiation of severe aplastic anaemia from hypocellular refractory cytopenia of childhood: reproducibility of histopathological diagnostic criteria. **Histopathology**, v.61, n.1, p.10-17, 2012.

BAUMANN, I.; NIEMEYER, C.M.; BENNETT, J.M.; SHANNON, K. Childhood myelodysplastic syndrome. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.104-107.

BERWICK, M.; SATAGOPAN, J. M.; BEN-PORAT, L.; CARLSON, A.; MAH, K.; HENRY, R.; DIOTTI, R.; MILTON, K.; PUJARA, K.; LANDERS, T.; DEV BATISH, S.; MORALES, J.; SCHINDLER, D.; HANENBERG, H.; HROMAS, R.; LEVRAN, O.; AUERBACH, A. D. Genetic heterogeneity among Fanconi anemia heterozygotes and risk of cancer. **Cancer Research**, v.67, n.19, p.9591-9596, 2007.

BLAU, O.; BALDUS, C. D.; HOFMANN, W. K.; THIEL, G.; NOLTE, F.; BURMEISTER, T.; TÜRKMEN, S.; BENLASFER, O.; SCHÜMANN, E.; SINDRAM, A.; MOLKENTIN, M.; MUNDLOS, S.; KEILHOLZ, U.; THIEL, E.; BLAU, I. W. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. **Blood**, v.118, n.20, p.5583-5592, 2011.

BONFIM, C. M.; de MEDEIROS C. R.; BITENCOURT, M. A.; ZANIS-NETO, J.; FUNKE, V.A.; SETUBAL, D. C.; RUIZ, J.; SANDERS, J. E.; FLOWERS, M. E.; KIEM, H. P.; STORB, R.; PASQUINI, R. HLA-matched related donor hematopoietic cell transplantation in 43 patients with Fanconi anemia conditioned with 60 mg/kg of cyclophosphamide. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.13, n.12, p.1455-60, 2007

BORTOLHEIRO, T. C. Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (Fab) À Classificação da Organização Mundial da Saúde (Oms): morphologic classifications of myelodysplastic syndromes: from Fab to Who. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.28, n.3, p.194-197, 2006.

BRUNNING, R.D.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.P.; THIELE, J.; PORWIT, A.; HELLSTROM-LINDBERG, E.; BENNETT, J.M. Refractory cytopenia with unilineage dysplasia. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.94-95

BRUNNING, R.D.; BENNETT, J.M.; MATUTES, E.; ORAZI, A.; VARDIMAN, J.W.; THIELE, J. Refractory cytopenia with multilineage dysplasia. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.98-99

BUTTURINI, A.; GALE, R. P.; VERLANDER, P. C.; ADLER-BRECHER, B.; GILLIO, A. P.; AUERBACH, A. D. Hematologic abnormalities in fanconi anemia: an international Fanconi Anemia Registry study. **Blood**, v.84, n.5, p.1650-1655, 1994.

CANTÙ RAJNOLDI, A.; FENU, S.; KERNDRUP, G.; VAN WERING, E. R.; NIEMEYER, C. M.; BAUMANN, I. Evaluation of dysplastic features in myelodysplastic syndromes: experience from the morphology group of the European Working Group of MDS in Childhood (EWOG-MDS). **Annals Of Hematology**, v.84, n.7, p.429-433, 2005.

CASTELLA, M.; PUJOL, R.; CALLÉN, E.; TRUJILLO, J. P.; CASADO, J. A.; GILLE, H.; LACH, F. P.; AUERBACH, A. D.; SCHINDLER, D.; BENÍTEZ, J.; PORTO, B.; FERRO, T.; MUÑOZ, A.; SEVILLA, J.; MADERO, L.; CELA, E.; BELÉNDEZ, C.; DE HEREDIA, C. D.; OLIVÉ, T.; DE TOLEDO, J. S.; BADELL, I.; TORRENT, M.; ESTELLA, J.; DASÍ, A.; RODRÍGUEZ-VILLA, A.; GÓMEZ, P.; BARBOT, J.; TAPIA, M.; MOLINÉS, A.; FIGUERA, A.; BUEREN, J. A.; SURRALLÉS, J. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. (Supplemental Information). **Blood**, v.117, n.14, p.3759-3769, 2011.

CECCALDI, R.; PARMAR, K.; MOULY, E.; DELORD, M.; KIM, J. M.; REGAIRAZ, M.; PLA, M.; VASQUEZ, N.; ZHANG, Q. S.; PONDARRE, C.; PEFFAULT DE LATOUR, R.; GLUCKMAN, E.; CAVAZZANA-CALVO, M.; LEBLANC, T.; LARGHERO, J.; GROMPE, M.; SOCIÉ, G.; D'ANDREA, A. D.; SOULIER, J. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Stem Cell**, v.11, n.1, p.36-49, 2012.

CIOC, A. M.; WAGNER, J. E.; MACMILLAN, M. L.; DEFOR, T.; HIRSCH, B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. **American Journal Of Clinical Pathology**, v.133, n.1, p.92-100, 2010.

D'ANDREA, A. D. Quick guide Fanconi anemia. **Current Biology**, v.13, n.14, p.546, 2003.

DE WINTER, J. P.; JOENJE, H. The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. **Mutation Research**, v.668, n1-2, p.11-19, 2009.

DUNKLEY, S. M.; MANOHARAN, A.; KWAN, Y. L. Myelodysplastic syndromes: prognostic significance of multilineage dysplasia in patients with refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts. **Blood**, v.99, n.10, p.3870-3871, 2002.

GARAYCOECHEA, J. I.; PATEL, K. J. Why Does The Bone Marrow Fail In Fanconi Anemia?, **Blood**, v.123, n.1, p.26-34, 2014.

GUARDIOLA, P.; PASQUINI, R.; DOKAL, I.; ORTEGA, J. J.; VAN WEEL-SIPMAN, M.; MARSH, J. C.; BALL, S. E.; LOCATELLI, F.; VERMYLEN, C.; SKINNER, R.; LJUNGMAN, P.; MINIERO, R.; SHAW, P. J.; SOUILLET, G.; MICHALLET, M.; BEKASSY, A. N.; KRIVAN, G.; DI BARTOLOMEO, P.; HEILMANN, C.; ZANESCO, L.; CAHN, J. Y.; ARCESE, W.; BACIGALUPO, A.; GLUCKMAN, E. Outcome of 69 Allogeneic Stem Cell Transplantation for Fanconi Anemia using HLA-matched Unrelated Donors: A study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Blood**, v.95, n.2, p.422-429, 2000.

GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M. M.; FENAUX, P.; MOREL, P.; SANZ, G.; SANZ, M.; VALLESPI, T.; HAMBLIN, T.; OSCIER, D.; OHYASHIKI, K.; TOYAMA, K.; AUL, C.; MUFTI, G.; BENNETT, J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.89, n.6, p.2079-2088, 1997'.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H. K.; VARDIMAN, J.; LISTER, T. A.; BLOOMFIELD, C. D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. **Histopathology**, v.36, n.1, p.69-86, 2000.

HASLE, H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children. **Current Opinion In Pediatrics**, v.19, n.1, p.1-8, 2007.

HASLE, H.; NIEMEYER, C. M. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. **British Journal Of Haematology**, v.154, n.2, p.185-195, 2011.

HASLE, H.; NIEMEYER, C. M.; CHESSELLS, J. M.; BAUMANN, I.; BENNETT, J. M.; KERNDRUP, G.; HEAD, D. R. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. **Leukemia**, v.17, n.2, p.277-282, 2003.

HASSERJIAN, R.P.; GATTERMANN, N.; BENNETT, J.M.; BRUNNING, R.D.; THIELE, J. Refractory anaemia with ring sideroblasts. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.96-97

HASSERJIAN, R.P.; LE BEAU, M.M.; LIST, A.F.; BENNETT, J.M.; THIELE, J. Myelodysplastic syndrome with isolated del (5q). In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.102-103

HODSON, C.; WALDEN, H. Towards a molecular understanding of the fanconi anemia core complex. **Anemia**, 2012.

KORDASTI, S. Y.; INGRAM, W.; HAYDEN, J.; DARLING, D.; BARBER, L.; AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; WLODARSKI, M. W.; MACIEJEWSKI, J. P.; FARZANEH, F.; MUFTI, G. J. CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS). **Blood**, v.110, n.3, p.847-850, 2007.

KUTLER, D. I.; SINGH, B.; SATAGOPAN, J.; BATISH, S. D.; BERWICK, M.; GIAMPIETRO, P. F.; HANENBERG, H.; AUERBACH, A. D. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). **Blood**, v.101, n.4, p.1249-1256, 2003.

LOBITZ, S.; VELLEUER, E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. **Nature Reviews. Cancer**, v.6, n.11, p.893-898, 2006.

MAAREK, O.; JONVEAUX, P.; LE CONIAT, M.; DERRÉ, J.; BERGER, R. Faconi anemia and bone marrow clonal chromosome abnormalities. **Leukemia**, v.10, n.11, p.1700-1704, 1996.

MANVELYAN, M.; KEMPF, P.; WEISE, A.; MRASEK, K.; HELLER, A.; LIER, A.; HÖFFKEN, K.; FRICKE, H. J.; SAYER, H. G.; LIEHR, T.; MKRTCHYAN, H. Preferred co-localization of chromosome 8 and 21 in myeloid bone marrow cells detected by three dimensional molecular cytogenetics. **International Journal of Molecular Medicine**, v.24, n.3, p.335-341, 2009.

MATSUDA, A.; JINNAI, I.; YAGASAKI, F.; KUSUMOTO, S.; MINAMIHISAMATSU, M.; HONDA, S.; MUROHASHI, I.; BESSHO, M.; HIRASHIMA, K. Re- fractory anemia with severe dysplasia: clinical significance of morphological features in refractory anemia. **Leukemia**, v.12, n.4, p.482-485, 1998.

MATSUDA, A.; JINNAI, I.; YAGASAKI, F.; KUSUMOTO, S.; MUROHASHI, I.; BESSHO, M.; HIRASHIMA, K.; HONDA, S.; MINAMIHISAMATSU, M.; FUCHIGAMI, K.; MATSUO, T.; KURIYAMA, K.; TOMONAGA, M. New system for assessing the prognosis of refractory anemia patients. **Leukemia**, v.13, n.11, p.1727-1734, 1999

MEYER, S.; FERGUSSON, W. D.; WHETTON, A. D.; MOREIRA-LEITE, F.; PEPPER, S. D.; MILLER, C.; SAUNDERS, E. K.; WHITE, D. J.; WILL, A. M.; EDEN, T.; IKEDA, H.; ULLMANN, R.; TUERKMEN, S.; GERLACH, A.; KLOPOCKI, E.; TÖNNIES, H. Amplification and translocation of 3q26 with overexpression of EVI1 in Fanconi anemia-derived childhood acute myeloid leukemia with biallelic FANCD1/ BRCA2 disruption. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.46, n.4, p.359-372, 2007.

MEYER, S.; NEITZEL, H.; TÖNNIES, H. Chromosomal aberrations associated with clonal evolution and leukemic transformation in Fanconi anemia: clinical and biological implications. **Anemia**, 2012.

MHETA, P. A.; HARRIS, R. E.; DAVIES, S. M.; KIM, M. O.; MULLER, R.; LAMPKIN, B.; MO, J.; MYERS, K.; SMOLAREK, T. A. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome – acute myeloid leucemia in patients with Fanconi Anemia. **Câncer Genetics and Cytogenetics**, v.203, n.2, p.180-186, 2010.

MUFTI, G. J.; BENNETT, J. M.; GOASGUEN, J.; BAIN, B. J.; BAUMANN, I.; BRUNNING, R.; CAZZOLA, M.; FENAUX, P.; GERMING, U.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; JINNAI, I.; MANABE, A.; MATSUDA, A.; NIEMEYER, C. M.; SANZ, G.; TOMONAGA, M.; VALLESPI, T.; YOSHIMI, A; INTERNATIONAL WORKING GROUP ON MORPHOLOGY OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME. 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**, v.93, n.11, p.1712-1717, 2008.

NEVELING, K.; ENDT, D.; HOEHN, H.; SCHINDLER, D. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. **Mutation Research**, v.668, n.1-2, p.73-91, 2009.

NIEMEYER, C. M.; BAUMANN, I. Classification of childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. **Hematology**, v.2011, n.1, p.84-89, 2011.

NIERO-MELO, L.; RESENDE, L. S. R.; GAIOLLA, R. D.; OLIVEIRA, C. T.; DOMINGUES, M. A. C.; NETO, F. A. M. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.28, n.3, p.167-174, 2006.

NÖSSLINGER, T.; REISNER, R.; KOLLER, E.; GRUNER, H.; TUCHLER, H.; NOWOTNY, H.; PITTERMANN, E.; PFEILSTOCKER, M. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. **Blood**, v.98, n.10, p.2935-2941, 2001.

ORAZZI, A.; BRUNNING, R.D.; HASSERJIAN, R.P.; GERMING, U.; THIELE, J. Refractory anaemia with excess blasts. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.100-101

ORAZZI, A.; BRUNNING, R.D.; BAUMANN, I.; HASSERJIAN, R.P. Myelodysplastic syndrome, unclassifiable. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.103

PILONETTO, D. V.; PEREIRA, N. F.; BITENCOURT, M. A.; MAGDALENA, N. I.; VIEIRA, E. R.; VEIGA, L. B.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, R. C.; PASQUINI, R. FANCD2 Western blot as a diagnostic tool for Brazilian patients with Fanconi anemia. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v.42, n.3, p.237-243, 2009.

QUENTIN, S.; CUCCUINI, W.; CECCALDI, R.; NIBOUREL, O.; PONDARRE, C.; PAGÈS, M. P.; VASQUEZ, N.; DUBOIS D'ENGHIEN, C.; LARGHERO, J.; PEFFAULT DE LATOUR, R.; ROCHA, V.; DALLE, J. H.; SCHNEIDER, P.; MICHALLET, M.; MICHEL, G.; BARUCHEL, A.; SIGAUX, F.; GLUCKMAN, E.; LEBLANC, T.; STOPPA-LYONNET, D.; PREUDHOMME, C.; SOCIÉ, G.; SOULIER, J. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. **Blood**, v.117, n.15, p.e161-170, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **The R Project for Statistical Computing**, 2015. Disponível em: <www.r-project.org>. Acesso em: 18 jun. 2015.

RAZA, A.; GEZER, S.; MUNDLE, S.; GAO, X. Z.; ALVI, S.; BOROK, R.; RIFKIN, S.; IFTIKHAR, A.; SHETTY, V.; PARCHARIDOU, A.; *et al.* Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.86, n.1, p.268-276, 1995.

ROSENBERG, P. S.; TAMARY, H.; ALTER, B. P. How High are Carrier Frequencies of Rare Recessive Syndromes? Contemporary Estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. **American Journal of Medical Genetics**, v.155, n.8, p.1877-1883, 2012.

SCHAISSON, G.; LEVERGER, G.; YILDIZ, C.; BERGER, R.; BERNHEIM, A.; GLUCKMAN, E. Fanconi's anemia. Incidence of its development into leukemia. **Presse Médicale**, v.12, n.20, p.1269-1274, 1983.

SHEN, L.; KANTARJIAN, H.; GUO, Y.; LIN, E.; SHAN, J.; HUANG, X.; BERRY, D.; AHMED, S.; ZHU, W.; PIERCE, S.; KONDO, Y.; OKI, Y.; JELINEK, J.; SABA, H.; ESTEY, E.; ISSA, J. P. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v.28, n4, p.605-613, 2010.

SHIMAMURA, A.; ALTER, B. P. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. **Blood Reviews**, v.24, n.3, p.101-122, 2010.

SILVA, F. P.; MOROLLI, B.; STORLAZZI, C. T.; ANELLI, L.; WESSELS, H.; BEZROOKOVE, V.; KLUIN-NELEMANS, H. C.; GIPHART-GASSLER, M. Identification of RUNX1/AML1 as a classical tumor suppressor gene. **Oncogene**, v.22, n.4, p.538-547, 2003.

SOULIER, J. Fanconi anemia. **Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v.2011, p.492-497, 2011.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. In: **World Health Organization Classification of Tumours**. 4.ed. Lyon, France: IARC Press, 2008. p.87-104.

TASSIN, F.; DEWE, W.; SCHAAF, N.; HERENS, C.; RAVOET, C.; ALBERT, A.; BEGUIN, Y.; PAULUS, J. M. A four-parameter index of marrow dysplasia has predictive value for survival in myelodysplastic syndromes. **Leukemia & Lymphoma**, v.36, n.5-6, p.485-496, 2000.

TENNANT, G. B.; CAVILL, I.; BURNETT, A. K. Long-term survival of myelodysplastic patients with macrocytosis. **British Journal of Haematology**, v.124, n.6, p.840-841, 2004.

TÖNNIES, H.; HUBER, S.; KÜHL, J. S.; GERLACH, A.; EBELL, W.; NEITZEL, H. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. **Blood**, v.101, n.10, p.3872-3874, 2003.

VERBURGH, E.; ACHTEN, R.; MAES, B.; HAGEMEIJER, A.; BOOGAERTS, M.; WOLF-PEETERS, C.; VERHOEF, G. Additional prognostic value of bone marrow histology in patients subclassified according to the international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v.21, n.2, p.273-282, 2003.

WELLS, D. A.; BENESCH, M.; LOKEN, M. R.; VALLEJO, C.; MYERSON, D.; LEISENRING, W. M.; DEEG, H. J. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v.102, n.1, p.394-403, 2003.

YOSHIMI, A.; NIEMEYER, C.; BAUMANN, I.; SCHWARZ-FURLAN, S.; SCHINDLER, D.; EBELL, W.; STRAHM, B. High incidence of Fanconi anaemia in patients with a morphological picture consistent with refractory cytopenia of childhood. **British Journal of Haematology**, v.160, n.1, p.109-111, 2013.

ZHANG, X.; LANCET, J. E.; ZHANG, L. Molecular pathology of myelodysplastic syndromes: new developments and implications for diagnosis and treatment. **Leukemia & Lymphoma**, p1-9, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE 1
GRADUAÇÃO DE DISERITROPOESE DOS CASOS COM SMD/SMD *BORDERLINE*

GRADUAÇÃO DE DISERITROPOESE DOS CASOS COM SMD/SMD BORDERLINE

Paciente	SMD	Diseritrop ose	Multinu clear	Pontes intermucle ares	Núcleos foliares	Núcleo fasia salame	Falhas Hinzificação	Cels em apoptose	Mitoses atípicas	Pontes intercelu lares	Howell- Jolly	Pontados basofílicos	Macrocitose oval	Dacrio- elipto- esquiso	Dimorfis mo	AniseC- Anisoc itose
CMN	CRDM	2	0	2	0	1	2	3	1	1	0	1	0	0	0	3
ESC	AREB-1	2	2	1	2	0	3	2	2	3	0	1	0	0	0	3
NL	CRDM	2	0	1	1	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	3
SMAP	MDS BOD	2	0	1	3	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
ACLS	AREB-1	2	0	1	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	1
EOB	CRDM	2	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0	2	0	0	1
JJR	MDS BOD	1	0	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1
JSS	CRDM	3	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	2	2
JAV	CRDM	3	0	1	0	1	2	2	1	2	0	0	1	0	0	1
MVPS	MDS BOD	1	0	0	1	0	2	0	0	1	0	1	2	1	0	1
RAS	CRDM	2	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	2	2	0	2
LAF	MDS BOD	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
NPO	MDS BOD	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
CES	CRDM	2	0	0	0	0	2	3	0	2	0	0	0	0	0	2
LESM	CRDM	2	0	0	0	0	2	1	0	0	2	2	0	0	0	0
IBSM	AREB-1	2	1	0	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0
RNSG	MDS BOD	2	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
FLSR	MDS BOD	2	0	2	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0
SDS	MDS BOD	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
LMAL	MDS BOD	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
ESC	CRDM	2	2	0	0	0	1	2	1	2	0	1	0	0	0	1
ACLS	CRDM	2	1	1	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0	0	2

APÊNDICE 2
GRADUAÇÃO DE DISGRANULOCITOPOESE DOS
CASOS COM SMD/SMD *BORDERLINE*

GRADUAÇÃO DE DISGRANULOCITOSE DOS CASOS COM SMD/SMD BORDERLINE

Paciente	SMD	Disgranulocitose	S.Gran maturação	S.Gran Tempka-Braun	Assincronismo	Hof ⁺ perinuclear	Apoptose	Form pilgeroides	Cels em rosca	Vascularização	Polioblastose	Monocitos	Blastos	Hipogranularidade
CMN	CRDM	3	0	1	2	0	1	3	0	1	2	0	0	1
ESC	AREB-1	3	0	0	3	0	2	2	0	1	0	2	5%	2
NL	CRDM	3	0	1	2	0	3	1	0	3	0	1	0	2
SMAP	MDS BOD	1	0	0	1	0	1	1	2	1	1	2	0	0
ACLS	AREB-1	3	0	1	1	0	2	1	0	0	1	1	6%	1
EOB	CRDM	3	0	1	2	0	1	2	1	0	0	0	0	1
JJR	MDS BOD	2	0	1	0	1	1	3	1	0	1	1	0	0
JSS	CRDM	2	0	0	2	0	2	2	0	1	1	1	3%	0
JAV	CRDM	3	1	3	3	0	0	2	0	0	1	0	0	2
MVFS	MDS BOD	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
RAS	CRDM	3	1	2	2	0	0	0	1	0	1	0	2%	1
LAF	MDS BOD	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NPO	MDS BOD	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
CES	CRDM	2	1	1	3	1	1	3	1	0	1	1	0	0
LESM	CRDM	3	1	1	3	2	0	1	0	0	0	0	3%	0
IBSM	AREB-1	3	0	3	2	0	0	0	1	1	3	0	6%	1
RNSG	MDS BOD	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
FLSR	MDS BOD	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SDS	MDS BOD	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
LMAL	MDS BOD	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
ESC	CRDM	3	1	2	2	0	0	1	0	1	1	1	0	0
ACLS	CRDM	3	0	1	2	0	2	1	0	0	2	1	0	2

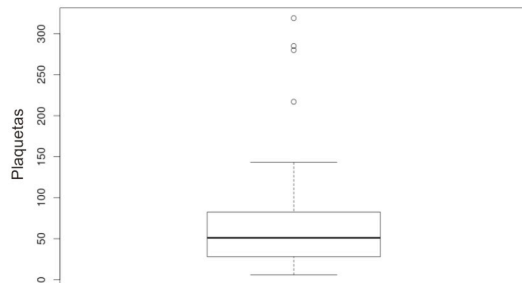
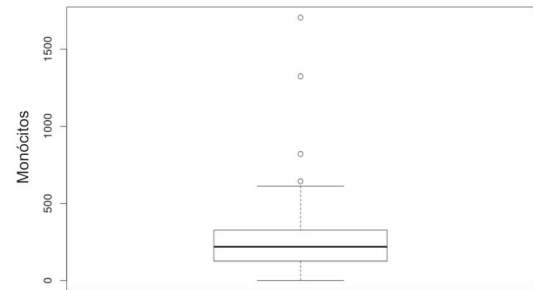
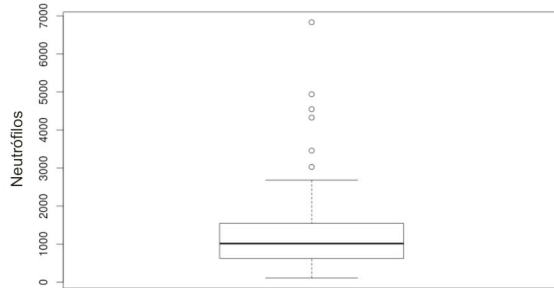
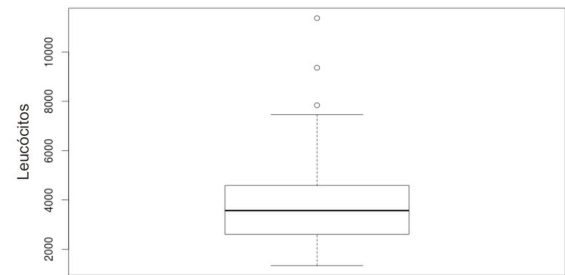
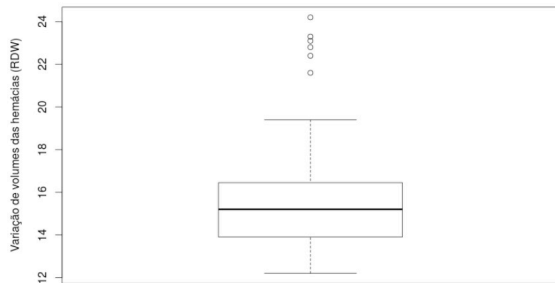
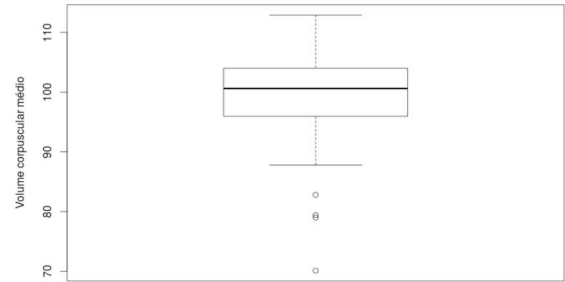
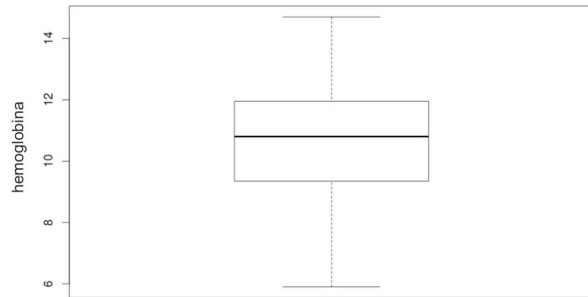
APÊNDICE 3
GRADUAÇÃO DE DISMEGACARIOCITOPOESE DOS
CASOS COM SMD/SMD *BORDERLINE*

GRADUAÇÃO DE DISMEGACARIOCITOPESE DOS CASOS COM SMD/SMD BORDERLINE

Paciente	SMD	DismegaKpoeise	Hipobulados	Monocitomas	Microformas	Fragmentados	Hipogranulares	Plaq agranulares	Megaplaquetas	Megacarioblastos
CMN	CRDM	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESC	AREB-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NL	CRDM	1	0	0	0	1	1	0	0	0
SMAP	MDS BOD	na	na	na	na	na	na	na	na	na
ACLS	AREB-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EOB	CRDM	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JJR	MDS BOD	na	na	na	na	na	na	na	na	na
JSS	CRDM	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JAV	CRDM	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MVPS	MDS BOD	na	na	na	na	na	na	na	na	na
RAS	CRDM	1	0	0	0	1	0	0	0	0
LAF	MDS BOD	2	0	0	0	2	2	0	0	0
NPO	MDS BOD	1	0	0	0	0	1	0	0	0
CES	CRDM	3	1	2	0	2	2	0	0	0
LESIM	CRDM	1	2	0	0	0	1	0	0	0
IBSM	AREB-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RNSG	MDS BOD	na	na	na	na	na	na	na	na	na
FLSR	MDS BOD	na	na	na	na	na	na	na	na	na
SDS	MDS BOD	2	0	2	2	0	0	0	0	0
LMAL	MDS BOD	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESC	CRDM	na	na	na	na	na	na	na	na	na
ACLS	CRDM	0	0	0	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE 4

GRÁFICOS DOS VALORES HEMATIMÉTRICOS DAS 58 AMOSTRAS DE SP



APÊNDICE 5
FICHÁRIO DE AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA DE
PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI

Biópsia de Medula Óssea - Anemia de Fanconi

Paciente: _____ / **lâm n.º:** _____
Idade (na coleta): _____ **Sexo:** () Fem () Masc **Cor:** () Bco () Não Bco **Procedência:** _____
Data da coleta: ____/____/_____
Material: (1= não_repres; 2 repres) **N.º espaços :** _____ **Adipócitos = não_sim** (1 2 3 4)
Celularidade global (1 2 3 4 5) **RGE:** ____ 1 diminuída, 2 normal, 3 aumentada
Distribuição: (1) homoG (2) heteroG
Ossos: (1) fino (2) normal (3) espesso; osteócitos (1) não (2) sim; osteoBL (1) não (2) sim;
 osteoCL (1) não (2) sim; cartiLG (1) não (2) sim
S.Eritroide: Celularidade (1) diminuída (2) normal (3) aumentada
 Maturação (1) normal (2) retardo (3) nãoAv
 DISeritro (1) ausente (2) presente tipos: _____

S.Granulocítica: Celularidade (1) diminuída (2) normal (3) aumentada
 Maturação (1) normal (2) retardo (3) nãoAv
 Blastos (1) não (2) focais (3) difusos
 ALIPS (1) ausentes (2) presentes
 Eosinofilia (1) ausente (2) presente
DISgranulo (1) ausente (2) presente (3) nãoAV

Tipos: _____

S.Megacariocítica: celularidade (1 2 3 4 5 6) (3_4=normais)
 Distribuição (1=central 2=paratrabecular)
 DISmegaK (1=não 2=sim 3=nãoAv) (4=isolados_5=agrupados)

Tipos: _____

SIEstromai agregado linfoide (1=ausente 2=presente) n.º = _____
 Plasmócitos (1=ausentes 2=presentes) (ativi_secret: 3=não_4=sim)
 Macrófagos (1=ausentes 2=presentes) (hemoFago; 3=não_4=sim)
 Linfócitos (1=ausentes 2=presentes) (plymph_centroC_centroBL)
 Mastócitos (1=ausente 2=presente)
 Necrose (1=ausente 2=focal 3=difusa)
 Edema (1=ausente 2=focal 3=difusa)
 Hemorragia (1=ausente 2=focal 3=difusa)
 Fibrose (1=ausente 2=focal 3=difusa)
 Ectasia vascular (1 ausente 2=presente)
 Hemossiderina (1 2 3 4 5 grânulos) (sideroblastos: Anel_não Anel)
 Citotoxicidade (1=ausente 2=presente) Tipo: _____

Impressões: _____

Data da revisão: ____/____/____

Dr. Lisandro; Dr.^a Ligia

Citologia de Medula Óssea - Anemia de Fanconi

Paciente: _____ / **lâm n.º:** _____ caso n.º _____
Idade (na coleta): _____ **Sexo:** () Fem () Masc **Cor:** () Bco () Não Bco **Procedência:** _____
Data da coleta: ____/____/____

Punção: (1) esternal (2) ílica (3) tibial
Celularidade: (1) aplásica (2) hipo (3) normo (4) hiper (5) dry tap (6) hemodiluída
Espículas: (1) aplásicas (2) hipocelulares (3) normocelulares (4) numerosos
RGE: ____ não Avaliável

SÉRIE ERITROIDE:

Celularidade absoluta (1) aplásica (2) hipo (3) normo (4) hiper (5) não Av
Celularidade relativa (1) hipo (2) normo (3) hiper
Nº mitoses (1) ausentes (2) pequeno (3) regular (4) grande (5) nãoAv
Mitoses (1) típicas (2) atípicas
Maturação (1) conservada (2) retardo_ pró-baso-poli-ortocromáticos (3) nãoAv
Transformação (1) microeritroblastose (2) normoeritroblastose (3) megaloblastose
Item acima (1) parcial (2) predominante (3) total
MegaloBl_verdadeira: (1) ausente (2) presente
Item acima (1) parcial (2) predominante (3) total
Hot spots (1) ausentes (2) raros (3) moderados (4) numerosos (5) ectópicos
Ihotas eritroblásticas: (1) ausentes (2) raras (3) moderados (4) numerosas (5) ectópicas
Eritrofagocitose: (1) ausente (2) discreta (3) moderada (4) importante
Diseritropose: (1) ausente (2) grau 1 (3) grau 2 (4) grau 3

TIPOS	GRAU ZERO	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	OBSERVAÇÕES
Multinuclearidade					
Pontes internucleares					
Núcleos foliares					
Núcleo "fatia salame"					
Falhas Hbnização					
Cels em apoptose					
Mitoses atípicas					
Pontes intercelulares					
Howell-Jolly					
Ponteados basófilos					
Macrocitose oval					
Dácrio-elipto-esquistó					
Dimorfismo					
anisoC_policromasia					
anisocitose					

SÉRIE GRANULOCÍTICA:

Celularidade Absoluta:	(0) aplásica	(1) hipo	(2) normo	(3) hiper	(4) nãoAV
Celularidade Relatiba:	(1) hipo	(2) normo	(3) hiper		
Nº mitoses:	(1) ausentes	(2) pequeno	(3) regular	(4) grande	(5) nãoAV
Maturação:	(1) conserV	(2) retardo em MB-PMC-MC-MMC	(3) nãoAv		
Tempka-Braun:	(1) ausente	(2) discreta	(3) moderada	(4) importante	
Granulocitofagocitose:	(1) ausente	(2) discreta	(3) moderada	(4) importante	
Eosinofilia:	(1) ausente	(2) discreta	(3) moderada	(4) importante	
Basofilia	(1) não	(2) sim			
Disgranulocitopese	(1) ausente	(2) grau 1	(3) grau 2	(4) grau 3	(5) nãoAv

TIPOS	GRAU ZERO	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	OBSERVAÇÕES
assincronismoN/C					
Hof perinuclear					
Apoptose					
Form_pelgeroides					
Cels em rosca					
Vacuolizações					
Polilobocitose					
Monócitos					
Blastos (I.II.III)					
Outros					

SÉRIE MEGACARIOCÍTICA:

Celularidade:	(1) aplásica	(2) hipo	(3) normo	(4) hiper
Clusters	(1) não	(2) sim		
Maturação	(1) preservada	(2) comprometida	(3) não Av	
Plaquetogênese:	(1) ausente	(2) diminuída	(3) preservada	(4) aumentada
DismegaKpese:	(1)ausente	(2) grau 1	(3) grau 2	(4) grau 3

TIPOS	GRAU ZERO	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	OBSERVAÇÕES
Hipolobulados					
Monoformas					
Microformas					
Fragmentados					
Hipogranulares					
plaQ_agrunalares					
Megaplaquetas					
Megacarioblastos					

SÉRIE IMUNO_ESTROMAL:

TIPOS	GRAU ZERO	GRAU 1	GRAU 2	GRAU 3	OBSERVAÇÕES
Histiócitos					
Tesaurócitos					
Siderófagos					
Hemofagocitose					
Plasmócitos					
Atividade secretora					
Multinucleares					
Redor histiócitos					
linfócitos					
Maduros					
Hematogônias					
Plymphs					
Centroцитos					
Centroblastos					
Sombras celulares					
Mastócitos					
Osteo BLastos					
Osteo CLastos					

Hemossiderina: (1) ausente (2) discreta (3) moderada (4) importante

Sideroblastos: (1) ausente (2) anel (3) não_anel

Impressões: _____

Data da revisão: ___ / ___ / ___

Dr. Lisandro; Dr.^a Ligía

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: Análise Citológica e Histológica de Medula Óssea de pacientes portadores de Síndrome de Anemia de Fanconi e sua relação com achados da Citogenética Convencional.

Pesquisador: Lisandro Lima Ribeiro

Versão: 1

Instituição: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

CAAE: 01078312.2.0000.0096

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 6364

Data da Relatoria: 23/03/2012

Apresentação do Projeto:

trata-se de projeto de pesquisa retrospectivo, por meio de análise de dados registrados em prontuários médicos de pacientes portadores de anemia de fanconi registrados e tratados no Serviço de Transplante de Medula Óssea do HC-UFPPr.

Objetivo da Pesquisa:

avaliar as alterações mielodisplásicas encontradas em portadores de anemia de Fanconi

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não há riscos para a população investigada, visto que não haverá qualquer procedimento ou interferência no tratamento destes pacientes. Como benefícios, haverá a determinação da incidência de alterações mielodisplásicas nesta população, que parece ser maior do que as apresentadas nos relatos de literatura especializada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

a pesquisa tem grande importância para a caracterização da população atendida na Instituição e certamente contribuirá para melhor atendimento destes pacientes, visto que orientará de forma mais objetiva a investigação de alterações associadas e, conseqüentemente, a conduta clínica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

estão corretos

Recomendações:

Não há recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser considerado aprovado.

ANEXO 2

COLORAÇÃO DAS LÂMINAS DE CITOLOGIA

As lâminas do esfregaço são encaminhadas ao laboratório de Hematologia e, após serem secas ao ar, recebem a coloração de Wright – Giemsa e Perls (hemossiderina), conforme as técnicas do laboratório de Hematologia

I. COLORAÇÃO DE WRIGHT-GIEMSA:

1. Preparação do corante Wright-Giemsa: Macerar 600 mg de Giemsa e 3 g de Wright com 30 ml de glicerina; Carrear o macerado com metanol para o galão a ser armazenado o corante. Filtra-se ao passar para o frasco de uso diário.
2. Preparação do Tampão-Fosfato: Adiciona-se 13,2g de KH_2PO_4 e 7g de $\text{Na}_2\text{PO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 2 litros de água destilada qsp.
3. Coloração das lâminas: cobre-se a lâmina por 4 minutos com a coloração Wright-Giemsa através de 1 pipeta pasteur; coloca-se a mesma quantidade de tampão fosfato por 12 minutos. Lava-se e seca-se a lâmina.

II. COLORAÇÃO DE PERLS (Hemossiderina):

1. Preparação do corante azul da Prússia: Adiciona-se 2g de ferricianeto de potássio ($\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a 100 ml de água destilada. Esta preparação deve ser realizada 24 horas antes do uso, permanecerá estável para uso no prazo de 60 dias. Preparar solução de ácido clorídrico: diluir 1 ml de ácido clorídrico em 99 ml de água destilada, separar 30 ml desta solução e adicionar 10 ml da solução do ferricianeto de potássio, resultará em 40 ml do corante azul da Prússia.
2. Preparação de solução de safranina: Adiciona-se 0,1ml da solução estoque de safranina a 5 ml de tampão 6,4
3. Coloração das lâminas: Primeiro fixam-se os esfregaços de MO e controle-testemunho, por 10 minutos, em álcool metílico. Lavar as lâminas em água corrente e deixar secar. Na sequência, corar com corante azul da Prússia por 30 minutos, lavar em água corrente e secar. Finalmente, corar com safranina por 1 minuto e 30 segundos; Lavar em água corrente e secar as lâminas. Avaliar em microscopia ótica.

PRODUÇÃO ACADÊMICA

1. Publicações em revistas:

Four cases of Chédiak-Higashi syndrome Azambuja AP, Nascimento B, Comar SR, Loth G, Ribeiro LL, Bonfim C, Pianovski M, Zanis-Neto J, Malvezzi M. Rev Bras Hematol Hemoter. 2011; 33(4):315-22

Cyclophosphamide-based in vivo T-cell depletion for HLA-haploidentical transplantation in Fanconi anemia. Thakar MS, Bonfim C, Sandmaier BM, Ribeiro LL et al. Pediatr Hematol Oncol. 2012; 29(6):568-78

Early lymphocyte recovery as a predictor of outcome, including relapse, after hematopoietic stem cell transplantation. Morando J, Fortier SC, Bonfim CM, Ribeiro LL et al Rev Bras Hematol Hemoter. 2012; 34(6): 430-5

X-linked adrenoleukodystrophy: correlation between Loes score and diffusion tensor imaging parameters. Ono SE, de Carvalho Neto A, Gasparetto EL, Coelho LO, Escuissato DL, Bonfim CM, Ribeiro LL. Radiol Bras. 2014 Nov-Dec; 47(6): 342-9.

Unrelated hematopoietic stem cell transplantation in the pediatric population: single institution experience. Marinho DH, Zanis-Neto J, Bonfim CMS, Funke VAM, Ribeiro LL. Rev Bras Hematol Hemoter. 2015; 37 (4): 236-241.

Revesz Syndrome-Case report. Issaho DC, Moreira AT, Ribeiro LL, Zago RJ, Ribeiro CG. Rev Bras Oftalm. 2015; 74(2): 110-2

2. Trabalhos premiados em congressos brasileiros:

Best abstract in Bone Marrow Failure Syndromes (Alírio Pfiffer Award) presented at the XIII Brazilian BMT Congress in 2009. Unrelated Bone Marrow Transplantation in patients with Fanconi Anemia. Bonfim CMS; Nabhan SK; Ribeiro LL et al. August 2009, Curitiba- Brazil

Best abstract in Bone Marrow Failure Syndromes (Alírio Pfiffer Award) presented at the XIX Brazilian BMT Congress in 2015. Haplo identical stem cell with post transplantation cyclophosphamide for the treatment of Fanconi Anemia. CMS Bonfim, LL Ribeiro, G Loth, S Nichele, C Kuwahara, MA Bitencourt, D Pilonetto, L Dorneles, NF Pereira, R Pasquini. August 2015, Curitiba- Brazil

Best abstract in Pediatric Hematology presented at the Brazilian Congress of Hematology - HEMO in 2015. Treatment of bone marrow failure in 49 Fanconi Anemia patients with Oxymetholone. Lisandro L. Ribeiro; Samantha Nichele; Marco Antonio Bitencourt; Ricardo R. Petterle; Gisele Loth; Daniela Pilonetto; Miriam Barbosa; Ricardo Pasquini; Carmem M.S. Bonfim.

Best abstract in Bone Marrow Transplantation presented at the Brazilian Congress of Hematology - HEMO in 2015. Excellent outcome after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT): A single Center Experience on 112 patients with Fanconi Anemia

3. Apresentações orais de trabalhos científicos:

26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium:

Treatment of Bone Marrow Failure in 49 Fanconi Anemia Patients with Oxymetholone. LL Ribeiro, S Nichele, MA Bitencourt, RR Petterle, G Loth, D Pilonetto, ML Barbosa, R Pasquini CMS Bonfim. Sept 2014 26thFARF.

Haploidentical Bone Marrow Transplantation and Post-transplantation Cyclophosphamide for patients with Fanconi Anemia: The experience of Curitiba. CMS Bonfim, LL Ribeiro, G Loth, S Nichele, C Kuwahara, MA Bitencourt, D Pilonetto, L Dorneles, NF Pereira, R Pasquini. Sept 2014 26thFARF.

XIX Brazilian BMT Congress in 2015:

Hematopoietic stem cell transplantation for Histiocytosis – Brazilian experience. Ribeiro LL, Ferandes JF; Cortadelo, V; Vieira, AK; Nichele, S., Loth G., Ginani, V; Gouveia R; Seber A; Bonfim, C. presented at the XIX Brazilian BMT Congress in 2015.

4. Aulas ministradas em congressos nacionais e internacionais:

Congresso Brasileiro de Hematologia – HEMO 2013, Brasilia DF:

Principais questões na terapia dos Linfomas Não Hodgkin – B recidivados ou refratários

Simposio Científico Internacional 50° Aniversario de la Sociedad Peruana de Hematología 14 y 15 Noviembre 2014 – Lima Peru:

Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Fanconi Anemia

ALL relapse treatment

II Encontro do Comitê de Hematologia e Hemoterapia Pediátrica da Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia em junho 2015 – São Paulo:

When thinking about Inherited Aplasia?

Fanconi Anemia: Androgen treatment

XIX Brazilian BMT Congress in 2015, Foz do Iguaçu:

Particularities of Haploidentical Bone Marrow Transplantation and post transplantation cyclophosphimide presented at the XIX Brazilian BMT Congress in 2015.