MARIA BEATRIZ BEÇA GONÇALVES PORTO E VASCONCELOS

ANÁLISE CROMOSSÓMICA EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS

SIGNIFICADO DAS ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS

PORTO
1992

MARIA BEATRIZ BEÇA GONÇALVES PORTO E VASCONCELOS

ANÁLISE CROMOSSÓMICA EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS

SIGNIFICADO DAS ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS

PORTO
1992

Maria Beatriz Beça Gonçalves Porto e Vasconcelos

ANÁLISE CROMOSSÓMICA EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS

SIGNIFICADO DAS ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Genética (Disciplina de Genética Humana), apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, sob a orientação da Profª Drª Isabel Matheiro e co-orientação da Profª Drª Maria de Sousa.

Resultante de trabalho desenvolvido no projecto intitulado "Impacto relativo do estudo imunológico, rearranjos de genes, alterações cromossómicas e valores do ferro no prognóstico das leucemias", subsidiado pela JNICT (proj. nº 87233).

Porto
1992

Preceitos Legais

De acordo com o nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, foram utilizados para esta tese resultados contidos nos seguintes trabalhos:

B Porto, G Porto, I Godinho & M de Sousa: Modulation of the relative expansion of T lymphocyte sets *in vitro* by red blood cells. 10th International Conference on Iron and Iron Proteins, Oxford, 1991.

B Porto, F Arosa & G Porto: Chromosome selection in hypodiploid lymphocytes in long term culture. Am J Hum Genet supp 49: 292, 1991 (abstract)

B Porto, A Mota, J Coutinho, B Justiça & MI Malheiro: Estudios citogenéticos en enfermedades hematológicas: analisis en 185 casos. Sangre (submetido para publicação).

Para o cumprimento do disposto naquele Decreto-Lei, esclarece-se ser da nossa responsabilidade a ordenação e execução dos experimentos que permitiram a obtenção dos resultados apresentados, a sua interpretação e discussão, bem como a redacção dos trabalhos referidos.

Aos meus Pais

Ao Zé Carlos

e

Francisco

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Prof. Dr. Amândio Tavares, pela amizade que sempre me dedicou e pelos seus valiosos ensinamentos que muito contribuiram para a progressão da minha carreira na área de Genética Humana.

À Srª. Profª. Drª. Maria Isabel Malheiro, cuja orientação nesta tese reflecte a amizade e trabalho de equipa que sempre nos uniu ao longo de uma carreira em comum, na área da Citogenética Humana. A sua revisão crítica e cuidada deste trabalho, acompanhada por um forte encorajamento, sobretudo nas horas de maior cansaço, foi indispensável para a sua concretização.

À Srª. Profª. Drª. Maria de Sousa, a quem devo a possibilidade da realização dos trabalhos apresentados, ao dirigir-me o convite para a colaboração no projecto de investigação intitulado "Impacto relativo do estudo imunológico, rearranjo de genes, alterações cromossómicas e valores do ferro no prognóstico das leucemias", do qual derivou o tema desta tese. Agradeço também o seu constante interesse pelo desenvolvimento dos experimentos, as suas críticas e comentários, que muito me honraram.

À minha irmã Graça Porto, agradeço profundamente o permanente interesse e dedicação por este trabalho, demonstrados nas inúmeras e esclarecedoras discussões que tivémos, e que contribuiram decisivamente para a sua realização. Agradeço ainda todo o apoio e colaboração que me dedicou na execução da análise estatística apresentada nos capítulos 4 e 5.

Às Sras. técnicas e auxiliar do Laboratório de Citogenética do ICBAS, Conceição Pina Cabral, Arminda Silva e Fernanda Filipe, que muito colaboraram na execução das técnicas laboratoriais utilizadas neste trabalho.

Às Drªs. Graça Porto e Inês Godinho, que executaram os estudos de proliferação em células mononucleares e caracterização fenotípica das células em divisão, apresentados no capítulo 3.

Ao Dr. Fernando Arosa, pela sua preciosa ajuda na contagem e identificação cromossómica apresentada no capítulo 3.

Aos Drs. Alexandra Mota e Jorge Coutinho, pela avaliação dos dados clínicos referentes a todos os doentes estudados no capítulo 5.

À Srª. Profª. Drª. Corália Vicente, pela sua ajuda na execução e interpretação de cálculos estatísticos apresentados neste trabalho.

Ao Serviço de Iconografia do ICBAS, em especial ao Sr. José Gonçalves, que pelo seu aperfeiçoamento na técnica fotográfica aplicada à citogenética muito contribuiu para os estudos de análise cromossómica.

Ao Gabinete de Desenho do ICBAS, pela execução das Figuras apresentadas neste trabalho.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Mutações em células somáticas 1
1.2. Alterações cromossómicas em células somáticas 4
1.3. Alterações cromossómicas no cancro 11
1.4. Objectivos do trabalho 19

Bibliografia 20

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS MALIGNAS SUJEITAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA

2.1. Introdução 29
2.2. Tempo de cultura 30
2.3. Tratamento com colchicina 37
2.4. Sincronização celular 42
2.5. Efeito dos glóbulos rubros em culturas de sangue periférico 45
2.6. Conclusões 54

Bibliografia 55

CAPÍTULO 3

EFEITO DOS GLÓBULOS RUBROS NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM CULTURAS DE SANGUE PERIFÉRICO

3.1. Introdução 59
3.2. Expansão relativa dos linfócitos CD8+ e CD4+ 60
3.3. Manutenção de células CD8+ em cultura prolongada 71
3.4. Conclusões 75

Bibliografia 76

CAPíTULO 4

ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS EM CULTURAS DE SANGUE PERIFÉRICO: EVIDÊNCIA DE SELECÇÃO CROMOSSÓMICA

4.1. Introdução 79
4.2. Selecção cromossómica nas aneuploidias não clonais de células CD8+ mantidas em cultura prolongada 81
4.3. Selecção cromossómica nas aneuploidias não clonais do sangue periférico de um doente com Anemia de Fanconi 92
4.4. Conclusões 100

Bibliografia 101

CAPíTULO 5

ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS MALIGNAS

5.1. Introdução 103
5.2. Alterações cromossómicas clonais - sua importância como factores de diagnóstico 104
5.3. Frequência de tetraploidias clonais 123
5.4. Significado das aneuploidias não clonais 126
5.5. Conclusões 137

Bibliografia 138

CAPíTULO 6

CONCLUSÕES FINAIS

6.1. Conclusões e considerações gerais 141
6.2. Perspectivas de trabalho futuro 142

RESUMO 147

SUMMARY 149

RÉSUMÉ 151

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	anemia de Fanconi
APAAP	fosfatase alcalina anti fosfatase alcalina
AR	anemia refractária
AREB	anemia refractária com excesso de blastos
AREB-t	anemia refractária com excesso de blastos em transformação
bcr-abl	"breakpoint cluster region - abelson c-oncogene"
BrdU	bromodeoxiuridina
CB	carcinoma da bexiga
CC	carcinoma do cólon
CMN	células mononucleares
del	delecção
der	cromossoma derivado
DH	doença de Hodgkin
dup	duplicação
FAB	"The French-American-British Co-operative group"
FB	fase blástica
FCS	soro fetal de vitela
FdU	fluorodeoxiuridina
FISH	hibridização *in situ* com fluorescência
G	bandas G
GR	glóbulos rubros
HGM	mapa do genoma humano
HLT4	hiperlinfocitose T4
HLT8	hiperlinfocitose T8
[^{3}H]	trítio
[^{3}H]TdR	timidina tritiada
i	isocromossoma
inv	inversão
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Cromossómica
leuc	leucemizado
LLA	leucemia linfoblástica aguda
LLC	leucemia linfocítica crónica
LMC	leucemia mieloide crónica
LMMC	leucemia mielomonocítica crónica
LNH	linfoma não Hodgkin
LNLA	leucemia não linfoblástica aguda
mar	cromossoma marcador
MG	meningioma
MI	mielofibrose idiopática
MIC	classificação morfológica, imunológica e citogenética
MM	mieloma múltiplo
p	braço curto
PHA	fitohemaglutinina
Ph1	cromossoma philadelphia
PL	prólinfocítica
PV	policitemia vera
PWM	mitogéneo pokeweed

q	braço longo
Q	bandas Q
R	bandas R
rob	translocação robertsoniana
SLP	síndrome linfoproliferativo
SMD	síndrome mielodisplásico
SMP	síndrome mieloproliferativo
SOD	dismutase do superóxido
t	translocação
TE	trombocitemia essencial

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. MUTAÇÕES EM CÉLULAS SOMÁTICAS

As células somáticas estão constantemente sujeitas à acção de agentes do meio ambiente externo e interno, capazes de provocar modificações que podem dar origem a um aumento, diminuição ou alteração do material genético nelas contido. A incidência destas modificações depende tanto da acção dos factores produtores, isto é, dos agentes mutagéneos, como da acção de sistemas de reparação endógenos.

Alterações do DNA

Os agentes mutagéneos podem, directa ou indirectamente, modificar o DNA nuclear. Sendo esta macromolécula portadora da informação genética, contida nos genes, a sua alteração poderá ter graves consequências funcionais. Estas podem manifestar-se por um bloqueio da expressão de um ou vários genes, ou pela formação de mensagens (mRNAs) erradas; a nível citoplasmático, as alterações traduzir-se-ão numa ausência de síntese proteica ou síntese de proteinas estrutural ou funcionalmente anormais. A alteração molecular do DNA poderá ainda envolver genes reguladores;

neste caso o efeito perturbador sobre os genes que se transcrevem será indirecto.

Nem todos os genes contidos no núcleo de uma célula se expressam; existe uma especificidade na actividade génica dependente do tipo celular. Assim sendo, somente as mutações que afectam genes que estão a ser expressos numa determinada célula e num determinado momento cinético, se repercutirão a nível celular e poderão ser observadas como modificações do comportamento biológico da célula.

Reparação do DNA

O DNA tem a capacidade de autoreparar-se. Esta acção realiza-se mediante vários sistemas enzimáticos que permitem, com maior ou menor eficácia, restituir a estrutura e função dos segmentos de DNA fragmentados.

Considerando que as mutações no DNA se reflectem em modificações, normalmente negativas, da sua transcrição, supõe-se que na evolução biológica se desenvolveram sistemas tendentes a reparar essas anomalias. O aparecimento destes sistemas de autoreparação deve corresponder a uma etapa muito precoce da evolução, já que em níveis filogeneticamente tão baixos como os procariotas se observam estes mecanismos perfeitamente desenvolvidos (Goyanes, 1978).

Quando as mutações aparecem, com as suas consequências para a célula, índivíduo ou espécie biológica sobre a qual incide, surge a necessidade da existência de um sistema de reparação que restitua a integridade estrutural e funcional do DNA afectado, protejendo assim a estabilidade do património genético da espécie. No entanto, tendo em conta as constantes modificações do meio ambiente, assim como todo o tipo de pressões da selecção natural, este sistema deverá ter uma certa elasticidade, de modo a que esporadicamente preserve modificações que sejam benéficas e capazes de produzir uma mutação evolutiva favorável à espécie.

Alterações cromossómicas e selecção

Na espécie humana existe uma grande variabilidade genética, dentro de margens consideradas fisiológicas, relativamente estável e capaz de assegurar possibilidades evolutivas. No entanto, a incidência de agentes mutagéneos incontrolados pode dar origem a alterações desfavoráveis da informação genética, capazes de modificar o equilíbrio actualmente existente. Quando essas alterações afectam uma célula somática, podem transmitir-se por mitose às gerações celulares seguintes, dentro de um mesmo tecido ou órgão, dando origem a um clone celular distinto. Mas este só persistirá se a mutação não interferir com a viabilidade dessas células.

As alterações cromossómicas são as mutações menos persistentes, pois como normalmente afectam grande quantidade de material genético informativo, estão fortemente sujeitas a pressões selectivas, acabando por ser eliminadas.

No entanto, também há modificações cromossómicas que podem, em determinadas células somáticas, representar uma certa vantagem selectiva. O exemplo mais comum são as alterações que surgem nas células malignas. Nestas, uma alteração cromossómica em vez de ser letal pode provocar o seu crescimento incontrolado. Mas também esta situação, que é vantajosa apenas para as células malignas, acabará por ser seleccionada, quer pelo tratamento quer pela morte do indivíduo.

Em resumo, as alterações cromossómicas em células somáticas são fortemente sujeitas a pressões selectivas. Embora na maioria dos casos sejam seleccionadas negativamente, há situações em que elas se tornam vantajosas para uma determinada população celular. Nestes casos, podem funcionar como marcas e a sua detecção permitirá estudar o papel de certos cromossomas ou segmentos cromossómicos específicos na biologia das células em causa.

1.2. ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM CÉLULAS SOMÁTICAS

Alterações numéricas

De acordo com a teoria cromossómica da hereditariedade de Sutton e Boveri (1902-1903), todas as células somáticas de um organismo devem possuir a mesma constituição cromossómica. Isto porque durante o processo de divisão mitótica o material genético de uma célula é distribuido igualmente por duas células filhas; cada cromossoma, após replicação no período S da interfase, é constituido por dois cromatídeos iguais que vão segregar na anafase; a segregação simultânea de todos os cromossomas do núcleo dá origem a dois núcleos filhos iguais. Este processo vai assim garantir uma continuidade genética, quantitativa e qualitativa, durante o desenvolvimento de um organismo.

No entanto este processo tão regular pode sofrer modificações e dar origem a uma alteração do número de cromossomas da célula.

As células somáticas humanas normais são ***diploides*** (2n=46 cromossomas), isto é, têm duas vezes um complemento haploide (n=23) de cromossomas. Existe assim uma **dissomia** para cada um dos 23 cromossomas (22 pares de autossomas e um par de cromossomas sexuais). Este número pode ser modificado como consequência dos seguintes mecanismos:

- uma alteração que atinge a globalidade dos cromossomas, dando origem a uma ***poliploidia***;

- uma alteração que atinge cromossomas individuais, dando origem a uma ***aneuploidia***.

Origem da poliploidia

O termo poliploidia usa-se de um modo geral para definir uma variação múltipla do DNA nuclear (n superior a dois: 3n, 4n, etc.).

São vários os mecanismos que levam ao aparecimento de poliploidia nas células somáticas. Numa das mais frequentes modificações da mitose, a

endoreduplicação, os cromossomas replicam duas ou mais vezes entre duas mitoses em vez de uma como numa divisão normal, aumentando o núcleo quer em tamanho quer em ploidia. Na ***endomitose***, a membrana nuclear não se dissolve e os dois cromatídeos de cada cromossoma não se separam em anafase, dando origem a uma célula tetraploide. Em certas ocasiões uma ausência de citocinese no fim da mitose, que vai dar origem a células binucleadas, pode provocar uma ***fusão nuclear*** com consequente poliploidização; este fenómeno ocorre principalmente em células pequenas onde o limite de espaço favorece os distúrbios mitóticos, especialmente a fusão dos fusos acromáticos.. A duplicação do número de cromossomas ainda pode surgir por intermédio de outra alteração mitótica, a ***restituição***, que consiste na ausência de segregação anafásica para os cromatídeos de todo o complemento cromossómico.

Significado da poliploidia

A poliploidia somática tem sido observada em diversos tecidos diferenciados, quer em plantas quer em animais (D'Amato, 1989). Nas células humanas este fenómeno foi também observado em diversos tecidos, nomeadamente no fígado (Swartz, 1956; Epstein, 1967; Carrierre, 1969; Wheatley, 1972), pâncreas (Ehrie e Swartz, 1974), fibroblastos (Therman, 1980), células do trofoblasto (Sarto *et al.*, 1982), células da placenta (Hunt e Jacobs, 1985) e megacariócitos (Paulus, 1968; Weste e Pennington, 1972). A trombopoiese depende mesmo da poliploidia celular: o megacariócito, que é proveniente de uma célula progenitora com um quantitativo de DNA normal (4C) pode atingir um quantitativo de 128C, até que rebenta para dar origem às plaquetas (Boll, 1981).

As células tumorais também são caracterizadas pelo aparecimento de poliploidia com uma frequência elevada (Therman, 1980; 1983). Este fenómeno, porém, raramente surge como alteração única, representando antes uma alteração mitótica inerente ao crescimento desregulado das células tumorais.

Existe assim uma aparente correlação entre poliploidia e diferenciação e transformação celulares. No entanto, a relação exacta entre estes fenómenos ainda não está bem esclarecida.

Na tentativa de dar uma explicação lógica para a existência de poliploidia em diversos tecidos diferenciados, deve-se ter em conta que uma célula poliploide é funcionalmente equivalente a duas, quatro , oito ou mais células diploides e por isso a restricção de determinada função a uma só célula pode ser vista sob um aspecto económico.

Grande parte dos estudos sobre o significado da poliploidia nas células somáticas referem-se a tecidos ou órgãos do reino vegetal (D'Amato, 1989; Brodsky e Uryvaeva, 1977). Nestes casos verifica-se que a poliploidia é um fenómeno especialmente importante e útil quando são impostas limitações espaciais e temporais ao crescimento de alguns tecidos ou órgãos (D'Amato, 1989). Também se verifica que, uma vez que a síntese do DNA é interrompida durante a divisão mitótica, nas células que sofrem várias replicações sem ser acompanhadas por divisão celular (endoreduplicação) estará aumentada a capacidade de síntese proteica. Um aumento da síntese proteica permite um crescimento rápido e um aumento na actividade metabólica, o que é especialmente importante para células ou tecidos com funções secretoras ou nutritivas (D'Amato, 1989).

Conforme foi referido, estas considerações referem-se a estudos em células vegetais. No entanto, não é de rejeitar a hipótese de que os mesmos fenómenos se verifiquem também nas células humanas que apresentam poliploidia, pois também estas estão muitas vezes associadas a funções secretoras e nutritivas. Contudo, deve-se ter em atenção que, embora uma multiplicação do genoma possa ter, em termos funcionais, efeitos favoráveis em determinadas células e em determinadas condições, a relação exacta entre a poliploidia e a diferenciação celular ainda não está perfeitamente esclarecida (Therman, 1980).

Origem da aneuploidia

Por razões várias, a segregação normal dos cromatídeos em anafase pode falhar. A inclusão dos dois cromatídeos de um mesmo cromossoma num mesmo núcleo, qualquer que seja o mecanismo, é chamada ***não-disjunção***. O resultado de uma não-disjunção será a existência de um cromossoma extra numa célula filha (trissomia para o cromossoma em causa) e a perda de um cromossoma na outra célula filha (monossomia para esse cromossoma).

Um cromatídeo também pode sofrer um ***atraso na sua ascensão anafásica***, não chegando a atingir o polo. Neste caso ele vai perder-se e a célula filha vai ficar monossómica para o cromossoma em causa.

Uma célula pode sofrer fenómenos de não-disjunção para vários cromossomas simultâneamente. Neste caso a célula filha vai designar-se por ***hiperdiploide*** se tem um aumento e ***hipodiploide*** se tem uma diminuição no número total de cromossomas.

Mas a aneuploidia não surge apenas por fenómenos de não-disjunção ou atraso na anafase. Durante um ciclo mitótico um ou ambos os centrossomas podem dividir-se mais que uma vez, dando origem a fusos tripolares ou tetrapolares; consequentemente uma só célula vai dar origem a 3 ou 4 células filhas hipodiploides, com uma distribuição irregular dos cromossomas. Esta ***divisão multipolar*** tem sido observada apenas em células tumorais (Oksala e Therman, 1974).

Significado da aneuploidia

A aneuploidia constitucional observa-se apenas para determinados cromossomas. As trissomias 13, 18 e 21 e a aneuploidia para cromossomas sexuais surgem regularmente, enquanto que a aneuploidia para os outros cromossomas raramente é compatível com a vida (de Grouchy e Turleau, 1979). Esta aneuploidia selectiva pode ocorrer porque aqueles cromossomas são mais susceptíveis aos fenómenos de não-disjunção ou porque a aneuploidia para os outros cromossomas não é viável. Muitos estudos que apoiaram a primeira explicação sugeriram vários factores que podiam estar na base do incremento da não-disjunção nos referidos cromossomas. Por exemplo, a associação de satélites dos cromossomas acrocêntricos (Henderson *et al.*, 1973; Hansson, 1979) ou um número relativamente pequeno de pontos de quiasma (Henderson e Edwards, 1968). No entanto, outros estudos sugeriram que todos os cromossomas podem sofrer fenómenos de não-disjunção, mas que a viabilidade da aneuploidia é diferente consoante o cromossoma em causa (Martin e Rademaker, 1990).

Nas células somáticas surgem por vezes aneuploidias clonais que involvem muitos outros cromossomas além dos descritos para as aneuploidias constitucionais. Este fenómeno tem sido observado

principalmente em células malignas; estão descritas alterações numéricas clonais associadas, de uma forma consistente e não ao acaso, a tipos específicos de tumores (Heim e Mitelman, 1987). No entanto, também já foi observada a ocorrência de aneuploidias clonais em culturas de células normais, nomeadamente em células da placenta (Hunt e Jacobs, 1985), células cerebrais (Heim *et al.*, 1989) e tecido renal (Elfving *et al.*, 1990).

É conhecido há já muito tempo que existe uma relação directa entre a idade e a frequência de linfócitos aneuploides, especialmente a perda do cromossoma X inactivo em células femininas (Abruzzo *et al.*, 1985). Em culturas de fibroblastos fetais os cromossomas mantêm-se estáveis durante grandes períodos de cultura, até ao declínio da linha celular (Hayflick e Moorhead, 1961; Saksela e Moorhead, 1963; Benn, 1976). No entanto, em culturas de fibroblastos de dadores adultos, surgem frequentemente clones celulares com alterações cromossómicas (Littlefield e Mailhes, 1975; Harnden *et al.*, 1976). Todas estas observações sugerem que as células vão acumulando erros genéticos com a idade, estabelecendo áreas de clones cromossomicamente alterados; estas podem assim reflectir um fenómeno normal associado ao processo de envelhecimento.

Em linhas celulares estabelecidas encontram-se frequentemente clones muito diferentes da linha primária, apresentando quase invariavelmente alterações no número de cromossomas (O'Neill e Miles, 1974; Erdel *et al.*, 1990). Embora nalguns casos estas aneuploidias sejam subestimadas, uma vez que podem corresponder a uma variação provocada pelas condições de cultura, noutros elas têm sido consideradas como um mecanismo biológico relacionado com a resposta das células a pressões selectivas.

Aneuploidias não clonais: artefactos técnicos?

Em culturas de linfócitos observam-se por vezes aneuploidias que, por serem esporádicas, não são representativas de uma transformação clonal. Estas células podem surgir por fenómenos de não-disjunção, mas também podem corresponder a artefactos técnicos.

A perda de cromossomas é muito mais frequente do que o aumento do seu número. Além disso, foi já demonstrado que a frequência de perdas está

inversamente relacionada com o tamanho dos cromossomas, enquanto que o aumento do seu número tem uma distribuição binomial e é independente do tamanho dos cromossomas (Brown *et al.*, 1983; Wenger *et al.*, 1984). Em culturas prolongadas de fibroblastos foram obtidos resultados idênticos (Wenger, 1989). Todos estes estudos sugerem que a hipodiploidia corresponde a artefactos técnicos, enquanto que a hiperdiploidia surge por fenómenos de não-disjunção.

Foi demonstrado que existe uma correlação entre a idade e a frequência de células hipodiploides , principalmente em indivíduos com idade superior a 60 anos e especialmente em mulheres (Galloway e Buckton, 1978; Abruzzo *et al.*, 1985). Este facto sugere que, embora muitas das células hipodiploides possam ser artefactos técnicos, uma proporção significativa pode surgir por erros mitóticos relacionados com o envelhecimento das células. Além disso, determinados cromossomas estão involvidos mais frequentemente nas hipodiploidias, como por exemplo, o X inactivo das células femininas, ou os cromossomas mais pequenos. É possível que, mediante a ocorrência de erros mitóticos que originam as aneuploidias, existam pressões selectivas que favoreçam apenas a sobrevivência das aneuploidias que não têm consequências graves para a actividade normal da célula. No entanto, será necessária uma investigação mais profunda para descobrir o eventual significado e importância destas alterações não clonais.

Alterações estruturais

Os cromossomas das células somáticas por vezes quebram, quer espontâneamente quer pela acção de agentes mutagéneos. Estas quebras podem ser reparadas, por meio de diversos sistemas de reparação do DNA. No entanto, se por algum motivo estes sistemas não actuarem, surgem cromossomas estruturalmente alterados.

Os cromossomas podem quebrar em qualquer fase do ciclo de divisão celular. Se as quebras surgem durante o período G1 da interfase, serão perpetuadas no período S e afectarão ambos os cromatídeos na metafase seguinte, dando origem a **quebras cromossómicas**. Se surgem após o período S, vão dar origem a **quebras cromatídicas**.

As quebras cromossómicas que involvem apenas um cromossoma podem dar origem a perda (**delecção, cromossoma em anel**), aumento (**duplicação**) ou recolocação (**inversão**) do material genético. Quando elas envolvem dois ou mais cromossomas podem dar origem a trocas intercromossómicas (**translocações**).

Todas estas alterações terão consequências graves para a célula, se atingirem um ou vários genes que sejam estrutural ou funcionalmente essenciais para actividade normal dessa célula.

As técnicas de bandas permitiram demonstrar que as quebras e rearranjos cromossómicos surgem nas inter-regiões G-Q/R (Morgan e Crossen, 1977), locais estes onde ocorrem mais frequentemente quiasmata mitóticos (Korenberg *et al.*, 1978). Contudo, não está demonstrado se as quebras ocorrem preferencialmente nestas zonas ou se existe um tipo de reparação preferencial (Therman, 1980).

Causas genéticas das quebras cromossómicas

A frequência com que surgem quebras espontâneas varia de indivíduo para indivíduo, dependendo da sua própria constituição genética. Determinados síndromes, a maioria dos quais são causados por genes autossómicos recessivos, apresentam uma elevada incidência de quebras e rearranjos cromossómicos (Schroeder e Kurth, 1971). Este fenómeno tem sido observado principalmente em culturas de linfócitos, embora os fibroblastos e as células da medula óssea também sejam afectados.

O primeiro síndrome no qual se detectou este tipo de instabilidade cromossómica foi a Anemia de Fanconi (Schroeder *et al*, 1964). Esta doença é caracterizada pela existência de várias anomalias congénitas, desenvolvimento de anemia aplástica e aumento da predisposição para a malignidade. As quebras ocorrem quase exclusivamente no período G2, o que leva à formação de quebras cromatídicas e formação de figuras tri e quadrirradiais entre cromossomas não homólogos. Provavelmente serão os rearranjos cromossómicos que levarão à transformação neoplásica.

1.3. ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS NO CANCRO

Perspectiva histórica

Foi há mais de cem anos que David von Hansemann (1890) chamou pela primeira vez a atenção para a existência de irregularidades mitóticas em células neoplásicas e sugeriu que estes fenómenos estavam relacionados com a origem e desenvolvimento de malignidade. Estes trabalhos, associados a estudos posteriores que confirmaram a existência de alterações nucleares em proliferações neoplásicas, deram origem à ***teoria da mutação somática no cancro***, apresentada por Boveri em 1914. Segundo este autor, são as alterações cromossómicas as modificações celulares responsáveis pela transição de uma proliferação normal para maligna.

Mas durante muitos anos esta teoria não pôde ser testada. Recorde-se que naquela época as dificuldades técnicas não permitiam visualizar os cromossomas, falava-se apenas em alterações nucleares e mitóticas. Só em 1956 é que Tjio e Levan identificaram com rigor o número de cromossomas no Homem.

Foi então em 1960 que surgiu a primeira descoberta de uma anomalia cromossómica consistentemente associada a uma neoplasia: Nowell e Hungerford identificaram um pequeno cromossoma marcador, o cromossoma Philadelphia (Ph^1), em células de doentes com leucemia mieloide crónica (LMC). Esta descoberta podia ir ao encontro da teoria de Boveri, ou seja, uma mutação somática numa célula hematopoiética que podia ser a causa directa do estado neoplásico. No entanto durante muitos anos o cromossoma Ph^1 manteve-se como a única alteração consistente no cancro. Vários estudos foram realizados em células malignas que de facto indicaram que as alterações cromossómicas são parte integrante da evolução neoplásica (Levan, 1966; van Steenis, 1966; Levan, 1967); contudo, a maior parte destes estudos referia-se a populações celulares em fase muito adiantada do processo tumoral, não se podendo fazer, portanto, uma associação das alterações cromossómicas com a origem da neoplasia.

Mas com o desenvolvimento das técnicas de bandas (Casperson *et al.*, 1970), que revolucionaram completamente a análise cromossómica, muitas outras alterações foram então detectadas de uma forma consistente em diversos tipos de tumor, para além do cromossoma Ph^1. Mesmo este, a partir de então foi mais correctamente identificado como sendo uma translocação entre os cromossomas 9 e 22 (Rowley, 1973).

Mais tarde, com a introdução das técnicas de bandas de alta resolução (Yunis, 1976), pequenas alterações estruturais, que dificilmente se detectariam com as técnicas clássicas de bandeamento, vão sendo identificadas num número cada vez maior de patologias. Todos estes dados vão sendo compilados e publicados periodicamente no "Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer" (Mitelman, 1988).

Actualmente, o desenvolvimento das técnicas de genética molecular tem levado à compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações citogenéticas, ou seja, da presença de genes relevantes para o cancro que vão ser activados (oncogenes) ou suprimidos (antioncogenes) em consequência de um rearranjo cromossómico, adquirido ou constitucional (Heim e Mitelman, 1987).

Em resumo, nas duas últimas décadas assistiu-se a um aperfeiçoamento tecnológico no campo da citogenética que permitiu demonstrar, de forma evidente, que as alterações cromossómicas são parte integrante do desenvolvimento neoplásico. O seu estudo sistemático tornou-se então clinicamente útil, não só pelo seu valor no diagnóstico e prognóstico de diversas patologias, como também na identificação de locais genómicos que podem estar na base da transformação maligna.

Importância das alterações cromossómicas

Uma das conclusões mais importantes que se pode tirar a partir dos estudos citogenéticos no cancro é a concepção de que as alterações que ocorrem nas células neoplásicas estão distribuidas pelo genoma de uma forma "não ao acaso". Determinados cromossomas, regiões e bandas estão preferencialmente envolvidos em diferentes tipos de neoplasia (Sandberg, 1980; Yunis, 1983; Rowley, 1984; Berger et al., 1985; Le Beau e Rowley,

1986; Mitelman, 1986). O facto de que alterações consistentes e específicas vão sendo descritas num número cada vez maior de neoplasias corrobora a favor do papel fundamental desses rearranjos cromossómicos no processo tumoral. A caracterização dos vários pontos de rotura nos cromossomas alterados constitui um passo crucial na identificação dos genes envolvidos na transformação tumoral. Uma discussão mais detalhada sobre o significado destas alterações pode ser encontrada numa série de revisões recentes (Bloomfield e de la Chapelle, 1987; Heim e Mitelman, 1987; Sandberg et al., 1988; Atkin, 1989; Greaves, 1989; Nowell, 1989; Teyssier, 1989; Rowley, 1990). Referências detalhadas de cada anomalia particular encontram-se em Mitelman, 1988, e Trent *et al.*, 1989.

Embora actualmente muitos estudos já tenham sido realizados nesta área, a informação existente é ainda escassa em alguns aspectos. Por exemplo, a maioria dos dados refere-se especificamente a doenças hematológicas. Os tumores sólidos compreendem apenas 20% do total da informação existente, o que é completamente desproporcional à contribuição relativa destas patologias para os índices de morbilidade e de mortalidade. Esta desproporção é em grande parte devida à maior facilidade, em termos técnicos, de obtenção de preparações cromossómicas no caso de células do sangue periférico e mesmo de medula óssea.

Outro aspecto a ter em conta é o facto de que os conhecimentos relativos a estados iniciais de tumores são ainda muito limitados, sendo por isso necessários mais estudos para poder relacionar as alterações cromossómicas com a origem da doença e principalmente para distinguir entre alterações que podem de facto ter um valor etiológico e alterações que vão dominar o cariotipo numa fase mais avançada da doença.

Ainda um outro aspecto a considerar é o facto de que nem todas as alterações que se encontram nas células neoplásicas têm realmente importância patogénica. Existem numerosos exemplos de neoplasias que apresentam alterações cariotípicas numéricas e/ou estruturais muito complexas que tornam difícil e confuso o estudo do seu papel no processo tumoral.

Vários grupos de investigadores, nomeadamente os grupos de Sandberg e Atkin, trabalharam muito nesta área, mas os resultados não foram suficientes para tirar uma conclusão definitiva.

No entanto uma melhor compreensão deste problema pode ser obtida tendo em conta que qualquer alteração cromossómica numa população de células neoplásicas pertence, em princípio, a uma de três categorias assim definidas:

Alterações primárias: ocorrem, de uma forma clonal, como alterações citogenéticas únicas já na primeira fase da doença. Estas são essenciais no estabelecimento da neoplasia, estão relacionadas com o tipo de tumor e encontram-se distribuidas pelo genoma de uma forma "não ao acaso".

- ***Alterações secundárias***: desenvolvem-se depois do tumor já estar estabelecido e reflectem uma evolução também clonal durante a progressão neoplásica, dominando frequentemente o padrão cariotípico nas últimas fases da doença. Também estão distribuidas pelo genoma de uma forma "não ao acaso".

- ***Alterações não clonais***: correspondem ao chamado "ruido citogenético" constituido por alterações não consequentes. Estas alterações, ao contrário das primárias e secundárias, estão distribuidas pelo genoma de uma forma "ao acaso". Quando existe uma grande instabilidade cromossómica numa população celular tumoral, este "ruido citogenético" pode dominar completamente o cariotipo e ocultar alterações que são patogenicamente importantes.

Um dos problemas mais importantes a resolver neste campo será desvendar, no meio da enorme variedade de alterações que surgem nas células neoplásicas, quais são as que têm uma importância decisiva no desenvolvimento do tumor, e quais as que são secundárias, não relacionadas portanto com o início da doença, mas que vão ser importantes na progressão do tumor. Só então nos aproximaremos do verdadeiro significado das alterações cromossómicas no cancro.

Significado das alterações numéricas

Aneuploidias primárias e secundárias

Embora nas neoplasias as alterações cromossómicas primárias mais frequentes sejam estruturais (principalmente translocações e delecções) estão também descritas alterações numéricas associadas de uma forma consistente a vários tipos de tumor, nomeadamente as que estão representadas no quadro 1.

Quadro 1. Alterações cromossómicas numéricas primárias associadas a alguns tipos de tumor.

patologia	alterações numéricas	referências
LNLA*	+4; -5; -7; +8; +21; -Y;	(Heim e Mitelman, 1986)
SMD *	+8; -5; -7;	(Heim e Mitelman, 1986)
LLC *	+12;	(Pittman e Catovsky, 1984)
LLA *	hiperdiploidia (>50);	(Bloomfield *et al.*, 1986)
	hipodiploidia ("near-haploid");	(Bloomfield *et al.*, 1986)
LNH *	+3; +7; +18;	(Gödde-Salz *et al.*, 1981)
		(Gödde-Salz *et al.*, 1986)
DH *	+3;	(Slavutsky *et al.*, 1985)
		(Fonatsch *et al.*, 1986)
		(Hansman *et al.*, 1986)
MM *	+3; +5; +7; +9; +11;	(Liang *et al.*, 1979)
		(Philip *et al.*, 1980)
		(Lewis e MacKenzie, 1984)
CC *	+7; +12;	(Becher *et al.*, 1983)
		(Ochi *et al.*, 1983)
CB *	+7; -9;	(Gibas *et al.*, 1984; 1986)
MG *	-22;	(Mark, 1977; Zang, 1982)

* LNLA- leucemia não linfoblástica aguda
SMD - síndrome mielodisplásico
LLC - leucemia linfocítica crónica
LLA - leucemia linfoblástica aguda
LNH - linfoma não-Hodgkin (não-Burkitt)
DH - doença de Hodgkin
MM - mieloma múltiplo
CC - carcinoma do cólon
CB - carcinoma da bexiga
MG - meningioma

O papel das trissomias e tetrassomias múltiplas adquire especial evidência no subgrupo de leucemia linfoblástica aguda (LLA) da criança com hiperdiploidia >50. Os cromossomas supranumerários encontrados nas células neoplásicas destes doentes pertencem quase invariavelmente aos pares números 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20, 21 e X (Yunis, 1987; Pui *et al*, 1990a). Embora as trissomias 4, 18, 21 e X também se encontrem noutros tipos de neoplasias, as trissomias 6, 10 e 14 só têm sido observadas primariamente neste subgrupo de LLA.

Na hipodiploidia com um número de cromossomas próximo do haploide ("near-haploid"), que surge noutro grupo de LLA, as alterações também aparecem de um modo consistente; além do complemento haploide a célula apresenta quase invariavelmente os cromossomas 8, 10, 14, 18, 21, X, Y e/ou 6 (Pui *et al.*, 1990a; 1990b).

Embora não de um modo tão evidente como nas alterações primárias, as secundárias também surgem de uma forma "não ao acaso" (Heim e Mitelman, 1987). A sua distribuição parece ser dependente quer da alteração primária quer do tipo de neoplasia em causa.

A importância das alterações numéricas secundárias na evolução do tumor torna-se evidente em vários casos. Na LMC, por exemplo, a doença é relativamente benigna enquanto existe apenas a t(9;22), mas agrava-se numa fase terminal na qual 80% dos doentes apresentam, além da t(9;22), um segundo cromossoma filadélfia (Ph^1), um isocromossoma 17q e/ou uma trissomia 8 (Swolin *et al.*, 1985). Numa revisão recente de alterações secundárias na leucemia não-linfocítica aguda (LNLA) verificou-se um envolvimento preferencial dos cromossomas 1, 7, 8, 9, 21, X e Y (Heim e Mitelman, 1986).

Assim, estas alterações, embora não contribuam para o desenvolvimento do tumor, são provavelmente importantes na progressão da doença, pois contribuem para uma diversidade genética que parece ser um pré-requisito para a evolução das células neoplásicas. Os subclones que tiverem uma vantagem selectiva, sob a forma de um maior potencial proliferativo, vão gradualmente dominar o padrão cariotípico. Em termos clínicos, isto vai corresponder a um agravamento gradual da doença.

Efeito das monossomias e trissomias na transformação neoplásica

Fazendo uma comparação entre monossomias totais e delecções parciais para os mesmos cromossomas, é possível analisar algumas características que podem ajudar à compreensão do significado das alterações numéricas no desenvolvimento maligno.

Partindo-se do princípio que o efeito da monossomia na transformação maligna consiste na perda de material genético que contém genes supressores de tumor (antioncogenes), então numa determinada patologia a perda de um cromossoma inteiro deverá ter um potencial neoplásico equivalente ao de uma monossomia parcial que abranja esses genes. Se assim fôr, deverá haver uma concordância fenotípica entre as monossomias totais e parciais observadas em patologias específicas.

Esta concordância verifica-se realmente para os cromossomas 5, 7 e 22: a delecção 22q e monossomia 22 estão ambas consistentemente associadas ao meningioma, a delecção 7q e monossomia 7 ocorrem ambas com uma elevada frequência na LNLA e nos síndromes mielodisplásicos estão descritas quer delecções 5q quer monossomias 5 ,embora as primeiras com uma maior frequência (Heim e Mitelman, 1987).

No entanto para outros cromossomas que têm sido identificados em monossomias totais e parciais (cromossomas 1, 3, 6, 9, 11, 12 e 13) não existe indicação de que hajam semelhanças funcionais entre os dois tipos de alteração (Heim e Mitelman, 1986). Assim, tem que haver outros mecanismos que justifiquem esta falta de concordância. A relação entre o local da rotura e genes adjacentes a este no caso de delecções, ou uma anomalia no controlo transcripcional quando se perdem cromossomas inteiros, podem ser hipóteses a considerar. Contudo, estas são ainda meramente especulativas; serão necessários mais estudos, sobretudo a nível molecular, para esclarecer completamente este assunto.

O papel das trissomias no processo neoplásico pode ser explicado por um simples efeito de dose dos genes localizados nesses cromossomas. Os oncogenes vão ter aqui um papel quantitativo fundamental, permitindo que células com alterações numéricas tenham uma vantagem selectiva na proliferação.

Mitelman e Levan propuseram uma hipótese segundo a qual os ganhos e perdas de cromossomas inteiros em células neoplásicas podem ser explicados por uma amplificação de uma alteração primária (Heim e Mitelman, 1986). Essa modificação primária pode corresponder a uma mutação num gene que normalmente exerce um controlo não muito marcado num determinado passo do crescimento ou diferenciação celular; o produto génico anormal precisaria de estar duplicado para exercer uma influência mais definida. Se ocorre uma não-disjunção, esta vai dar origem a trissomias ou monossomias. Se a trissomia inclui dois cromossomas alterados e apenas um normal surge uma amplificação da aberração primária. Se se perde o cromossoma homólogo normal ocorre uma monossomia para o cromossoma que contém a aberração primária, situação esta que também pode amplificar o efeito do gene alterado, principalmente se a monossomia leva à perda de genes supressores de tumor. Se, pelo contrário, a não-disjunção vai dar origem a uma duplicação do cromossoma normal nas trissomias ou uma perda do cromossoma alterado nas monossomias, então não haverá transformação neoplásica nessas células.

Resumindo, todos estes dados indicam que existe uma tendência para certos cromossomas (ou regiões particulares de cromossomas) estarem sub ou supra representados em tipos específicos de neoplasias. Embora este assunto não esteja ainda completamente esclarecido, é provável que este efeito de dose, associado a um desequilíbrio génico envolvendo oncogenes ou antioncogenes, se manifeste de facto numa vantagem selectiva de determinados subclones durante o desenvolvimento tumoral.

Aneuploidias não clonais

Enquanto o significado biológico das anomalias cariotípicas clonais se vai tornando cada vez melhor compreendido, o papel das alterações não clonais durante o processo neoplásico é ainda ambíguo.

Muitos factores laterais à alteração maligna ou pré-maligna podem causar modificações não clonais, nomeadamente vírus, radiações e outros factores físicos ou químicos (Longacre *et al.*, 1989). Nalguns casos estas modificações podem ser transitórias, não se encontrando de novo

durante semanas ou meses quando novas amostras são analisadas. Noutros casos uma anomalia numa só célula, que não representa clonalidade, pode aparecer sistematicamente em estudos seriados (Mc Connell *et al.*, 1991). Não deve por isso ser desprezada porque pode eventualmente estar relacionada com a evolução da doença em causa.

Utilizando a definição de clone estabelecida no Sistema Internacional de Nomenclatura Cromossómica (ISCN, 1978), alterações que ocorrem com uma frequência menor que a aceite convencionalmente são explicadas por instabilidade cariotípica, perdas casuais ou artefacto técnico. No entanto, não estarão a ser ignoradas anomalias que podem representar uma população celular que vai sofrer mais tarde uma transformação clonal? Se assim fôr, a detecção destas alterações será clinicamente importante para o estudo do desenvolvimento tumoral.

A análise cromossómica seriada em doenças hematológicas malignas tem permitido identificar alterações clonais que revelam uma progressão biológica das células anormais (Miller *et al.*, 1985). Assim, como a evolução clonal é um fenómeno comum nas neoplasias, algumas alterações consideradas não clonais podem de facto representar uma modificação primária ou secundária que pode ter ou vir a ter um papel importante no desenvolvimento do tumor. Devem por isso ser investigadas mais detalhadamente e não ignoradas.

1.4. OBJECTIVOS DO TRABALHO

O aperfeiçoamento das técnica de citogenética ao longo das duas últimas décadas permitiu demonstrar claramente que as alterações cromossómicas, que envolvem directamente modificações do DNA, estão intimamente associadas ao processo de desenvolvimento neoplásico. O estudo sistemático dessas alterações tornou-se clinicamente útil, não só pelo seu contributo como factor de diagnóstico e prognóstico, mas também

pelo seu papel na identificação de locais genómicos que podem estar relacionados com a origem ou progressão da transformação maligna.

A existência de alterações cromossómicas clonais consistentemente associadas a tipos específicos de leucemias e outros tipos de doenças hematológicas malignas está bem demonstrada. Quanto às alterações que surgem nestas patologias de uma forma não clonal, o seu eventual papel na progressão tumoral não foi ainda esclarecido. Como são normalmente consideradas artefactos técnicos ou a consequência de erros mitóticos não relevantes, o seu estudo tem sido praticamente ignorado.

Por esta razão, o objectivo principal deste trabalho foi dar uma atenção especial ao estudo das aneuploidias não clonais em doenças hematológicas malignas, a fim de investigar o eventual papel destas alterações no processo de transformação neoplásica.

Mas quando se pretende fazer um estudo cromossómico em células malignas, depara-se muitas vezes com graves problemas de ordem técnica: a má qualidade das metafases e o baixo índice mitótico destas células em cultura espontânea dificultam muitas vezes a realização de uma análise cromossómica adequada.

Por esta razão, foi também feito neste trabalho um estudo comparativo da proliferação das células hematopoiéticas malignas sujeitas a diferentes condições de cultura, com o objectivo de optimizar as técnicas a utilizar no estudo de diferentes tipos de patologia.

BIBLIOGRAFIA

Abruzzo MA, Mayer M, Jacobs PA (1985): Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. Cytogenet Cell Genet 39: 275-278.

Atkin NB (1989): Solid tumor cytogenetics. Progress since 1979. Cancer Genet Cytogenet 40: 3-12.

Becher R, Gibas Z, Sandberg AA (1983) : Involvement of chromosomes 7 and 12 in larger bowel cancer: trisomy 7 and 12 q-. Cancer Genet Cytogenet 9: 329-332.

Benn PA (1976): Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. Am J Hum Genet 28: 465-473.

Berger R, Bloomfield CD, Sutherland GR (1985) : Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and fragile sites. Eigth International Workshop on Human Gene Mapping. Cytogenet Cell Genet 40: 490-535.

Bloomfield G D, Goldman AI, Alimena G, Berger R, Borgström GH, Brandt L, Catovsky D, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM, Garwicz S, Golomb HM, Hossfeld DK, Lawler SD, Mitelman F, Nilsson P, Pierre RV, Philip P, Prigogina E, Rowley JD, Sakurai M, Sandberg AA, Secker Walker LM, Tricot G, van Den Berghe H, van Orshoven A, Vuopio P, Whang-Peng J (1986): Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. Blood 67: 415-420.

Bloomfield CD, de la Chapelle A (1987) : Chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: clinical and biological significance. Semin Oncol 14: 372-383.

Boll ITM (1981): Origin of the early megakaryopoietic precursor cell and further polyploidization in the thrombopoietic cell series. Phase-contrast observations of human bone marrow. Acta Haemat 66: 187-194.

Boveri T (1914): *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.* Gustav Fischer-Verlag, Jena.

Brodsky WY, Uryvaeva IV (1977): Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. Int Rev Cytol 50: 275-332.

Brown T, Fox DP, Robertson FW, Bullock I (1983): Non-random chromosome loss in PHA-stimulated lymphocytes from normal individuals. Mutation Research 122: 403-406.

Carrierre R (1969): The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation. Int Rev Cytol 25: 201-277.

Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970): Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. Exp Cell Res 60: 315-319.

D'Amato F (1989): Polyploidy in cell diffferentiation. Caryologia 42: 183-211.

de Grouchy J, Turleau C (1984): *Atlas des maladies chromosomiques.* Expansion Scientifique, Paris.

Ehrie MC, Swartz FJ (1974) : Diploid, tetraploid and octaploid beta cells in the islets of Langherans of the normal human pancreas. Diabetes 23: 583-588.

Elfving P, Cigudosa JC, Lundgren R, Limon J, Mandahl N, Kristoffersson U, Heim S, Mitelman F (1990): Trisomy 7, trisomy 10, and loss of the Y chromosome in short-term cultures of normal kidney tissue. Cytogenet Cell Genet 53: 123-125.

Epstein CJ (1967): Cell size, nuclear content and the development of polyploidy in the mammalian liver. Proc Nat Acad Sci USA 57: 327-334.

Erdel M, Peter W, Spiess E, Trefz G, Ebert W (1990) : Karyotipic characterization of established cell lines derived from a squamous cell carcinoma and an adenocarcinoma of human lung cancers. Cancer Genet Cytogenet 49: 185-198.

Fonatsch C, Diehl V, Schaadt M, Burrichter H, Kirchner HH (1986) : Cytogenetic investigations in Hodgkin's disease: I. Involvement of specific chromosomes in marker formation. Cancer Genet Cytogenet 20: 39-52.

Galloway SM, Buckton KE (1987): Aneuploidy and aging: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. Cytogenet Cell Genet 20: 78-95.

Gibas Z, Prout GR, Connolly JG, Pontes JE, Sandberg AA (1984) : Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer Res. 44: 1257-1264.

Gibas Z, Prout GR, Pontes JE, Connolly JG, Sandberg AA (1986) : A possible specific chromosome change in transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer Genet Cytogenet 19: 229-238.

Gödde-Salz E, Feller AC, Lennert K (1986) : Cytogenetic and immunohistochemical analysis of lymphoepithelioid cell lymphoma (Lennert's lymphoma): further substantiation of its T-cell nature. Leukemia Res 10: 313-323.

Gödde-Salz E, Schwarze EW, Stein H, Lennert H, Grote W (1981): Cytogenetic findings in T-zone lymphoma. J Cancer Res Clin Oncol 101: 81-89.

Goyanes V (1978): Mutágeneos. Em: *Genética Médica.* Egozcue J, Antich J, Ballesta F, Goyanes V, Izquierdo L, Tamparillas M, Tavares A. Editorial Espaxs, pp 359-381.

Greaves MF (1989): The contribution of molecular genetics to the study of leukemia. Cancer Genet Cytogenet 40: 217-230.

Hansman ML, Gödde-Salz E, Hui P-K, Müller-Hermelink H-K, Lennert K

(1986): Cytogenetic findings in nodular paragranuloma (Hodgkings disease with lymphocytic predominance; nodular) and in progressively transformed germinal centers. Cancer Genet Cytogenet 21: 319-325.

Hansson A (1979) : satellite association in human metaphases: a comparative study of normal individuals, patients with Down syndrome and their parents. Hereditas 90: 59-83.

Harnden DG, Benn PA, Oxford JM, Taylor AMR, Webb TP (1976) : Cytogenetically marked clones in human fibroblasts cultured from normal subjects. Somat Cell Genet 2: 55-62.

Hayflick L, Moorhead PS (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25: 585-621.

Heim S, Mandahl N, Jin Y, Strömblad S, Lindström E, Salford LG, Mitelman F (1989): Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. Cytogenet Cell Genet 52: 136-138.

Heim S, Mitelman F (1986) : Numerical chromosome aberrations in human neoplasia. Cancer Genet Cytogenet 22: 99-108.

Heim S, Mitelman F (1987): *Cancer Cytogenetics*. Alan R Liss Inc, New York, pp 27; 70; 114; 265-294.

Henderson SA, Edwards RG (1968): Chiasma frequency and maternal age in mammals. Nature 218: 22-28.

Henderson SA, Warburton D, Atwood KC (1973): Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. Nature 245: 95-97.

Hunt PA, Jacobs PA (1985): In vitro growth and chromosome constitution of placental cells. I. Spontaneous and elective abortions. Cytogenet Cell Genet 39: 1-6.

ISCN (1978): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Cytogenet Cell Genet 21: 371.

Korenberg JR, Therman E, Denniston C (1978): Hot spots and functional organization of human chromosomes. Hum Genet 43: 13-22.

Le Beau MM, Rowley JD (1986): Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma: clinical and biological significance. Adv Hum Genet 15: 1-54.

Levan A (1966): Non-random representation of chromosome types in human tumor stemlines. Hereditas 55: 28-38.

Levan A (1967): Some current problems of cancer cytogenetics. Hereditas 57: 343-355.

Lewis JP, MacKenzie MR (1984) : Non-random chromosomal aberrations associated with multiple myeloma. Hematol Oncol 2: 307-317.

Liang W, Hopper JE, Rowley JD (1979) : Karyotypic abnormalities and clinical aspects of patients with multiple myeloma and related paraproteinemic disorders. Cancer 44: 630-644.

Littlefield LG, Mailhes JB (1975): Observations of de novo clones of cytogenetically aberrant cells in primary fibroblast cell strains from phenotypically normal women. Am J Hum Genet 27: 190-197.

Longacre TA, Foucar K, Crago S, Chen I, Griffith B, Dressler L, Mc Connell TS, Duncan M, Gribble J (1989): Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. Blood 73: 543-552.

Mark J (1977): Chromosomal abnormalities and their specificity in human neoplasms: an assessment of recent observations by banding techniques. Adv Cancer Res 24: 165-222.

Martin RH, Rademaker A (1990) : The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. Cytogenet Cell Genet 53: 103-107.

Mc Connell TS, Duncan MH, Foucar K, SWOG Leukemia Cytogenetics Subcommittee (1991): Do random (non-clonal) chromosome abnormalities in bone marrow predict a clone to come? Cancer Genet Cytogenet 53: 257-263.

Miller BA, Weinstein HJ, Nell M, Henkle CT, Dillon PL, Tantravahi R (1985): Sequential development of distinct clonal chromosome abnormalities in a patient with preleukemia. Br J Haematol 59: 411-418.

Mitelman F (1986): Clustering of breakpoints to specific chromosomal regions in human neoplasia. A survey of 5.345 cases. Hereditas 104: 113-119.

Mitelman F (1988): *Catalog of Chromosome Aberrations*. Third edition. Alan R Liss Inc, New York.

Morgan WF, Crossen PE (1977): The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes. Hum Genet 38: 271-278.

Nowell PC (1989): Chromosomal and molecular clues to tumor progression. Semin Oncol 16: 116-127.

Nowell PC, Hungerford DA (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132: 1497.

Ochi H, Takeuchi J, Holyoke D, Sandberg AA (1983): Possible specific chromosome changes in large bowel cancer. Cancer Genet Cytogenet 10: 121 -. 122.

Oksala T, Therman E (1974): Mitotic abnormalities and cancer. In: German J (ed): *Chromosomes and Cancer*, pp 239-263.

O'Neill FJ, Miles CP (1974): Specific C band patterns in continuous human lymphoblastoid cell lines

Paulus J (1968): Cytophotometric measurements of DNA in thrombopoietic megakaryocytes. Exp Cell Res 53: 310-313.

Philip P, Drivsholm A, Hansen NE, Jensen MK, Killmann SA (1980) : Chromosomes and survival in multiple myeloma. A banding study of 25 cases. Cancer Genet Cytogenet 2: 243-257.

Pittman S, Catovsky D (1984) : Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. Br J Haematol 58: 649-660.

Pui C-H, Carroll AJ, Raimondi SC, Land VJ, Crist WM, Shuster JJ, Williams DL, Pullen DJ, Borowitz MJ, Behm FG, Look AT (1990a): Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid <45 line. Blood 75: 1170-1177.

Pui C-H, Crist WM, Look AT (1990b): Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 76: 1449-1463.

Rowley JD (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243: 290-293.

Rowley JD (1984) : Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. Cancer Res 44: 3159-3168.

Rowley JD (1990): Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma. Sem Hematol 27: 122-136.

Saksela E, Moorhead PS (1963): Aneuploidy in the degenerative phase of serial cultivation of human cell strains. Proc Nat Acad Sci USA 50: 390-395.

Sandberg AA (1980): *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*. Elsevier/North-Holland, New York.

Sandberg AA, Turc-Carel C, Gemmill RM (1988) : Chromosomes in solid tumors and beyond. Cancer Res 48: 1049-1059.

Sarto GE, Stubblefield PA, Therman E (1982) : Endomitosis in human trophoblast. Hum Genet 62: 228-232.

Scroeder TM, Anschütz F, Knopp A (1964) : Spontane chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie. Humangenetik 1: 194-196.

Schroeder TM, Kurth R (1971): Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. Blood 37: 96-112.

Slavutsky I, Labal de Vinuesa, Estevez ME, Sen L, Salum B de (1985): Cytogenetic and immunologic phenotype findings in Hodgkin's disease. Cancer Genet Cytogenet 16: 123-130.

Sutton WS (1903): The chromosomes in heredity. Biol Bull 4: 231-251.

Swartz FJ (1956): The development in the human liver of multiple deoxyribose nucleic acid (DNA) classes and their relationship to the age of the individual. Chromosoma 8: 53-72.

Swolin B, Weinfeld A, Westin J, Waldenström J, Magnusson B (1985) : Karyotypic evolution in Ph-positive chronic myeloid leukemia in relation to management and disease progression. Cancer Genet Cytogenet 18: 65-79.

Teyssier JR (1989): The chromosomal analysis of human solid tumors. A triple challenge. Cancer Genet Cytogenet 37: 103-125.

Therman E (1980): *Human chromosomes. Structure, behavior, effects.* Springer, New York, pp 31, 36, 78.

Therman E, Sarto GE, Buchler DA (1983): The structure and origin of giant nuclei in human cancer cells. Cancer Genet Cytogenet 9: 9-18.

Tjio JH, Levan A (1956) : The chromosome number of man. Hereditas 42: 1-6.

Trent JM, Kaneko Y, Mitelman F (1989) : Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia. Human Gene Mapping 10 (1989). Cytogenet Cell Genet 51: 533-562.

van Steenis H (1966): Chromosomes and cancer. Nature 209: 819-821.

von Hansemann D (1890) : Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. Virchows Arch A Path Anat 119: 299-326.

Weste SM, Pennington DG (1972): Fluorometric measurement of DNA in bone marrow cells: the measurement of megakaryocyte DNA. J Histochem Cytochem 20: 627-633.

Wenger SL (1989): Nonmodal chromosome gain and loss in human fibroblast cultures. Cytogenet Cell Genet 52: 201.

Wenger SL, Golden WL, Dennis SP, Steele MW (1984): Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? Am J Med Genet 19: 715-719.

Wheatley DN (1972): Binucleation in mammalian liver. Studies on the control of cytokinesis in vivo. Exp Cell Res 74: 455-465.

Yunis JJ (1976): High resolution of human chromosomes. Science 191: 1268-1270.

Yunis JJ (1983): The chromosomal basis of human neoplasia. Science 221: 227-236.

Yunis JJ (1987): Multiple recurrent genomic deletions and duplications are a common features in most human neoplasias. Em: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. New Series, vol 61 (Gale RP, Golde DW, Eds). Alan R Liss, Inc, New York, pp 3-21.

Zang KD (1982) : Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. Cancer Genet Cytogenet 6: 249-274.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS MALIGNAS SUJEITAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA

2.1. INTRODUÇÃO

O sucesso dos estudos de alterações cromossómicas em células malignas está dependente da possibilidade de se obterem metafases em número e qualidade suficientes para fazer uma investigação adequada.

No caso das doenças hematológicas malignas, a facilidade com que se obtêm células em divisão a partir de culturas espontâneas de sangue periférico e de medula óssea permitiu que esses estudos tivessem um desenvolvimento muito superior ao observado em tumores sólidos (Heim e Mitelman, 1987). No entanto, o índice mitótico espontâneo dessas células é por vezes muito baixo e a qualidade das metafases muito inferior à observada em células normais (Dutrillaux e Couturier, 1981). Por isso, continua a ser do interesse de todo o investigador que trabalha nesta área o constante aperfeiçoamento das técnicas a utilizar, de modo a obter cada vez mais e melhores resultados.

Embora exista um método básico para a execução de culturas espontâneas de células do sangue periférico e medula óssea (Yunis, 1981; Sumner,

1982; Williams *et al.*, 1984), várias modificações técnicas são praticadas pelos diferentes investigadores. No entanto, uma transferência directa dessas modificações de laboratório para laboratório é por vezes muito difícil; há pormenores técnicos que só se aprendem com a prática e a qualidade das alterações introduzidas depende das condições de que cada laboratório dispõe.

Assim, no decorrer de um estudo citogenético de indivíduos com doenças hematológicas malignas, foi feita uma análise comparativa da proliferação de células sujeitas a determinadas variações nas condições de cultura, com o objectivo de optimizar as técnicas a usar para cada tipo de patologia.

Mantendo constantes certas condições básicas de cultura, como sejam a concentração celular, o meio de cultura, a concentração de soro fetal, as condições de temperatura e atmosfera, a análise comparativa foi baseada na variação de quatro parâmetros estudados independentemente: a) tempo de cultura b) tratamento com colchicina c) aplicação de técnicas de sincronização celular d) efeito dos glóbulos rubros em culturas de sangue periférico.

2.2. TEMPO DE CULTURA

Quando se pretende fazer um estudo cromossómico de células malignas de medula óssea ou sangue periférico as metafases não devem ser obtidas a partir de culturas muito prolongadas; estas poderiam não ser representativas da situação *in vivo* (Heim e Mitelman, 1987). No entanto, não existe apenas um tempo de cultura que dê consistentemente melhores resultados. Alguns laboratórios utilizam técnicas directas, outros culturas de 24 horas ou de 48 horas. Assim, cada um deve definir o seu próprio critério conforme a sua experiência e condições laboratoriais. Um dos processos de o conseguir, e que foi utilizado neste trabalho, consiste na análise da proliferação das células de cada doente em várias culturas com diferentes durações, com o objectivo de verificar qual o melhor método para cada tipo de patologia.

Trabalho experimental

Num estudo cromossómico de células de medula óssea de 31 indivíduos com doenças hematológicas malignas foram feitas, para cada doente, três culturas simultâneas, nas mesmas condições (concentração celular de $0.5x10^6$/ml em RPMI com L-glutamina suplementado com 15% de FCS e com antibióticos, incubação a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2), variando apenas o tempo de incubação: técnica directa, cultura de 24 horas e de 48 horas. Em mais 96 casos foram feitas duas culturas simultâneas: de 24 horas e de 48 horas (em 43 casos a partir de células de medula óssea e em 53 casos a partir de células de sangue periférico).

As metafases foram bloqueadas com 0.1ml de uma solução de colchicina (concentração de 4μg/ml) durante os últimos 30 minutos de cultura, seguindo-se um tratamento hipotónico com KCl a 0.075M. As células foram fixadas em metanol acético 3:1.

Para cada doente estudado foi considerado como melhor tempo o das culturas que apresentaram maior número de metafases e/ou com melhor qualidade. Nos casos em que foi possível obter igual quantidade e qualidade de metafases com diferentes tempos de cultura, todos estes foram considerados como tempos adequados.

Para a análise comparativa de frequências utilizou-se o teste X^2.

Resultados

Comparação entre a técnica directa e culturas de curta duração

Os resultados obtidos mostram que apenas para 3 dos 31 doentes estudados foi possível obter um número adequado de células em divisão a partir do método directo (Quadro 2). Estes correspondem a 2 dos 7 casos diagnosticados com leucemia não linfoblástica aguda (LNLA) e 1 dos 14 casos diagnosticados com leucemia mieloide crónica (LMC). Mesmo para estes doentes a qualidade das metafases obtidas com o método directo foi idêntica à obtida em culturas de curta duração.

Quadro 2. Proliferação celular obtida a partir de técnicas directas e culturas de curta duração. Para cada um de 31 indivíduos diagnosticados com doenças hematológicas malignas está assinalado o tipo ou tipos de cultura a partir dos quais foi feito o estudo cromossómico.

doente	diagnóstico	técnica directa	cultura de curta duração
P12	LMC*		+
P18	LMC		+
P22	LMC		+
P27	LMC	+	+
P35	LMC		+
P38	LMC		+
P43	LMC		+
P46	LMC		+
P47	LMC		+
P48	LMC		+
P50	LMC		+
P59	LMC		+
P62	LMC		+
P181	LMC		+
P19	SMP*		+
P23	SMP		+
P10	LNLA*		+
P32	LNLA		+
P34	LNLA		+
P39	LNLA	+	+
P56	LNLA	+	+
P142	LNLA		+
P171	LNLA		+
P15	SMD*		+
P25	SMD		+
P30	SMD		+
P31	LLC*		+
P16	LLA*		+
P42	LLA		+
P44	LLA		+
P51	LLA		+

*
LMC -leucemia mieloide crónica
SMP -síndrome mieloproliferativo (não LMC)
LNLA-leucemia não linfoblástica aguda
SMD -síndrome mielodisplásico
LLC -leucemia linfocítica crónica
LLA -leucemia linfoblástica aguda

Comparação entre culturas de 24 horas e de 48 horas

Os resultados mostram que, para um total de 127 indivíduos estudados, as culturas de 24 horas permitiram fazer o estudo cromossómico em 66.7% dos casos. As culturas de 48 horas permitiram fazer o estudo em 33.3% dos casos (Quadro 3).

Comparando os resultados obtidos em cada tipo de patologia, não se encontrou uma diferença significativa entre eles (p=0.9995).

Quadro 3. Proliferação celular em culturas de 24 e 48 horas. Está indicada para diferentes patologias a frequência com que se fizeram estudos cromossómicos a partir dos dois tipos de cultura.

tipo patologia	nº estudos a partir de culturas de 24 h (%)	nº estudos a partir de culturas de 48 h (%)	nº total de casos
LNLA*	65.7	34.3	35
SMD*	63.6	36.4	12
LMC*	67.5	32.5	40
SMP*	64.7	35.3	17
LLA*	65.2	34.8	23
TOTAL	**66.7**	**33.3**	**127**

X^2=0,0617 p=0,9995

* LNLA-leucemia não linfoblástica aguda
SMD -síndrome mielodisplásico
LMC -leucemia mieloide crónica
SMP -síndrome mieloproliferativo (não LMC)
LLA -leucemia linfoblástica aguda

Comparando ainda os resultados obtidos separadamente para culturas de medula óssea e sangue periférico (Quadro 4), também não se encontrou uma diferença significativa entre os dois tipos de células (p=0.5543).

Quadro 4. Proliferação celular em culturas de 24 e 48 horas. Está indicada para culturas de medula óssea e sangue periférico a frequência com que se fizeram estudos cromossómicos a partir dos dois tipos de cultura.

tipo células	nº estudos a partir de culturas de 24 h (%)	nº estudos a partir de culturas de 48 h (%)	nº total de casos
medula óssea	68.9	31.1	74
sangue perif.	62.3	37.7	53
TOTAL	**66.1**	**33.9**	**127**

X^2=0,3497 p=0,5543 (com correcção de Yates)

Discussão

Os métodos que existem actualmente para a análise cromossómica de células hematopoiéticas malignas não são constantemente satisfatórios. Muitas vezes eles não permitem a observação de um número suficiente de metafases para fazer um estudo adequado. Outras vezes a resolução das bandas cromossómicas está longe de ser a desejável, devido à má qualidade das células malignas em divisão. Consequentemente, metafases com alterações cromossómicas podem, nalguns casos, ser ignoradas.

As técnicas mais correntemente utilizadas compreendem o método directo e cultura não estimulada de 24 horas. Existe pouca concordância entre

laboratórios acerca de qual o melhor método. Alguns investigadores argumentam que a técnica directa é a melhor, pois permite a observação de células imediatamente a seguir à colheita; estas representarão mais fielmente a situação *in vivo* (Dewald *et al.*, 1985). Outros sugerem que uma cultura de 24 horas pode aumentar o número de metafases, pois as células malignas dividem-se preferencialmente durante as primeiras 24-48 horas em cultura (Knuutila *et al.*, 1980; Knuutila *et al.*, 1981; Waghray *et al.*, 1981; Fitzgerald *et al.*, 1982).

No decorrer deste trabalho foram comparados os resultados obtidos a partir do método directo, cultura de 24 horas e ainda cultura de 48 horas. Este último método não tem sido aplicado tão frequentemente como os anteriores. No entanto, uma vez que às 48 horas de cultura ainda se podem encontrar células malignas em divisão, foi também estudada a eficácia desta técnica relativamente às mais correntes.

Nas condições técnicas e laboratoriais em que este trabalho foi realizado, as culturas directas não mostraram resultados satisfatórios. Apenas em 3 dos 31 casos estudados com esta técnica foi possível obter metafases (Quadro 2). E mesmo para estes casos foi obtido o mesmo resultado a partir de culturas de curta duração.

Foram sem dúvida as culturas espontâneas de 24 horas que permitiram obter um maior número de resultados satisfatórios (Quadro 3). No entanto, as culturas de 48 horas também permitiram fazer o estudo em 33.9% dos casos. Convém ainda salientar que para 15 destes 43 casos as metafases foram observadas apenas com este tempo de cultura; isto significa que se não tivesse sido utilizada esta técnica não teria sido possível obter os resultados cromossómicos apresentados no Quadro 5, que tão valiosamente contribuiram para o estudo descrito no capítulo 5. Refira-se, a título de exemplo, a importância da obtenção dos resultados dos doentes P114 e P115, que são 2 dos 5 casos de mielofibrose idiopática (MI) estudados. Embora actualmente o número de estudos citogenéticos de indivíduos diagnosticados com MI seja ainda muito limitado, uma delecção do cromossoma 13 foi já identificada em cerca de 10% dos casos com alterações cromossómicas (Heim e Mitelman, 1987). Os resultados obtidos para os doentes P114 e P115 vêem apoiar esta associação entre o cromossoma 13 e a MI.

Quadro 5. Resultados dos estudos citogenéticos de 15 indivíduos com doenças hematológicas malignas, cujas metafases foram obtidas somente a partir de culturas de 48 horas.

doente	diagnóstico	resultado
P64	LMC*	46,XX,t(9;22)
P90	SMP (nc)*	46,XX
P97	SMP (nc)	46,XY
P114	MI *	46,XY,13q-/46,XY
P115	MI	46,XY,t(7;13)(p15;q14)
P55	LNLA* (M4)	47,XX,+mar
P69	LNLA (M4)	46,XX,der(7)
P93	LNLA (M5)	46,XY
P153	LNLA (M2)	46,XX,del(7),t(8;21)
P188	LNLA (M2)	46,XY
P63	LMMC*	47,XO,+2mar/48,XX,+2mar
P30	LMMC	46,XY
P117	LLA (c)*	46,XY,t(9;10)
P154	LLA (c)	47,XY,+5
P128	LLA (B)	46,XY,dup(1),t(8;14),-17+mar

*LMC -leucemia mieloide crónica
SMP (nc) -síndrome mieloproliferativo não classificado
MI -mielofibrose idiopática
LNLA -leucemia não linfoblástica aguda
LMMC -leucemia mielomonocítica crónica
LLC (c) -leucemia linfoblástica aguda "common"
LLC (B) -leucemia linfoblástica aguda tipo Burkitt

Em face de todos estes resultados conclui-se que os estudos de doenças hematológicas malignas devem ser feitos a partir de culturas de curta duração. Além disso, não se deve utilizar um método único. Obter-se-á um maior número de resultados se forem sempre feitas duas culturas simultâneas com 24 e 48 horas.

2.3. TRATAMENTO COM COLCHICINA

A colchicina adicionada às culturas celulares a uma concentração apropriada, dissolve a tubulina dos microtúbulos do fuso acromático, impedindo que este se forme nas células em divisão. As células ficam por isso bloqueadas em metafase e a contracção dos cromatídeos dependerá do seu tempo de actuação.

É muito variável o tempo de exposição das células à colchicina escolhido pelos diferentes investigadores para a análise de cromossomas metafásicos. Mas essa escolha deve ser sempre um compromisso entre dois factores aparentemente opostos: o tempo necessário para bloquear um número suficiente de metafases (quanto maior fôr melhor) e o tempo necessário para que a contracção dos cromatídeos não seja demasiada, para não dificultar a identificação das bandas (que deve, portanto, ser curto).

Para a observação de metafases em culturas espontâneas de células hematopoiéticas malignas esse compromisso é ainda mais difícil de resolver. Nestes casos, se por um lado os cromatídeos contraem ainda mais do que nas células normais (Lemieux *et al.*, 1987) e portanto o tratamento deve ser curto, por outro o índice mitótico é por vezes muito baixo, e então um tratamento curto pode não permitir o bloqueio de um número suficiente de metafases. Além disso, a duração do ciclo de divisão destas células é muito variável nas diferentes patologias (Webber e Garson, 1983), sendo imprevisível em que altura do período de cultura se encontra uma maior concentração de células em mitose.

Assim, para optimizar a quantidade de metafases a obter em culturas espontâneas de células de indivíduos com doenças hematológicas malignas, a par de um tratamento clássico de colchicina durante um período limitado, foi feito um outro com adição da mesma durante o tempo total de cultura, bloqueando então todas as células que entram em divisão.

Trabalho experimental

Para a observação de metafases em culturas de medula óssea ou sangue periférico de 81 indivíduos com doenças hematológicas malignas foram feitas, para cada doente, duas culturas simultâneas, nas mesmas condições (concentração celular de $0.5x10^6$/ml em RPMI 1640 com L-glutamina suplementado com 15% de FCS e com antibióticos, incubação durante 24 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2), variando apenas o tratamento com colchicina: adição durante os trinta minutos finais de incubação a uma concentração de 4μg/ml e adição durante as 24 horas totais de incubação, à mesma concentração.

Após bloqueio das metafases com os tratamentos referidos, as células foram tratadas com uma solução hipotónica (KCl a 0.075M), seguida de fixação com metanol acético 3:1.

Para cada doente estudado o melhor tratamento foi considerado o da cultura que permitiu fazer o estudo cromossómico, ou seja, daquela que apresenta metafases com melhor qualidade. Refira-se que com um tratamento prolongado de colchicina é possível obter um elevado número de metafases, mas no entanto estas podem ter cromossomas demasiadamente contraídos, de tal modo que não permitam uma análise de bandas adequada. Assim, para estudo do cariotipo a qualidade dos cromossomas será necessariamente mais importante que a quantidade.

Quando ambas as culturas apresentavam metafases de boa qualidade, os dois tratamentos foram considerados como adequados

Para a análise comparativa de frequências utilizou-se o teste X^2

Resultados

O tratamento com colchicina durante a 1/2 hora final de incubação permitiu fazer o estudo cromossómico em 76.8% dos doentes estudados. O tratamento durante o tempo total de cultura permitiu fazer o estudo em 23.2% dos doentes estudados (Quadro 6).

Comparando os resultados obtidos em cada tipo de patologia não se encontrou uma diferença significativa entre eles (p=0.5044).

Quadro 6. Proliferação celular em culturas bloqueadas com colchicina durante 1/2 hora e 24 horas. Está indicada para diferentes patologias a frequência com que se fizeram estudos cromossómicos a partir de cada um dos dois tipos de tratamento.

tipo patologia	nº estudos a partir de tratamento de 1/2 h (%)	nº estudos a partir de tratamento de 24 h (%)	nº total de casos
LNLA*	76.0	24.0	25
LMC*	66.7	33.3	21
SMD*	100.0	0.0	6
SMP*	76.9	23.1	13
LLA*	82.4	17.6	17
TOTAL	**76.8**	**23.2**	**82**

X^2=3,3289 p=0,5044

*LNLA -leucemia não linfoblástica aguda
LMC -leucemia mieloide crónica
SMD -síndrome mielodisplásico
SMP -síndrome mieloproliferativo (não LMC)
LLA -leucemia linfoblástica aguda

Comparando ainda os resultados obtidos separadamente para culturas de medula óssea e sangue periférico (Quadro 7), também não se encontrou uma diferença significativa entre os dois tipos de células.

Quadro 7. Proliferação celular em culturas bloqueadas com colchicina durante 1/2 hora e 24 horas. Está indicada para culturas de medula óssea e sangue periférico a frequência com que se fizeram estudos cromossómicos a partir dos dois tipos de cultura.

tipo células	nº estudos a partir de tratamento de 1/2 h (%)	nº estudos a partir de tratamento de 24 h (%)	nº total de casos
medula óssea	76.9	23.1	65
sangue perif.	76.5	23.5	17
TOTAL	**76.8**	**23.2**	**82**

X^2=0,0015 p=1 (com correcção de Yates)

Discussão

Para a maioria dos casos estudados, o tratamento com colchicina durante as 24 horas totais de cultura foi muito agressivo para os cromossomas. Essa agressividade manifestou-se não só pela enorme contracção dos cromatídeos, que não permitia muitas vezes a identificação das bandas, como também pelo aparecimento de células tetraploides em consequência do tratamento prolongado.

No entanto, para 18 casos (23.2%) foi possível obter com estas culturas metafases de muito boa qualidade, sem contracção exagerada dos cromatídeos. Além disso, para 8 destes doentes estas culturas foram as únicas que permitiram fazer o estudo cromossómico, ou seja, um tratamento com colchicina durante meia hora não abrangeu nenhuma célula em divisão. Poder-se-á pôr a hipótese de que nestes casos em que não se encontraram células em divisão durante a meia hora final de incubação, o

tratamento prolongado com colchicina permitiu bloquear células que se encontravam em metafase num momento mais precoce do período de cultura.

Assim, se não tivesse sido utilizada esta técnica nos 8 casos referidos, não teria sido possível obter os resultados cromossómicos descritos no Quadro 8.

Quadro 8. Resultados dos estudos citogenéticos de 8 indivíduos com doenças hematológicas malignas, cujas metafases foram obtidas somente a partir de culturas tratadas com colchicina durante o tempo total de cultura.

doente	diagnóstico	resultado
P47	LMC*	46,XX,t(9;22)
P230	LMC	46,XY,t(9;22)
P118	SMP (nc)*	46,XY
P107	PV*	45,XX,rob(14q;21q),del(20)/ 45,XX,rob(14q;21q)
P223	TE*	46,XX/46,XX,13q-
P105	LNLA* (M2)	46,XY
P124	LNLA (M5)	46,XX/46,XX,4q+
P130	LNLA (M6)	46,XY

*LMC -leucemia mieloide crónica
SMP (nc) -síndrome mieloproliferativo não classificado
PV -policitemia vera
TE -trombocitemia essencial
LNLA -leucemia não linfoblástica aguda

Em face destes resultados, a prática de culturas com tratamento de colchicina durante 24 horas, a par de culturas com tratamento durante a meia hora final de incubação, passou a fazer parte do protocolo do estudo cromossómico em doenças hematológicas malignas. A utilização de duas técnicas em simultâneo permite obter um maior número de resultados cromossómicos adequados.

2.4. SINCRONIZAÇÃO CELULAR

As técnicas de sincronização celular para obtenção de bandas de alta resolução têm tido um impacto notável no estudo dos cromossomas humanos. Estas permitem uma melhor detecção de pequenas alterações estruturais que não seriam identificadas com os métodos clássicos de bandeamento.

Embora tenham começado por ser praticadas em células de sangue periférico (Yunis, 1976; Yunis *et al.*, 1978; Viegas-Pequignot e Dutrillaux, 1978), foram rapidamente descritos vários métodos aplicados a células de medula óssea (Hagemeijer *et al.*, 1979; Yunis *et al.*, 1981; Yunis, 1982). No entanto, hoje em dia existem ainda dificuldades na obtenção de preparações cromossómicas de células neoplásicas sincronizadas que dêem resultados satisfatórios de uma forma consistente.

Neste trabalho foi feito um estudo comparativo entre a proliferação de células hematopoiéticas malignas em culturas não sincronizadas e sincronizadas com bromodeoxiuridina (BrdU) ou fluorodeoxiuridina (FdU). A experimentação de dois tipos de sincronização teve como objectivo comparar a técnica mais correntemente utilizada (BrdU) com uma técnica mais apropriada para células de medula óssea (FdU). Esta última aumenta o índice mitótico e é menos tóxica para os cromossomas (Webber e Garson, 1983).

Trabalho experimental

Foi feito um estudo comparativo da proliferação espontânea de células de medula óssea ou de sangue periférico de 64 indivíduos com doenças hematológicas malignas, em culturas com e sem sincronização. Para cada doente foram feitas duas culturas simultâneas, nas mesmas condições (concentração celular de 0.5×10^6/ml em RPMI com L-glutamina suplementado com 15% de FCS e com antibióticos, incubação durante 24 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2), variando apenas na aplicação ou não de sincronização celular.

Em 32 casos a sincronização foi feita com BrdU, utilizando uma modificação da técnica de Dutrillaux e Viegas-Pequignot (1981). Em 32 casos foi feita com FdU, utilizando uma modificação da técnica de Webber e Garson (1983).

Técnica de sincronização com BrdU

A BrdU foi adicionada a cada cultura numa concentração final de 0.2mg/ml (0.6mM) durante 17 horas. As células foram depois lavadas em HBSS e colocadas em novo meio de cultura (RPMI, sem adição de soro fetal). Adicionou-se timidina numa concentração final de 3μg/ml (10μM) durante as 6 horas finais de cultura, seguindo-se a técnica normal.

Técnica de sincronização com FdU

Adicionaram-se a cada cultura FdU numa concentração final de 0.1μM e uridina numa concentração final de 10μM durante 17 horas. Ao fim deste tempo adicionou-se timidina numa concentração final de 10μM durante 7 horas, seguindo-se a técnica normal.

Para cada doente estudado, o melhor tratamento foi considerado o da cultura que permitiu fazer o estudo cromossómico, ou seja, da que apresentava mais metafases com melhor qualidade.

Resultados

A aplicação das técnicas de sincronização reduziu significativamente o índice mitótico das células em cultura, de tal modo que apenas para 6 dos 64 casos estudados foi possível obter metafases a partir das culturas sincronizadas. Estes correspondem a cinco doentes com síndrome mieloproliferativo (SMP) e um com síndrome mielodisplásico (SMD). Em nenhum caso de leucemia aguda foi possível obter boas preparações cromossómicas com sincronização.

Uma vez que este resultado podia corresponder a uma deficiência do próprio método, foram aplicadas as mesmas técnicas para um estudo

cromossómico em 8 indivíduos normais, isto é, não portadores de qualquer doença hematológica maligna. Em todos eles se obtiveram metafases com uma qualidade e quantidade suficientes para fazer um estudo cromossómico adequado.

Discussão

A aplicação da sincronização celular aos estudos cromossómicos de células hematopoiéticas malignas tem permitido a identificação de alterações clonais que não seriam detectadas com as técnicas clássicas sem sincronização (Yunis *et al.*, 1981; Bloomfield e de la Chapelle, 1987). No entanto, nem todos os laboratórios utilizam estas técnicas, pois nem sempre os resultados são satisfatórios e consistentes. Vários factores, incluindo o tipo de patologia, a qualidade e quantidade da amostra a analisar e o tratamento das células antes da colheita podem afectar adversamente a qualidade dos cromossomas (Knutsen *et al.*, 1990).

Neste trabalho não foi possível obter resultados satisfatórios com a utilização dos métodos de sincronização. Para nenhum caso de leucemia aguda foi possível obter metafases sincronizadas; estas foram essencialmente obtidas em doentes com LMC, para os quais a detecção da t(9;22) não necessita propriamente da utilização de bandas de alta resolução.

Assim, a aplicação destas técnicas, tal como foram ensaiadas, não apresentou qualquer vantagem para os estudos cromossómicos de indivíduos com doenças hematológicas malignas. Contudo, uma vez que elas poderiam contribuir para a identificação de pequenas alterações estruturais indetectáveis com os métodos clássicos, novos ensaios serão feitos num futuro próximo. Estes englobarão não só modificações das técnicas já testadas, mas também utilização de outros tipos de sincronização.

2.5. EFEITO DOS GLÓBULOS RUBROS EM CULTURAS DE SANGUE PERIFÉRICO

Na preparação de culturas de sangue periférico para estudos cromossómicos nem todos os laboratórios de citogenética utilizam o mesmo tipo de amostra. Alguns usam sangue total, outros separam os glóbulos rubros (GR) por centrifugação ou sedimentação (Zackai e Mellman, 1974; Verma e Babu, 1989). Até hoje não foi estabelecido nenhum critério padrão para a escolha de um ou outro método.

Em culturas espontâneas de células malignas, o índice mitótico é de um modo geral baixo e a qualidade das metafases fraca, sendo muitas vezes difícil fazer a análise cromossómica num número suficiente de metafases. No entanto, estes estudos podem ser melhorados se forem feitas, para cada doente, culturas simultâneas com variações em determinadas condições de cultura. Este facto já foi testado variando o tempo de cultura (página 30) e o tratamento com colchicina (página 37).

Especificamente para culturas de sangue periférico, não existem estudos que indiquem se as células não terão um comportamento proliferativo diferente quando em presença ou ausência de GR. Assim, neste trabalho foi feito, para indivíduos com diversas doenças hematológicas, um estudo comparativo da proliferação celular em culturas de sangue total e de sangue com deplecção de GR.

Trabalho experimental

Proliferação espontânea de células malignas

Foi feito um estudo comparativo da proliferação espontânea de células do sangue periférico obtidas a partir de amostras de sangue total (GR+) e de sangue com deplecção de glóbulos rubros (GR-), em 32 indivíduos com doenças hematológicas malignas.

Para cada doente foram feitas duas culturas simultâneas, nas mesmas condições (concentração celular de $0.5x10^6$/ml em RPMI com L-glutamina

suplementado com 15% de FCS e com antibióticos, incubação durante 24 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2), variando apenas o tipo de inóculo: GR+ ou GR-.

Na maioria dos casos estudados o índice mitótico era tão baixo que se tornava difícil uma quantificação desse valor. Por isso, o estudo comparativo teve como base a proporção relativa de células em divisão nos dois tipos de cultura, adoptando-se uma classificação segundo o seguinte critério:

- as culturas de sangue total e sangue com deplecção de glóbulos rubros têm sensivelmente a mesma proporção de células em divisão **(GR+=GR-)**;

- as culturas sem glóbulos rubros têm uma proporção de células em divisão pelo menos duas vezes superior à das culturas de sangue total **(GR->GR+)**;

- as culturas de sangue total têm uma proporção de células em divisão pelo menos duas vezes superior à das culturas com deplecção de glóbulos rubros **(GR+>GR-)**.

Proliferação de linfócitos estimulados com PHA

Foi também feito um estudo comparativo da proliferação de linfócitos obtidos a partir dos dois tipos de amostra referidos (GR+ e GR-), em 40 indivíduos com doenças hematológicas.

Para cada doente foram feitas duas culturas simultâneas, nas mesmas condições (concentração celular de $0.5x10^6$/ml em RPMI com L-glutamina suplementado com 15% de FCS e com antibióticos, incubação durante 72 horas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2, estimulação com PHA à concentração de 5µg/ml), variando apenas o tipo de inóculo: amostra com ou sem GR.

Tal como no estudo de culturas espontâneas, o índice mitótico dos linfócitos destes doentes em culturas estimuladas com PHA era por vezes muito baixo, sendo mais uma vez difícil a sua quantificação. Assim, o critério de classificação utilizado no estudo anterior foi aplicado novamente.

Resultados

Comparação entre a proliferação espontânea em culturas de sangue total e de sangue com deplecção de GR

Os resultados obtidos mostram que em 81% dos casos não se detectaram diferenças na proliferação entre os dois tipos de cultura e em 19% as células cresceram melhor em culturas de sangue total (Quadro 9).

No grupo de doentes cujas células proliferaram melhor na presença de GR não se encontra nenhum tipo de neoplasia preferencial, embora o número de casos seja muito pequeno para ser feita uma avaliação correcta.

Comparação entre a proliferação de linfócitos em culturas de sangue total e de sangue com deplecção de GR estimuladas com PHA

Os resultados obtidos mostram que em 92.5% dos casos detectaram-se diferenças na proliferação celular entre as culturas com e sem GR (Quadro 10), ou seja, em 52.5% existe uma maior proliferação na presença de GR, e em 40% a proliferação é maior em culturas com deplecção de GR. Em 7.5% dos casos não se observaram diferenças no crescimento dos linfócitos entre os dois tipos de cultura.

Analisando detalhadamente estas diferenças de proliferação celular na presença e ausência de GR procurou-se verificar se existe alguma correlação aparente com o tipo de patologia em causa.

Quadro 9. Estudo comparativo da proliferação espontânea em culturas de sangue total (GR+) e de sangue com deplecção de glóbulos rubros (GR-) de 32 indivíduos com doenças hematológicas malignas.

doente	diagnóstico	GR->GR+	GR+=GR-	GR+>GR-
P1	LMC*		+	
P3	LMC			+
P12	LMC		+	
P35	LMC		+	
P38	LMC		+	
P48	LMC		+	
P50	LMC		+	
P57	LMC		+	
P67	LMC		+	
P73	LMC			+
P235	LMC		+	
P11	SMP*			+
P26	SMP		+	
P17	LNLA*		+	
P24	LNLA		+	
P29	LNLA		+	
P37	LNLA			+
P55	LNLA		+	
P58	LNLA		+	
P69	LNLA		+	
P74	LNLA		+	
P171	LNLA		+	
P6	SMD*			+
P31	LLC*		+	
P2	LLA*		+	
P8	LLA		+	
P21	LLA		+	
P54	LLA		+	
P77	LLA		+	
P78	LLA		+	
P82	LLA		+	
P209	LLA			+

*LMC - leucemia mieloide crónica
SMP - síndrome mieloproliferativo (não LMC)
LNLA - leucemia não linfoblástica aguda
SMD - síndrome mielodisplásico
LLC - leucemia linfocítica crónica
LLA - leucemia linfoblástica aguda

Quadro 10. Estudo comparativo da proliferação de linfócitos em culturas de sangue total (GR+) e de sangue com deplecção de glóbulos rubros (GR-) de 40 indivíduos com doenças hematológicas.

doente	diagnóstico	GR->GR+	GR+=GR-	GR+>GR-
P3	LMC*			+
P12	LMC	+		
P48	LMC		+	
P50	LMC	+		
P57	LMC			+
P122	LMC			+
P195	LMC			+
P72	SMP*	+		
P118	SMP			+
P37	LNLA*		+	
P55	LNLA			+
P58	LNLA			+
P69	LNLA	+		
P74	LNLA			+
P119	LNLA			+
P159	LNLA	+		
P171	LNLA			+
P8	LLA*	+		
P21	LLA			+
P54	LLA			+
P82	LLA	+		
P209	LLA		+	
P31	LLC*			+
P98	LLC			+
P106	LLC			+
P140	LLC			+
P148	LLC			+
P158	LLC			+
P170	LLC			+
P36	AF*	+		
P81	AF?	+		
P102	AF?	+		
P133	AF?	+		
P155	AF?	+		
P160	AF	+		
P250	AF	+		
P9	HLT8*			+
P40	HLT8			+
P147	HLT4*	+		
P149	HLT4	+		

*LMC - leucemia mieloide crónica
SMP - síndrome mieloproliferativo
LNLA- leucemia não linfoblástica aguda
LLA - leucemia linfoblástica aguda
LLC - leucemia linfocítica crónica
HLT8- hiperlinfocitose T8
HLT4- hiperlinfocitose T4
AF - anemia de Fanconi

Nos 17 indivíduos diagnosticados com patologias da linha mieloide (LMC, SMP e LNLA) não se encontrou qualquer correlação aparente entre a proliferação dos linfócitos e a presença ou ausência de GR. Em 10 doentes obteve-se uma melhor proliferação na presença de GR e em 5 as células cresceram melhor sem GR. Convém ter presente que nestes casos foi analisado o comportamento dos linfócitos T constitucionais e não o das células malignas, uma vez que as culturas foram estimuladas com PHA.

Relativamente aos indivíduos com leucemia linfoblástica aguda (LLA), também não se observou um crescimento preferencial dos linfócitos constitucionais em qualquer uma das condições de cultura. Não se pode, porém, tirar uma conclusão definitiva porque o número de casos estudados é muito pequeno (n=5).

Quanto à proliferação dos linfócitos pertencentes aos 7 doentes diagnosticados com leucemia linfocítica crónica (LLC), observou-se sempre uma maior proporção de células em divisão nas culturas de sangue total; pode-se mesmo afirmar que nas culturas de sangue com deplecção de GR nunca se conseguiu obter um número de metafases suficiente para fazer o estudo cromossómico. Assim, embora o número de doentes estudados seja pequeno, existe sem dúvida nenhuma um crescimento preferencial na presença de GR.

Uma situação contrária foi observada nos doentes diagnosticados ou com diagnóstico de presunção de anemia de Fanconi (AF). Em todos eles (n=7) se detectou um melhor crescimento em culturas sem GR; além disso, a qualidade das metafases era muito superior nessas culturas. Esta diferença qualitativa nunca foi detectada nos estudos comparativos das patologias até agora referidas.

Nos dois casos de hiperlinfocitose T8 (HLT8) as culturas de sangue total apresentaram uma proporção de células em divisão muito superior à das culturas sem GR; nestas, as células praticamente não entraram em divisão.

Nos dois casos de hiperlinfocitose T4 (HLT4) verificou-se a situação oposta, ou seja, nas culturas de sangue total o crescimento celular parece estar inibido, enquanto que nas culturas sem GR observou-se uma grande quantidade de células em divisão.

Discussão

O efeito da presença de GR em culturas de sangue periférico de indivíduos com doenças hematológicas foi testado através de um estudo comparativo entre a proliferação celular em culturas de sangue total e de sangue com deplecção de GR.

Em culturas espontâneas, a presença de GR não teve qualquer influência na proliferação das células malignas. No entanto, em culturas estimuladas com PHA encontraram-se diferenças significativas na proliferação celular conforme se trata de culturas com ou sem GR. Analisando detalhadamente os resultados obtidos para diferentes patologias, verificou-se que em determinados casos as células cresceram melhor na presença de GR; noutros casos a ausência de GR pareceu beneficiar a proliferação celular.

Culturas de linfócitos para o estudo cromossómico em doentes com LLC

Para os estudos cromossómicos em doentes com LLC foram, sem dúvida alguma, as culturas de sangue total estimuladas com PHA que permitiram obter um maior número de células em divisão. Porém, a PHA estimula primariamente a divisão de células T. Assim, nos casos de LLC de origem B, os resultados cromossómicos obtidos a partir destas culturas podem não ser representativos da população maligna; eles só serão considerados como conclusivos nos casos em que seja comprovado que são as células neoplásicas e não os linfócitos T constitucionais que se encontram em divisão. Na realidade, esta prova foi obtida para dois dos casos estudados (P98 e P106). Em ambos se detectou uma trissomia para o cromossoma 12, que é uma alteração numérica típica das células malignas de indivíduos com LLC-B e que não aparece nas células constitucionais.

Nos casos em que não se detectaram alterações cromossómicas específicas, os resultados infelizmente não puderam ser conclusivos.

Em face destes dados, para as culturas de sangue total estimuladas com PHA serem aplicadas aos estudos cromossómicos de doentes com LLC-B, será necessário, para cada doente, que estas sejam sempre acompanhadas da marcação das células em divisão. Este estudo será feito futuramente, sendo esta marcação analisada através de citometria de fluxo.

Culturas de linfócitos para o estudo cromossómico em doentes com AF

A AF é uma doença autossómica recessiva caracterizada clinicamente por uma pancitopenia progressiva, diversas anomalias congénitas e aumento de predisposição para a malignidade (Fanconi, 1967; Schroeder *et al.*, 1976). As células destes doentes apresentam instabilidade cromossómica que se manifesta, em culturas de sangue periférico, pela presença de quebras cromossómicas, quer espontâneas quer induzidas. Por este facto, tem sido sugerido que a anomalia básica nesta doença consiste numa capacidade reduzida para a reparação de DNA (Heim e Mitelman, 1987).

As técnicas actualmente descritas para a detecção de quebras cromossómicas em doentes com AF são praticadas unicamente em culturas de sangue total (German *et al.*, 1987; Auerbach *et al.*, 1989; Morimoto, 1990). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os linfócitos destes doentes proliferam mais em culturas de sangue com deplecção de GR e a qualidade das metafases também é consideravelmente melhor nestas culturas. Além disso, também se detectou, num dos doentes estudados, uma diferença no número de quebras espontâneas e de hipodiploidias não clonais entre culturas com e sem GR, sendo menores nas culturas depletadas de GR.

Nordenson (1977), ao cultivar linfócitos de doentes com AF na presença ou ausência de dismutase do superóxido (SOD) e catalase, verificaram que estas diminuiam o número de quebras cromossómicas. Joenje e colaboradores (1978) mediram a actividade da SOD directamente nos GR e verificaram que os GR de doentes com AF tinham uma actividade diminuida comparada com a de indivíduos normais. Foi então proposto que o defeito

primário na AF estava relacionado com o metabolismo do O_2 e não com a reparação do DNA. No entanto, o decréscimo na actividade da SOD observado era quase sempre inferior a 50%, o que torna pouco provável que este seja o único defeito nesta condição homozigótica recessiva. De qualquer modo, a diminuição da actividade da SOD, ao impôr uma maior necessidade de reparação, deve estar envolvida na patogénese da doença (Gordon-Smith e Rutherford, 1989).

Neste trabalho verificou-se que as células de doentes com AF crescem melhor na ausência de GR. Embora não esteja ainda esclarecida a causa desta diferença entre os dois tipos de cultura (GR+ e GR-), pode-se pôr a hipótese de que ela esteja associada ao defeito na actividade da SOD nos eritrócitos. Serão feitos, num futuro próximo, mais estudos comparativos entre culturas com e sem GR, que serão úteis não só para confirmar esta hipótese como eventualmente para ajudar à compreensão da patogénese desta doença, até hoje ainda não esclarecida.

Culturas de linfócitos para o estudo cromossómico em doentes com HLT8 e HLT4

Nos 2 casos de HLT8 estudados, as células cresceram preferencialmente na presença de GR. Nos casos de HLT4 só foi possível obter células em divisão nas culturas com deplecção de GR. Estes resultados permitem pôr a hipótese da existência de uma associação das células CD8+ e CD4+ com as diferenças encontradas entre culturas com e sem GR.

Para comprovação desta hipótese, foi feito um estudo mais detalhado da proliferação de células T de indivíduos normais, doentes com HLT8 e doentes com HLT4, em culturas de sangue periférico, estimuladas com PHA, na presença e ausência de GR.

Esse estudo será apresentado no capítulo 3.

2.6. CONCLUSÕES

Existe uma grande diversidade de técnicas, ou antes, de modificações técnicas, que podem ser utilizadas para os estudos citogenéticos de células malignas. Estas, quando em cultura, apresentam comportamentos proliferativos muito variados, que dependem não só do tipo de patologia em causa como também das condições de cultura. Por isso, cada laboratório deve definir os seus próprios métodos a fim de optimizar a quantidade e qualidade das metafases a analisar em cada caso específico.

Neste trabalho, foi feito um estudo comparativo da proliferação de células malignas de medula óssea e sangue periférico sujeitas a diferentes condições de cultura. O seu objectivo principal foi o estabelecimento de um protocolo para estudos cromossómicos em indivíduos com doenças hematológicas malignas, a ser aplicado no laboratório de citogenética do I.C.B.A.S., onde este trabalho foi realizado.

Como se pode verificar pelos resultados apresentados, não é aconselhável fazer apenas um tipo de cultura para cada doente. O número de resultados adequados pode aumentar significativamente se forem utilizadas várias técnicas em simultâneo, pois não existe nenhuma que dê consistentemente melhores resultados.

Assim, para cada doente, serão sempre feitas 4 culturas simultâneas:

1. cultura espontânea de 24 horas; tratamento de colchicina durante os 30 minutos finais de incubação.

2. cultura espontânea de 24 horas; tratamento de colchicina durante as 24 horas totais de cultura.

3. cultura espontânea de 48 horas.

4. cultura de 72 horas estimulada com PHA, para estudo do cariotipo constitucional.

Nos casos em que o estudo cromossómico é feito a partir de células do sangue periférico, utilizar-se-ão, para culturas espontâneas, amostras de sangue total. Para culturas estimuladas com PHA, a escolha do inóculo será dependente do tipo de patologia em causa:

- De um modo geral, para o estudo do cariotipo constitucional em qualquer patologia serão feitas culturas de sangue total.

- Para estudos cromossómicos de doentes com LLC serão também feitas culturas com sangue total. No entanto, cerca de 90% dos casos de LLC são de origem B, e a PHA estimula primariamente células T. Por isso, o estudo cromossómico deverá ser acompanhado da marcação das células em divisão, para confirmar se estas são representativas da população maligna que se pretende estudar.

- Para estudos cromossómicos de doentes com AF, serão feitas culturas de sangue com deplecção de GR. No entanto, o uso exclusivo desta técnica só será aplicado se, após um estudo comparativo da frequência de quebras em culturas com e sem GR, não se detectar uma diferença significativa entre o resultado cromossómico nos dois tipos de cultura.

- Para estudos de síndromes linfoproliferativos com uma população preferencial de células CD8+ serão feitas culturas de sangue total. Para os que possuem preferencialmente células CD4+ serão feitas culturas de sangue com deplecção de GR.

BIBLIOGRAFIA

Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder TM (1989): International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. Blood 73: 391-396.

Bloomfield CD, de la Chapelle A (1987) : Chromosome abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: clinical and biological significance. Seminars in Oncology 14: 372-383.

Dewald GW, Broderick DJ, Tom WW, Hagstrom JE, Pierre RV (1985): The efficacy of direct, 24-hour culture, and mitotic synchronization methods for cytogenetic analysis of bone marrow in neoplastic hematologic disorders. Cancer Genet Cytogenet 18: 1-10.

Dutrillaux B, Couturier J (1981): *La Pratique de l'Analyse Chromosomique*. Masson, Paris, p 16.

Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E (1981): High-resolution R and G banding in the same preparation. Hum Genet 57: 93-95.

Fanconi G (1967) : Familial constitutional panmyelopathy, Fanconi's anemia (FA) I. Clinical aspects. Seminars in Hematol 4: 233.

Fitzgerald PH, Morris CM, Giles LM (1982): Direct versus cultured preparation of bone marrow cells from 22 patients with acute myeloid leukemia. Hum Genet 60: 281-283.

German J, Schonberg S, Caskie S, Warburton D, Falk C, Ray J (1987): A test for Fanconi Anemia. Blood 6: 1637-1641.

Gordon-Smith EC, Rutherford TR (1989): Fanconi Anemia - constitutional, familial aplastic anaemia. Baillière's Clinical Haematol 2: 139-152.

Hagemeijer A, Smit EMA, Bootsma D (1979): Improved identification of chromosomes of leukemic cells in methotrexate-treated cultures. Cytogenet Cell Genet 23: 208-212.

Joenge H, Eriksson AW, Frants RR (1978) : Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's Anemia. Lancet I: 204.

Heim S, Mitelman F (1987): *Cancer Cytogenetics*. Alan R Liss Inc, New York, pp 11, 24, 33, 135.

Knutsen T, Bixenman HA, Lawce H, Martin PK (1990) : Chromosome analysis guidelines - preliminary report. Cytogenet Cell Genet 44: 1-4.

Knuutila S, Vuopio P, Borgström GH, de la Chapelle A (1980): Higher frequency of 5q- clone in bone marrow mitoses after culture than by a direct method. Scand J Haematol 25: 358-362.

Knuutila S, Vuopio P, Elonen E, Siimes M, Kovanen R, Borgström GH, de la Chapelle A (1981): culture of bone marrow reveals more cells with chromosomal abnormalities than the direct method in patients with hematologic disorders. Blood 58: 369-375.

Lemieux N, Richer C-L, Jean P (1987) : Combined myeloid cell synchronization and chromosome G-banding by bromodeoxyuridine. Cancer Genet Cytogenet 28: 229-236.

Morimoto K (1990): Life-style and genetic factors that determine the susceptibility to the production of chromosome damage. Em: *Chromosomal Aberrations. Basic and applied aspects*(Obe G, Natarajan AT, Eds). Springer-Verlag. pp 287-301.

Nordenson I (1977): Effect of superoxide dismutase and catalase on spontaneously occurring chromosome breaks in patient with Fanconi's Anemia. Hereditas 86: 147-150.

Sumner AT (1982): The nature and mechanisms of chromosome banding. Cancer Genet Cytogenet 6: 59-87.

Verma RS, Babu A (1989): *Human chromosomes. Manual of basic techniques.* Pergamon Press, pp 6-9.

Viegas-Pequignot E, Dutrillaux B (1978): Une méthode simple pour obtenir des prophases et des promethafases. Ann Génét (Paris): 21: 122-125.

Waghray M, Eques C, Rowley JD, Martin P, Testa JR (1981): Methods of processing marrow samples may affect the frequency of detectable aneuploid cells. Am J Hematol 11: 409-415.

Webber LM, Garson OM (1983): Fluorodeoxyuridine synchronization of bone marrow cultures. Cancer Genet Cytogenet 8: 123-132.

Williams DL, Harris A, Williams KJ, Brosius MJ, Lemonds W (1984) : A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 13: 239-257.

Yunis JJ (1976): High resolution of human chromosomes. Science 191: 1268-1270.

Yunis JJ (1981): New chromosome techniques in the study of human neoplasia. Hum Pathol 12: 540-549.

Yunis JJ (1982): Comparative analysis of high-resolution chromosome techniques for leukemic bone marrows. Cancer Genet Cytogenet 7: 43-50.

Yunis JJ, Bloomfield CA, Ensrud K (1981): All patients with acute nonlymphocytic leukemia may have a chromosomal defect. New Engl J Med 305: 135-139.

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

Zackai EH, Mellman WJ (1974): Human peripheral blood leukocyte cultures. Em: *Human Chromosome Methodology.* JJ Yunis (Ed). Academic Press, 2nd edition, p 11.

CAPÍTULO 3

EFEITO DOS GLÓBULOS RUBROS NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM CULTURAS DE SANGUE PERIFÉRICO

3.1. INTRODUÇÃO

Para a realização de estudos cromossómicos em linfócitos do sangue periférico as células podem ser obtidas a partir de dois métodos básicos: culturas de sangue total (Arakaki e Sparkes, 1963; Hungerford, 1965) e culturas de leucócitos separados dos glóbulos rubros (GR) (Moorhead *et al.*, 1960). As técnicas que se utilizam actualmente em qualquer laboratório de citogenética sofreram poucas modificações em relação às descritas originalmente, e não existe nenhum critério universal para a escolha de um ou outro método. As duas principais diferenças entre eles são 1) a presença ou ausência de GR nas culturas 2) a quantidade de células necessária para obter um número adequado de metafases; o inóculo é sempre maior para culturas de leucócitos separados (macroculturas) do que para culturas de sangue total (microculturas). Esta última diferença sugere que os GR podem ter um efeito potenciador na proliferação dos linfócitos *in vitro*.

O efeito potenciador dos GR já foi demonstrado em culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMN) estimuladas com PHA, que mostraram um aumento na incorporação de timidina tritiada ([^{3}H]TdR)quando cultivadas com GR autólogos (Tarnvik, 1970; Johnson *et al.*, 1972). Mais tarde foi demonstrado um efeito potenciador idêntico em culturas de CMN estimuladas com PWM, e foi sugerido que este efeito era mediado pelos linfócitos T com função "helper" (Rugeles *et al.*, 1987; Virella *et al.*, 1988). Contudo, estes estudos não foram complementados com a caracterização fenotípica das células em proliferação (CD8+ ou CD4+).

Foi observado em dois doentes com hiperlinfocitose T8 (HLT8) uma maior proliferação celular em culturas com GR, e em dois doentes com hiperlinfocitose T4 (HLT4) uma proliferação celular apenas em culturas com deplecção de GR (capítulo 2, páginas 49, 50). Com base neste facto, pôs-se a hipótese de que a influência dos GR não é idêntica para as duas subpopulações de linfócitos T. A verificação desta hipótese foi o objectivo dos estudos apresentados neste capítulo.

3.2. EXPANSÃO RELATIVA DOS LINFÓCITOS CD8+ E CD4+

Neste trabalho foi feito um estudo da proliferação de linfócitos T em culturas de sangue periférico com e sem GR, acompanhado de caracterização fenotípica. Este teve como objectivo investigar a influência dos GR na expansão relativa dos linfócitos CD8+ e CD4+.

Trabalho experimental

Separação das CMN e GR do sangue periférico

O sangue periférico de 11 indivíduos saudáveis e um doente com HLT8 foi colhido por punção venosa em tubos heparinizados, e as CMN foram

separadas por centrifugação de uma diluição de sangue 1:2 em HBSS (Gibco) sobre um volume igual de Lymphoprep (Nycomedas, Oslo, Norway). A viabilidade das células foi determinada por exclusão com azul de tripano. Os GR autólogos foram separados das amostras de sangue heparinizado após centrifugação a 400g e remoção do "buffy coat" e plasma. Os GR foram lavados 3 vezes em HBSS antes de serem adicionados às culturas de CMN.

Culturas de CMN para estudos de proliferação

As CMN foram cultivadas a uma concentração de $3x10^6$/ml em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de FCS (Gibco) inactivado pelo calor, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 2mM de glutamina. As células foram distribuidas em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (Nunc) a uma concentração de 20^5células/poço, em triplicado. Foram em seguida estimuladas com 5µg/ml de PHA (Difco) e cultivadas a 37°C numa atmosfera humidificada e com 5% de CO_2. Aos 3º e 6º dias de cultura as células foram recolhidas em "cell harvest" após 4 horas de incubação com 10µCi/ml [^{3}H]TdR (Amersham). A radioactividade incorporada foi medida num contador de cintilações Beckman. Foram feitas culturas duplicadas com e sem adição de GR autólogos. Estes foram adicionados numa proporção de 100GR/1CMN.

Culturas de sangue periférico para obtenção de células em metafase

O sangue periférico de 4 indivíduos saudáveis, um doente com HLT8 e dois doentes com HLT4, foi colhido por punção venosa em tubos heparinizados. Para cada indivíduo foram feitas culturas simultâneas de sangue total e sangue com deplecção de GR por centrifugação. Os leucócitos foram cultivados a uma concentração de $0.5x10^6$/ml em meio RPMI 1640 com L-glutamina (Gibco) suplementado com 15% de FCS, 100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina, a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2. As células foram estimuladas com PHA (PHA-M, Gibco). Ao fim de 3 e 6 dias as células foram tratadas com colchicina a 4µg/ml durante 30 minutos, para obtenção das células em metafase. Seguiu-se um tratamento hipotónico com KCl a 0.075M e fixação em metanol acético 3:1.

Determinação do índice mitótico

Em face do já previsto baixo número de células em divisão nalgumas culturas, foi utilizado para a determinação do índice mitótico um método que permite a obtenção de um resultado correcto e bastante preciso.

Após determinação da concentração de células na suspensão a utilizar, foram colocadas, sobre lâminas de vidro muito bem limpas e desengorduradas, duas gotas de 25µl dessa suspensão. Estas foram secas ao ar e coradas com Giemsa a 4% (em tampão fosfato) durante 7 minutos. Em cada lâmina foram contadas todas células que se encontravam em divisão (metafases bloqueadas durante o tratamento de 30 minutos com colchicina), utilizando um microscópio de luz Nikon Labophot (observação com uma ampliação de 100x). O índice mitótico foi calculado dividindo o número total de metafases observadas pelo conhecido número total de células na lâmina (x100).

Usando este método foi possível contar o número de metafases numa população de 10^4 a 10^5 células e determinar índices mitóticos tão baixos como 0.01%.

Caracterização do fenótipo celular

As subpopulações de células T foram definidas por imunocitoquímica, utilizando anticorpos monoclonais contra os antigenes CD4 e CD8 (Dako T4 e Dako T8, Dakopats), por uma modificação do método APAAP (Reimão *et al.*, 1991).

Fenótipo das células em divisão

O fenótipo dos linfócitos T que se encontram em proliferação foi definido por dupla marcação com imunocitoquímica e autorradiografia da [^{3}H]TdR incorporada. As CMN foram cultivadas em tubos de cultura de 2ml (Nunc) a uma concentração celular de $1x10^6$/ml durante 6 dias a 37°C e numa atmosfera humidificada com 5% de CO_2. As culturas foram feitas em duplicado com e sem a adição de GR numa proporção de 100GR/1CMN. As células foram estimuladas com 5µg/ml de PHA (Difco). Uma hora antes da paragem da cultura foi adicionada [^{3}H]TdR (0.1µCi/ml). Os esfregaços

foram preparados numa citocentrífuga Shandon. A fenotipagem com o método APAAP foi feita após secagem ao ar à temperatura ambiente durante a noite. Para o processamento da autorradiografia, lâminas previamente aquecidas foram mergulhadas numa emulsão Ilford K5 a 54°C. As lâminas foram reveladas com o revelador Kodak D19, após 10 dias de exposição a 4°C.

O fenótipo das células em divisão foi definido pela percentagem de células CD4+ e CD8+ na população de células que incorporaram [^{3}H] (mais de 10 grãos com background contendo menos de 1 grão por área celular). As lâminas foram codificadas antes de serem lidas por dois observadores. Foi calculado um coeficiente de variância (CV) para cada par. O CV médio foi de 9.16 (0.00-28.28) para valores compreendidos entre 20 e 74. Nove de quarenta lâminas não puderam ser quantificadas devido à fraca expressão dos marcadores de superfície ou devido à má qualidade dos esfregaços, sendo por isso excluidas da análise.

Análise estatística

As médias entre grupos foram comparadas pelo teste T.

A correlação entre variáveis foi estudada por análise de regressão simples. Os dados foram analisados utilizando o programa Statgraphics (STSC).

Resultados

A presença de GR aumenta a resposta proliferativa das células do sangue periférico à PHA

A presença de GR nas culturas de sangue periférico de indivíduos normais teve um efeito potenciador consistente na resposta das células à PHA.

Este efeito verificou-se quer em culturas de sangue total quer em culturas de CMN com adição de GR. No primeiro caso foi observado ao 3º dia de cultura e medido pelo índice mitótico (Figura 1); no segundo foi

observado ao 3º ou 6º dia de cultura e medido por incorporação de [^{3}H]TdR (Figura 2).

O índice mitótico nas culturas de sangue total (média: 2.74±0.75) foi significativamente maior (p=0.005) que nas culturas de sangue com deplecção de GR (média: 1.87±0.53) (Figura 1).

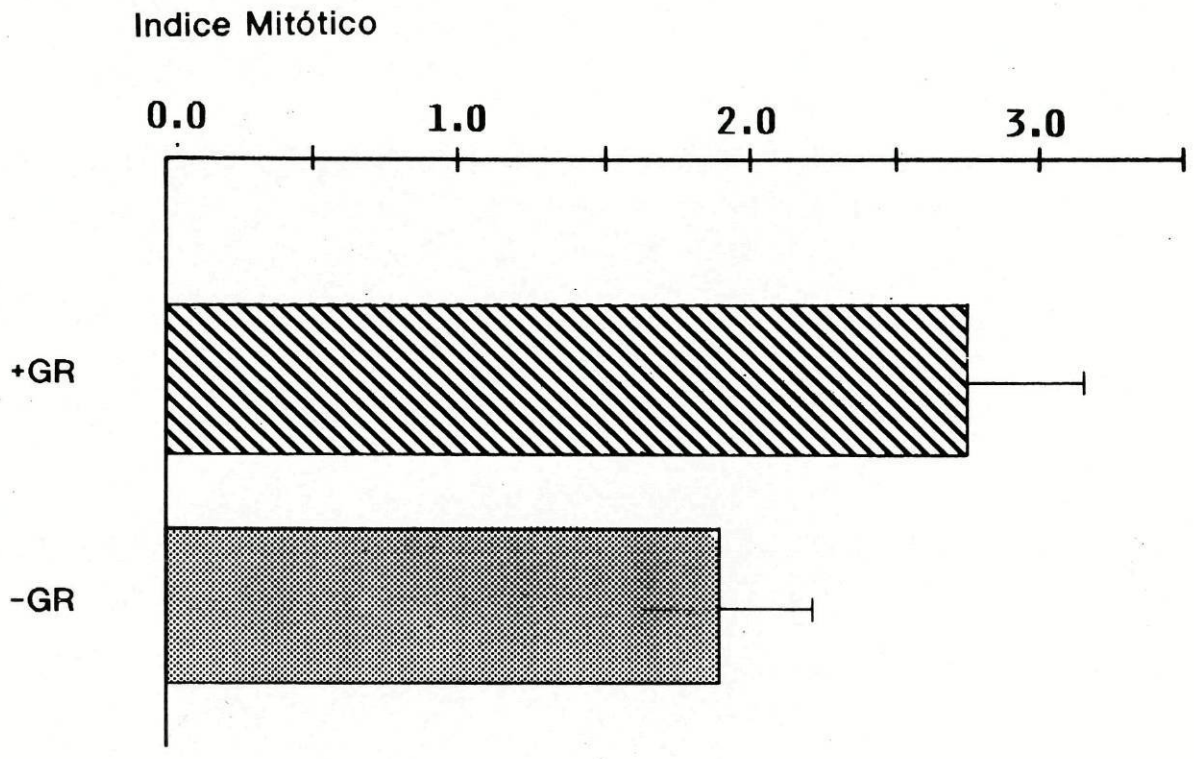


Figura 1. Comparação entre o índice mitótico (3º dia) de células em culturas de sangue total (+GR) e sangue com deplecção de glóbulos rubros (-GR) de indivíduos normais. Está indicada a média e o erro padrão da média em 4 experimentos.

Do mesmo modo, em cada cultura de CMN com GR, o pico de incorporação de [^{3}H] foi consistentemente maior que o pico de uma cultura simultânea sem GR (p=0.007) (Figura 2).

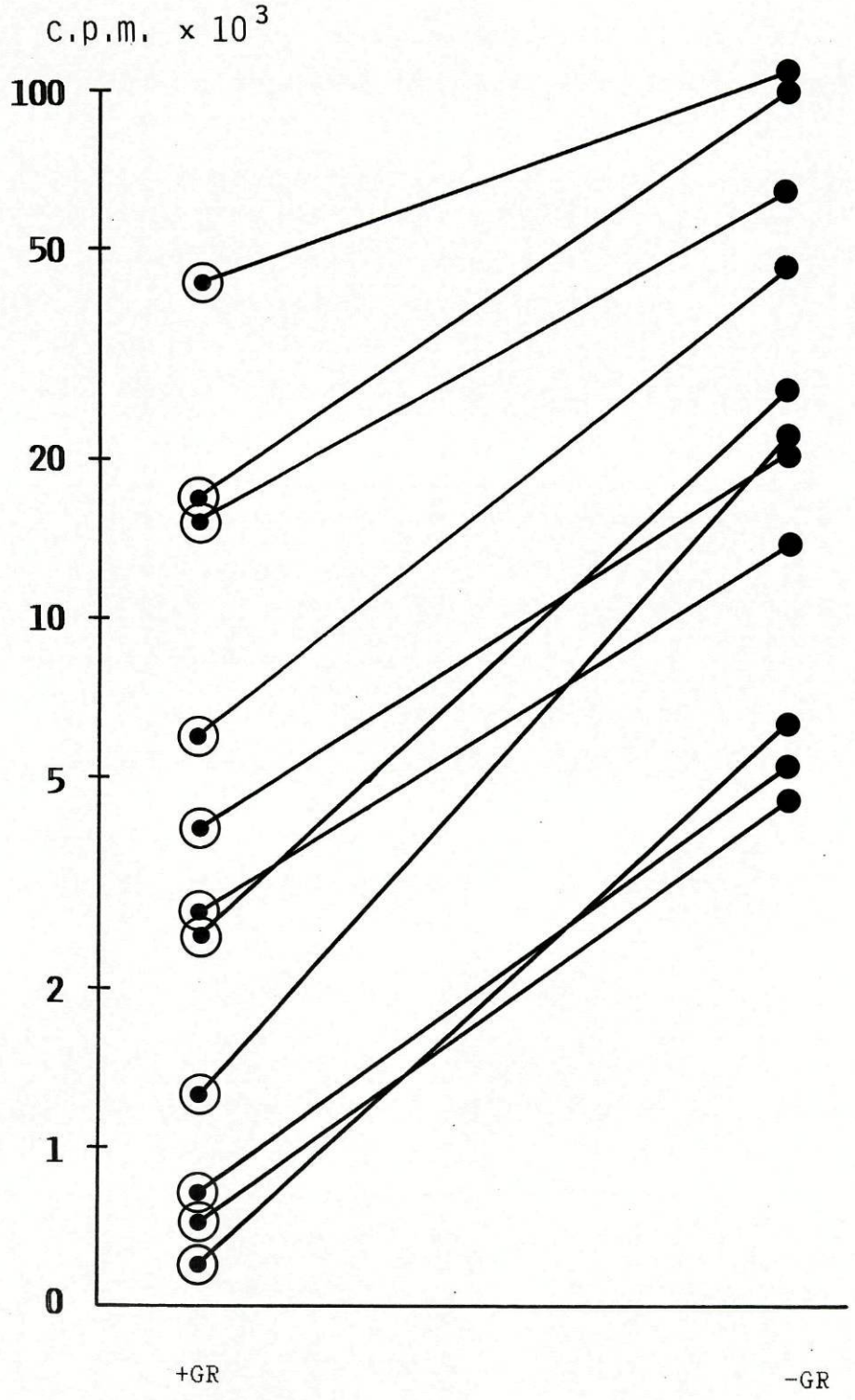


Figura 2. Efeito da adição de glóbulos rubros autólogos (GR) na proliferação induzida com PHA de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normais. Está indicado o valor da incorporação de [^{3}H]TdR em 11 experimentos independentes.

As células CD8+ proliferam preferencialmente na presença de GR

A adição de GR no início de culturas de CMN fez aumentar significativamente o número de células CD8+ em divisão observadas ao 6º dia ($p=0.026$). A percentagem de células em mitose que expressam o fenótipo CD8 foi significativamente superior ($p=0.003$) em culturas com GR (média: 55.5±10.2) do que nas culturas sem GR (média: 31.4±15.7). Contrariamente a estes resultados, não se observou uma diferença significativa entre a percentagem de células CD4+ em divisão em culturas com GR (média: 41.6±10.5) e sem GR (média: 46.7±10.7).

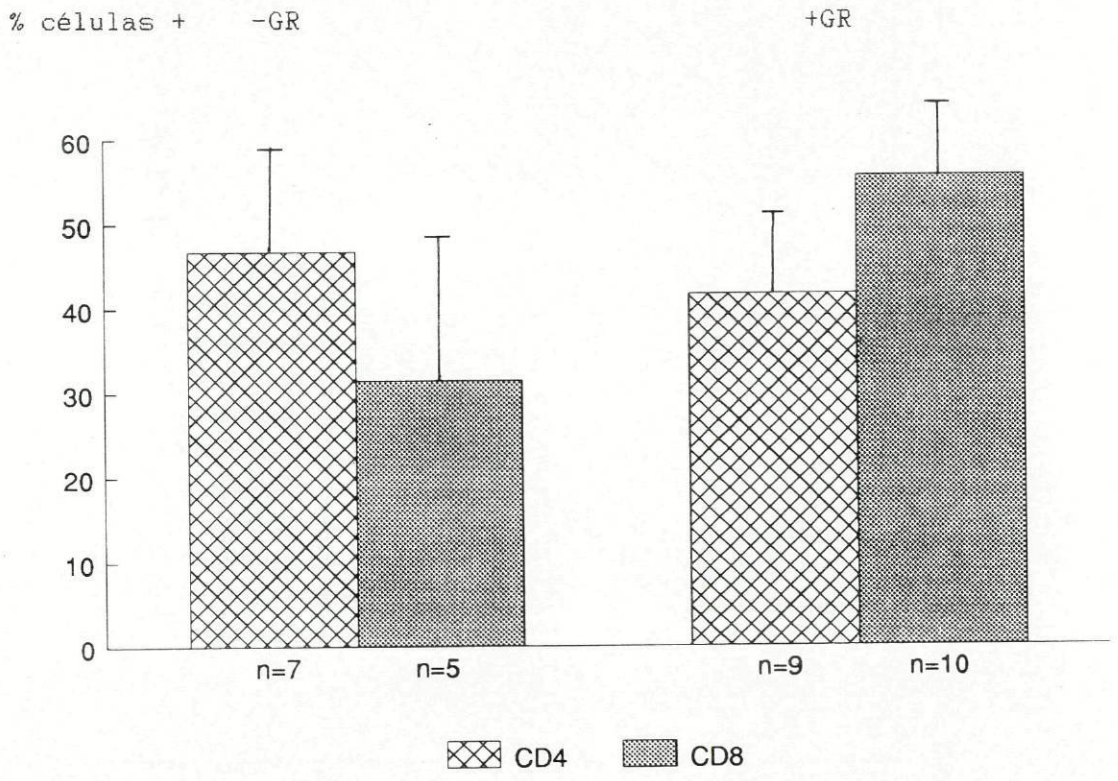


Figura 3. Proporção relativa de células CD4+ e CD8+ em divisão ao 6º dia de culturas estimuladas com PHA de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normais na presença (+GR) e ausência (-GR) de glóbulos rubros autólogos. Está indicado o número de observações para cada marcador de superfície em cada condição de cultura.

Efeito da presença de GR em culturas de células CD8+

O efeito dos GR na proliferação de células CD8+ foi observado em culturas de linfócitos obtidos a partir do sangue periférico de um doente com HLT8. O efeito potenciador dos GR na resposta à PHA foi confirmado pela incorporação de [^{3}H]TdR ao 3º e 6º dias de culturas de CMN (Figura 4) e pelo índice mitótico ao 6º dia de culturas de sangue total (Figura 5). Em cada cultura de CMN com GR o pico de incorporação de [^{3}H]TdR foi consistentemente superior ao pico em culturas sem GR ($p=0.026$) (Figura 4). Do mesmo modo, o índice mitótico nas culturas com GR (média: 1.13±0.36) foi significativamente superior ($p=0.03$) ao das culturas sem GR (média: 0.41±0.14) (Figura 5).

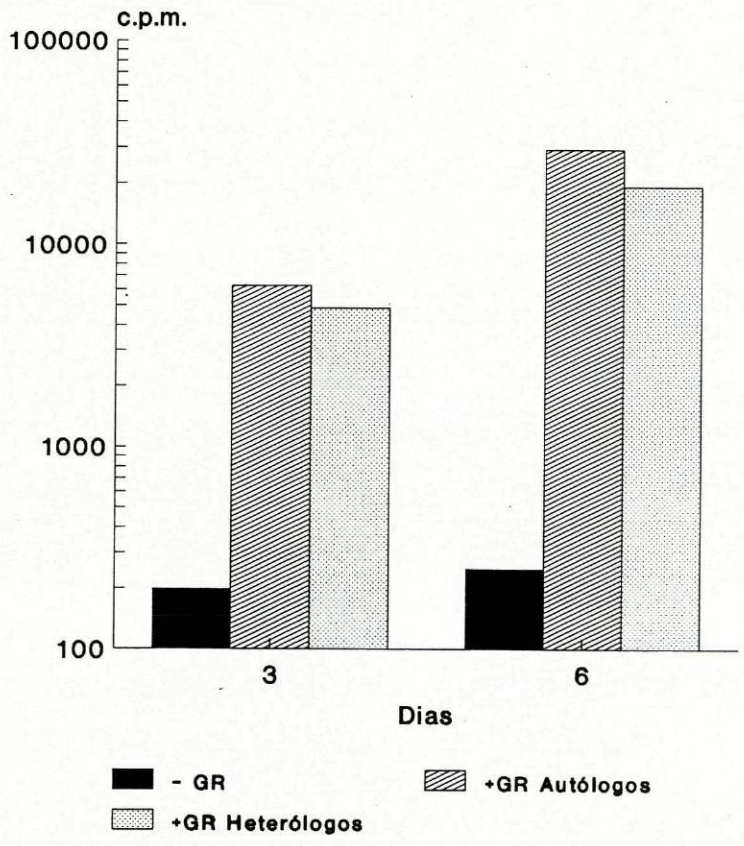


Figura 4. Efeito da adição de glóbulos rubros autólogos e heterólogos na proliferação induzida com PHA de células mononucleares do sangue periférico de um doente com hiperlinfocitose T8.

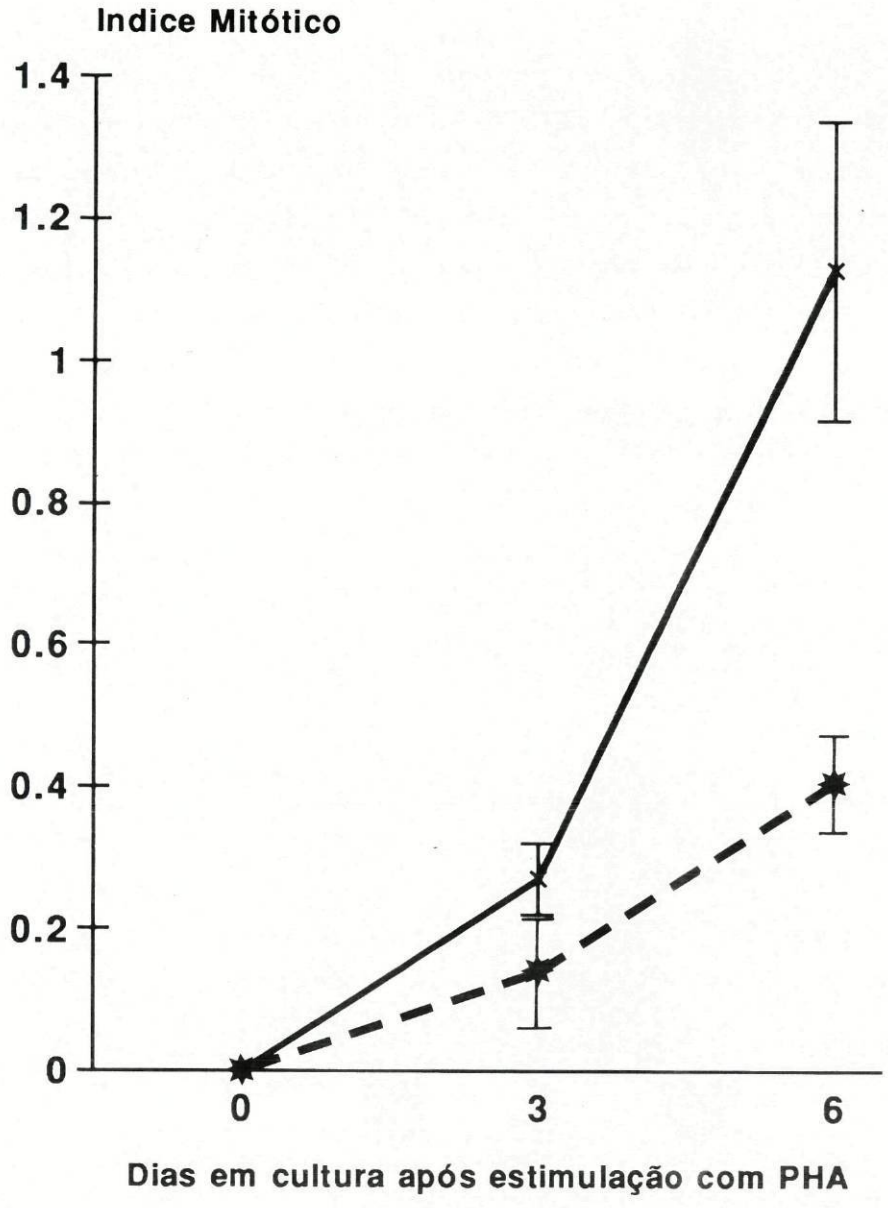


Figura 5. Comparação entre o índice mitótico de culturas de sangue total (____) e culturas de sangue com deplecção de glóbulos rubros (- - -) de um doente com hiperlinfocitose T8. Está indicada a média e erro padrão da média de três experimentos.

Efeito da presença de GR em culturas de células CD4+

Foi observado um efeito inibidor dos GR na proliferação de células CD4+ em culturas de linfócitos do sangue periférico de dois doentes com HLT4 (Figura 6).

As culturas de sangue com deplecção de GR mostraram, em ambos os casos, um índice mitótico significativamente superior (p=0.000) ao das culturas de sangue total.

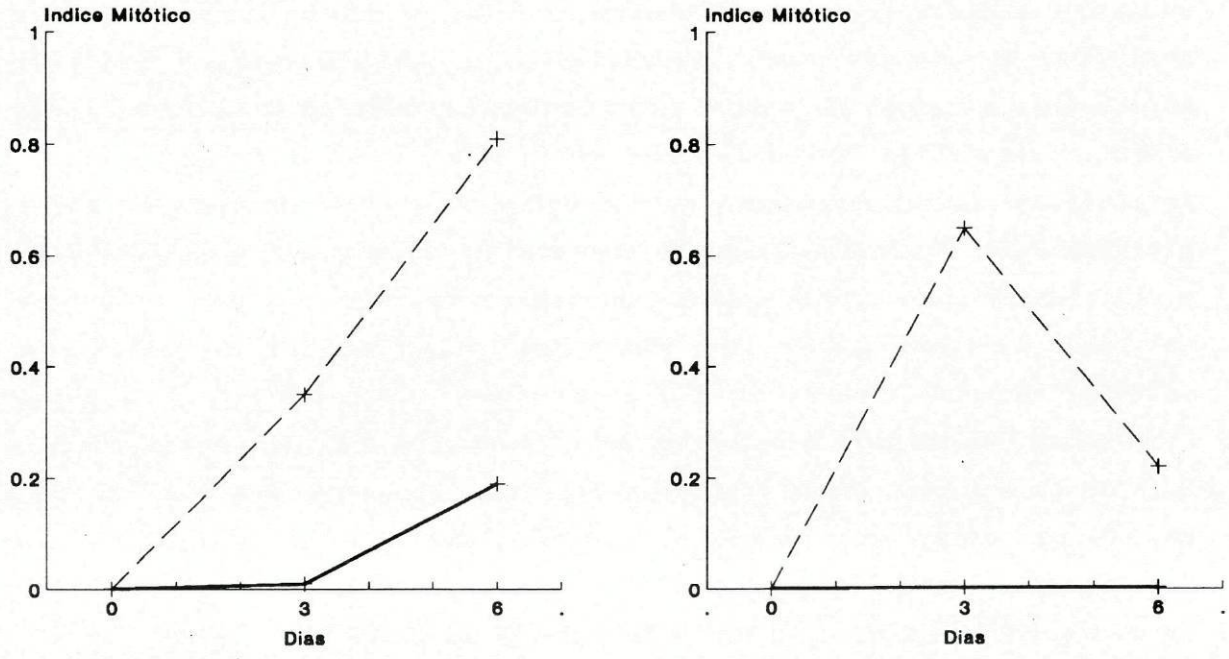


Figura 6. Comparação entre o índice mitótico de células em culturas de sangue total (____) e sangue depletado de glóbulos rubros (- - -) em dois casos de Hiperlinfocitose T4.

Discussão

As culturas de sangue total estimuladas com PHA são as que mais correntemente se usam em estudos citogenéticos, para análise cromossómica. Com este método é necessário um inóculo mínimo para obter uma proliferação eficiente de linfócitos. Quando existem GR em excesso estes parecem ser prejudiciais à cultura, possivelmente pelo seu papel na metabolização de nutrientes vitais no meio (Zackai e Mellman, 1974). Este problema pode então ser resolvido usando um grande volume de meio com um volume de sangue relativamente pequeno (por isso o termo "microcultura"). As preparações celulares que se obtêm a partir de "macroculturas" de sangue com deplecção de GR são normalmente de melhor qualidade, o que pode estar relacinado com a ausência de GR e plaquetas no meio . A desvantagem deste método consiste no grande volume de sangue necessário para obter uma população adequada de células em divisão. Na verdade são necessários muito menos linfócitos para produzir actividade mitótica quando são introduzidos na cultura sob a forma de sangue total. Esta diferença do tamanho do inóculo entre os dois métodos sugere que a presença de GR pode induzir um efeito potenciador na resposta proliferativa dos linfócitos à PHA. De facto, uma influência dos GR autólogos na estimulação dos linfócitos pela PHA foi descrita pela primeira vez por Castairs (1962). Este referiu que a presença de algumas células rubras parece benefeciar as culturas de células mononucleares. Esta ideia foi mais tarde confirmada por vários autores que demonstraram um efeito potenciador de GR autólogos, homólogos ou heterólogos na proliferação linfocitária (Tarnvick, 1970; Johnson *et al.*, 1972; Holter *et al.*, 1986; Huet *et al.*, 1986; Makgoba *et al.*, 1987).

Neste trabalho confirmou-se que a presença de GR autólogos em culturas de sangue periférico de indivíduos normais tem um efeito potenciador consistente na resposta proliferativa dos linfócitos à PHA. Esta observação levantou a seguinte questão: estarão os GR a estimular indistintamente qualquer subpopulação de linfócitos T ou será este efeito mediado por um tipo particular de células? Embora tanto Rugeles e colaboradores (1987) como Virella e colaboradores (1988) tivessem

sugerido que este efeito potenciador era mediado pelas células T com função "helper" (supostamente com fenótipo CD4+), esses estudos não foram acompanhados da caracterização fenotípica. Neste trabalho foi posto em evidência o efeito potenciador dos GR numa população de linfócitos CD8+, pertencentes a um doente com HLT8. No entanto, outra questão se levantou em seguida: uma vez que este estudo foi feito a partir de uma população celular que praticamente não tem células com fenótipo CD4, será que numa população de células T normal, com ambas as subpopulações CD4+ e CD8+, o efeito dos GR pode ser atribuido a um tipo particular de células? O estudo da proporção relativa de linfócitos CD4+ e CD8+ numa população de células em divisão pertencentes a indivíduos normais demonstrou que são realmente as células CD8+ que proliferam preferencialmente na presença de GR.

Em culturas de células CD4+, pertencentes a dois doentes com HLT4, tornou-se evidente a inibição da proliferação celular na presença de GR. Embora ainda não seja possível explicar a causa deste fenómeno, estes resultados sugerem que os GR não só potenciam a proliferação das células CD8+ como também, por um mecanismo ainda não esclarecido, interferem na proliferação das células CD4+.

3.3. MANUTENÇÃO DE CÉLULAS CD8+ EM CULTURA PROLONGADA

O efeito potenciador dos GR na proliferação de células CD8+ foi testado numa cultura prolongada de sangue periférico do doente com HLT8 já referido, onde se usaram GR heterólogos em adição à PHA para estimular a proliferação celular.

Trabalho experimental

Células de sangue periférico do doente com HLT8 foram mantidas em cultura prolongada. Foram feitas inicialmente culturas com sangue total e com sangue com deplecção de GR, segundo os métodos já descritos

(página 61). O meio de cultura foi substituido semanalmente por meio fresco suplementado com PHA à mesma concentração da cultura inicial (5µg/ml). Numa cultura de sangue total a substituição do meio não foi acompanhada de estimulação com PHA. Na 3ª, 6ª e 8ª semanas foram adicionados às cultura iniciais de sangue total GR heterólogos, obtidos a partir de sangue periférico de indivíduos normais do sexo oposto, a uma concentração de 100GR/1CMN. Cada vez que foram adicionados GR, os que se encontravam previamente na cultura foram removidos por lise com NH_4Cl a 0.165M. O fenótipo das células foi determinado regularmente por imunocitoquímica (método APPAP, Reimão *et al.*, 1991).

O índice mitótico foi determinado segundo a técnica já descrita na página 62.

Foi ainda feita uma tentativa de manter células do sangue periférico de 3 indivíduos normais em cultura prolongada, utilizando a mesma metodologia descrita para o doente com HLT8.

Resultados

As células CD8+ do sangue periférico do doente com HLT8 foram mantidas em cultura prolongada durante 9 semanas. A proliferação celular foi medida pelo índice mitótico (Figura 7).

Ao fim de duas semanas de incubação os linfócitos deste doente deixaram de proliferar, quer na cultura de sangue com deplecção de GR quer na de sangue total (Figura 7). No entanto, a viabilidade das células foi completamente diferente entre os dois tipos de cultura: enquanto que na de sangue com deplecção de GR as células morreram ao fim de três semanas, na de sangue total elas sobreviviam, embora não se dividissem. Foram então adicionados GR heterólogos a esta cultura, que continuou a ser estimulada com PHA, e um novo pico de proliferação surgiu ao fim de uma semana, embora com um índice mitótico muito baixo. Quando as células deixaram novamente de proliferar (6ª semana) adicionaram-se novamente GR heterólogos, surgindo outro pico de proliferação ao fim de uma semana. GR heterólogos foram adicionados ainda mais uma vez (8ª semana) obtendo-se um novo pico de proliferação.

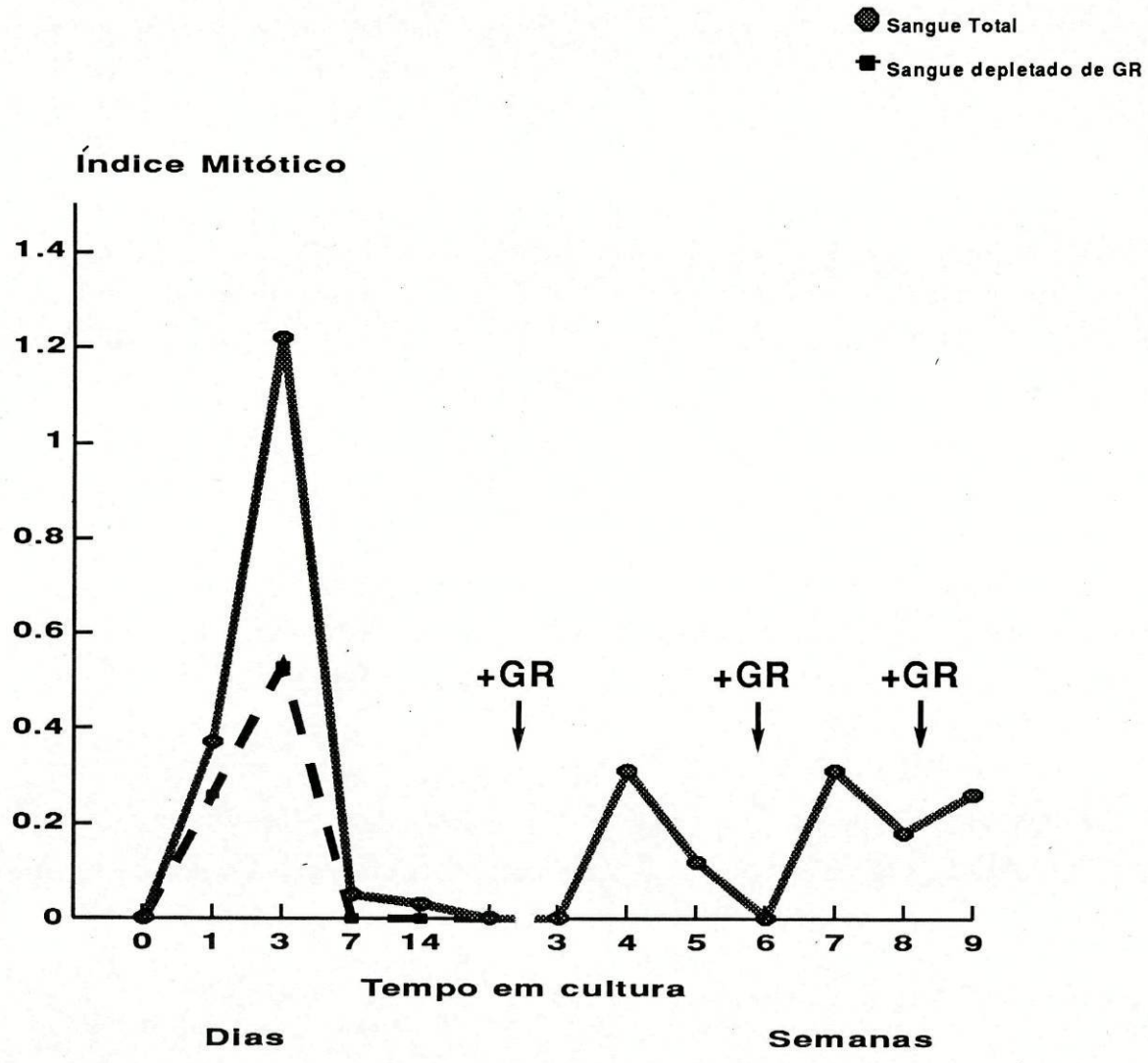


Figura 7. Efeito da adição de glóbulos rubros (+GR) na manutenção de células CD8+ em cultura prolongada estimulada com PHA. Estão indicados com setas os tempos aos quais foram adicionados GR. Está indicado o índice mitótico determinado semanalmente.

Com este sistema foi possível manter as células CD8+ durante 9 semanas em cultura, sem adição de factores de crescimento. Ao fim deste tempo a cultura foi bloqueada devido a problemas de contaminação.

Sempre que ocorreu um pico de mitoses bloquearam-se metafases para fazer o estudo cromossómico; este confirmou sempre a constituição cromossómica do doente (46,XX). Foi feita também uma fenotipagem regular das células durante todo o tempo de cultura, que revelou sempre uma marcação CD8+.

Numa cultura prolongada de sangue total em que se adicionaram GR heterólogos, mas sem estimulação com PHA, as células não entraram de novo em divisão.

Foi feita uma nova cultura prolongada de células do mesmo doente passados três meses do primeiro experimento. As células, sujeitas às mesmas condições de cultura e aos mesmos tipos de tratamento, mantiveram-se em cultura durante 7 semanas, ao fim das quais também foram bloqueadas devido a problemas de contaminação. Um terceiro experimento foi feito três meses depois e novamente as células mantiveram-se em cultura prolongada, durante 11 semanas.

Foi feita uma tentativa de manter células de sangue periférico de indivíduos normais em cultura prolongada. Em 3 experimentos independentes as células não se mantiveram em cultura além de 4 semanas.

Discussão

Normalmente é difícil manter culturas prolongadas de linfócitos do sangue periférico pelas técnicas correntes em citogenética; a actividade mitótica destas células estimuladas com PHA geralmente não ultrapassa os 14-20 dias (Zackai e Mellman, 1974). No caso de doenças linfoproliferativas crónicas a actividade mitótica é ainda muito inferior à das células normais e a resposta das células aos mitogéneos muito fraca (Heim e Mitelman, 1987); consequentemente, a obtenção de

culturas prolongadas sem adição de factores específicos de crescimento torna-se muito difícil. No entanto, o efeito potenciador dos GR em culturas de sangue periférico estimuladas com PHA permitiu que os linfócitos CD8+ de um doente com HLT8 se mantivessem em cultura prolongada durante 9 semanas, sem adição de factores de crescimento. Estes resultados sugerem que os GR não só potenciam a proliferação das células CD8+ como também permitem que estas células mantenham a sua capacidade de divisão, evidenciada quando estimuladas com PHA. Refira-se que numa cultura paralela em que foram adicionados GR mas sem estimulação com PHA, as células, embora viáveis, não se dividiram.

Foi feita uma tentativa de manter células CD8+ de indivíduos normais em cultura prolongada. Em três experimentos efectuados com sangue total, as células não se mantiveram em cultura além de 4 semanas. Possivelmente o facto das células CD8+, no caso da HLT8, corresponderem praticamente à totalidade da população linfocitária permita um comportamento proliferativo diferente do que se obtém numa população mista de células CD4+ e CD8+. Este facto sugere que estas subpopulações não actuam isoladamente, mas possivelmente terão um equilíbrio proliferativo que ainda não está completamente esclarecido. A corroborar esta hipótese está a inibição da proliferação de células CD4+ em culturas com GR, já referida anteriormente (página 69).

3.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado que os GR têm o efeito de potenciar a proliferação de células CD8+ em culturas de sangue periférico estimuladas com PHA. Foi ainda posta em evidência a inibição da proliferação de células CD4+ de dois doentes com HLT4 em culturas feitas com sangue total.

Estes resultados têm implicações práticas muito importantes, pois sugerem que existe uma modulação da população de células T em divisão, dependente de diferentes condições de cultura, ou seja, em culturas de

sangue total existe um crescimento preferencial das células CD8+. Este aspecto deve ser tomado em consideração quando pretendemos fazer estudos citogenéticos de doentes que tenham alterações da proporção relativa de células CD8+ e CD4+. No caso de doenças hematológicas malignas, a escolha de condições de cultura específicas para os estudos de hiperlinfocitoses e leucemias linfocíticas crónicas T torna-se fundamental, pois para estas patologias é normalmente muito difícil obter uma população suficiente de células em divisão para fazer um estudo cromossómico adequado. Estão também em curso estudos noutras doenças não malignas com alterações da razão CD4/CD8; estes poderão ajudar a clarificar alguns dos aspectos envolvidos na relação entre GR e células CD8+ e CD4+.

Neste trabalho foi também possível manter células CD8+ em cultura prolongada durante 9 semanas, sem adição de factores de crescimento. Este facto, é só por si importante, pois até hoje ainda não tinha sido possível manter células não malignas em cultura mais de 3-4 semanas. No entanto, ele pode ser representativo de um estado patológico, pois não foi possível manter uma população mista de células CD8+ e CD4+ de indivíduos normais em cultura prolongada. A fim de testar o efeito dos GR na manutenção de células CD8+ de indivíduos normais em cultura prolongada, serão feitos futuramente experimentos com populações isoladas de células CD8+.

BIBLIOGRAFIA

Araki DT, Sparkes RS (1963): Microtechnique for culturing leukocytes from hole blood. Cytogenetics (Basel) 2: 57-60.

Carstairs K (1962) : The human small lymphocyte : its possible pluripotential quality. Lancet I: 829-832.

Heim S, Mitelman F (1987): *Cancer Cytogenetics.* Alan R Liss Inc, New York, pp 176.

Holter W, Fischer GF, Majdic O, Stockinger H, Knapp W (1986): T cell stimulation via the erithrocyte receptor. Synergism between monoclonal antibodies and phorbol myristate acetate without changes of free cytoplasmic Ca++ levels. J Exp Med 163: 654-664.

Huet A, Wakasugi H, Sterkers G, Gilmour J, Tursz T, Boumsell L, Bernard A (1986): T cell activation via CD2 [T, gp 50]: the role of acessory cells in activating resting T cells via CD2. J Immunol 137: 1420-1428.

Hungerford DA (1965): Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. Stain Technol 40: 333-338.

Johnson RA, Smith TK, Kirkpatrick CH (1972) : Augmentation of phytohemagglutininmitogenic activity by erythrocyte membranes. Cell Immunol 3: 186-197.

Makgoba MW, Shaw S, Gugel EA, Sanders ME (1987) : Human T cell rosetting ismediated by LFA-3 on autologous erythrocytes. J Immunol 138: 3587-3589.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA (1960): Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp Cell Res 20: 613-616.

Reimão R, Porto G, De Sousa M (1991): Stability of CD4/CD8 ratios in man: newcorrelation between CD4/CD8 profiles and iron overload in idiopathic hemochromatosis patients. Comptes Rendus Acad Sci Paris 313 série III:481-487.

Rugeles MT, La Via M, Goust JM, Kilpatrick JM, Hyman B, Virella G (1987): Autologous red blood cells potentiate antibody synthesis by unfraccionated human mononuclear cell cultures. Scand J Immunol 26: 119-127.

Tarnvik A (1970): A role for red cells in phytohaemagglutinin-induced lymphocyte stimulation. Acta Pathol Microbiol Scand Section B 78: 733-740.

Virella G, Rugeles MT, Hyman B, La Via M, Goust JM, Frankis M, Bierer BE (1988): The interaction of CD2 with its LFA-3 ligand expressed by autologous erythrocytes results in enhancement of B cell responses. Cell Immunol 116: 308-319.

Zackai EH, Mellman WJ (1974): Human peripheral blood leukocyte cultures. Em: *Human Chromosome Methodology*. JJ Yunis (Ed), Academic Press, New York, pp 102; 113.

CAPÍTULO 4

ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS EM CULTURAS DE SANGUE PERIFÉRICO: EVIDÊNCIA DE SELECÇÃO CROMOSSÓMICA

4.1. INTRODUÇÃO

Em culturas de linfócitos do sangue periférico de indivíduos normais surgem esporadicamente células com um número de cromossomas diferente do número diploide. Estas aneuploidias não clonais podem ocorrer como consequência de erros mitóticos ou podem corresponder a artefactos técnicos. Existe evidência de que o aumento do número de cromossomas se dá ao acaso, enquanto que a perda de cromossomas está inversamente relacionada com o tamanho dos mesmos (Brown *et al.*, 1983; Wenger *et al.*, 1984). Por esta razão foi sugerido que as células hiperdiploides surgem por fenómenos de não-disjunção, enquanto que a hipodiploidia corresponde a artefactos técnicos. O tratamento hipotónico (que pode rebentar com a membrana celular, dispersando mais os cromossomas), uma fixação não muito forte (que pode deixar o citoplasma frágil) e a secagem ao ar (que submete as células a forças consideráveis), são factores que podem contribuir para a perda de cromossomas nas células metafásicas. Os

cromossomas mais pequenos, dadas as suas dimensões, serão mais susceptíveis à influência dos referidos factores (Brown *et al.*, 1983).

A semelhança entre o padrão de hipodiploidias não clonais em culturas de linfócitos e em culturas de outros tipos de células, nomeadamente fibroblastos e espermatozoides, levou a que alguns autores considerassem este fenómeno como um artefacto técnico, qualquer que seja a origem celular (Wenger, 1989; Martin e Rademaker, 1990).

Por outro lado, foi já demonstrada uma relação directa entre a idade e a frequência de aneuploidias (Jacobs *et al.*, 1961; Galloway e Buckton, 1978; Abruzzo *et al.*, 1985). Este facto sugere que estas, ou parte destas alterações, ocorrem como consequência de erros mitóticos, que podem reflectir um fenómeno associado à idade biológica das células.

As aneuploidias não clonais ocorrem em células normais com uma frequência baixa. De um modo geral, a perda de cromossomas é um fenómeno mais comum que o aumento do seu número. Estão referidas, para diversos tipos de células, frequências de hipodiploidia de 3.3%, 4.0%, 5.6%, 6.0% e 11.8% e frequências de hiperdiploidia respectivamente de 0.7%, 0.3%, 0.6%, 0.2% e 0.1% (Martin e Rademaker, 1990; Wenger *et al.*, 1984; Wenger, 1989; Stallard *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1983). Nunca foram descritas situações em que a frequência de hipodiploidia fosse elevada, para as quais seria menos provável que a causa fosse um artefacto técnico. Dada a dificuldade em manter linfócitos de indivíduos normais em cultura prolongada, também nunca foi investigado se não existirá uma selecção nos cromossomas envolvidos nas hipodiploidias ao longo do tempo de cultura. Se esta existir de facto, poder-se-á eliminar, pelo menos em parte, a hipótese de que estas alterações não clonais correspondem a artefactos técnicos.

No decorrer de um estudo citogenético de um doente com hiperlinfocitose T8 (HLT8), foi possível manter os linfócitos do sangue periférico em cultura prolongada durante 9 semanas (capítulo 3). Ao longo deste tempo detectou-se a presença de um elevado número de hipodiploidias não clonais. Em culturas de curta duração (48 horas) de linfócitos do sangue periférico de um doente com Anemia de Fanconi (AF) (capítulo 2), também se detectou um elevado número de hipodiploidias não clonais.

Com base nestes dois casos, foi feito um estudo detalhado das aneuploidias não clonais, com os seguintes objectivos:

- verificar, para frequências de hipodiploidia elevadas, se estas também estão relacionadas com o tamanho dos cromossomas.
- verificar se existe algum tipo de selectividade nos cromossomas envolvidos nas hipodiploidias ao longo do tempo de cultura.

4.2. SELECÇÃO CROMOSSÓMICA NAS ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS DE CÉLULAS CD8+ MANTIDAS EM CULTURA PROLONGADA

A manutenção da actividade mitótica de células CD8+ de um doente com HLT8 em cultura prolongada, durante 9 semanas, permitiu fazer um estudo cromossómico ao longo deste tempo. Neste trabalho foi determinada a frequência das hipodiploidias não clonais ao longo do tempo total de cultura, assim como a frequência com que cada cromossoma se encontra envolvido em hipodiplodia. Foi feito um estudo comparativo em indivíduos normais, para os quais foi possível manter as células em proliferação apenas durante 6 dias.

Trabalho experimental

Análise citogenética

Linfócitos do sangue periférico de um doente com HLT8 foram mantidos em cultura prolongada durante 9 semanas, de acordo com o método já descrito no capítulo 3. Para a análise cromossómica foi feito bloqueio das metafases com colchicina 4 vezes durante o tempo total de cultura (1ª, 4ª, 7ª e 9ª semanas).

Também foram feitas culturas de linfócitos do sangue periférico de três indivíduos normais, segundo o método já descrito no capítulo 3. Para cada indivíduo foram executados estudos cromossómicos ao fim de 3 e

6 dias, em culturas de sangue total e de sangue com deplecção de glóbulos rubros (GR).

Para evitar contagens de aneuploidias provocadas por artefactos técnicos, foram eliminadas da análise todas as metafases que apresentavam cromossomas demasiadamente espalhados, assim como aquelas que se encontravam demasiadamente próximas umas das outras.

Para determinação da frequência de aneuploidias foram consideradas todas as metafases analisáveis nas quais se identificava claramente o número de cromossomas. Para identificação dos cromossomas envolvidos foram utilizadas apenas as metafases nas quais foi possível identificar cada cromossoma, com bandas G.

Para o estudo da correlação entre a frequência de perdas e o tamanho dos cromossomas, este último parâmetro foi determinado do seguinte modo: o comprimento de cada cromossoma foi medido, em centímetros, a partir dos diagramas representados no Mapa do Genoma Humano (HGM 10.5); estas medidas foram convertidas em comprimentos relativos (comprimento de cada cromossoma / soma dos comprimentos de todos os cromossomas x 100).

Análise estatística

Para a análise comparativa de frequências utilizou-se o teste X^2. A correlação entre variáveis foi estudada por análise de regressão linear. Os dados foram analisados utilizando o programa Statgraphics (STSC).

Resultados

Frequência de aneuploidias não clonais

Um total de 307 metafases, obtidas ao longo da cultura prolongada de linfócitos do doente com HLT8, foram examinadas para pesquisa de aneuploidias não clonais.

Foram também examinadas 200 metafases, obtidas a partir de culturas de linfócitos de um indivíduo normal, para pesquisa de aneuploidias não clonais.

Para as células do doente com HLT8 e para as células do controlo, foi observada uma frequência de hiperdiploidias respectivamente de 2.9% e de 3.5%. Dada a baixa incidência deste tipo de aneuploidia, neste trabalho foram estudadas apenas as hipodiploidias não clonais.

A frequência de hipodiploidias não clonais nos linfócitos do doente com HLT8 ao longo do tempo de cultura variou entre 39.0% e 19.4%. O maior número de perdas foi observado na primeira semana de cultura, enquanto que a frequência mais baixa foi observada ao fim de 9 semanas (Figura 8).

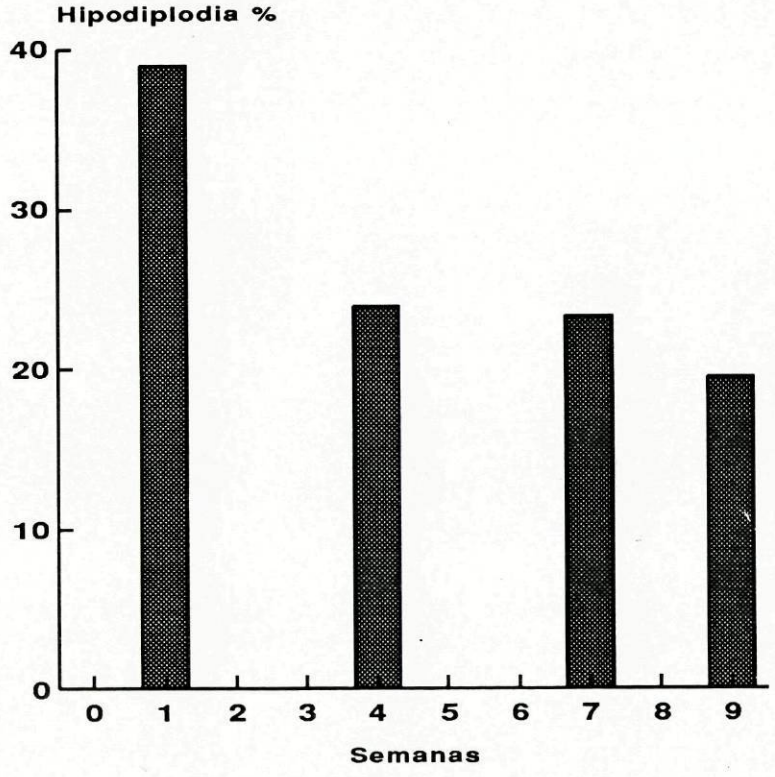


Figura 8. Frequência de hipodiploidias não clonais em linfócitos do sangue periférico de um doente com hiperlinficitose T8, mantidos em cultura ao longo de 9 semanas. Está indicada a frequência observada ao fim de 1, 4, 7 e 9 semanas.

Nas culturas de linfócitos do sangue periférico de 3 indivíduos normais, a frequência média de hipodiploidias ao 3º dia foi de 8.5% e ao 6º dia de 51.8% (Figura 9). Não se encontrou uma diferença significativa entre as frequências em culturas com e sem GR.

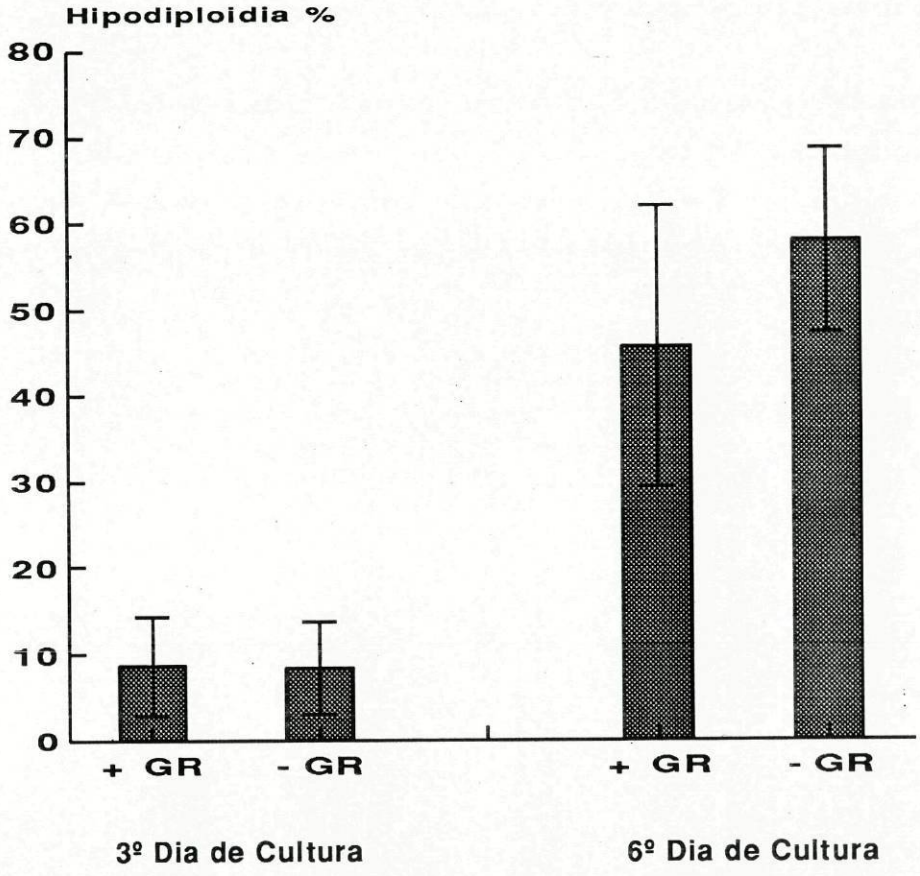


Figura 9. Frequência de hipodiploidias não clonais em linfócitos de indivíduos normais, obtidos a partir de culturas, de 3 e 6 dias, de sangue total (+GR) e sangue com deplecção de GR (-GR),. Está indicada a média e o erro padrão da média em 3 experimentos.

Correlação entre o número de perdas e o tamanho dos cromossomas

Foi feita uma análise cuidada dos cromossomas perdidos nas células hipodiploides observadas ao longo da cultura prolongada de linfócitos do

doente com HLT8. Um total de 386 cromossomas foram perdidos em 50 metafases completamente analisadas com bandas G. A mesma análise foi feita para as hipodiploidias observadas em duas culturas simultâneas de 6 dias de linfócitos de um indivíduo normal. Um total de 301 cromossomas foram perdidos em 61 metafases hipodiploides analisadas com bandas G.

Após determinação da frequência relativa de perdas para cada cromossoma individualmente, foi estudada a correlação entre essa frequência e o tamanho dos cromossomas.

Os resultados mostram que existe uma correlação entre estes parâmetros, ou seja, o número de perdas está inversamente relacionado com o tamanho dos cromossomas. Este fenómeno verifica-se quer para os cromossomas do doente com HLT8 (Figura 10), quer para os do controlo (Figura 11).

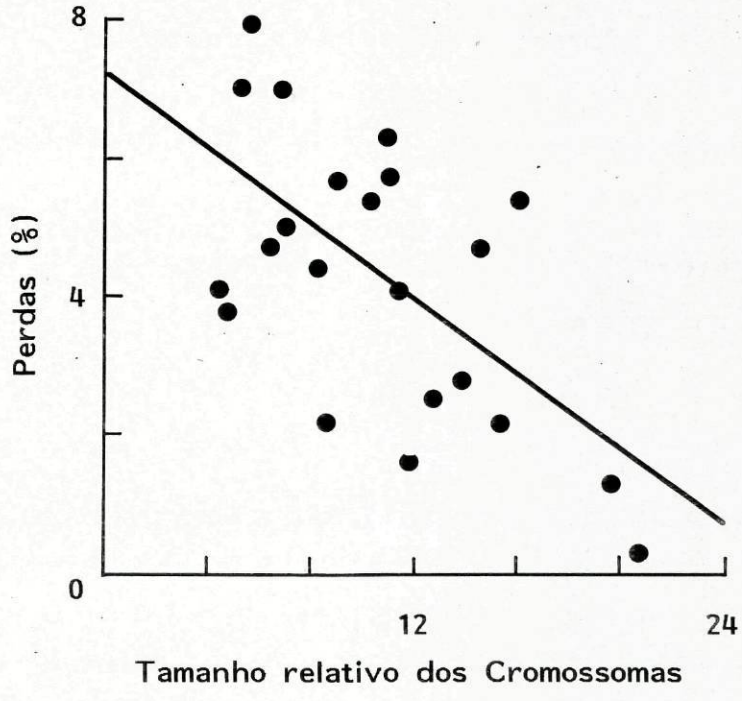


Figura 10. Relação entre a frequência relativa de perdas para cada cromossoma e o tamanho dos cromossomas, numa cultura prolongada de linfócitos de um doente com hiperlinfocitose T8. O tamanho dos cromossomas está inversamente correlacionado com o nº de perdas.

p = 0,002 r = -0,613711 R2 = 37,66%

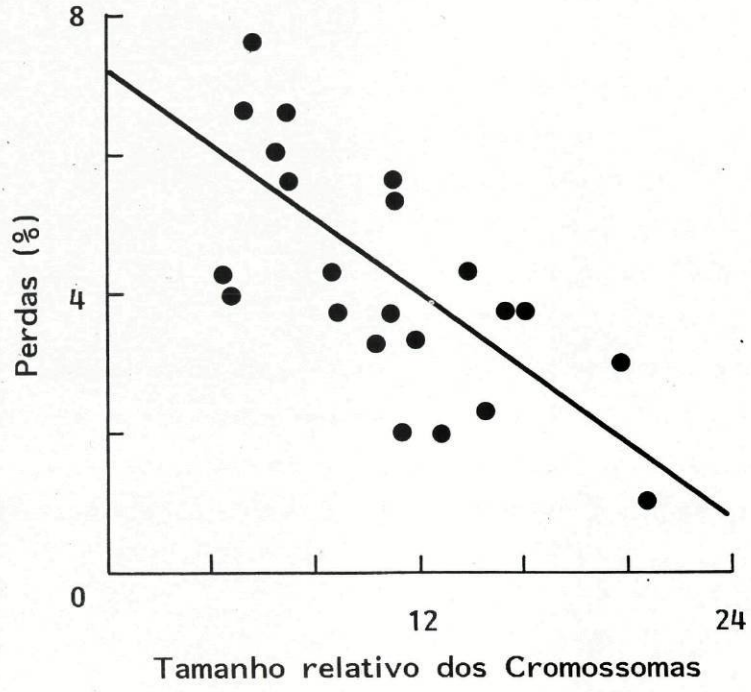


Figura 11. Relação entre a frequência relativa de perdas para cada cromossoma e o tamanho dos cromossomas, em culturas de linfócitos de um indivíduo normal. O tamanho dos cromossomas está inversamente correlacionado com o nº de perdas.

p = 0,001 r = -666073 R2 = 44,37%

No entanto, tendo em conta o valor de R2, apenas 37.7% da variação das perdas no doente com HLT8 e 44.4% da variação no controlo podem ser justificadas pelo tamanho (respectivamente Figuras 10 e 11). Para a restante percentagem, outros factores, além do tamanho, devem estar envolvidos.

Cromossomas preferencialmente envolvidos nas hipodiploidias

No Quadro 11 está representado o nº de perdas observado e esperado para cada cromossoma , na cultura prolongada de linfócitos do sangue

periférico do doente com HLT8. Assumindo que a perda de cromossomas se dá ao acaso, os cromossomas 1, 2, 4, X, 7 e 14 perderam-se significativamente menos do que o esperado; os cromossomas 11, 17, 19 e 20 perderam-se significativamente mais do que o esperado.

Quadro 11. Número de perdas para cromossomas individuais, em 50 metafases obtidas ao longo de uma cultura prolongada de linfócitos de um doente com hiperlinfocitose T8.

nº do cromossoma	observado	esperado*
1 *	3	16.8
2 *	9	
3	19	
4 *	9	
5	18	
6	12	
7 *	11	
8	14	
9	21	
10	20	
11 **	27	
12	18	
13	21	
14 *	9	
15	22	
16	19	
17 **	24	
18	18	
19 **	29	
20 **	25	
21	17	
22	15	
X *	9	

* esperado = nº total de perdas (386) / 23

* $p < 0,05$; menor número de perdas que o esperado
** $p < 0,05$; maior número de perdas que o esperado

No Quadro 12 está representado o nº de perdas observado e esperado para cada cromossoma individual, nas culturas de 6 dias de linfócitos do sangue periférico de um indivíduo normal. Assumindo que a perda de cromossomas se dá ao acaso, os cromossomas 1, 7 e 8 perderam-se significativamente menos do que o esperado; os cromossomas 15, 17, 19 e 20 perderam-se significativamente mais do que o esperado.

Quadro 12. Número de perdas para cromossomas individuais, em 61 metafases obtidas a partir de culturas de 6 dias de linfócitos de um indivíduo normal.

nº do cromossoma	observado	esperado*
1 *	3	13.1
2	9	
3	11	
4	11	
5	7	
6	13	
7 *	6	
8 *	6	
9	11	
10	16	
11	17	
12	10	
13	11	
14	13	
15 **	24	
16	17	
17 **	20	
18	18	
19 **	23	
20 **	20	
21	13	
22	12	
X	10	

* esperado = nº total de perdas (301) / 23

* $p < 0,05$; menor número de perdas que o esperado
** $p < 0,05$; maior número de perdas que o esperado

Discussão

A perda esporádica de cromossomas nos linfócitos em culturas de indivíduos normais, surge com uma frequência relativamente baixa, sendo considerada por diversos autores como um artefacto técnico (Stallard *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1983; Wenger *et al.*, 1984).

Numa cultura prolongada de células CD8+ pertencentes a um doente com HLT8 encontrou-se, ao longo do tempo de cultura, uma frequência de hipodiploidia que variou entre 39 e 19% (Figura 8). Em culturas de 72 horas de linfócitos de indivíduos normais encontrou-se uma frequência média de hipodiploidia de 8.5%. Com o prolongamento da cultura até ao 6º dia ela aumentou significativamente (p=0) para 51.8% (Figura 9). A elevada frequência com que surgem estas aneuploidias não clonais em cultura prolongada, assim como a sua variação ao longo do tempo, sugerem que elas não podem ser explicadas simplesmente por artefactos técnicos.

As células normais ao 6º dia de cultura apresentam uma actividade mitótica muito baixa; são células que estão condenadas a morrer, pois na 2ª semana de cultura já não se encontram em divisão (capítulo 3).

O aumento significativo da frequência de aneuploidias não clonais ao 6º dia de cultura pode, pois, ser a consequência de erros mitóticos relacionados com o processo de declínio das células em cultura.

Ao longo do tempo da cultura prolongada de células CD8+, as metafases foram sempre obtidas em períodos que correspondiam a um pico na proliferação (Figura 7); estas células estavam, assim, em plena actividade mitótica. Neste caso, encontrou-se uma situação inversa à anterior, ou seja, ao longo do tempo a frequência de aneuploidias não clonais vai diminuindo. Este facto sugere que, neste caso, pode existir uma selecção positiva para as células normais relativamente às hipodiploides, que surgem como consequência de erros mitóticos. No entanto, a frequência ainda elevada destas últimas células ao longo do tempo, sugere que existe provavelmente uma permanência em cultura de determinadas aneuploidias que não provocam desequilíbrio grave na actividade normal da célula em divisão.

A relação inversa entre o número de perdas e o tamanho dos cromossomas tem sido utilizada como um dos argumentos a favor da hipótese de que as

hipodiploidias são artefactos técnicos. Os cromossomas mais pequenos podem separar-se mais facilmente da célula, por efeitos técnicos (Brown *et al.*, 1983).

Neste trabalho também foi encontrada uma relação inversa entre o número de perdas e o tamanho dos cromossomas, quer nas células do doente com HLT8 quer nas de um controlo (Figuras 10 e 11). No entanto, apenas 37.7% da variação das perdas no doente com HLT8 e 44.4% da variação no controlo são justificadas pelo tamanho. Por isso, outros factores, além do tamanho, devem estar envolvidos. Uma hipótese a considerar será a possibilidade de estas aneuploidias não clonais, ou pelo menos grande parte delas, serem consequência de erros mitóticos. A selecção pode intervir sobre elas, favorecendo a sobrevivência preferencial de aneuploidias que tenham perda de um menor número de genes funcionalmente importantes para a célula em causa. Esta selecção positiva de certo modo também estará relacionada com o tamanho dos cromossomas.

Para comprovar esta hipótese, foi estudado o envolvimento de cada um dos cromossomas nas hipodiploidias, a fim de verificar se existe alguma selecção preferencial. Os resultados mostram que, para as células do doente com HLT8, os cromossomas não se perdem ao acaso, mas apresentam antes uma distribuição selectiva: os cromossomas 1, 2, 4, 7, 14 e X são preferencialmente mantidos enquanto que os cromossomas 11, 17, 19 e 20 se perdem significativamente mais do que o esperado. Para verificar se a manutenção dos cromossomas acima referidos está de algum modo relacionada com a actividade das células CD8+, examinou-se o mapa génico destes cromossomas (HGM, 11, 1991). Em todos eles estão localizados genes relacionados com a célula T (Quadro 13). O antigéneo CD8 está no cromossoma 2, os genes do receptor da célula T estão nos cromossomas 7 e 14. No cromossoma 1 está localizado o antigéneo CD2. Este pode ser importante para a proliferação das células CD8+ na presença de GR, se fôr provado que a activação se dá via CD2-LFA3. Para o X não é tão clara a relação. No entanto, foi já sugerido que, no caso das hipodiploidias clonais em doentes com leucemia linfoblástica aguda, a retenção de ambos os cromossomas sexuais parece ser importante para a proliferação celular (Pui *et al.*, 1990). Neste cromossoma existe um gene que actua na fase G1 do ciclo celular (Quadro 13), que pode eventualmente estar relacionado com este fenómeno.

Quadro 13. Selecção de alguns genes localizados em cromossomas preferencialmente mantidos na cultura prolongada de linfócitos CD8+ de um doente com hiperlinfocitose T8,

cromossoma 1	antigéneo CD2
cromossoma 2	antigéneo CD8
cromossoma 4	interleuquina 4
cromossoma 7	receptor da célula T, cadeia γ receptor da célula T, cadeia β
cromossoma 14	receptor da célula T, cadeia α receptor da célula T, cadeia δ
cromossoma X	ciclo celular, fase G1

(dados obtidos a partir do HGM 11)

Relativamente aos linfócitos do controlo, mantidos em cultura durante 6 dias, observou-se também uma distribuição não ao acaso: existe uma perda dos cromossomas 15, 17, 19 e 20 significativamente superior à esperada, assim como uma manutenção preferencial dos cromossomas 1, 7 e 8. No entanto, a manutenção preferencial destes cromossomas não implica que apenas estes sejam importantes para a actividade destas células. Sendo as hipodiploidias consequência de erros mitóticos que levam à perda de cromossomas ao acaso, o prolongamento da proliferação apenas por 6 dias não deve ser suficiente para permitir que se exerça uma selecção marcada nas células portadoras dessas alterações.

4.3. SELECÇÃO CROMOSSÓMICA NAS ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS DO SANGUE PERIFÉRICO DE UM DOENTE COM ANEMIA DE FANCONI

No decorrer de um estudo citogenético de um doente com AF, verificou-se que, em culturas de 48 horas, os linfócitos apresentavam um elevado número de aneuploidias não clonais. Neste trabalho foi determinada a frequência com que ocorrem as hipodiploidias não clonais, assim como a frequência com que cada cromossoma se encontra envolvido nessas aneuploidias. Foi feito um estudo comparativo entre os resultados obtidos a partir de uma cultura de sangue total e de uma cultura de sangue com deplecção de GR.

Trabalho experimental

Análise citogenética

Foram feitas culturas de 48 horas de linfócitos do sangue periférico de um doente com AF, segundo o método descrito no capítulo 2. As metafases foram obtidas às 48 horas, a partir de duas culturas simultâneas: uma de sangue total e outra de sangue com deplecção de GR.

Para evitar contagens de aneuploidias provocadas por artefactos técnicos, foram eliminadas da análise todas as metafases que apresentavam cromossomas demasiadamente espalhados, assim como aquelas que se encontravam demasiadamente próximas umas das outras.

Para a determinação da frequência de aneuploidias foram consideradas todas as metafases analisáveis nas quais se identificava claramente o número de cromossomas. Para identificação dos cromossomas envolvidos, foram utilizadas apenas as metafases nas quais foi possível identificar cada cromossoma, com bandas G.

Para o estudo da correlação entre a frequência de perdas e o tamanho dos cromossomas, este último parâmetro foi determinado do seguinte modo:

o comprimento de cada cromossoma foi medido, em centímetros, a partir dos diagramas representados no Mapa do Genoma Humano (HGM 10.5). Estas medidas foram extrapoladas para comprimentos relativos (comprimento de cada cromossoma / soma dos comprimentos da totalidade dos cromossomas).

Análise estatística

Para a análise comparativa de frequências utilizou-se o teste X^2. A correlação entre variáveis foi estudada por análise de regressão linear. Os dados foram analisados utilizando o programa Statgraphics (STSC).

Resultados

Frequência de aneuploidias não clonais

A frequência de hiperdiploidias encontrada nas culturas de sangue total e de sangue com deplecção de GR foi respectivamente de 0% e 2%. Dada a baixa incidência deste tipo de aneuploidia, para este trabalho foi estudada apenas a frequência de hipodiploidias não clonais.

Na cultura de sangue total encontrou-se uma quantidade muito pequena de células em mitose. Além disso, a qualidade destas era muito fraca. Por estas razões, para a análise cromossómica foram contadas apenas 28 metafases. Nesta população celular, a frequência de hipodiploidias não clonais foi de 53.6% .

Na cultura de sangue com deplecção de GR a quantidade e qualidade das metafases foi muito superior à da cultura de sangue total. Para a análise cromossómica foram então contadas 150 metafases. Nestas, a frequência de hipodiploidias não clonais foi de 21% .

Correlação entre o número de perdas e o tamanho dos cromossomas

Foi feita uma análise cuidada dos cromossomas perdidos nas células hipodiploides. Na cultura de sangue total, foram perdidos 108

cromossomas num total de 15 metafases completamente analisadas com bandas G. Na cultura de sangue com deplecção de GR, um total de 199 cromossomas foram perdidos em 31 metafases completamente analisadas com bandas G.

Após determinação da frequência relativa de perdas para cada cromossoma, foi estudada a correlação entre essa frequência e o tamanho dos cromossomas.

Os resultados mostram que não existe relação entre estes parâmetros, ou seja, existe uma distribuição de perdas ao acaso, quer na cultura de sangue total (Figura 12) quer na cultura de sangue com deplecção de GR (Figura 13).

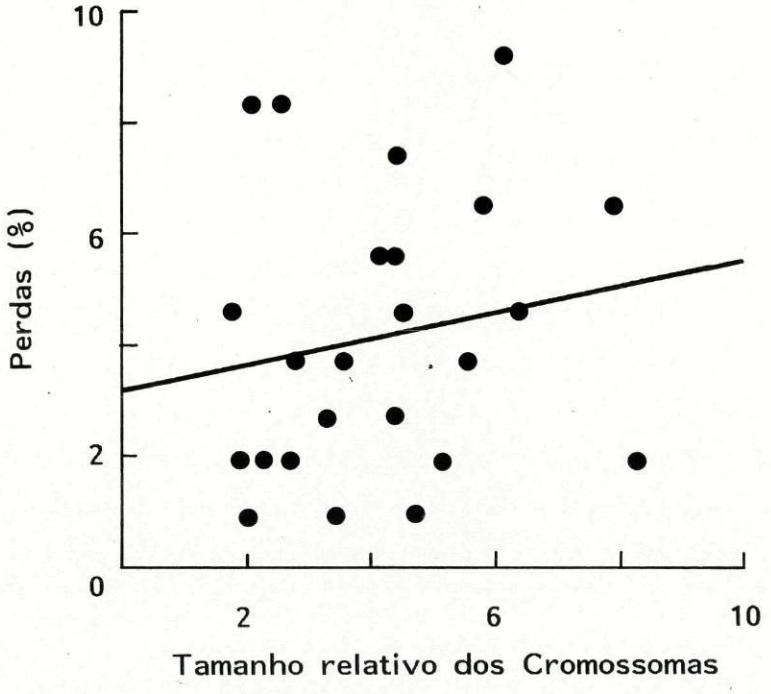


Figura 12. Relação entre a frequência de perdas para cada cromossoma e o tamanho dos cromossomas, numa cultura de sangue total de um doente com Anemia de Fanconi. Não existe correlação entre estes dois parâmetros.

p = 0,424 r = 0,171051 R2 = 2,93%

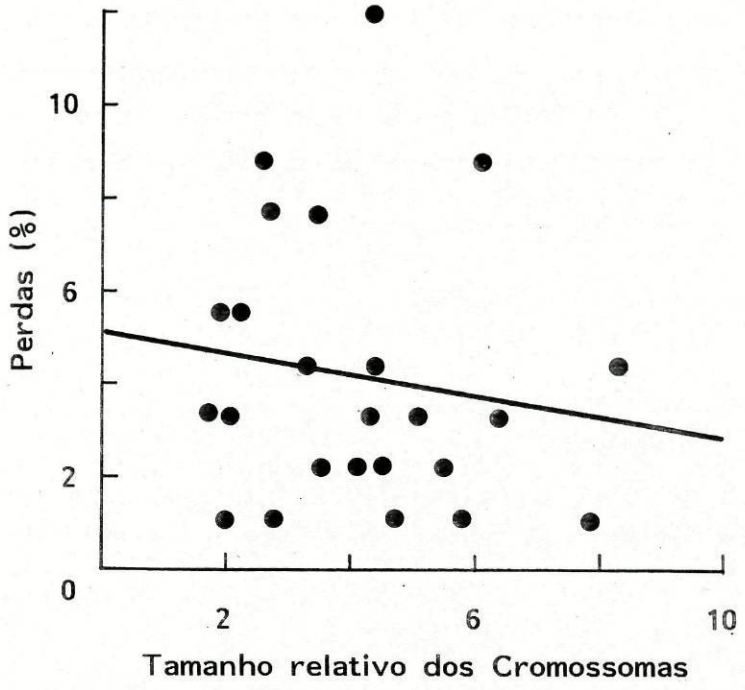


Figura 13. Relação entre a frequência de perdas para cada cromossoma e o tamanho dos cromossomas, numa cultura de sangue com deplecção de GR de um doente com Anemia de Fanconi. Não existe correlação entre estes dois parâmetros.

p = 0,506 r = -0,142711 R2 = 2,04

Foi também investigado se existe alguma relação, no que se refere à distribuição das perdas pelos diferentes cromossomas, entre as culturas de sangue total e sangue com deplecção de GR.

Os resultados mostram que não existe correlação entre essa distribuição nos dois tipos de cultura (p = 0.380; r = 0.187465; R2 = 3.51%), ou seja, para diferentes condições (GR+ e GR-) o padrão de hipodiploidias é diferente.

Cromossomas preferencialmente envolvidos nas hipodiploidias

No Quadro 14 está representado o nº de perdas observado e esperado para cada cromossoma, na cultura de sangue total do doente com AF. Assumindo que a perda de cromossomas se dá ao acaso, os cromossomas 4, 18 e 20 perderam-se significativamente mais do que o esperado.

Quadro 14. Número de perdas para cada cromossoma, em 15 metafases obtidas a partir de uma cultura de sangue total de um doente com Anemia de Fanconi.

nº do cromossoma	observado	esperado*
1	2	4.7
2	7	
3	5	
4 *	10	
5	7	
6	4	
7	2	
8	5	
9	3	
10	8	
11	6	
12	6	
13	4	
14	1	
15	3	
16	4	
17	2	
18 *	9	
19	2	
20 *	9	
21	5	
22	2	
X,Y	4	

* esperado = nº total de perdas (108)/23

* $p < 0,05$; maior número de perdas que o esperado

No Quadro 15 está representado o número de perdas observado e esperado para cada cromossoma, na cultura de sangue com deplecção de GR do doente com AF. Assumindo que a perda de cromossomas se dá ao acaso, os cromossomas 2, 5 e 16 perderam-se significativamente menos do que o esperado; os cromossomas 4, 11 e 18 perderam-se significativamente mais do que o esperado.

Quadro 15. Número de perdas para cada cromossoma em 31 metafases obtidas a partir de uma cultura de sangue com deplecção de GR de um doente com Anemia de Fanconi.

nº do cromossoma	observado	esperado*
1	3	4.0
2 *	1	
3	3	
4 **	8	
5 *	1	
6	2	
7	3	
8	2	
9	3	
10	4	
11 **	11	
12	2	
13	2	
14	7	
15	4	
16 *	1	
17	7	
18 **	8	
19	5	
20	3	
21	3	
22	5	
X,Y	2	

* esperado = nº total de perdas (91) / 23

* $p < 0,05$; menor número de perdas que o esperado
** $p < 0,05$; maior número de perdas que o esperado

Uma vez que não há correlação entre o padrão de hipodiploidias nas culturas com e sem GR (p = 0.380; r = 0.187465), foi feita uma análise comparativa entre a frequência relativa de perdas para cada cromossoma nos dois tipos de cultura.

Os resultados mostram que existe uma diferença significativa na frequência de perdas dos cromossomas 2, 5, 10, 14 e 20 , entre as culturas com e sem GR (Figura 14).

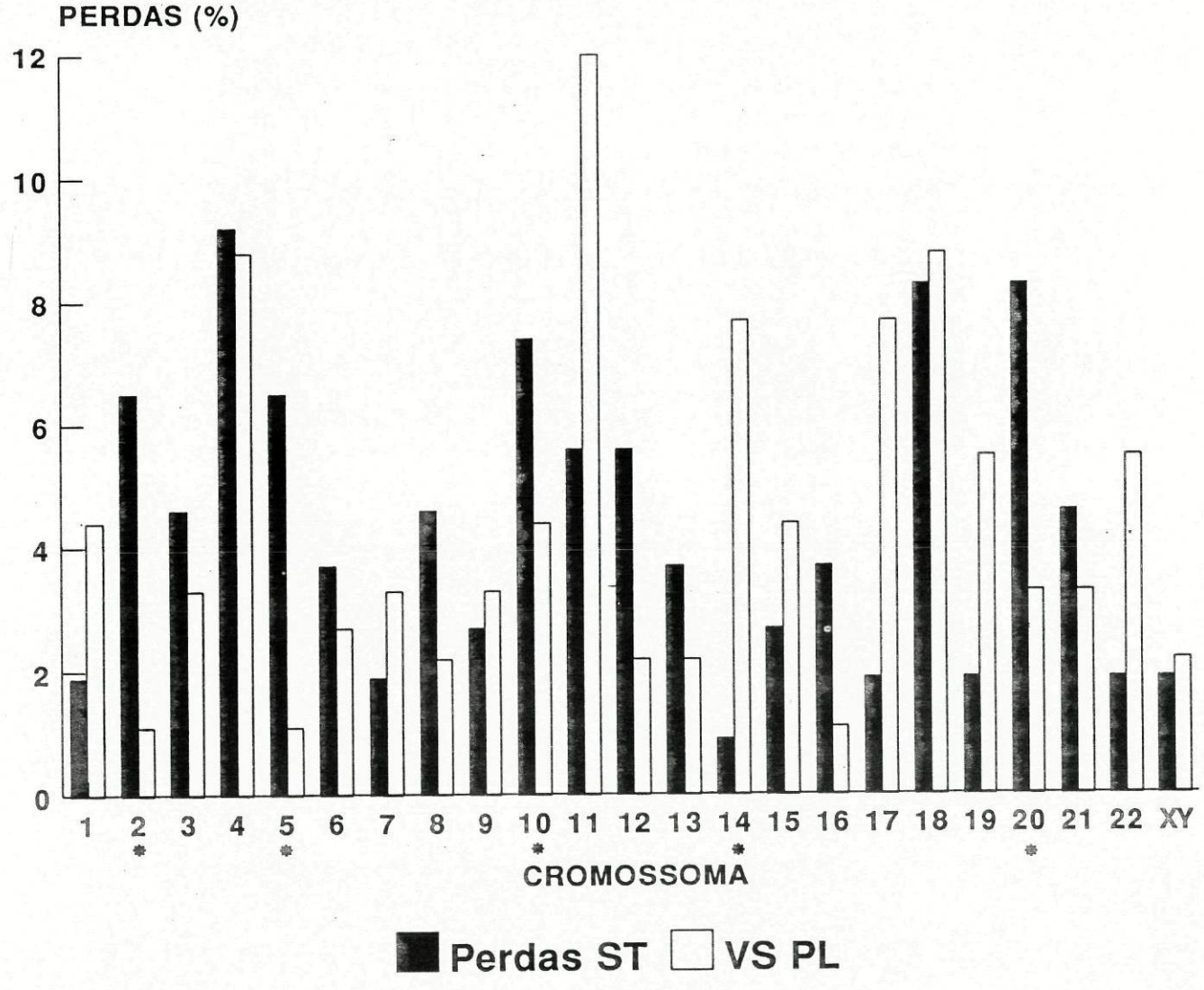


Figura 14. Análise comparativa entre a frequência de perdas cromossómicas individuais em culturas de sangue total e de sangue com deplecção de GR de um doente com Anemia de Fanconi.

* p < 0,05; diferença significativa entre os dois tipos de cultura

Discussão

Foi observada, em culturas de linfócitos do sangue periférico de um doente com AF, uma frequência elevada de hipodiploidias não clonais. Nestas, o número de perdas não está relacionado com o tamanho dos cromossomas (Figuras 12 e 13). Estes dados sugerem que as hipodiploidias não são artefactos .técnicos. Podem antes ser consequência de erros mitóticos que ocorrem *in vitro* ou mesmo *in vivo*, uma vez que estas alterações são observadas em culturas de curta duração. Sugere-se ainda que estes erros mitóticos possam estar de algum modo relacionados com a instabilidade cromossómica típica desta doença.

Num estudo comparativo da proliferação de linfócitos de doentes com AF em culturas de sangue total e de sangue com deplecção de GR, observou-se um melhor crescimento destas células na ausência de GR (capítulo 2). Neste trabalho verificou-se que a frequência de hipodiploidias não clonais é inferior (21%) nas culturas de melhor qualidade, ou seja, de sangue com deplecção de GR, que nas culturas de sangue total (54%). Perante este facto, poder-se-á pôr a hipótese de ocorrer, nas culturas sem GR, uma selecção positiva para as células cromossomicamente normais. Por outro lado, poder-se-á também pôr a hipótese de que, relativamente às aneuploidias que surgem ao acaso por erros mitóticos, a selecção pode intervir, permitindo que se mantenham em cultura apenas aquelas que conferem de algum modo uma vantagem para a célula em divisão. Para comprovar esta última hipótese, foi estudado o envolvimento de cada um dos cromossomas nas hipodiploidias dos dois tipos de cultura, com o objectivo de verificar se existe alguma selecção preferencial. Observou-se então que , para a cultura de sangue total, os cromossomas 4, 18 e 20 perdem-se significativamente mais do que o esperado (Quadro 14). Em culturas de sangue com deplecção de GR os cromossomas 2, 5 e 16 são preferencialmente mantidos; os cromossomas 4, 11 e 18 perdem-se significativamente mais do que o esperado (Quadro 15). Analisando a diferença entre o número de perdas para cada cromossomas nos dois tipos de cultura, verificou-se que para os cromossomas 2, 5, 10 e 20 existe uma manutenção significativamente maior nas culturas com deplecção de GR (Figura 14).

Para verificar se a manutenção dos cromossomas atrás referidos está de algum modo relacionada com a AF, foi examinado o mapa génico destes cromossomas (HGM, 11, 1991). Nos cromossomas 2, 10 e 16 estão localizados genes de reparação de DNA (respectivamente ERCC3, ERCC6 e ERCC4). Relativamente ao cromossoma 20, foi sugerido recentemente que este deve ser pelo menos um dos genes relacionados com a AF (Moustachi *et al.*, 1991). No cromossoma 5 não se localiza nenhum gene de reparação de DNA, pelo menos conhecido até hoje. Sugere-se, no entanto, que a presença dos genes ribossomais RPS17A, RPS20A e RPS20B seja importante para a actividade metabólica das células, uma vez que eles têm de estar activos para se dar a produção de RNA.

Em face destes resultados, sugere-se que, se existe de facto uma selecção para cromossomas directamente relacionados com a actividade das células, então os genes de reparação de DNA, incluidos nos cromossomas preferencialmente mantidos em cultura, podem estar activos e não com capacidade de reparação reduzida. A confirmação deste facto poderá apoiar a hipótese já sugerida por Joenje e colaboradores (1978, 1979) de que o defeito primário na AF está relacionado com a actividade diminuida da dismutase do superóxido nos GR, que pode intoxicar as células provocando um maior número de quebras cromossómicas, e não propriamente com uma capacidade reduzida de reparação de DNA. Num futuro próximo serão feitos novos estudos num maior número de doentes, para verificar se este padrão de hipodiploidias não clonais é uma característica constante em todos eles. Serão também feitos estudos da actividade dos genes referidos como potencialmente envolvidos nesta patologia.

4.4. CONCLUSÕES

O aparecimento de hipodiploidias não clonais em culturas do sangue periférico de indivíduos normais tem sido considerado como um artefacto técnico relacionado com o tamanho dos cromossomas, ou seja, quanto menor fôr o comprimento do cromossoma mais facilmente ele se perde por deficiências técnicas. A frequência com que surgem estas aneuploidias é

normalmente baixa. Se as perdas cromossómicas surgissem com uma elevada frequência, elas não poderiam ser explicadas apenas por artefactos técnicos. Dada a dificuldade em manter linfócitos do sangue periférico de indivíduos normais em cultura prolongada, também nunca foi estudada a frequência dessas hipodiploidias ao longo do tempo de cultura.

Neste trabalho foram estudadas duas patologias que apresentaram uma frequência elevada de hipodiploidias não clonais: um doente com HLT8 e um doente com AF. Além disso, foi possível manter os linfócitos do doente com hiperlinfocitose T8 em cultura prolongada durante 9 semanas, o que permitiu estudar o comportamento das células hipodiploides ao longo do tempo.

Os resultados obtidos sugerem, que nestes casos, as perdas cromossómicas, ou pelo menos parte delas, não são artefactos técnicos. Elas podem ser antes consequência de erros mitóticos que surgem *in vitro*, ou mesmo *in vivo*, e sobre os quais a selecção pode intervir, favorecendo a manutenção em cultura de células que não provocam desequilíbrio grave na actividade normal dessa população celular.

A importância destes resultados tornou-se evidente no caso do doente com AF, para o qual foi possível observar uma variação do padrão de hipodiploidias não clonais dependente das condições de cultura. A ser confirmado em mais casos, este facto sugere que, através do estudo detalhado das aneuploidias não clonais, é possível estudar a importância relativa de cada cromossoma perante diferentes situações *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

Abruzzo MA, Mayer M, Jacobs PA (1985): Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. Cytogenet Cell Genet 39: 275-278.

Brown T, Fox DP, Robertson FW, Bullock I (1983): Non-random chromosome loss in PHA-stimulated lymphocytes from normal individuals. Mutation Research 122: 403-406.

Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping (1991). Cytogenet Cell Genet 58, 1-2.

Galloway SM, Buckton KE (1978): Aneuploidy and aging: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. Cytogenet Cell Genet 20: 78-95.

Jacobs PA, Brown WM, Doll R (1961): Distribution of human chromosome counts in relation to age. Nature 191: 1178-1180.

Joenge H, Eriksson AW, Frants RR (1978):Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's anaemia. Lancet 1: 204.

Joenge H, Frants RR, Arwort F (1979): Erythrocyte superoxide dismutase deficiency in Fanconi's anaemia established by two independent methods of assay. Scand J Clin Lab Invest 39: 759-764.

Martin RH, Rademaker A (1990) : The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. Cytogenet Cell Genet 53: 103-107.

Moustachi E, Diatloff-Zito C, Duchaud E, Papadopoulo D, Guillouf C, Gorius A, Rosselli F (1991): Genetic defect in Fanconi Anemia and its correction *in vitro*. Am J Hum Genet Supp 4: 61 (abstract)

Pui C-H, Carroll AJ, Raimondi SC, Land VJ, Crist WM, Shuster JJ, Williams DL, Pullen DJ, Borowitz MJ, Behm FG, Look AT (1990): Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid <45 line. Blood 5: 1170-1177.

Stallard R, Haney NR, Frank PA, Styron P, Juberg RC (1981) : Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring: preliminary observations. Cytogenet Cell Genet 30: 50-53.

Wenger SL (1989): Nonmodal chromosome gain and loss in human fibroblast cultures. Cytogenet Cell Genet 52: 201.

Wenger SL, Golden WL, Dennis SP, Steele MW (1984) : Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? Am J Med Genet 19: 715-719.

CAPÍTULO 5

ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM DOENÇAS HEMATOLÓGICAS MALIGNAS

5.1. INTRODUÇÃO

Hoje em dia é universalmente aceite que se podem obter informações fundamentais no campo das doenças hematológicas malignas quando se realizam, de forma coordenada em cada doente, estudos morfológicos, imunológicos e citogenéticos (MIC cooperative study group, 1986; 1988).

Na área da citogenética, os avanços mais significativos surgiram com o desenvolvimento das técnicas de marcação cromossómica pelas bandas (Casperson *et al.*, 1970), que permitiram a identificação individual inequívoca dos cromossomas. Estes avanços levaram ao reconhecimento de alterações cariotípicas características de tipos específicos de neoplasias (Rowley, 1982; Yunis, 1983; Yunis, 1987; Heim e Mitelman, 1987). A identificação destas alterações permite um diagnóstico mais exacto e uma melhor subclassificação das diversas patologias.

Também têm sido identificadas em diversas neoplasias alterações que não são consistentes e específicas, mas que podem representar uma evolução clonal durante a progressão do tumor (Mitelman, 1990). Estas constituem assim um dado importante no prognóstico da doença.

Um outro tipo de alterações que têm sido observadas com uma elevada frequência nas células malignas são as aneuploidias não clonais. Estas, que constituem o chamado "ruido citogenético", estão distribuidas pelo genoma de uma forma ao acaso, e são consideradas como aberrações não consequentes (Mitelman, 1990). No entanto, a informação que existe sobre estas aneuploidias é ainda muito escassa. Como surgem de uma forma não clonal não constituem, segundo as regras convencionais de análise cromossómica (ISCN, 1978; Knutsen *et al.*, 1990), informação obrigatória nos resultados do estudo citogenético. Assim, o seu eventual significado não tem sido valorizado.

Em Junho de 1988 iniciou-se, no laboratório de citogenética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), um estudo citogenético sistemático em indivíduos diagnosticados com doenças hematológicas malignas, tendo em vista os seguintes objectivos:

- identificação de alterações cromossómicas clonais associadas aos diferentes tipos de patologias, salientando o seu papel como factores de diagnóstico e prognóstico, e a sua importância na progressão tumoral.
- identificação de aneuploidias não clonais e análise da sua frequência, para eventual esclarecimento do significado biológico destas alterações, consideradas até hoje como não consequentes.

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos durante o período de 13 de Junho de 1988 a 21 de Janeiro de 1992.

5.2. ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS CLONAIS - SUA IMPORTÂNCIA COMO FACTORES DE DIAGNÓSTICO

O estudo sistemático das aberrações cromossómicas clonais, em culturas espontâneas de medula óssea ou sangue periférico de indivíduos com doenças hematológicas malignas, tem permitido demonstrar que determinadas alterações, que surgem de forma consistente em tipos específicos de patologia, são parte integrante do seu processo de

transformação celular. A sua detecção torna-se útil, não só como factor de diagnóstico, mas também na avaliação do prognóstico das diferentes patologias.

O presente trabalho, uma vez que reune resultados de um período relativamente curto (aproximadamente 3 anos), não é suficiente para a avaliação do prognóstico destes doentes. Assim, ele consiste essencialmente na revisão dos resultados obtidos na fase de diagnóstico.

Trabalho experimental

Doentes

Durante o período de 13 de Junho de 1988 a 21 de Janeiro de 1992 foi feito no ICBAS um estudo cromossómico em 185 indivíduos com doenças hematológicas malignas e pré-malignas. Estes foram-nos enviados, pelos Serviços de Hematologia, Medicina e Pediatria Oncológica do Hospital Geral de Stº António, com os diagnósticos propostos de: leucemia mieloide crónica (LMC) (42 casos); síndrome mieloproliferativo não LMC (SMP) (33 casos); leucemia não linfoblástica aguda (LNLA) (43 casos); síndrome mielodisplásico (SMD) (17 casos); síndrome linfoproliferativo (SLP) (14 casos); leucemia linfoblástica aguda (LLA) (36 casos). Estes diagnósticos basearam-se em estudos imunológicos e nos critérios FAB (Bennet *et al.*, 1982; 1985).

Estudo Citogenético

Técnicas de cultura

Para cada doente foi feito um estudo cromossómico utilizando um dos seguintes tipos de amostra:

- células de medula óssea, colhidas para tubos estéreis contendo meio de cultura (2ml de RPMI) e heparina.
- células de sangue periférico, colhidas por punção venosa para tubos estéreis heparinizados.

As metafases foram obtidas a partir de culturas directas ou de curta duração (24 ou 48 horas). Para cada doente também foi feita uma cultura de 72 horas estimulada com fitohemaglutinina (PHA), para identificação do cariotipo constitucional.

As células foram cultivadas a uma concentração inicial de $0.5x10^6$/ml em 6ml de RPMI 1640 com L-glutamina (GIBCO) suplementado com 15% de soro fetal de vitela (GIBCO) e com antibióticos (100U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina). Para o estudo do cariotipo constitucional as células foram ainda estimuladas com PHA (M-form, GIBCO) a uma concentração de 5µg/ml. A incubação foi a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2. Todas estas manipulações foram feitas em câmara estéril de fluxo laminar vertical.

Nalguns casos foi feita sincronização celular com BrdU ou FdU (técnicas descritas no capítulo 3).

Bloqueio das mitoses

As metafases foram bloqueadas com 0.1ml de uma solução de colchicina (concentração de 4µg/ml) durante a última meia hora de cultura, à temperatura de 37°C. Nalguns casos o tratamento foi feito durante o tempo total de cultura (24 horas).

Tratamento hipotónico

Após o tratamento com colchicina o meio foi retirado por centrifugação a 1000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. Seguidamente as células foram sujeitas a um choque hipotónico por tratamento com 5ml de uma solução de KCl à concentração de 0.075M, durante 10 minutos, a 37°C.

Fixação e Lavagens

Retirada a solução hipotónica por centrifugação a 800 rpm durante 10 minutos, as células foram fixadas em 5ml de metanol acético 3:1, previamente refrigerado. Após meia hora de fixação a 4°C, foram

lavadas pelo menos duas vezes em fixador fresco (centrifugações a 1000 rpm durante 10 minutos).

Esfregaços

No final das lavagens foi feita uma suspensão das células em 0.5ml de fixador, aproximadamente. Este valor pode variar consoante a quantidade de células obtidas. Sobre lâminas de vidro, deixaram-se cair uma a duas gotas da suspensão. é fundamental que as lâminas estejam bem limpas e desengorduradas para haver uma perfeita dispersão da suspensão, e consequentemente dos cromossomas. Para isso, elas foram tratadas previamente com HCl a 2%, lavadas em água corrente e passadas por um banho de alcool a 70°. As preparações foram secas ao ar.

Técnica de bandas

Os cromossomas foram marcados com bandas G, utilizando uma modificação do método de Seabright (1971): as preparações, com pelo menos uma semana, foram mergulhadas numa solução de tripsina (0.25% em tampão fosfato) a 37°C durante 10-25 segundos, sendo logo em seguida lavadas em tampão fosfato. As células foram coradas com Giemsa (4% em tampão fosfato) e secas ao ar.

Microfotografia

As metafases foram fotografadas em filme Copex. As fotografias foram feitas em papel Ilford Multigrade 111 MGX.1M ou 5M, com uma ampliação de 2500 vezes. Para cada doente foram fotografadas e organizadas pelo menos duas metafases de cada clone previamente identificado ao microscópio, ou três no caso de cariotipos com perdas cromossómicas.

Análise cromossómica

Foram analisadas, sempre que possível, um mínimo de 20 metafases para cada doente. Nos casos em que se detectaram dois ou mais clones celulares, foram observadas pelo menos 30 metafases.

De acordo com as regras convencionais, nas patologias onde se detecta uma alteração que é consistente com o diagnóstico, um número mais reduzido de células pode ser suficiente para dar um resultado (Knutsen *et al.*, 1990). Assim, para alguns destes casos, foram completamente analisadas pelo menos 5 metafases, com bandas G.

A morfologia dos cromossomas nas células neoplásicas é de um modo geral de pior qualidade que nas células normais da mesma amostra. Por isso, a análise cromossómica foi sempre feita em células com vários graus de qualidade.

As alterações cromossómicas foram classificadas de acordo com a Nomenclatura Internacional (ISCN, 1978).

Um clone alterado foi definido sempre que se observavam:

- duas ou mais metafases com alterações estruturais idênticas ou cromossomas adicionais idênticos.
- três ou mais metafases com falta do mesmo ou mesmos cromossomas.

Resultados

Dos 185 exames citogenéticos efectuados foi possível obter mitoses para estudo cromossómico em 152 (82.2%). Foi para os doentes com LMC e LNLA que se obteve maior número de resultados positivos (respectivamente 39/42 e 40/43). A menor percentagem de resultados positivos corresponde aos estudos em doentes com SMD (10/17) e SMP (23/33).

Alterações cromossómicas em doentes com LMC (Quadro 16)

Foi feito o estudo cromossómico em 36 doentes com o diagnóstico de fase crónica da LMC . Em 32 casos encontrou-se a característica t(9;22), sendo em quatro deles acompanhada de outras alterações. Num dos quatro casos em que o cariotipo era normal foi feita a pesquisa do rearranjo *bcr-abl*, que foi positiva.

Em três doentes que se encontravam em fase blástica, foi constante a presença de anomalias adicionais à t(9;22).

Quadro 16. Resultados dos estudos cromossómicos em doentes com leucemia mieloide crónica.

doente	diagnóstico	resultado
P61	LMC*	-
P66	LMC	-
P235	LMC	-
P38	LMC	46,XY
P8	LMC	46,XY
P113	LMC	46,XY
P199	LMC	46,XY *bcr+*
P4	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P6	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P13	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P27	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P35	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P47	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P48	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P50	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P57	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P59	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P64	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P73	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P79	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P91	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P92	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P111	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P132	LMC	46,XY,t(9;22)(q34:q11)
P144	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P162	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P163	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P173	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P181	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P195	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P202	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P207	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P230	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P12	LMC	46,XX/46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P62	LMC	46,XY/46,XY,t(9;22)(q34;q11)
P18	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)/45,XY,t(9;22)(q34;q11),-18
P43	LMC	47,XX,t(9;22)(q34;q11),+Ph/46,XX,t(9;22)(q34;q11)
P46	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11)/47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)
P67	LMC	45,X0,t(9;22)(q34;q11)/46,X0,+8,t(9;22)(q34;q11)
P1	LMC-FB*	46,X,t(X;7)(q23;p22),t(6;6)(q27;q12),t(9;22)(q34;q11),t(10;16)(q24;q24),18q+/46,XX,1q-,inv(5)(p15;p11),t(5;12)(p15;q11),-7,8q-,t(9;22)(q34;q11),13q-,+mar/45,X,t(X;2)(q23;p25),3p-,-8,t(9;22)(q34;q11),12q+

(continua)

(continuação)

P3	LMC-FB	46,XY,t(9;22)(q34;q11),i(21q)
P137	LMC-FB	45,XY,t(9;14;22)(q34;q13;q11),inv(16)(q11q23), -17 / 46,XY,t(9;14;22)(q34;q13;q11), inv(16)(q11q23)

* LMC ; leucemia mieloide crónica
FB ; fase blástica

\- não se observaram células em divisão

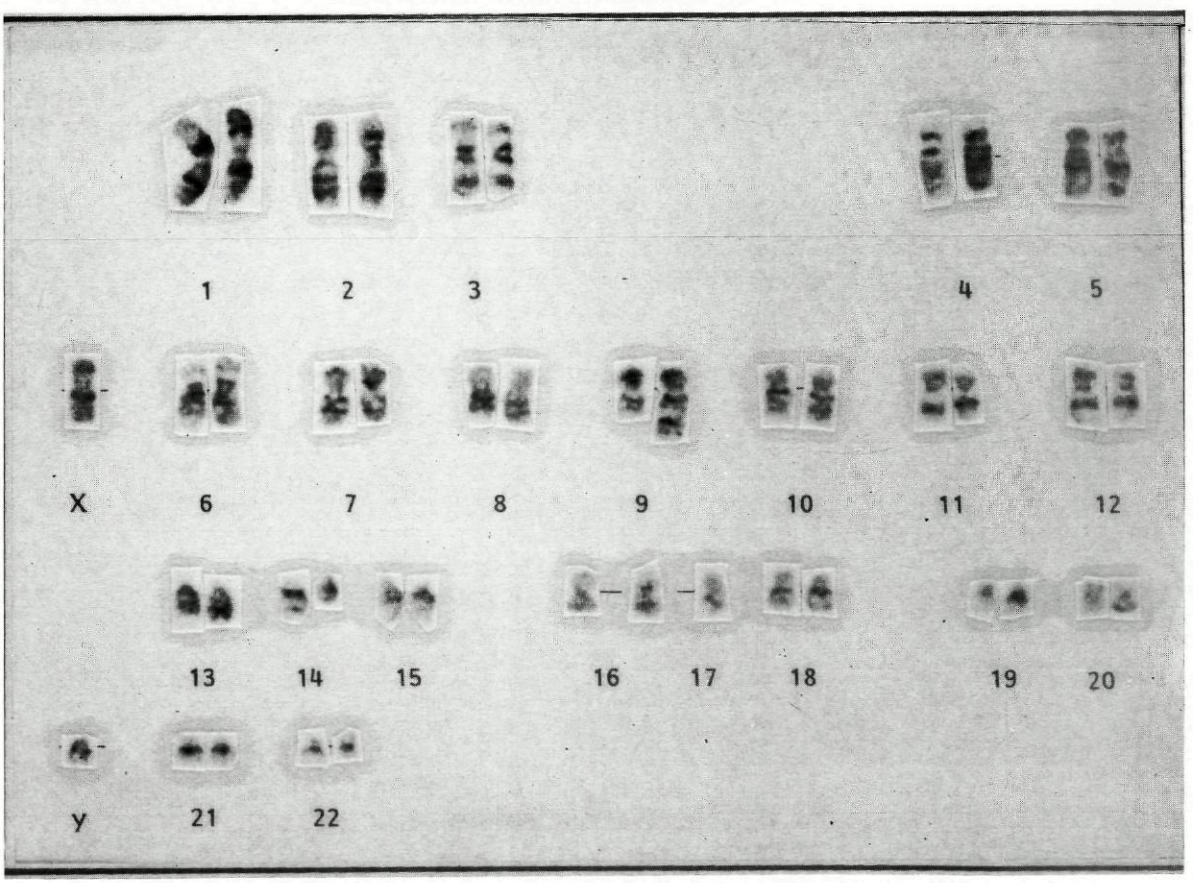


Foto 1. Cariotipo de uma das linhas celulares do doente P137 referido no Quadro 16.

Alterações cromossómicas em doentes com SMP (Quadro 17)

Os resultados dos vários síndromes mieloproliferativos são apresentados em conjunto, dada a diversidade dos diagnósticos e do pequeno número de doentes estudados em cada um deles.

Neste grupo de doentes a alteração cromossómica mais frequentemente encontrada foi a del(13q-), a qual esteve presente em três casos, um de policitemia vera (PV), um de trombocitemia essencial (TE) e um de mielofibrose idiopática (MI). É de referir também a presença do envolvimento do cromossoma 13 num outro tipo de alteração (t(7;13)), num caso de MI.

Quadro 17. Resultados dos estudos cromossómicos em doentes com síndromes mieloproliferativos

doente	diagnóstico	resultado
P65	TE*	-
P83	TE	-
P86	TE	-
P217	TE	-
P11	TE	46,XY
P19	TE	46,XX
P95	TE	46,XY
P223	TE	46,XX/46,XX,13q-
P72	PV*	-
P96	PV	-
P23	PV	46,XX
P94	PV	46,XY
P52	PV	46,XY,13q-
P107	PV	45,XX,-14,-21,+t(14q;21q),del(20)(q11)/45,-14, -21,+t(14q21q)
P136	MI*	-
P114	MI	46,XY,13q-(q14?)/46,XY
P115	MI	46,XX,t(7;13)(p15;q14)/46,XX
P150	MI	46,XX,del(14)(q24?)
P28	nc*	-
P127	nc	-
P164	nc	-
P7	nc	46,XY
P26	nc	46,XX

(continua)

			(continuação)
P90	nc	46,XX	
P97	nc	46,XY	
P118	nc	46,XY	
P176	nc	46,XY	
P186	nc	46,XX	
P201	nc	46,XY	
P208	nc	46,XX	
P219	nc	46,XY	
P220	nc	46,XY	
P108	nc	45,X,-Y	

* TE ; trombocitemia essencial
PV ; policitemia vera
MI ; mielofibrose idiopática
nc ; não classificado

\- não se observaram células em divisão

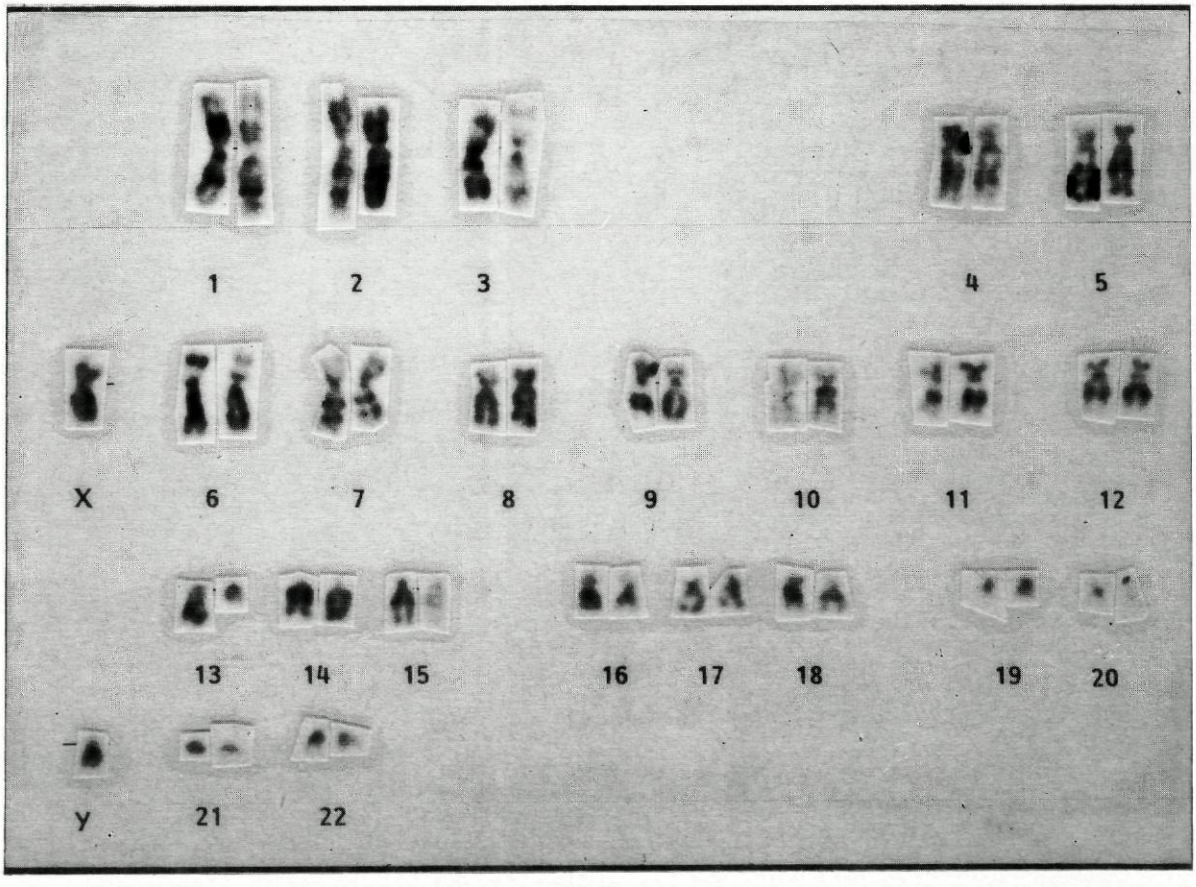


Foto 2. Cariotipo de uma das linhas celulares do doente P114 referido no Quadro 17,.

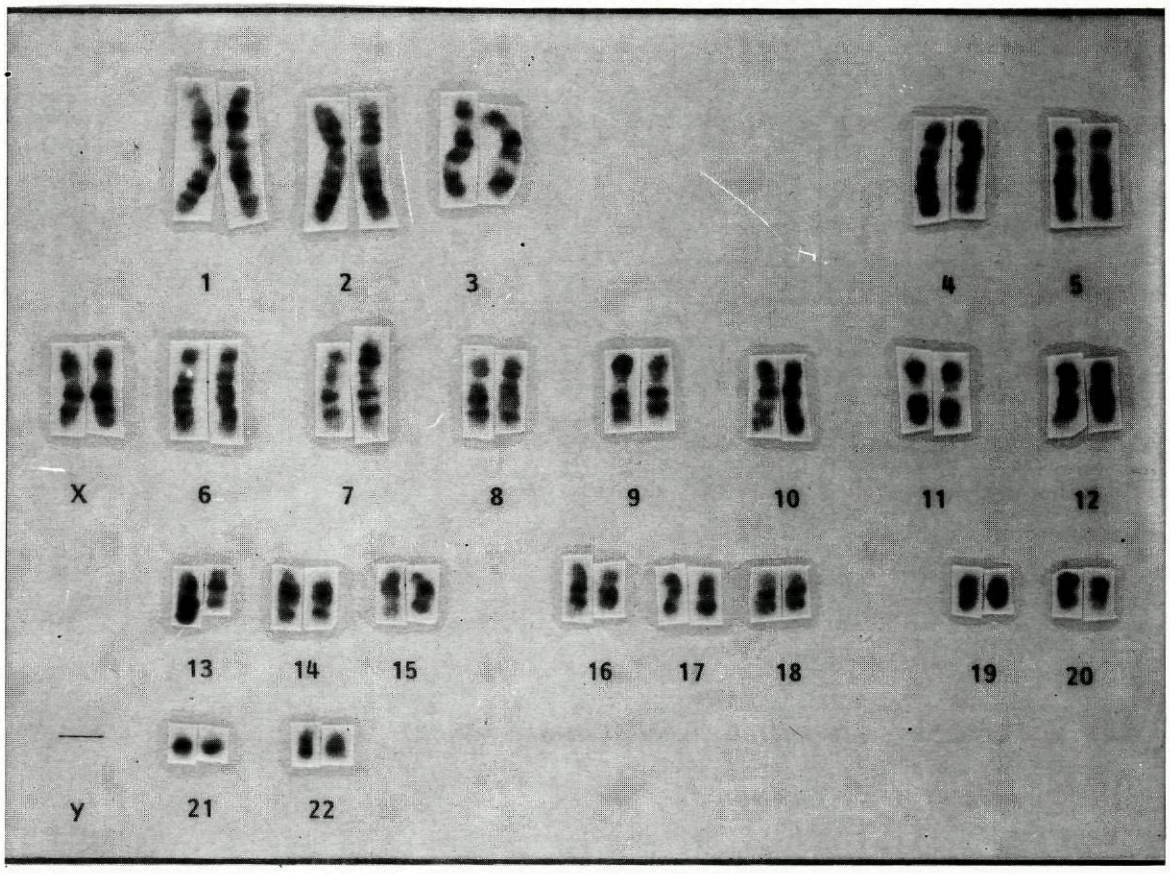


Foto 3. Cariotipo de uma das linhas celulares do doente P115 referido no Quadro 17.

Alterações cromossómicas em doentes com SLP (Quadro 18)

Neste grupo foram incluidos doentes com leucemia linfocítica crónica de origem B (LLC-B e LLC/PL) e três casos de linfoma leucemisado.

A trissomia 12 foi encontrada em dois casos de LLC-B e no doente com LLC/PL. Noutro doente com LLC-B o cariotipo apresentou 14q+.

Quadro 18. Resultados dos estudos cromossómicos em doentes com síndromes linfoproliferativos

doente	diagnóstico	resultado
P169	LLC-B*	-
P172	LLC-B	-
P229	LLC-B	-
P140	LLC-B	46,XY
P158	LLC-B	46,XY
P225	LLC-B	46,XY
P31	LLC-B	46,XX/47,XX,+12
P98	LLC-B	46,XY/47,XY,+12 /48,XY,+12,-20,+2mar
P148	LLC-B	46,XY,der(2),14q+,/46,XY
P170	LLC-B	46,XX/47,XX,+?
P106	LLC/PL*	46,XY/47,XY,+12
P126	LNH leuc*	-
P166	LNH leuc	46,XY
P177	LNH leuc	46,XY

* LLC-B ; leucemia linfocítica crónica de origem B
PL ; prólinfocítica
LNH leuc ; linfoma não Hodgkin leucemisado

\- não se observaram células em divisão

Alterações cromossómicas em doentes com LNLA (Quadro 19)

Dos 5 casos de M1 FAB estudados, dois apresentaram alterações cromossómicas: del(5q) e t(7;11).

Nos 13 casos de M2 FAB a t(8;21) estava presente em quatro. Num destes a translocação apareceu isolada e nos restantes três casos associou-se a outras alterações estruturais e numéricas. Refira-se que para um destes doentes, que apresenta del(7), se obteve a informação de que esta leucemia aguda foi precedida de SMD. Anomalias dos cromossomas 5, 7 e 17 estavam presentes em três dos restantes casos.

Em todos os casos com o diagnóstico proposto de M3 FAB encontrou-se a t(15;17).

Em 3 dos 4 casos com M4 FAB encontraram-se alterações cromossómicas que envolviam os cromossomas 7, 16 e 20.

Dos 7 doentes com M5 FAB três tinham cariotipo normal. Nos restantes observaram-se alterações numéricas ou estruturais: 16q-, t(10;11), der(7), +21, 14q+.

Nos restantes 6 doentes com LNLA encontraram-se quatro com cariotipo normal, um caso com +21 e del(11) e um caso M7 FAB com monossomia 9.

Quadro 19. Resultados dos estudos cromossómicos em doentes com leucemia não linfoblástica aguda.

doente	diagnóstico	resultado
P189	M1	-
P56	M1	46,XX
P100	M1	46,XY
P185	M1	46,XX
P24	M1	46,XX,del(5)(q15q31)
P165	M1	46,XX,t(7;11)(p11;p11)
P17	M2	46,XY
P105	M2	46,XY
P119	M2	46,XX
P187	M2	46,XX
P188	M2	46,XY
P29	M2	45,X0,t(8;21)(q22;q22)/46,XX,t(8;21)(q22;q22)
P34	M2	46,XX,t(8;21)(q22;q22)/45,XX,t(8;21)(q22;q22),-20
P58	M2	46,XX,t(8;21)(q22;q22)
P153	M2	46,XX,del(7)(q31),t(8;21)(q22;q22)
P37	M2	45,XX,-5,-7,+der(11),t(7;11)(q31;p14),-17,i(21q), inv (16)(p13q22),+mar/46,XX,-5,t(7;11)(q31p14), +11,-17,i(21q),+mar
P177	M2	45,XX,-7
P184	M2	46,XX,del(9)(q11)
P194	M2	46,XY,der(17)(q11)
P159	M3	-
P10	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q11)/46,XX
P206	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q11)/46,XY
P39	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q11)
P142	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q11)
P210	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q11)
P85	M4	-
P221	M4	46,XX
P55	M4	47,XX,+mar(20?)

(continua)

P69	M4	46,XX,der(7)(q11qter)	(continuação)
P121	M4	46,XY/46,XY,der(16?)	
P93	M5	46,XY	
P120	M5	46,XX	
P146	M5	46,XX	
P14	M5	46,XY,16q-(q22?)	
P74	M5	46,XY,t(10;11)(p14;q13-14)	
P124	M5	46,XX/46,XX,4q+	
P138	M5	46,XY,der(7)/47,XY,der(7),+21	
P130	M6	46,XX	
P5	M7	46,XY	
P116	M7	46,XY,-9,+mar	
P32	nc	46,XX/47,XX,+21/46,XX,del(11)(q23qter)	
P192	nc	46,XY	
P226	nc	46,XY	

* M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 : leucemia não linfoblástica aguda, classificação FAB
nc : não classificada

\- não se observaram células em divisão

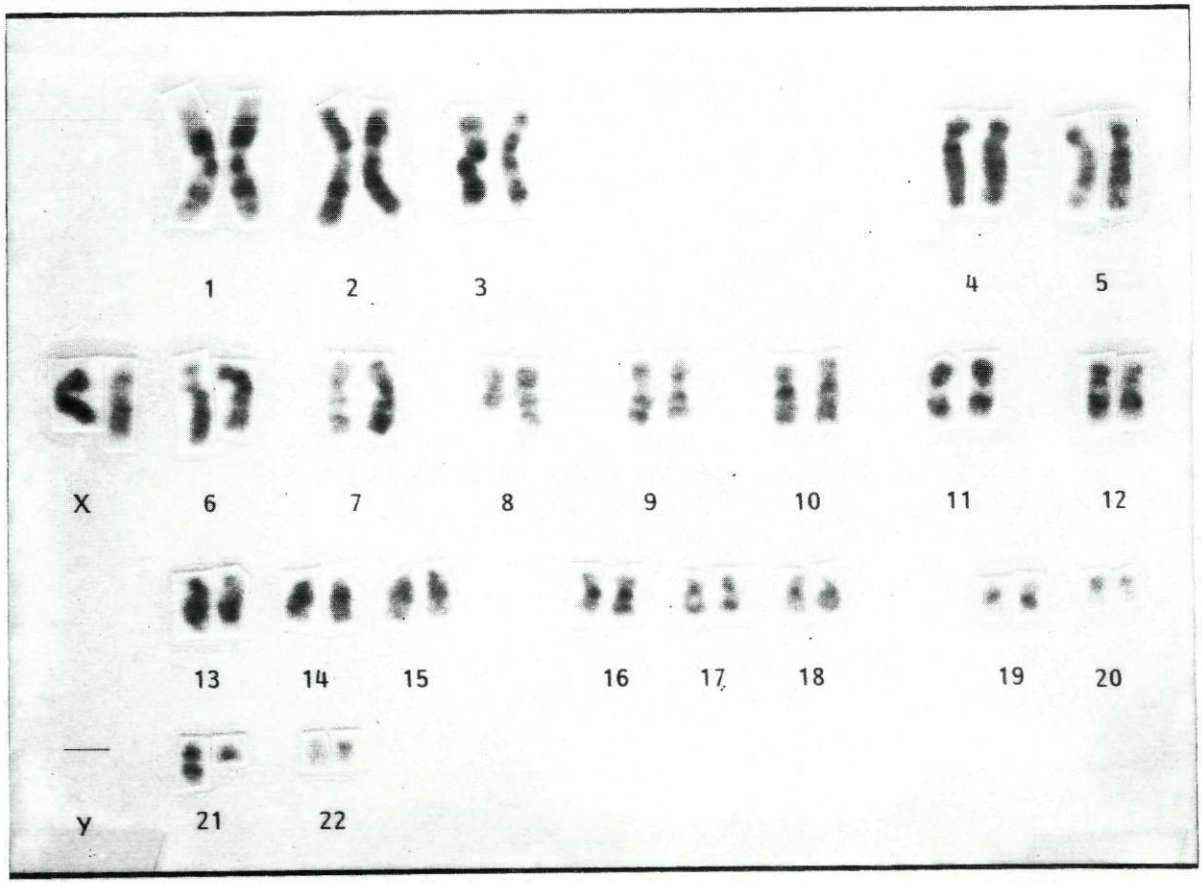


Foto 4. Cariotipo de uma das linhas celulares do doente P34 referido no Quadro 19.

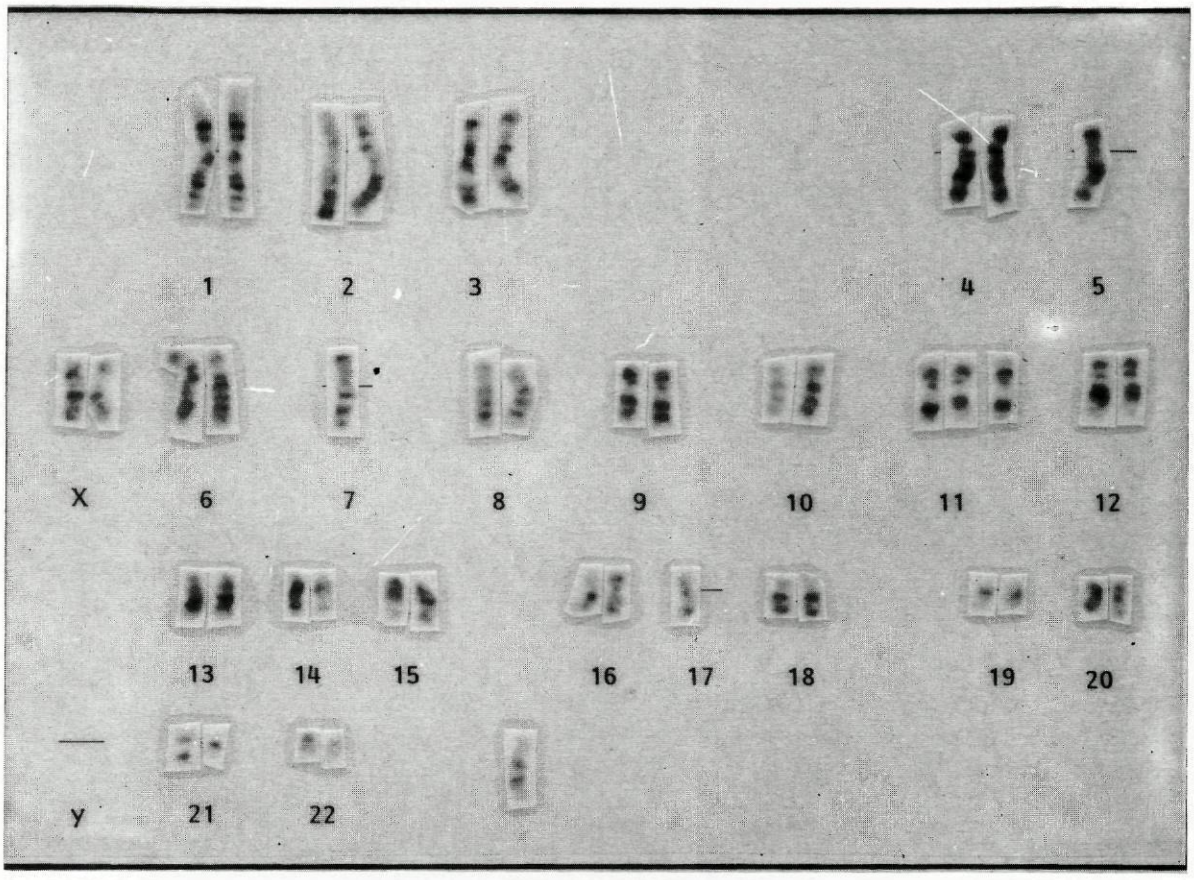


Foto 5. Cariotipo de uma das linhas celulares do doente P37 referido no Quadro 19.

Alterações cromossómicas em doentes com SMD (Quadro 20)

Embora o número de casos estudados seja ainda pequeno, detectaram-se alterações cromossómicas em 50% dos casos (em 5 de 10 casos).

Um doente com AREB-t tinha trissomias 8 e 9. A del(5) foi detectada em dois doentes, sempre associada a outras alterações numéricas e estruturais.

Quadro 20. Resultados dos estudos cromossómicos em doentes com síndromes mielodisplásicos.

doentes	diagnóstico	resultado
P168	AR*	-
P25	AR	46,XX
P76	AR	46,XX

(continua)

(continuação)

P45	AREB*	-
P75	AREB	-
P212	AREB	46,XYq+/45,XYq+,1p+,2q+,del(5)(q32),del(6)(q21),-7,14q+
P110	AREB-t*	-
P197	AREB-t	-
P15	AREB-t	46,XY/48,XY,+8,+9/47,XY,+8/48,XY,+9,+9
P122	LMMC*	-
P167	LMMC	-
P30	LMMC	46,XY
P134	LMMC	46,XX
P63	LMMC	47,XO,+2mar/48,XX,+2mar
P99	nc*	46,XX
P87	nc	45,XX,-1,del(5)(q13q33),-12,+mar/46,XX
P101	nc	46,XX,1q+

* AR ; anemia refractária
AREB ; anemia refractária com excesso de blastos
AREB-t; anemia refractária com excesso de blastos, em transformação
LMMC ; leucemia mielomonocítica crónica
nc ; não classificada

- não se observaram células em divisão

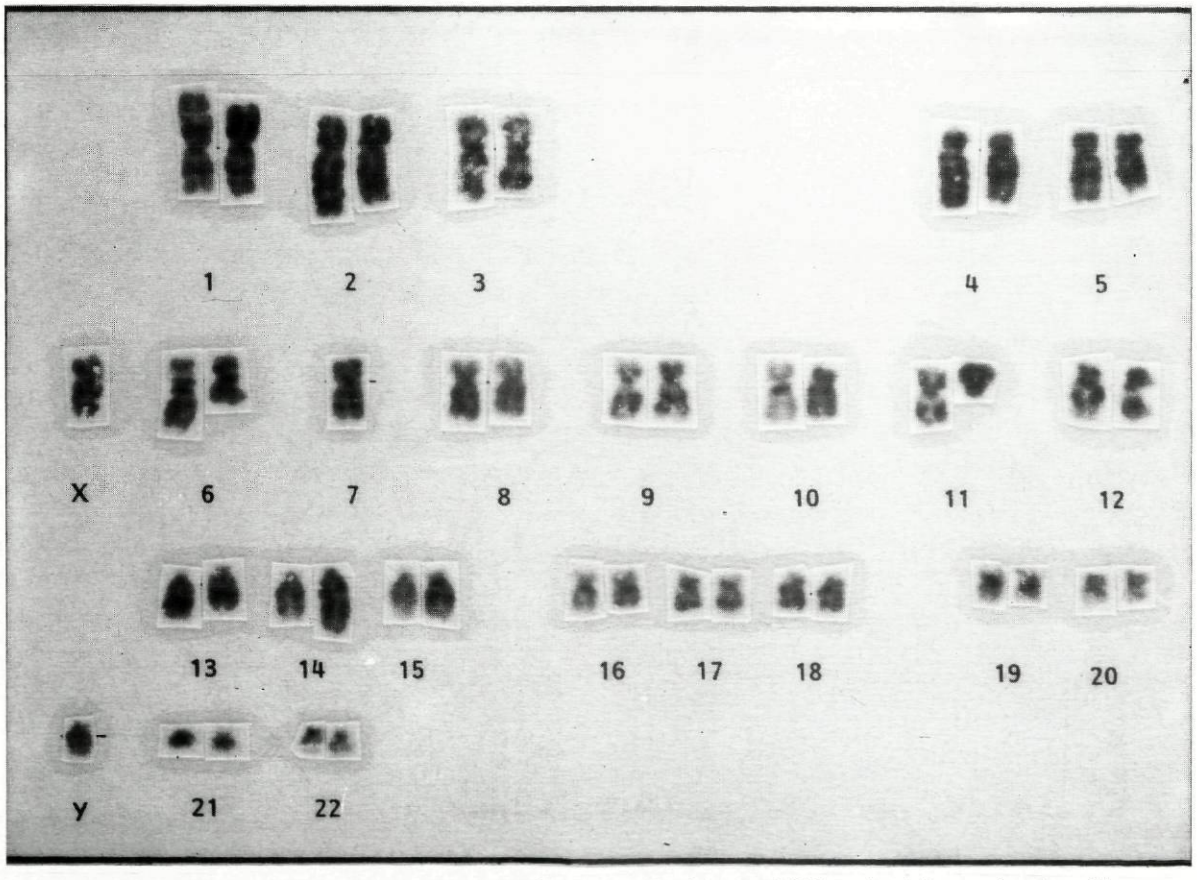


Foto 6. Cariotipo de uma das linhas celulares do doente P212 referido no Quadro 20.

Alterações cromossómicas em doentes com LLA (Quadro 21)

Foram encontradas alterações cromossómicas clonais em 12 dos 36 doentes estudados.

Em 6 casos identificaram-se as alterações estruturais: t(9;22), t(4;11), t(9;10), del(6), t(8;14) e 22q+.

Em 7 casos detectaram-se alterações numéricas clonais: trissomia 5 (1 caso), hiperdiploidia >50 (3 casos), tetraploidia em 100% das células analisadas (1 caso) e monossomias 19 e Y (1 caso).

Quadro 21. Resultados dos estudos cromossómicos em doentes com leucemia linfoblástica aguda

doente	diagnóstico	resultado
P54	LLA*	-
P205	LLA	46,XY
P216	LLA	46,XY (57%) / hipodiploidia 33-45 (43%)
P42	LLA	hipodiploidia 32-44 (68%) / tetraploidia (19%) / 46,XY (13%)
P129	LLA	hipodiploidia 22-45 (73%) / hiperdiploidia >50 (17%) / 46,XY (10%)
P44	LLA	92,XXYY
P224	LLA	hiperdiploidia >50 (52-55)
P51	LLA	60,XX,+1,2p+,-5,+8,+9,+10,+11,+13,+14,+15,+19,+20 +21,r(?),+mar1,+mar2,+mar3
P89	LLA-T*	-
P68	LLA-T	46,XY
P112	LLA-T	46,XX
P131	LLA-T	46,XX (62%) / hipodiploidia 38-45 (38%)
P128	Burkitt*	46,XY,dup(1)(q21q31),t(8;14)(q24;q32),-17,+mar
P21	Pré-Pré B*	45,X,-Y,-19,+mar
P8	Pré-Pré B	46,XX,t(9;22)(q32;q11)
P182	Pré-Pré B	46,XX/46,XX,t(4;11)(q21;q23)
P174	LLA-c	-
P191	LLA-c	-
P203	LLA-c	-
P211	LLA-c	-
P78	LLA-c	46,XX
P104	LLA-c	46,XX
P125	LLA-c	46,XX

(continua)

(continuação)

P183	LLA-c	46,XY
P209	LLA-c	46,XY
P16	LLA-c	46,XY (56%) / hipodiploidia 34-44 (34%) / / tetraploidia (10%)
P82	LLA-c	hipodiploidia 32-44 (78%) / 46,XY (22%)
P77	LLA-c	hipodiploidia 41-44 (85%) / 46,XY (15%)
P178	LLA-c	hiperdiploidia >50 (51-53)
P234	LLA-c	hiperdiploidia >50 (54-56)
P154	LLA-c	47,XY,+5
P218	LLA-c	54,XY,+6,+7,+11,+15,+17,+18,+21,+21
P227	LLA-c	56,XXY,+5,+8,+10,+15,+17,+18,+21,+21,+22
P117	LLA-c	46,XY,t(9;10)(q22;q22)
P151	LLA-c	46,XX,del(6)(q21),i(7q),-19,+mar / /47,XX,+2,del(6)(q21),i(7q),-19,+mar
P228	LLA-c	46,XX.22q+

* LLA : leucemia linfoblástica aguda
LLA-T ; leucemia linfoblástica aguda de células T
Burkitt ; leucemia linfoblástica aguda tipo Burkitt
LLA-c ; leucemia linfoblástica aguda "common"

- não se observaram células em divisão

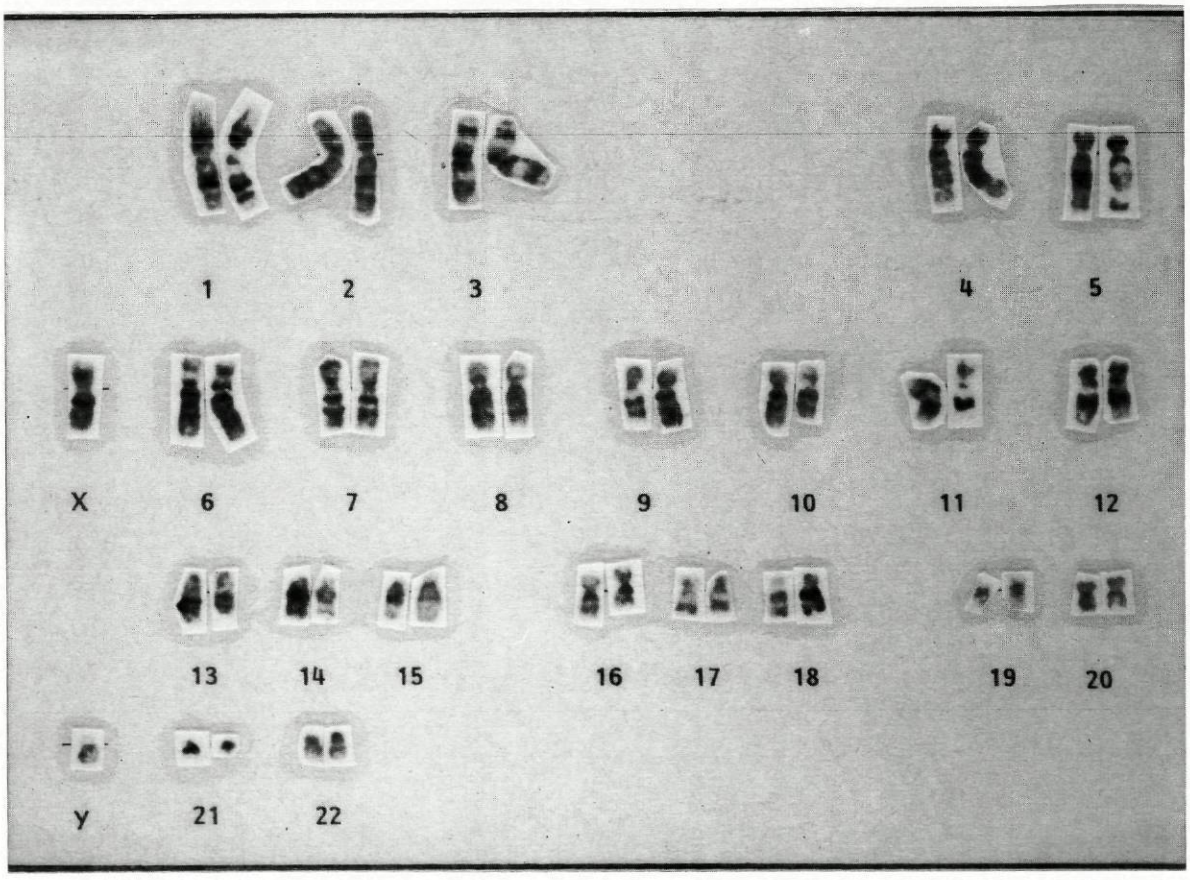


Foto 7. Cariotipo do doente P117 referido no Quadro 21.

Discussão

Os resultados apresentados referem-se, em todos os casos, a doentes em fase de diagnóstico.

Em 35 doentes com o diagnóstico proposto de LMC encontrou-se a característica t(9;22), que pela constância com que aparece em tais casos é considerada como "obrigatória" para o diagnóstico definitivo. O estudo citogenético não contribuiu para afirmar o diagnóstico de LMC em quatro doentes em que o cariotipo era normal. No entanto, no único desses doentes em que foi procurado o rearranjo *bcr-abl*, o referido rearranjo estava presente. O recurso a este último estudo torna-se, portanto, necessário, nos casos em que na ausência de t(9;22) os critérios clínicos e laboratoriais sejam fortemente sugestivos de LMC.

Em 4 dos 32 doentes em fase crónica e nos 3 doentes em fase blástica a t(9;22) encontrava-se associada a outras alterações cromossómicas. A presença destas alterações adicionais na altura do diagnóstico não é considerada, por alguns autores, como indicadora de uma maior agressividade da doença. No entanto, eles valorizam-nas como factor de pior prognóstico quando vão aparecendo ao longo do curso da fase crónica da doença (Geraci *et al.*, 1987; Sokal *et al.*, 1988).

Os dados sobre estudos citogenéticos nos SMP são escassos quando comparados com os existentes para as leucemias agudas ou para a LMC . No entanto, estão já descritas algumas alterações, quer numéricas quer estruturais, preferencialmente envolvidas nestes tipos de patologia (Mertens *et al.*, 1991). Um desses cromossomas é o 13, que surge frequentemente na PV e MI com uma delecção do braço longo. Nos casos estudados neste trabalho encontrou-se a del(13q-) em todos os subgrupos de SMP (TE, PV e MI) e uma t(7;13) num caso de MI. Estes dados vêm apoiar e reforçar a importância do cromossoma 13 nos SMP de um modo geral.

Foram detectadas alterações cromossómicas clonais em 24 de 40 indivíduos com LNLA. A t(8;21) encontrada em 4 dos 13 doentes com M2

FAB, a t(15;17) que se detectou em todos os doentes M3 FAB e a t(10;11) num caso M5 FAB são exemplos da relação existente entre os dados citogenéticos e o diagnóstico de alguns casos de LNLA. Refira-se que num doente que foi enviado com o diagnóstico de M5 FAB, detectou-se uma alteração no cromossoma 16 que está associada com grande frequência à LNLA M4 FAB (Heim e Mitelman, 1987), o que levou à revisão da classificação desse caso.

Os estudos citogenéticos, conjugados com estudos bioquímicos, ajudaram a estabelecer a natureza clonal da origem dos SMD (Nowell, 1992). Apesar de não específicas para um determinado sub-tipo FAB de SMD, a sua presença é considerada importante em termos de prognóstico, conforme o tipo de anomalia encontrada. As alterações mais frequentemente associadas com os SMD são 5q-, -5, -7, +8 e delecções e translocações dos cromossomas 11 e 12 (Heim e Mitelman, 1987). Embora tenham sido estudados poucos casos de SMD, foram encontradas alterações envolvendo os cromossomas 5, 7 e 8, em casos de AREB e AREB-t (Quadro 20), que são as formas mais graves e de pior prognóstico deste tipo de doenças.

Vários tipos de alterações cromossómicas clonais estão relacionados com os diferentes subgrupos de LLA de uma forma não ao acaso (Heim e Mitelman, 1987). No pequeno número de casos apresentados encontram-se já algumas das alterações cromossómicas estruturais descritas como específicas (Quadro 21).

A grande variabilidade do número de cromossomas nas LLA é uma característica que não se encontra noutros tipos de leucemia. A hiperdiploidia >50, que confere melhor prognóstico na LLA da criança e a hipodiploidia "near haploid", que confere pior prognóstico, mostram a grande diversidade das alterações cromossómicas numéricas neste tipo de patologia (Pui *et al.*, 1989; 1990a).

Em 3 dos doentes estudados com LLA identificaram-se hiperdiploidias >50. Nos casos P218 e P227 encontraram-se trissomias para os cromossomas 6, 10, 17, 18 e X, e o cromossoma 21 em 4 cópias. Foi já descrita uma maior frequência do envolvimento destes cromossomas em trissomia. No entanto, não se sabe ainda qual o seu significado (Yunis, 1987; Pui *et al*, 1990b).

Nos casos sem alterações clonais detectou-se uma elevada frequência de aneuploidias, por vezes até superior ao número de células normais (34-85%). De acordo com as regras convencionais de análise cromossómica estas não devem ser incluidas no estudo citogenético, porque não se manifestam de uma forma clonal. No entanto, estas aneuploidias muito frequentes podem eventualmente representar um estadio prévio do desenvolvimento de clonalidade e por isso sugere-se que elas não sejam eliminadas do resultado cariotípico destes doentes. Um estudo mais detalhado sobre o eventual significado destas aneuploidias não clonais será apresentado em 5.4..

5.3. FREQUÊNCIA DE TETRAPLOIDIAS CLONAIS

O aparecimento de aneuploidias é um fenómeno comum nas células neoplásicas. Mas a existência de clones tetraploides já é muito menos frequente (Mitelman, 1988), e na maioria dos casos aparece simultâneamente com outras alterações, numéricas ou estruturais (Heim *et al.*, 1987).

Neste trabalho foi analisada a incidência de tetraploidias clonais nos indivíduos com doenças hematológicas malignas referidos em 5.2..

Resultados

Observou-se a presença de um clone de células poliploides em 10 dos 39 casos com LMC (26%), num dos 23 casos de SMP (4%), num dos 10 casos de SMD (10%), em 4 de 40 casos de LNLA (10%) e em 3 de 30 casos de LLA (10%) (Quadro 22).

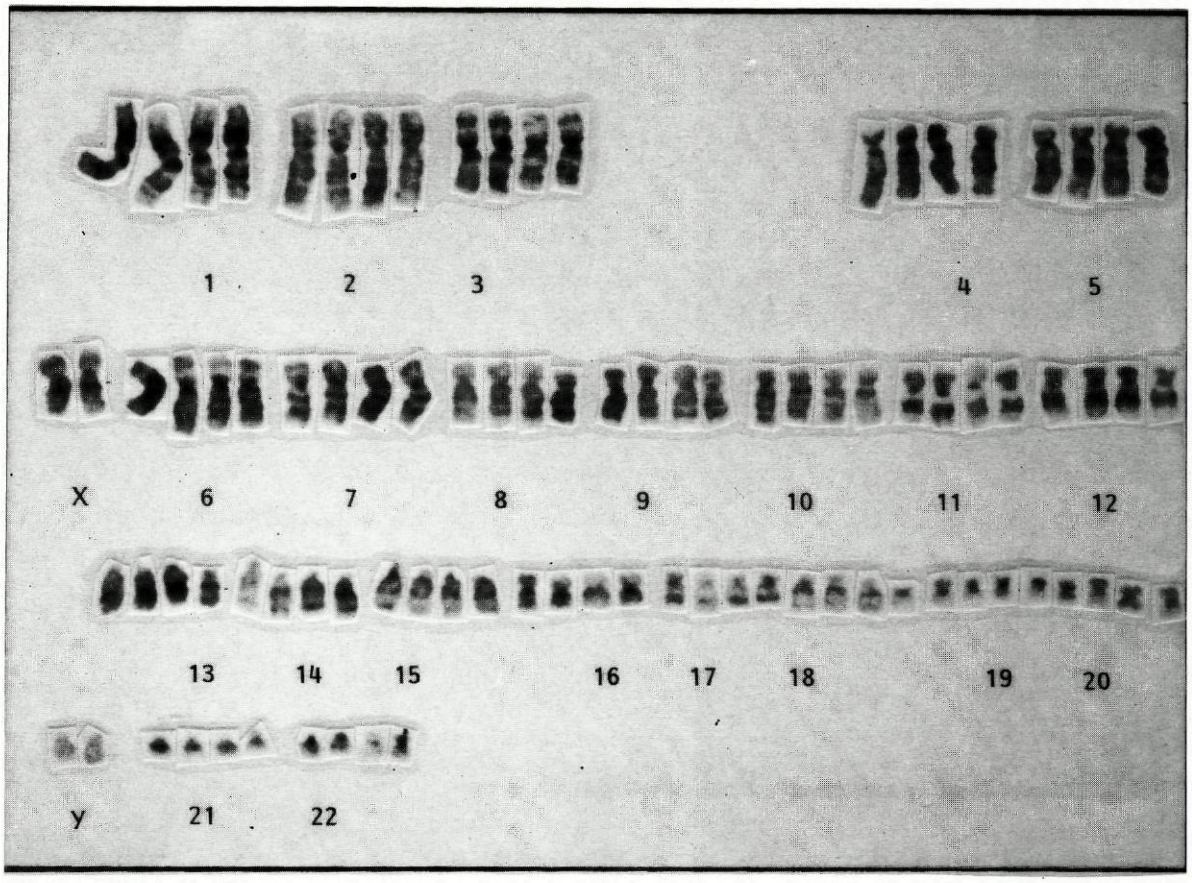
Com a excepção do caso de LLA onde a tetraploidia dominou completamente a população celular analisada (Foto 8), as maiores frequências individuais de tetraploidia foram encontradas para doentes com LMC (Quadro 22).

Quadro 22. Frequência de poliploidia em células de 19 indivíduos com doenças hematológicas malignas, em culturas espontâneas.

doente	diagnóstico	frequência (%)	nº células observadas
P1	LMC*	3.5	115
P4	LMC	6.0	100
P18	LMC	3.5	58
P27	LMC	4.0	50
P27a	LMC	2.9	35
P43	LMC	66.7	63
P59	LMC	37.5	16
P88	LMC	11.4	44
P199	LMC	12.0	25
P202	LMC	24.0	25
P114	SMP*	8.1	37
P15	SMD*	1.8	113
P5	LNLA*	2.7	75
P17	LNLA	2.2	45
P56	LNLA	9.1	51
P146	LNLA	15.0	20
P16	LLA*	10.0	50
P44	LLA	100.0	23
P42	LLA	19.1	21

* LMC - leucemia mieloide crónica
SMP - síndrome mieloproliferativo
SMD - síndrome mielodisplásico
LNLA - leucemia não linfoblástica aguda
LLA - leucemia linfoblástica aguda

Foto 8. Tetraploidia num caso de leucemia linfoblástica aguda (P44).



Discussão

A poliplodia não é uma alteração cromossómica recorrente nas doenças hematológicas malignas. A sua presença, quando associada a outras alterações ou mesmo a populações celulares cromossomicamente normais, pode representar um fenómeno relacionado com o crescimento desregulado das células tumorais. No entanto, o modo como ela pode eventualmente contribuir para o desenvolvimento tumoral continua por esclarecer (Heim *et al.*, 1987).

Para alguns casos referidos neste trabalho a poliploidia foi observada com uma frequência elevada. Este facto sugere que a sua manutenção pode eventualmente representar uma certa vantagem selectiva para as células

em questão. Se assim fôr, pelos resultados obtidos pode pôr-se a hipótese de que esta situação se torna especialmente vantajosa para as células maligna dos doentes com LMC. Nestes casos não só se encontra uma maior frequência de poliploidias, relativamente aos outros tipos de patologias, mas também se observam as maiores frequências para os casos individuais (quadro 22).

A presença de tetraploidia como alteração única foi já descrita em dois casos de LLA com morfologia L2 (Heim *et al.*, 1987). Foi então sugerido que para esta alteração tão rara, a sua ocorrência em dois casos com o mesmo tipo de patologia poderia corresponder a um subtipo ainda não reconhecido. Foi feito ao doente acima referido, com tetraploidia em 100% das células analisadas, o estudo morfológico que revelou tratar-se também de uma LLA-L2. Este facto vem apoiar a hipótese da existência do subtipo mencionado.

5.4. SIGNIFICADO DAS ANEUPLOIDIAS NÃO CLONAIS

Enquanto que o papel das alterações cromossómicas clonais na etiologia das doenças malignas se vai tornando cada vez mais esclarecido, o significado das aneuploidias não clonais continua pouco evidente.

Segundo as regras de nomenclatura internacionais para análise cromossómica (ISCN, 1978), um clone celular é definido sempre que se observam pelo menos duas células com aumento ou alteração do mesmo ou mesmos cromossomas, ou pelo menos três células com perda do mesmo ou mesmos cromossomas. As alterações que são observadas fora do contexto destas regras são consideradas como consequência de erros mitóticos ocasionais, sem significado para a população celular em causa. No entanto, foi já demonstrado que a detecção de uma só célula alterada, mas que é sempre observada ao longo de estudos seriados no mesmo doente, pode ser representativa de uma população celular que mais tarde vai sofrer uma transformação clonal (Mc Connell *et al.*, 1991). Este facto sugere que estas alterações, ditas ocasionais, não devem ser ignoradas,

pois podem fornecer informações úteis acerca de eventuais fenómenos relacionados com a evolução da doença.

Este trabalho teve como objectivos analisar a frequência de hipodiploidias não clonais em diversas doenças hematológicas malignas, estudar a relação entre as perdas de cromossomas e o tamanho dos mesmos, assim como a relação entre o padrão de hipodiploidias em diferentes tipos de patologia.

Trabalho experimental

Análise citogenética

Foi determinada a frequência de hipodiploidias não clonais em culturas espontâneas de células de medula óssea ou sangue periférico de 104 indivíduos com diversas doenças hematológicas malignas (20 doentes com LLA, 38 doentes com leucemia mieloblástica aguda (LMA) e 46 doentes com SMP).

Para cada doente, a frequência foi determinada a partir da observação do número de cromossomas num mínimo de 20 metafases. No entanto, quase sempre foi observado um número superior (média: 35 ± 15; mínimo: 20; máximo: 100).

Para evitar contagens de aneuploidias provocadas por artefactos técnicos, foram eliminadas da análise todas as metafases que apresentavam cromossomas demasiadamente espalhados, assim como aquelas que se encontravam demasiadamente próximas umas das outras.

Para determinação da frequência de aneuploidias foram consideradas todas as metafases analisáveis nas quais se identificava claramente o número de cromossomas. Para identificação de cada cromossoma envolvido nas aneuploidias, foram utilizadas apenas metafases nas quais foi possível fazer essa identificação com as bandas G.

O estudo da correlação entre a frequência de perdas e o tamanho dos cromossomas não pôde ser feito relativamente a cromossomas individuais,

dado o pequeno tamanho da amostra em alguns casos. Foi por isso baseado na perda de cromossomas por grupo e no tamanho médio dos cromossomas em cada grupo. Este último parâmetro foi determinado do seguinte modo: o comprimento de cada cromossoma foi medido, em centímetros, a partir dos diagramas representados no Mapa do Genoma Humano (HGM 10.5). Foi depois medido o tamanho médio dos cromossomas em cada grupo (de A a G). Estas medidas foram convertidas em tamanhos relativos (comprimento médio de cada grupo cromossómico / soma dos comprimentos médios de todos os grupos x 100).

Análise estatística

Para a análise comparativa de frequências utilizou-se o teste X^2. A correlação entre variáveis foi estudada por análise de regressão linear. Os dados foram analisados utilizando o programa Statgraphics (STSC).

Resultados

Frequência de hipodiploidias não clonais

A frequência média de hipodiploidias não clonais nas células em divisão espontânea de indivíduos com SMP, LMA e LLA foi respectivamente de 11.2%, 18.9% e 35.8% (Quadro 23).

Quadro 23. Frequência de hipodiploidias não clonais em culturas espontâneas de células de medula óssea ou sangue periférico de 104 indivíduos com doenças hematológicas malignas.

tipo patologia	frequência hipodiploidia	nº metafases	nº doentes
SMP*	11.2 ± 8.3	1724	46
LMA*	18.9 ± 15.2	1392	38
LLA*	35.8 ± 25.0	649	20

* SMP - síndrome mieloproliferativo
LMA - leucemia mieloblástica aguda
LLA - leucemia linfoblástica aguda

Existe uma diferença altamente significativa (p = 0.000) entre a frequência nos três tipos de patologia. Ela é superior nas leucemias agudas, e para estas encontra-se ainda uma frequência superior nas leucemias da linha linfoide.

Correlação entre o número de perdas e o tamanho dos cromossomas

Foi feita uma análise dos cromossomas perdidos nas células hipodiploides. Para os doentes com SMP foi possível identificar 84 cromossomas, perdidos num total de 65 metafases. Para os doentes com LMA identificaram-se apenas 49 cromossomas, perdidos em 34 metafases. Finalmente um total de 233 cromossomas foram perdidos num total de 50 metafases em doentes com LLA.

Devido à má qualidade das metafases em culturas espontâneas de células malignas, a identificação dos cromossomas com bandas torna-se por vezes muito difícil. Por isso, nem sempre é possível identificar todos os cromossomas nas metafases observadas em cada estudo.

Neste trabalho, dado o escasso número de perdas cromossómicas identificadas para os doentes com SMP e LMA, a correlação entre a frequência de perdas e o tamanho dos cromossomas foi estudada, não para cromossomas individuais, mas para grupos de cromossomas (de A a G).

Os resultados mostram que não existe correlação entre estes parâmetros, ou seja, o número de perdas está distribuido ao acaso pelos diferentes grupos de cromossomas. Este fenómeno verifica-se para os três tipos de patologia estudados (Figuras 15, 16 e 17).

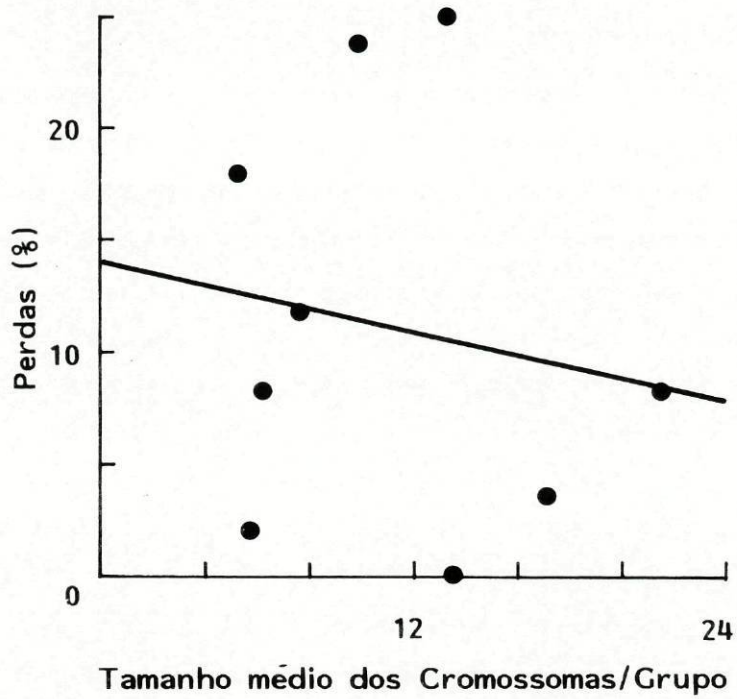


Figura 15. Relação entre a frequência relativa de perdas em cada grupo de cromossomas e o tamanho médio dos cromossomas nesses grupos, em culturas espontâneas de doentes com síndromes mieloproliferativos. Não existe correlação entre estes dois parâmetros.

p = 0,6867 r =-0,156976 R2 =2,46%

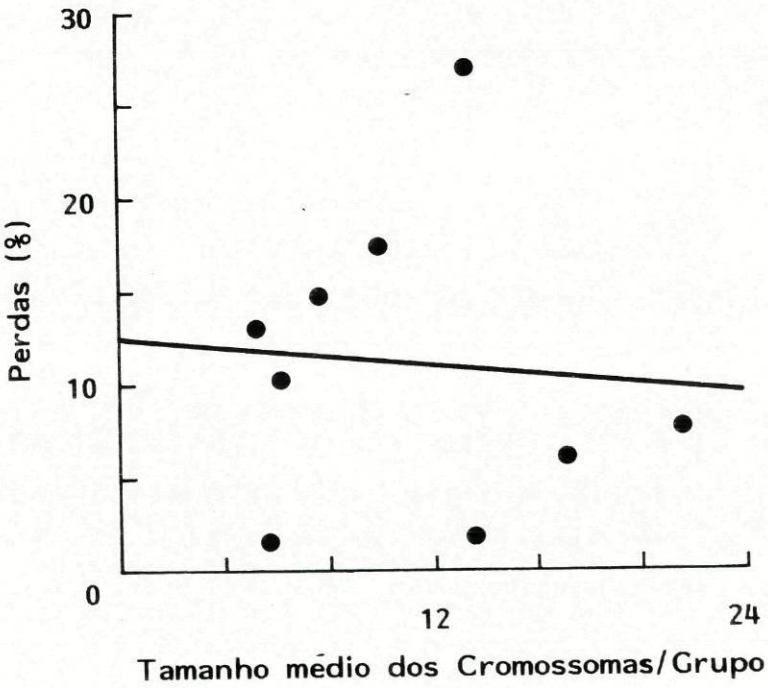


Figura 16. Relação entre a frequência relativa de perdas em cada grupo de cromossomas e o tamanho médio dos cromossomas nesses grupos, em culturas espontâneas de doentes com leucemia linfoblástica aguda. Não existe correlação entre estes dois parâmetros.

p = 0,8234 r = -0,087222 R2 = 0,76%

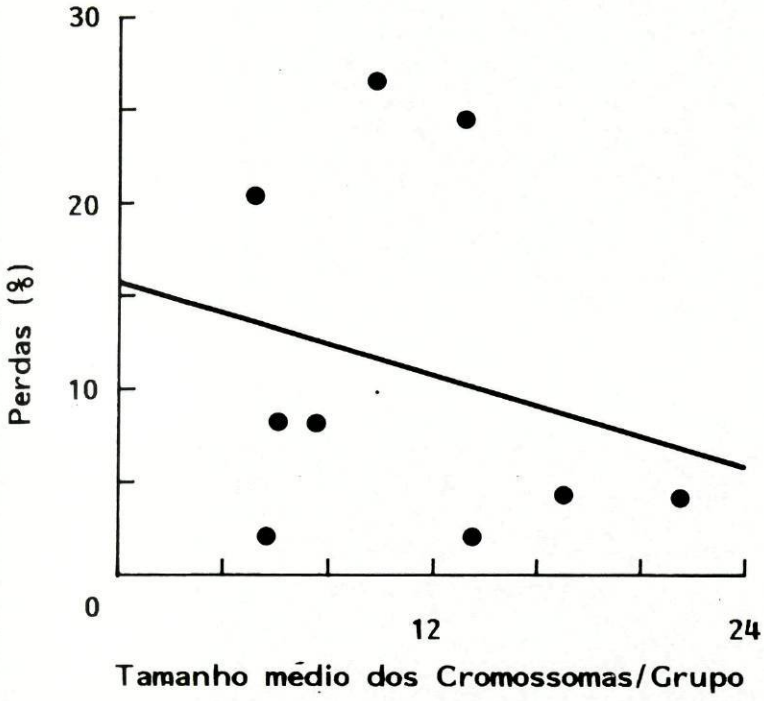


Figura 17. Relação entre a frequência relativa de perdas em cada grupo de cromossomas e o tamanho médio dos cromossomas nesses grupos, em culturas espontâneas de doentes com leucemia mieloblástica aguda. Não existe correlação entre estes dois parâmetros.

p = 0,5359 r =-0,238897 R2 = 5,71%

Correlação entre o padrão de hipodiploidia nos diferentes tipos de patologia

Foi investigado se existe alguma relação, no que diz respeito à distribuição das perdas pelos diferentes grupos de cromossomas, entre os tipos de patologia estudados: SMP, LMA e LLA.

Os resultados mostram que existe uma forte correlação relativamente a essa distribuição (Figuras 18 e 19).

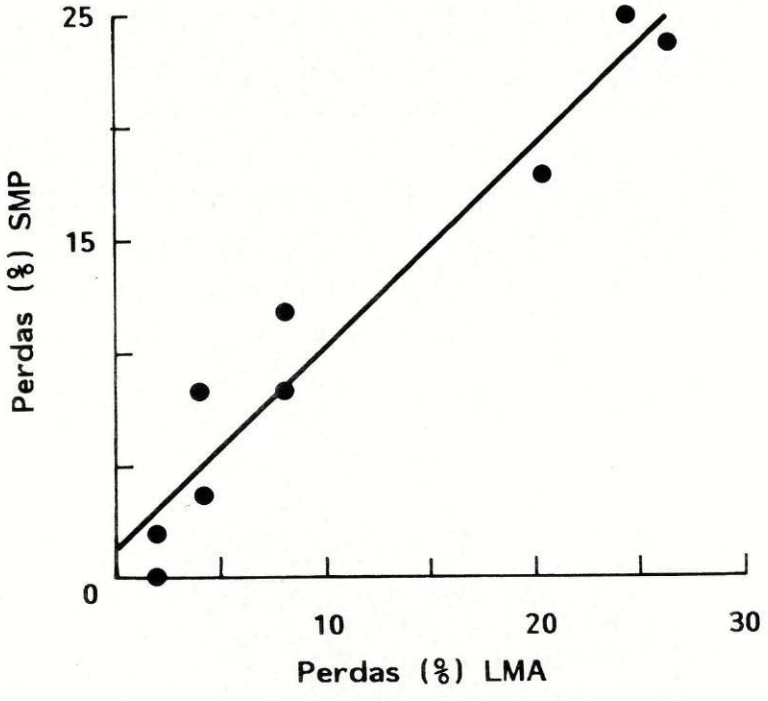


Figura 18. Relação entre a distribuição das perdas cromossómicas em células de doentes com síndromes mieloproliferativos e leucemia mieloblástica aguda. Existe correlação entre estas duas patologias.

p = 0,0000 r = 0,96833 R2 = 93,7%

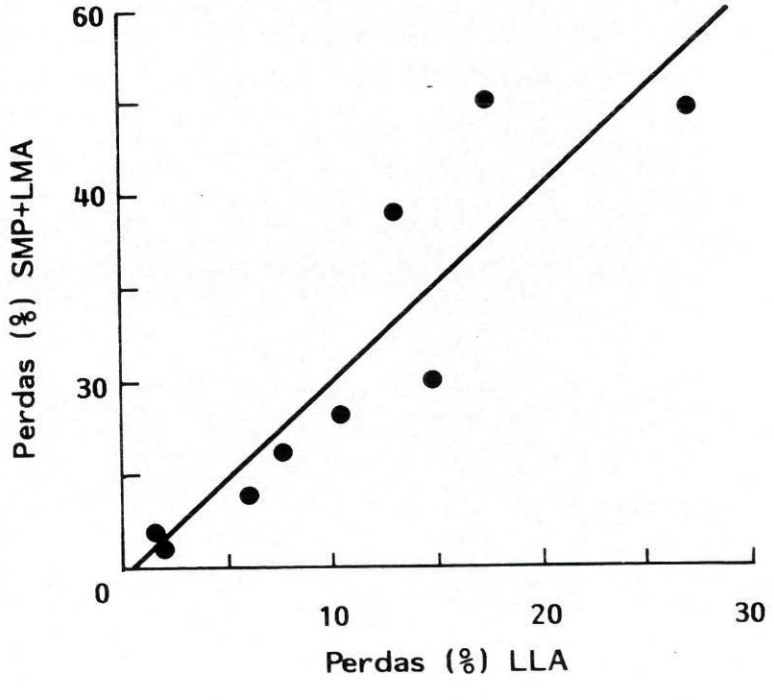


Figura 19. Relação entre a distribuição das perdas cromossómicas em células de doentes com patologias da linha mieloide e da linha linfoide. Existe correlação entre estas patologias.

p = 0,0009 r = 0,902376 R2 = 81,4%

Grupos de cromossomas preferencialmente envolvidos nas hipodiploidias

No Quadro 24 está representado o número de perdas observado e esperado para cada grupo cromossómico, nas culturas espontâneas de células malignas dos doentes com SMP. Assumindo que a perda de cromossomas se dá ao acaso, cromossomas dos grupos D e G perderam-se significativamente mais do que o esperado.

Quadro 24. Número de perdas para grupos de cromossomas, em 65 metafases obtidas a partir de culturas espontâneas de células malignas de 46 indivíduos com síndromes mieloproliferativos.

grupo cromossómico	observado	esperado*
A	7	10.9
B	3	7.3
C	21	25.6
D *	20	10.9
E	10	10.9
F	7	7.3
G *	15	7.3
X,Y	2	3.7

* esperado: nº cromossomas/grupo x nº total de perdas (84) / 23

* $p < 0,01$; maior número de perdas que o esperado

No Quadro 25 está representado o nº de perdas observado e esperado para cada grupo cromossómico, em culturas espontâneas de células malignas dos doentes com LMA. Assumindo que a perda de cromossomas se dá ao acaso, cromossomas dos grupos D e G perderam-se significativamente mais do que o esperado.

Quadro 25. Número de perdas para grupos cromossómicos, em 34 metafases obtidas a partir de culturas espontâneas de células malignas de 38 doentes com leucemia mieloblástica aguda.

grupo cromossómico	observado	esperado*
A	2	6.4
B	2	4.3
C	12	14.9
D *	13	6.4
E	4	6.4
F	4	4.3
G *	10	4.3
X,Y	2	2.1

* esperado: nº cromossomas /grupo x nº total de perdas (49) / 23

* $p < 0,001$; maior número de perdas que o esperado

No Quadro 26 está representado o nº de perdas observado e esperado para cada grupo cromossómico, em culturas espontâneas de células malignas de doentes com LLA.

Assumindo que a perda de cromossomas se dá ao acaso, cromossomas do grupos A perderam-se significativamente menos do que o esperado, e cromossomas dos grupos E e F perderam-se significativamente mais do que o esperado.

Quadro 26. Número de perdas para grupos cromossómicos, em 50 metafases obtidas a partir de culturas espontâneas de células malignas de 20 doentes com leucemia linfoblástica aguda.

grupo cromossómico	observado	esperado*
A *	19	30.4
B	17	20.3
C	66	70.9
D	31	30.4
E **	40	30.4
F **	27	20.3
G	23	20.3
X,Y	10	5.1

* esperado: nº cromossomas/grupo x nº total de perdas (223) / 23

* $p < 0,005$; menor número de perdas que o esperado
** $p < 0,005$; maior número de perdas que o esperado

Discussão

A frequência de aneuploidias não clonais encontrada nas culturas espontâneas de células de indivíduos com doenças hematológicas malignas é de um modo geral elevada. Mas verifica-se que existe uma variação significativa nessa frequência quando se comparam diferentes tipos de patologia. As leucemias agudas apresentam uma frequência significativamente maior que a dos síndromes mieloproliferativos. Além disso, ela é também significativamente maior nas leucemias agudas da linha linfoide, comparativamente com as da linha mieloide (Quadro 23). Este facto sugere que 1) a frequência com que ocorrem erros mitóticos é diferente para diferentes tipos de células, 2) ou estes erros ocorrem de igual forma em todas as patologias, mas a selecção vai actuar, mantendo apenas determinados rearanjos cromossómicos, dependentes do tipo de células em causa. Estes poderão assim representar populações celulares

que mais tarde podem sofrer uma transformação clonal. A elevada frequência com que se observam alterações numéricas clonais na LLA, relativamente às outras doenças hematológicas malignas é um dado a favor desta hipótese, pois é precisamente nas leucemias agudas da linha linfoide que se encontrou a maior percentagem de aneuploidias não clonais.

A perda de cromossomas nas células hipodiploides estudadas dá-se de uma forma ao acaso, não dependente do tamanho dos mesmos (Figuras 15, 16 e 17). No entanto, quando se comparam as frequências observadas para diferentes patologias verifica-se que existe uma forte correlação entre elas (Figuras 18 e 19). Com base nestes dados sugere-se que existe uma certa "ordem na distribuição ao acaso", fenómeno este que pode corresponder a uma característica comum às células neoplásicas dos doentes com SMP, LMA e LLA estudadas.

Analisando o padrão de hipodiploidias para os diferentes tipos de patologia verificou-se que para as doenças malignas da linha mieloide (SMP e LMA) os cromossomas dos grupos D e G perdem-se significativamente mais que os restantes, enquanto que na LLA os cromossomas dos grupos E e F perdem-se significativamente mais e os do grupo A significativamente menos que os restantes. Se existe de facto uma certa "ordem na distribuição ao acaso" dos cromossomas envolvidos em hipodiploidia, a selecção pode intervir favorecendo a perda ou manutenção de cromossomas específicos, que será dependente do tipo de patologia ou células em causa. Poder-se-á então pôr a hipótese de que as aneuploidias não clonais, que surgem inicialmente como erros mitóticos casuais, podem levar ao aparecimento de padrões cromossómicos que vão mais tarde, por selecção, ser preferencialmente mantidos de forma específica em diferentes tipos de patologia. O estudo destas aneuploidias ao longo do tempo pode então fornecer informações úteis acerca de eventuais modificações que mais tarde podem originar novos clones celulares. Elas devem, por isso, ser sistematicamente estudadas e não ignoradas.

Será feito futuramente este estudo num maior número de doentes, que permitirá analisar o envolvimento de cromossomas específicos, e não de grupos de cromossomas, nas aneuploidias não clonais das diferentes

doenças hematológicas. Também a utilização de técnicas citogenéticas em núcleos interfásicos, usando probes moleculares num grande número de células (Nederlof *et al.*, 1989), poderá ajudar a clarificar estas situações, mesmo em casos em que não seja possível obter um número suficiente de células em divisão.

5.5. CONCLUSÕES

Neste estudo foi confirmada a importância, como factores de diagnóstico, de determinadas alterações cromossómicas recorrentes associadas a tipos específicos de doenças hematológicas malignas.

Também foi posta em evidência a importância de outras alterações clonais que, embora não apareçam de forma recorrente e específica, podem estar directamente envolvidas no processo de transformação neoplásica.

No entanto foi dada uma atenção especial ao estudo das aneuploidias não clonais, alterações estas que até hoje têm sido pouco valorizadas. A elevada frequência e distribuição destas aneuploidias nas culturas espontâneas de células neoplásicas sugerem que elas são consequência de erros mitóticos, inerentes à própria condição maligna. Foi demonstrado que existe uma variabilidade dessa frequência dependente do tipo de patologia. Também o padrão de hipodiploidias é variável, sendo dependente do tipo de células em causa. Estes dados permitiram pôr a hipótese de que as células aneuploides, que surgem como consequência de erros mitóticos ao acaso, podem estar sujeitas à acção de pressões selectivas que levam à manutenção preferencial de determinados reareanjos cromossómicos. Assim, estas alterações podem ser representativas de populações celulares que mais tarde poderão tornar-se importantes para a evolução tumoral. Devem, pois, ser sempre referidas nos estudos sistemáticos das alterações cromossómicas em indivíduos com doenças hematológicas malignas.

BIBLIOGRAFIA

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1982): Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 51: 189-199.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann Intern Med 103: 626-629.

Casperson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ (1970): Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. Chromosoma 30: 215-227.

First MIC Cooperative Study Group (1986): Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. Cancer Genet Cytogenet 23: 189.

Geraci L, Palka G, Fioritoni G, Iacone A, Stuppia L, Calabrese G, Parruti G, Franchi PG, Berardi A, Arduini A, Torlontano G (1987): Prognostic value of atypical chromosomal changes during chronic myeloid leukemia. Haematologica 72: 515-521.

Heim S, Alimena G, Billström R , Diverio G, Kristoferson U, Mandahl N, Nanni N , Mitelman F (1987): Tetraploid karyotype (92,XXYY) in two patients with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 29: 129.

Heim S, Mitelman F (1987): *Cancer Cytogenetics.* Alan R Liss Inc, New York, pp 23, 70, 126, 147.

ISCN (1978): An international system for human cytogenetics nomenclature. Cytogenet Cell Genet 21: 309-408.

Knutsen T, Bixenman HA, Lawce H, Martin PK (Association of Cytogenetic Technologists Task Force) (1990): Chromosome analysis guidelines-preliminary report. Cytogenet Cell Genet 44: 1-4.

Mc Connell TS , Duncan MH , Foucar K , SWOG Leukemia Cytogenetics Subcommittee (1991): Do random (nonclonal) chromosome abnormalities in bone marrow predict a clone to come? Cancer Genet Cytogenet 53: 257-263.

Mertens F, Johansson B, Heim S, Kristoffersson U, Mitelman F (1991): Karyotypic patterns in chronic myeloproliferative disorders: report on 74 cases and review of the literature. Leukemia 5: 214-220.

Mitelman F (1988): *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer.* Third Edition. Alan R Liss Inc, New York.

Mitelman F (1990) : Patterns of chromosome variation. Em: Obe G,

Natarajan (Eds): *Chromosomal Aberrations. Basic and Applied Aspects.* Springer Verlag Berlin, pp 99.

Nederlof PM, van der Flier S, Raap AK, Tanke HJ, van der Ploeg M, Kornips F, Geraedts JPM (1989): Detection of chromosome aberrations in interphase tumor nuclei by nonradioactive *in situ* hybridization. Cancer Genet Cytogenet 42: 87-98.

Nowell PC (1992): Chromosome abnormalities in myelodysplastic syndromes. Seminars in Oncology 19: 25-33.

Pui C-H, Carroll AJ, Raimondi SC, Land VJ , Crist WM , Shuster JJ , Williams DL, Pullen DJ, Borowitz MJ, Behm FG, Look AT (1990a): Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid <45 line. Blood 5: 1170-1177.

Pui C-H, Crist WM, Look AT (1990b): Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 76: 1449-1463.

Pui C-H, Raimondi SC, Dodge RK, Rivera GK, Fuchs LAH, Abromowitch M, Look AT, Furman WL, Crist WM, Williams DL (1989): Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. Blood 37: 1963-1967.

Rowley JD (1982): Identification of the constant chromosome regions involved in hematologic malignat disease. Science 216: 749.

Seabright M (1971): A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet II: 971-972.

Second MIC Cooperative Study Group (1988): Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Br J Haematol 68: 487-494.

Sokal JE, Gomez GA, Baccarani M, Tura S, Clarkson B D, Cervantes F, Rozman C, Carbonell F, Anger B, Heimpel H, Nissen NI, Robertson JE (1988): Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of philadelphia chromosome-positive chronic granulocytic leukemia. Blood 72: 294-298.

Yunis JJ (1983): The chromosomal basis of human neoplasia. Science 221: 227.

Yunis JJ (1987): Multiple recurrent genomic deletions and duplications are a common feature in most human neoplasias. Em: *Recent Advances in Leukemia and Lymphoma* (Gale RP, Golde DW, Eds.). Alan R Liss Inc, New York, pp 3-21.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES FINAIS

6.1. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste trabalho foi abordado um tema que, embora venha sendo objecto de estudos intensivos ao longo destes últimos anos, está longe de ser um assunto completamente compreendido: o papel das alterações cromossómicas na etiologia e evolução das doenças hematológicas malignas.

O aperfeiçoamento das técnicas citogenéticas tem permitido identificar, cada vez com maior precisão e em maior número, alterações cromossómicas que são características de tipos específicos de doenças hematológicas malignas. No entanto, o sucesso na aplicação destas técnicas está dependente dos métodos básicos de cultura, ou seja, da possibilidade de se obter um número suficiente de células em divisão, que por sua vez está dependente do tipo de patologia em causa. Assim, para optimizar as técnicas a usar em cada doença hematológica, foi feita uma análise comparativa da proliferação de células malignas sujeitas a determinadas variações nas condições de cultura. Os resultados permitiram concluir que se devem utilizar pelo menos três métodos em simultâneo para cada doente (culturas de 24 horas, 48 horas e 24h com tratamento de colchicina durante o tempo total de cultura), pois não existe nenhum que dê consistentemente melhores resultados. Concluiu-se também que para culturas de sangue periférico estimuladas com PHA, a

presença ou ausência de GR vão influenciar o índice de proliferação, conforme o tipo de células em cultura ou o tipo de patologia em causa.

Foi confirmado neste trabalho o valor de determinadas alterações cromossómicas recorrentes no diagnóstico das doenças hematológicas malignas, assim como o papel de outras alterações clonais não recorrentes na progressão tumoral. No entanto, a conclusão principal destes estudos foi a percepção de que as aneuploidias não clonais, consideradas até hoje como alterações não consequentes, podem ter um papel crucial na progressão tumoral, através de selecção positiva para determinados rearranjos cromossómicos, que se podem tornar vantajosos para as células em causa. Por isso, elas devem ser objecto de estudo sistemático durante a evolução da doença.

A importância das aneuploidias não clonais também foi posta em evidencia em situações não malignas, onde se verificou que existe uma manutenção preferencial de determinados cromossomas nas células aneuploides que se encontram em cultura. A principal conclusão destes estudos foi que os cromossomas que são preferencialmente mantidos nas células aneuploides são portadores de genes directamente relacionados com a actividade das células em causa. Estes dados vêm apoiar a hipótese, já apresentada para as células neoplásicas, de que as aneuploidias não clonais, que surgem inicialmente como erros mitóticos casuais, vão originar células cromossomicamente alteradas que, se forem vantajosas para a actividade das células em causa, vão permanecer em cultura. Assim sendo, a análise destes cromossomas preferencialmente retidos poderá fornecer informações úteis acerca de prováveis genes envolvidos na actividade celular.

6.2. PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Em qualquer trabalho científico os resultados dos experimentos, feitos inicialmente com um determinado objectivo, abrem novos caminhos para a

formulação de mais hipóteses e consequentemente execução de novos experimentos. Também neste trabalho foi possível, a partir dos resultados obtidos, planear novos estudos, a ser executados num futuro próximo.

No capítulo 2, a partir de estudos de proliferação de células hematopoiéticas sujeitas a diferentes condições de cultura, foi posto em evidência que as células do sangue periférico de doentes con LLC crescem melhor em culturas de sangue total estimuladas com PHA. Uma vez que este mitogéneo estimula primariamente células T, serão feitas futuramente, para todos os doentes com LLC a estudar, estas mesmas culturas acompanhadas de caracterização fenotípica, a fim de identificar se são realmente as células malignas que se encontram em proliferação. Esta caracterização será feita utilizando citometria de fluxo.

Também no capítulo 2 foi observado que as células do sangue periférico de doentes com AF crescem preferencialmente em culturas na ausência de GR. Serão feitos novos estudos comparativos entre culturas com e sem GR, a fim de verificar se existe uma variação na frequência de quebras espontâneas e induzidas entre estes dois tipos de cultura, tal como foi observado para um caso. Se assim fôr, será investigada mais profundamente a hipótese de que o defeito da actividade da SOD nos GR está relacionado com a etiologia desta doença.

No capítulo 3 foi demonstrado o efeito potenciador dos GR na proliferação das células CD8+. Esta estimulação pode surgir via CD2-LFA3. Para comprovar esta hipótese serão feitas culturas de sangue total na presença de anti-LFA3, a fim de verificar se surge inibição da proliferação das células CD8+.

No capítulo 4 foi posta em evidência uma selecção para os cromossomas envolvidos em aneuploidias não clonais, em culturas onde estas aneuploidias surgem com uma frequência elevada. Para verificar se essa selecção é característica das células em causa, serão feitos novos estudos em mais doentes com os mesmos tipos de patologia. Para demonstrar que essa selecção cromossómica está relacionada com genes que são importantes para a actividade das células em causa, serão feitos

estudos, a nível molecular, da actividade de alguns desses genes seleccionados.

No capítulo 5 foram apresentados os resultados referentes aos estudos cromossómicos de indivíduos com doenças hematológicas malignas, durante um período aproximado de 3 anos, salientando o seu papel como factores de diagnóstico. A continuação destes estudos durante os próximos anos permitirá fazer uma avaliação das alterações cromossómicas como factores de prognóstico nessas doenças.

O estudo do significado das aneuploidias não clonais nas células hematopoiéticas malignas foi valorizado neste trabalho, analizando grupos de cromossomas, dado o ainda pequeno número de dados obtidos. A continuação destes estudos permitirá fazer uma análise da frequência com que cromossomas individuais estão envolvidos nessas aneuploidias, a fim de confirmar se de facto existem diferenças significativas no padrão de hipodiploidia entre tipos específicos de patologias. Os estudos cromossómicos serão complementados com técnicas de citogenética em células interfásicas, utilizando técnicas de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH).

* * *

RESUMO

A importância das alterações cromossómicas no processo de transformação neoplásica foi posta em evidência neste trabalho, utilizando como modelo células de medula óssea e sangue periférico de indivíduos com doenças hematológicas malignas.

Devido à má qualidade e ao baixo índice mitótico espontâneo destas células em cultura, a análise citogenética é muitas vezes de difícil obtenção, dependendo sobretudo do tipo de patologia em causa. Por isso, foi feito um estudo comparativo da proliferação destas células sujeitas a diferentes condições de cultura, estabelecendo-se quais os melhores métodos a aplicar em tipos específicos de doenças hematológicas.

Durante o período de 13 de Junho de 1988 a 21 de Janeiro de 1992 foram estudados 185 indivíduos com doenças hematológicas malignas. Com base nestes dados foi confirmada a importância de determinadas alterações cromossómicas recorrentes como factores de diagnóstico, assim como o envolvimento de outras alterações clonais no processo de transformação neoplásica. No entanto, foi dada uma especial atenção ao estudo das aneuploidias não clonais, alterações estas que até hoje têm sido pouco estudadas. Neste trabalho sugere-se que elas são consequência de erros mitóticos inerentes à própria condição neoplásica, e que por mecanismos de selecção podem mais tarde originar clones cromossomicamente alterados. Assim, o seu estudo sistemático pode fornecer informações úteis acerca da evolução cromossómica das células malignas.

A importância das aneuploidias não clonais também foi posta em evidência em duas situações não malignas onde elas surgem com uma elevada frequência: numa cultura prolongada de células CD8+ e numa cultura de linfócitos de um doente com instabilidade cromossómica. Nestes estudos verificou-se que existe uma selecção para os cromossomas envolvidos nas hipodiploidias, sendo preferencialmente mantidos em cultura cromossomas portadores de genes que estão relacionados com a actividade das células em causa.

SUMMARY

The importance of chromosomal aberrations in the process of neoplastic transformation was put into evidence in this study, using as model bone marrow and peripheral blood cells from individuals with hematological malignancies.

Because of the bad quality and low spontaneous mitotic index of these cells in culture, cytogenetic analysis is sometimes difficult to achieve, depending on the type of disease analysed. A comparative study of the proliferative response of these cells submitted to different culture conditions was performed in order to define the best methods to use in each type of hematological disease.

From 13 June 1988 to 21 January 1992 cytogenetic analyses were performed in 185 patients. In this study it was confirmed the importance of certain recurrent chromosome alterations as diagnostic factors and also the involvement of other clonal aberrations in neoplastic transformation. However, a special relevance was given to the study of nonrandom nonclonal aneuploidies. It is suggested that these aneuploidies are the consequence of mitotic errors inherent in the neoplasic condition and that, by selection, may originate chromosomically altered clones. Their systematic study may therefore give useful information about the chromosomal evolution of malignant cells.

The importance of nonclonal aneuploidies was also studied in two nonmalignant situations where their frequency was very high: in a prolonged culture of CD8+ lymphocytes and in a culture of lymphocytes from a patient with chromosomal instability. In these studies, it was observed a selection of the chromosomes involved in hypodiploidy, being preferentially maintained in culture chromosomes that bear genes related to the activity of the cells in question.

RÉSUMÉ

L'importance des aberrations chromosomiques au cours du proccessus de transformation néoplasique a était mise en évidence dans ce travail, en utilisant comme modèle des cellules de la moelle et du sang périphérique de sujets avec des maladies hématologiques malignes. L'analyse cytogénétique des cellules néoplasiques est souvent difficile à réussir. La difficulté de ces études est liée d'une part au fait que la fréquence des cellules porteuses du remaniement acquis est souvent faible et d'autre part à la qualité fréquemment médiocre des métaphases anormales. Pour cette raison on a fait une étude comparative de la prolifération de ces cellules soumises à différentes conditions de culture, et on a établit les meilleures méthodes à utiliser dans chaque pathologie.

Pendant la période comprise entre le 13 Juin de 1988 et le 21 Janvier de 1992, on a étudié 185 malades avec néoplasies hématologiques. On a confirmé l'importance de certaines anomalies chromosomiques récurrentes comme des facteurs de diagnostique, aussi que la participation d'autres aberrations clonales au cours du processus néoplasique. Mais on a surtout valorisé la présence des aneuploïdies nonclonales, lesquelles sont les moins étudiées jusqu'á présent. Dans ce travail, on suggère qu'elles sont conséquence d'erreurs mitotiques liées à la condition néoplasique et, par mécanismes de sélection elles peuvent, plus tard, occasionner des clones cellulaires chromosomiquement anormaux. Ainsi, l'étude de ces aberrations peut donner des informations utiles concernant l'évolution chromosomique des cellules malignes.

L'importance des aneuploïdies nonclonales a été aussi mise en évidence en deux situations nonnéoplasiques, oú elles ont été observées avec une fréquence élevée: dans une culture de longue durée de cellules CD8+ et dans une culture de lymphocytes d'un malade avec instabilité chromosomique. On a démonstré l'existence d'une sélection pour les chromosomes des cellules aneuploïdes. Les chromosomes qui ont des gènes liés à l'activité des cellules en étude sont préférentiellement maintenus en culture.