

Artigo/Article

Nódulos linfóides medulares

Bone marrow lymphoid nodules

Silvia M. M. Magalhães¹
Francisco D. Rocha Filho²
José Vassallo³
Irene Lorand-Metze⁴

A biópsia de medula óssea é parte integrante do estadiamento e seguimento de pacientes com doenças hematológicas. Nódulos linfóides são um achado comum, usualmente observados em associação com doenças inflamatórias crônicas, infecção, hemólise, síndromes mieloproliferativas e doenças auto-imunes. São, em geral, considerados reacionais. Sendo a medula óssea o sítio extranodal mais comumente envolvido nos linfomas foliculares, o diagnóstico diferencial mais importante é a infiltração medular por doença linfoproliferativa. Do ponto de vista prático, os infiltrados linfóides são, em geral, facilmente distinguíveis ao estudo histológico. Agregados reacionais são pequenos, têm bordas delimitadas, são compostos por uma população celular heterogênea e têm localização central. Nódulos malignos infiltram a medula óssea na região paratrabecular e são compostos por células clivadas. A análise imunofenotípica, utilizando um painel de anticorpos monoclonais, é capaz de definir a linhagem celular, subpopulação e estágio de diferenciação da população neoplásica, contribuindo para a confirmação do diagnóstico. Nos casos controversos, a análise molecular da proliferação linfóide pode ser útil. A monoclonalidade pode ser demonstrada pela restrição de cadeias leves ou através do rearranjo do DNA da cadeia pesada das imunoglobulinas. Idealmente, os resultados da análise molecular devem ser interpretados em conjunto com a análise morfológica e imunofenotípica. A morfologia continua sendo o padrão-ouro na avaliação da infiltração medular por linfoma folicular e as análises imunofenotípica e molecular devem ser consideradas complementares. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003; 25(2):81-87.

Palavras-chave: Nódulos linfóides; medula óssea; imunofenotipagem; análise molecular.

¹Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará/HEMOCE.

²Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará.

³Departamento de Patologia, Universidade Estadual de Campinas - SP.

⁴Departamento de Medicina Clínica, Universidade Estadual de Campinas - SP.

Correspondência para: Silvia Maria Meira Magalhães
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - HEMOCE
Av. José Bastos 3390 – 60436-160 – Fortaleza – Ceará
e-mail: silviamm@ufc.br

Nódulos linfóides medulares

A biópsia da medula óssea é parte integrante do diagnóstico, estadiamento e seguimento de pacientes com doenças linfoproliferativas. Também doenças não neoplásicas infecciosas e sistêmicas com frequência induzem alterações morfológicas na medula óssea.¹

Linfócitos são observados na medula normal como células isoladas ou em grupamentos linfóides. Nódulos linfóides (NL) medulares são um achado morfológico comum, com uma frequência que varia entre 18% e 47%.² A frequência aumenta com a idade, alcançando valores mais elevados na população com idade superior a 50 anos (Tabela 1).

Tabela 1
Frequência de nódulos linfóides medulares de acordo com a faixa etária*

| Nódulos linfóides medulares | |
|-----------------------------|----------------|
| Idade (anos) | Frequência (%) |
| 0 - 19 | 7,2 |
| 20-39 | 9,5 |
| 40-59 | 11,4 |
| 60-79 | 16,7 |
| >80 | 24,6 |

*Navone R e colaboradores, 1985⁴

Nos pacientes mais jovens, a presença de agregados de pequenos linfócitos maduros pode representar um processo reacional, frequentemente associado a um amplo espectro de distúrbios infecciosos e doenças inflamatórias crônicas^{3,4,5}; doenças de caráter auto-imune, doenças do tecido conjuntivo,⁶ anemia megaloblástica, anemia ferropriva, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)⁷ e outras.⁸ Os NL podem ocorrer com frequência aumentada também em doenças clonais do tecido hematopoético, tais como as síndromes mieloproliferativas⁹ e síndromes mielodisplásticas.¹⁰ A presença dessas estruturas tem merecido atenção, sobretudo porque o diagnóstico diferencial mais importante da hiperplasia folicular reacional é o envolvimento medular por doença linfoproliferativa, em especial os linfomas não-Hodgkin indolentes.^{11,12}

Nas síndromes mielodisplásticas (SMD), NL medulares foram observados em 24,8% dos 206 casos analisados. Nessa condição, a presença desses agregados não apresentou relação com a idade, progressão da doença, sobrevida global ou associação com doença linfoproliferativa.¹⁰

Nos linfomas de curso indolente, o envolvimento da medula óssea pode ser observado num percentual significativo de casos, alcançando em algumas séries 90%.^{13,14,15} O linfoma folicular representa o tipo que mais frequentemente invade a medula óssea. Pequenos infiltrados, no entanto, são potencialmente obscurecidos por outras células medulares e podem passar despercebidos. Considerando que o achado de NL medulares pode ser a única evidência de linfoma em pacientes sem envolvimento nodal aparente e, ainda, que pacientes portadores de linfoma podem apresentar NL reacionais, a definição do caráter benigno ou maligno é fundamental no diagnóstico, no processo de estadiamento, na decisão da conduta terapêutica e na definição do prognóstico.

O diagnóstico diferencial baseia-se na análise morfológica, análise imunofenotípica e análise molecular.^{16,17,18}

Análise morfológica

Nenhum critério histopatológico isolado se mostrou eficaz para o diagnóstico diferencial entre NL benignos e malignos, e os princípios gerais propostos mais recentemente por Thiele e colaboradores¹⁶ não diferem significativamente daqueles propostos anteriormente por Brunning e colaboradores² (Tabela 2).

Agregados reacionais são, em geral, pouco numerosos, bem delimitados e têm composição celular polimórfica constituída de pequenos linfócitos maduros de permeio a raras células reticulares, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos. Têm localização preferencial na região intertrabecular da medula, podendo eventualmente tocar a trabécula e estão, em geral, associados a vasos. Podem, ainda, exibir centro germinativo, sobretudo nos casos associados a doenças inflamatórias ou de caráter auto-imune. A presença de centro germinativo, portan-

Tabela 2
Critérios morfológicos para o diagnóstico diferencial entre nódulos linfóides medulares benignos e malignos*

| Nódulos linfóides medulares | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| BENIGNOS | MALIGNOS |
| Localização central | Localização paratrabecular |
| Forma e limites precisos | Forma irregular e limites imprecisos |
| Ausência de infiltrado intersticial | Infiltrado intersticial freqüente |
| Constituição polimórfica | Constituição monomórfica |
| Ausência de mielofibrose | Presença de mielofibrose |
| Associação com vasos sanguíneos | Ausência de associação com vasos |
| Eventual centro germinativo | Ausência de centro germinativo |

*Adaptado de Brunning e McKenna, 1994²

to, sugere caráter benigno, embora possa, eventualmente, ser observado no linfoma da zona marginal^{1,2,16} (Figuras 1 a, b, c).

A presença de diferentes citoquinas e diferentes níveis de fatores de crescimento no microambiente local induz tipos de nichos particulares. Na doença linfoproliferativa, notadamente as de curso indolente, a infiltração medular assume uma localização preferencial paratrabecular, o que, associado à presença de mielofibrose nas áreas de infiltração, constituem os critérios morfológicos mais relevantes para o diagnóstico diferencial. Nódulos neoplásicos têm, em geral, limites imprecisos, o que evidencia um padrão infiltrativo de crescimento e composição celular monomórfica.^{2,16} (Figura 1 d).

Análise imunofenotípica

A infiltração medular mínima por doença linfoproliferativa pode se tornar aparente apenas com o uso de técnicas imunofenotípicas. Essa análise contribui na determinação da linhagem celular, subpopulação e sugere o estágio de diferenciação da população linfóide envolvida. Seu valor pode, no entanto, ser limitado pela população reacional de permeio, por vezes reduzindo a população maligna à maioria das células observadas.

Vários critérios imunofenotípicos são utilizados no diagnóstico da neoplasia linfóide: homogeneidade de expressão de alguns antígenos, expressão antigênica aberrante e restrição de cadeias leves em neoplasias que expressam imunoglobulinas (Ig) de superfície. Nas proliferações T é comum o fenômeno da perda antigê-

nica de marcadores de membrana pan-T.

Um painel de anticorpos limitado é suficiente para a detecção de envolvimento medular mínimo na maioria dos casos, e inclui CD20 e/ou CD79a e CD3 e/ou CD45RO.^{15,19,20,21} Ocasionalmente alguns marcadores adicionais podem ser necessários, como anticorpos contra cadeias leves de Ig nas proliferações plasmocitóides, CD5 ou ainda ciclina D1 para o

diagnóstico de linfoma de células do manto ou de pequenas células B. West e colaboradores demonstraram que um painel composto por CD20, CD5, CD10 e bcl-2 é útil para a distinção entre agregados linfóides medulares benignos e neoplásicos²² (Tabela 3).

Nódulos linfóides constituídos exclusivamente por células B representam, em geral, infiltração medular por doença linfoproliferativa indolente, muito embora esses possam se acompanhar de percentuais variáveis de células T reacionais (linfoma B rico em células T). Agregados reacionais são freqüentemente compostos por células B e T.^{19,20,23}

Nas SMD, um painel reduzido de anticorpos monoclonais, composto por CD20, CD45RO, CD3 e anti-bcl-2, foi utilizado para avaliação imunofenotípica desses agregados. Os NL, não associados a doença linfoproliferativa, apresentaram três padrões distintos de marcação para o anticorpo anti-CD20 (central, perinodular e difuso) e percentuais variáveis de células T de permeio.¹⁰

O diagnóstico diferencial entre lesão neoplásica e processo reacional pode requerer a determinação da clonalidade da proliferação. A restrição de cadeias leves de imunoglobulinas (Ig) é considerada critério diagnóstico para neoplasia de células B, baseado no conhecimento de que cerca de 80% dessas neoplasias expressam apenas kappa ou lambda, enquanto nos processos reacionais o padrão é policlonal. A técnica requer, como método de escolha, tecido congelado e, ainda assim, são fatores limitantes a presença de Ig no interstício, o nível de expressão de cadeias leves, a compo-

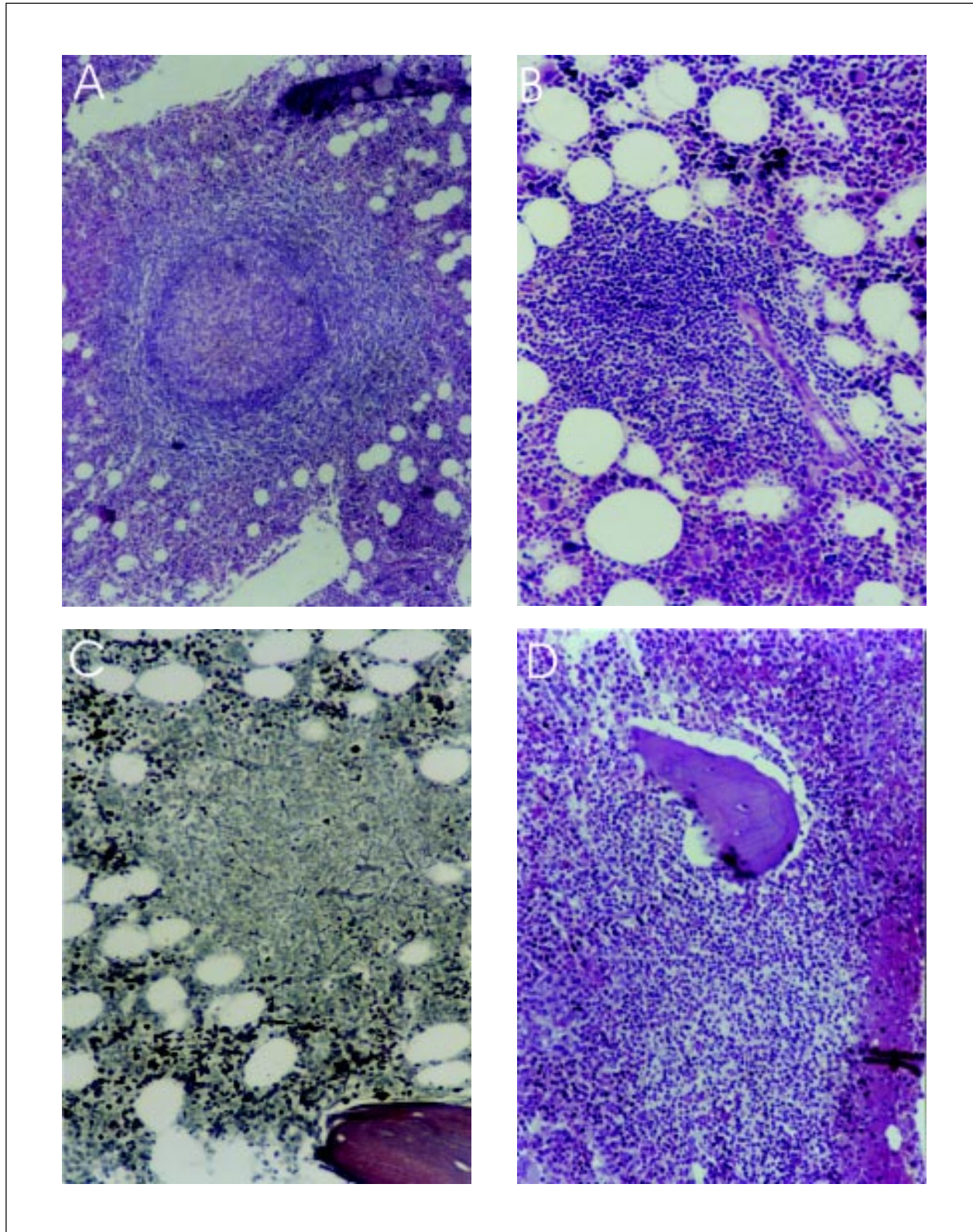


Fig. 1 – Nódulos linfóides medulares: A – Nódulo linfóide intersticial benigno, com centro germinativo exuberante e coroa linfocitária, observado em paciente HIV (HE 200x); B – Nódulo linfóide intersticial benigno, bem delimitado, com vaso sanguíneo evidente (HE 200x); C – Nódulo linfóide reacional com fibras reticulares deicadas de distribuição periférica (Prata reticulina 200x); D – Volumoso nódulo linfóide neoplásico de limites imprecisos e localização para-trabecular (HE 200x)

Tabela 3
Critérios imunofenotípicos para o diagnóstico diferencial entre nódulos linfóides medulares benignos e malignos*

| | Benignos | Malignos |
|-------|----------|----------|
| CD20 | | |
| >50% | 55% | 88% |
| CD5 | | |
| >50% | 55% | 15% |
| CD10 | | |
| >15% | 5% | 46% |
| Bcl-2 | | |
| >50% | 75% | 100% |

*Adaptado de West e colaboradores, 2002²²

sição celular do infiltrado e também a extensão do infiltrado inflamatório policlonal de permeio. Os melhores resultados, portanto, são obtidos através da demonstração de Ig citoplasmáticas, o que restringe a sua utilização para desordens com diferenciação plasmocitária.²⁴

A análise imunofenotípica da expressão das cadeias leves em material a fresco por citometria de fluxo é utilizada para determinação de clonalidade de proliferações B. A técnica é rápida e de baixo custo e permite a detecção de pequeno número de células monoclonais (1% a 5%) na presença de células B policlonais.²⁵ Em material de arquivo, a análise retrospectiva de 105 pacientes revelou especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo de 92,3%, 73,1%, 90%, 77%, respectivamente.²⁶ Para avaliação de estruturas nodulares, no entanto, a obtenção de uma amostra de limites definidos, representativa do material a ser examinado, pode constituir um fator limitante desse método.

Análise molecular

A análise imunogenotípica, através da evidência da restrição de cadeias leves ou através do estudo do rearranjo do DNA da região CDR3 da cadeia pesada das imunoglobulinas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), é capaz de determinar a clonalidade de proliferações

linfóides B em nível molecular em casos que escapam à detecção morfológica e imunohistoquímica. Tornou-se, portanto, um importante estudo complementar na avaliação das desordens linfoproliferativas.¹⁷

O estudo de DNA extraído de fragmentos de biópsia óssea fixados, descalcificados e incluídos em parafina mostrou resultados superiores àqueles obtidos de material aspirado¹⁸ uma vez que o padrão de envolvimento medular, freqüentemente heterogêneo e focal, pode resultar na ausência de células neoplásicas detectáveis no aspirado. A diluição inevitável com células do sangue periférico pode alterar de forma crítica o limiar de detecção pela técnica utilizada. Também o espessamento da rede de reticulina, que, com freqüência, acompanha as proliferações linfomatosas, pode ser um fator limitante para a obtenção de material adequado.

Especialmente para a avaliação de infiltrados nodulares é difícil a definição de um limiar para a relação kappa:lambda que define monoclonalidade, considerando que o material analisado forçosamente inclui células reacionais de permeio. Magalini e colaboradores utilizaram, para garantir a adequação da amostra, a técnica de microdissecção do agregado linfóide a partir de fragmentos de biópsia.²⁷ A técnica, no entanto, não está amplamente disponível e não é adequada para estudos de rotina.

Mais recentemente, a evidência de monoclonalidade através da restrição de cadeias leves foi demonstrada em material de arquivo utilizando PCR quantitativo ("real time PCR"). Lehmann e colaboradores aumentaram a taxa de detecção de clonalidade, de uma média de 17% obtida através de imuno-histoquímica e 66% através da análise do rearranjo de DNA por PCR convencional, para 83% com a nova técnica. A metodologia beneficiou, em especial, a análise dos linfomas foliculares.²⁸

A análise imunogenotípica convencional tem se mostrado um recurso de alta especificidade, mas com elevado número de resultados falso-negativos, com uma sensibilidade que varia em torno de 60%.^{18,29,30} As causas prováveis dos resultados falso-negativos são a contaminação, erro de amostragem, distribuição heterogênea e focal do infiltrado linfomatoso, a

degradação do DNA, resultado do processo de fixação e descalcificação e competição na amplificação do DNA por células policlonais. Um elevado número de resultados falso-negativos pode ainda ser atribuído à hipermutação dos genes das cadeias pesadas de imunoglobulinas, nos estudos de rearranjo.^{18,29,30}

Conclusão

O diagnóstico diferencial entre NL malignos e benignos deve ser resultado de correlação clínica e morfológica. A análise morfológica continua sendo o padrão-ouro na avaliação diagnóstica de infiltrados linfóides medulares. A análise imunofenotípica e imunogenotípica são adjuntos importantes, sobretudo nos casos duvidosos ou inconclusivos.

Abstract

Bone marrow trephine biopsies are an integral part of the diagnosis, staging and follow-up of patients with haematologic disorders. Lymphoid nodules are a common finding, usually reported in association with chronic inflammatory syndromes, infection haemolysis, myeloproliferative disorders and autoimmune diseases. They are usually considered to be a reactionary feature. As bone marrow is the most common site of extranodal involvement of follicular lymphoma, the most important differential diagnosis is represented by bone marrow involvement by malignant lymphoma. From a practical point of view bone marrow lymphoid infiltrates are easy to diagnose on a histological basis. Benign aggregates are typically smaller, well distinguishable, contain a mixed population of cells and are nonparatrabeular. Neoplastic aggregates involving bone marrow as a paratrabeular infiltrate composed of cleaved cells. Immunophenotyping using a panel of monoclonal antibodies is capable of determining the lineage, subset and stage of differentiation of neoplastic lymphoid cells and may therefore contribute to confirm diagnosis. Especially in controversial cases, immunogenotypic analysis of the lymphoid proliferation may be helpful. Monoclonality may be detected by monotypic expressions of immunoglobulins or clonal rearrangements in the immunoglobulin heavy chain or T cell receptor genes. Ideally, the results of immunogenotypic analysis should be interpreted only in conjunction with the results of morphologic evaluation and immunophenotypic analysis. Morphology is still the gold standard in evaluating bone

marrow infiltration by follicular lymphoma and immunophenotypic and immunogenotypic analysis should be considered as useful complementary investigations. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003; 25(2):81-87.

Key words: Lymphoid nodules; bone marrow; immunophenotyping; immunogenotyping.

Referências Bibliográficas

1. Diebold J, Molina T, Camilleri-Broet S, Tourneau A, Audouin J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy. *Histopathology* 2000; 37:199-211.
2. Brunning RD, McKenna RW. Tumors of the bone marrow: lesions simulating lymphoma. In: Atlas of Tumour Pathology, 3rd Series, Fascicle 9, Vol.1, Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1994. p. 409-55.
3. Rywlin AM, Ortega RS, Dominguez CJ. Lymphoid nodules of the bone marrow: normal and abnormal. *Blood* 1974;43:389-400.
4. Navone R, Valpreda M, Pich A. Lymphoid nodules and nodular lymphoid hyperplasia in bone marrow biopsies. *Acta Haemat* 1985;74:19-22.
5. Magalhães SMM, Duarte FB, Vassallo J, Costa SCB, Lorand-Metze I. Multiple lymphoid nodules in bone marrow biopsy in immunocompetent patient with cytomegalovirus infection: an immunohistochemical analysis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34:365-8.
6. Rosenthal NS, Farhi DC. Bone marrow findings in connective tissue disease. *Am J Clin Pathol* 1989;92: 650-4.
7. Bain BJ. Lymphoma and reactive lymphoid lesions in HIV infection. *Blood Reviews* 1998;12:154-62.
8. Laroche M, Ludot I, Brousset P, Mazières B. Osteoporosis with lymphoid nodules and hematopoietic marrow hyperplasia. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:457-60.
9. Franco V, Florena AM, Aragona F, Campesi G. Immunohistochemical evaluation of bone marrow lymphoid nodules in chronic myeloproliferative disorders. *Virchows Archiv Pathol Anat* 1991;419:261-6.
10. Magalhães SMM, Vassallo J, Rocha Filho FD, Pinheiro MP, Metzke K, Lorand-Metze I. Bone marrow lymphoid aggregates in myelodysplastic syndromes: incidence, immunomorphological characteristics and correlation with clinical features and survival. *Leuk Res* 2002;26: 525-30.
11. Toren A, Bem-Bassat I, Rechavi G. The gray zone between malignant and reactive processes in lymphoproliferative diseases. *Acta Haematol* 1996; 96:120-5.
12. Crocker J. Lymphoid aggregates in bone marrow trephines: new approaches to a continuing problem. *J Pathol* 1996;179:367-8.

13. Lambertenghi-Delilieri G, Annaloro C, Soligo D, Oriani A, Pozzoli E, Quirici N, Luksch R, Polli EE. Incidence and histological features of bone marrow involvement in malignant lymphomas. *Ann Hematol* 1992;65:61-5.
14. Schimid C, Isaacson PG. Bone marrow trephine biopsy in lymphoproliferative disease. *J Clin Pathol* 1992;45:745-50.
15. Henrique R, Achten R, Maes B, Verhoef G, De Wolf-Peeters C. Guidelines for subtyping small B-cell lymphomas in bone marrow biopsies. *Virchows Arch* 1999;435:549-58.
16. Thiele J, Zirbes TK, Kvasnicka HM, Fischer R. Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies: differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma – a practical guideline. *J Clin Pathol* 1999;52:294-300.
17. Knowles DM. Immunophenotypic and immunogenotypic approaches useful in distinguishing benign and malignant lymphoid proliferations. *Sem Oncol* 1993;20:583-610.
18. Maes B, Achten R, Demunter A, Peeters B, Verhoef G, De Wolf Peeters C. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry and molecular analysis. *J Clin Pathol* 2000;53:835-40.
19. Bluth R, Casey TT, McCurley TL. Differentiation of reactive from neoplastic small-cell lymphoid aggregates in paraffin-embedded marrow particle preparations using L-26 (CD20) and UCHL-1 (CD45RO) monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 1993;99:150-6.
20. Horny HP, Wehrmann M, Griesser H, Tiemann M, Bultmann B, Kaiserling E. Investigation of bone marrow lymphocyte subsets in normal, reactive and neoplastic states using paraffin-embedded biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1993;99:142-9.
21. Chetty R, Echezarreta G, Comley M, Gatter K. Immunohistochemistry in apparently normal bone marrow trephine specimens from patients with nodal follicular lymphoma. *J Clin Pathol* 1995;48:1.035-8.
22. West RB, Warnke RA, Natkunam Y. The usefulness of immunohistochemistry in the diagnosis of follicular lymphoma in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2002;117:636-43.
23. Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke RA. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1994;102:825-34.
24. Vassallo J. Hematopatologia – aspectos gerais. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J, editores. *Manual de Imuno-histoquímica*. São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Patologia p.127-32, 1999.
25. Fukushima PI, Nguyen PKT, O'Grady P, Stetler-Stevenson M. Flow cytometric analysis of kappa and lambda light expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. *Cytometry* 1996;26:243-52.
26. Chizuka A, Kanda Y, Nannya Y, Oshima K, Kaneko M, Yamamoto R, Suguro M, Hamaki T, Matsuyama T, Takezako N, Miwa A, Togawa A. The diagnostic value of kappa/lambda ratios determined by cytometric analysis of biopsy specimens in B-cell lymphoma. *Clin Labor Haematol* 2002;24:33-6.
27. Magalini AR, Facchetti F, Salvi L, Fontana L, Massimo P, Scarpa A. Clonality of B-cells in portal lymphoid infiltrates of HCV-infected livers. *J Pathol* 1998;185:86-90.
28. Lehmann U, Bock O, Langer F, Kreipe H. Demonstration of light restricted clonal B-lymphoid infiltrates in archival bone marrow trephines by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2001;59:2023-9.
29. Brinckmann J, Kaufmann O, Reinartz B, Dietel M. Specificity of PCR-based clonality analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements for the detection of bone marrow involvement by low-grade B-cell lymphomas. *J Pathol* 2000;190:55-60.
30. Ben-Ezra J, Hazelgrove K, Ferreira-Gonzalez A, Garrett CT. Can polymerase chain reaction help distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow aspirates? *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:511-5.

Recebido:10/01/03

Aceito: 22/03/03