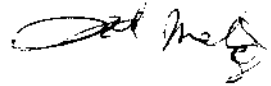


Este exemplar corresponde à
versão final da Tese de Doutorado
apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP pela médica
Helena Zerlotti Wolf Grotto.
Campinas, 30 de outubro de 1990.


HELENA ZERLOTTI WOLF GROTTTO

Profa. Dra. Irene E. H. Lorand-Metze
- orientadora -

REGIÕES ORGANIZADORAS DE NÚCLÉOLO NA HEMATOPOESE
NORMAL E NAS LEUCEMIAS AGUDAS

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ORIENTADOR: PROF. DRA. IRENE LORAND-METZE

CAMPINAS

-1990-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÀS MINHAS FILHAS

ISABELA E BEATRIZ

AGRADECIMENTOS

1. À Prof. Dra. Irene Lorand Metze pela orientação desse trabalho.

2. Aos docentes, funcionários e médicos residentes da Disciplina de Hematologia do Departamento de Clínica Médica e Hemocentro da UNICAMP, pela colaboração na seleção e diagnóstico dos pacientes estudados.

3. Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna e Prof. Dra. Denise Norato pela acessoria estatística e processamento dos dados.

4. À Rute Siqueira Alves e Silvia C. Panebianco pela valiosa colaboração na utilização do microcomputador.

5. Aos colegas docentes do Departamento de Patologia Clínica pelo estímulo.

6. À Prof. Dra. Silvia R. Brandalise, demais funcionários e pacientes do Centro Infantil "Dr. Domingos A. Boldrini" e Hospital A.C. Camargo.

7. Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, amigo sempre presente, grande incentivador do trabalho de investigação na nossa Disciplina, pelo apoio, estímulo e, acima de tudo, pelo exemplo de seriedade e honestidade científicas.

8. À amiga Maria de Fátima Sonati, companheira de luta, pela compreensão e auxílio prestados.

9. À todos os funcionários do Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica, em especial à amiga Maria de Fátima Gilberti, pelo apoio e estímulo.

10. À Srta. Elza M. Kimura pela amizade e valiosa colaboração técnica.

11. Aos meus pais, Celso e Cleide, cujo apoio e auxílio muito contribuíram para a realização desse trabalho.

12. Ao Fernando, Isabela e Beatriz, pela compreensão, tolerância e estímulo.

ERRATA

1. PÁGINA 10, LINHA 19: "...celular (PLOTON et al, 1985).
Na interfase precoce, através da técnica..."

2. PÁGINA 44, LINHA 5: "... a 0,50 para os pontos, sendo as
médias gerais de "clusters" de $2,99 \pm 0,48$ e de pontos de
 $0,16 \pm 0,12$ (Tabela IX e Gráfico III).

3. PÁGINA 51, LINHA 7: "...1,02 para os pontos. As médias
gerais de "clusters" e pontos foram, respectivamente $2,76 \pm$
 $0,68$ e $0,16 \pm 0,22$."

4. PÁGINA 70, LINHA 11: "...Estatisticamente não houve
diferença significativa entre as médias das contagens de
"clusters" dos blastos normais quando comparados aos blastos
leucêmicos, assim como entre os 2 grupos de leucemias
agudas. Quanto aos pontos, a diferença foi estatisticamente
significativa entre blastos normais e blastos de LMA e LLA,
mas não entre os 2 tipos de leucemias."

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	18
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	20
III.1. CASUÍSTICA.....	21
III.2. MÉTODOS.....	25
1. Hemograma.....	25
2. Mielograma.....	25
3. Técnica de Ag-NOR	26
a) Fixação.....	26
b) Coloração.....	27
c) Contracoloração.....	27
d) Montagem.....	27
4. Contagem das Ag-NORs.....	28
4.1. Grupo Controle.....	28
4.2. Grupo de pacientes leucêmicos.....	29
5. Avaliação das Ag-NORs.....	29
6. Análise estatística.....	30
6.1. Grupo controle.....	30
6.2. Grupos de LMA e LLA.....	30
6.3. Reprodutibilidade do método.....	30

IV. RESULTADOS.....	31
IV.1. A M.O. CONTROLE.....	32
1. Série granulocítica.....	32
2. Série eritroblástica.....	37
3. Série megacariocítica.....	42
IV.2. MIELOBLASTOS NO GRUPO CONTROLE.....	43
IV.3. CÉLULAS BLÁSTICAS NA LMA.....	44
IV.4. CÉLULAS BLÁSTICAS NA LLA.....	51
 V. DISCUSSÃO.....	 58
1. A Hematopoese Normal.....	59
2. Ag-NORs nas Leucemias Agudas.....	66
 VI. CONCLUSÕES.....	 79
 VI. RESUMO.....	 82
 VII. SUMMARY.....	 85
 VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 87

I - INTRODUÇÃO

O nucléolo foi descrito pela primeira vez por FONTANA, em 1781. Observando células epidermais de enguia, o autor refere-se ao núcleo como um "corpo oviforme" e ao nucléolo como uma "mancha". Estes e outros dados históricos a respeito dessa pequena estrutura nuclear, constam de uma revisão feita por MONTGOMERY, em 1898, onde o autor relata que, durante o século XIX foram realizados cerca de 700 trabalhos, todos sobre número e volume nucleolares.

Nessa época o nucléolo já era reconhecido como uma estrutura celular típica, que MONTGOMERY descreve como homogênea, de forma esférica, que podia ser corada com soluções ácidas, mas que também tinha caráter basofílico se corado com soluções básicas. OGATA (1883) descreve 2 nucléolos: um ácido, que seria o nucléolo verdadeiro e um básico, que chamou de "cariossoma", constituído de cromatina. Em 1885, ZACHARIAS et al, usando diversos procedimentos de coloração, fazem a diferenciação entre o nucléolo real e os cromossomas.

Os estudos sobre a composição nucleolar datam do início do nosso século, quando RUSICKA (1899) e SIMARRO (1900) descrevem a reação de impregnação pela prata no nucléolo e

CAJAL (1903) relata a presença dos grânulos argentófilos.

Em 1907 HEIDENHAIN constata a presença de uma "bainha cromática" circundando o nucléolo, o que deve ter sido a primeira demonstração da existência da cromatina associada. A relação com a constrição secundária do cromossoma foi demonstrada através da observação do comportamento do nucléolo durante o ciclo celular, por HEITZ em 1931. McCLINTOCK, em 1934, mostrou que o mesmo era organizado numa região específica do cromossoma 6 das células de milho.

Na década de 40 as investigações direccionaram-se para o papel do nucléolo no metabolismo celular e a partir de 1950 para a sua estrutura, estudos esses que têm se acumulado nas duas últimas décadas (dados de revisão feita por GHOSH em 1976).

Atualmente os conhecimentos sobre o nucléolo, no que diz respeito à sua morfologia à microscopia óptica (M. óptica), à ultra-estrutura, composição química e função já estão relativamente definidos. Assim, num núcleo interfásico, o nucléolo à M.óptica apresenta-se como uma estrutura esférica, basófila, com número, tamanho e forma dependentes do organismo, tipo celular e estado fisiológico da célula (GOESSENS, 1984). Assim, em células que possuem núcleo razoavelmente grande e cromatina bem dispersa, os nucléolos são prontamente observados; o que não acontece quando os núcleos são menores e a cromatina condensada, o que contribui para que os nucléolos sejam ofuscados (HAM et CORMACK, 1983).

Não obstante, à Microscopia Eletrônica (M.E.), a sua presença é sempre demonstrada, sendo os seus constituintes distinguíveis através de suas características ultra-estruturais. Desse modo, constituem o nucléolo: os centros fibrilares, o componente fibrilar denso, o componente granular, a cromatina condensada associada e o interstício nucleolar (GOESSENS, 1984).

Os centros fibrilares são constituídos de material fibrilar frouxo, de densidade moderada, envolvido por anéis espessos de material fibrilar denso (HAM et CORMACK, 1983, DERENZINI et al, 1988). Fazem parte da sua composição: proteínas, em especial as proteínas argirofílicas (Ag-NDRs), enzimas envolvidas na formação dos componentes ribossomais maduros do RNA e lípidos (GOESSENS, 1984).

O componente fibrilar denso é composto de fibras de aproximadamente 4 nm de diâmetro associadas aos centros fibrilares, o que sugere uma relação funcional entre os dois componentes. Apresentam regiões de alta densidade, exibindo um aspecto reticulado. Através da digestão com RNase foi demonstrada a presença de RNA no componente fibrilar, além de DNA e de proteínas ácidas argirofílicas, demonstradas após a coloração com prata (BOURGEOIS et al, 1979, GOESSENS, 1984).

O componente granular contém numerosas partículas de 15 nm de diâmetro, irregularmente distribuídas pelo nucléolo, ao redor ou entre o componente fibrilar (GHOSH, 1976, GOESSENS, 1984). Os grânulos são compostos de ribonucleoproteínas (RNP)

e são formados próximos ao componente fibrilar; em seguida são liberados como partículas pré-ribossomais e finalmente transportadas ao citoplasma como subunidades ribossomais (GOESSENS, 1984).

O interstício nucleolar forma áreas esféricas claras de baixa densidade rodeando a massa nucleolar. Possuem grânulos que parecem corresponder a partículas pré-ribossomais maduras, que são estocadas e transportadas nesse interstício (GOESSENS, 1984).

Separando o corpo nucleolar do nucleoplasma encontramos a cromatina nucleolar associada, composta de filamentos conectados a alças de cromatina intranucleolar, que penetram no corpo nucleolar, assim como mantém uma ligação com os centros fibrilares (GHOSH, 1976, GOESSENS, 1984). Como o núcleo, o nucléolo possui uma matriz formada de membrana nuclear residual, ainda com algum complexo de poros, restos de cromatina e do próprio nucléolo e que constituem o seu esqueleto (GOESSENS, 1984).

A principal função do nucléolo é a síntese do RNA ribossomal (RNAr). Os genes nucleolares, que codificam as moléculas de RNAr, estão distribuídos de forma repetitiva ao longo da cromatina distendida do DNA das porções cromossomais correspondentes às constricções secundárias dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos de números 13, 14, 15, 21 e 22 (BEIGUELMAN, 1982, HAM et CORMACK, 1983). Essa constricção é denominada Região Organizadora de Nucléolo (NOR) e está

ativamente engajada na síntese de RNAr durante a interfase (MILLER et al, 1976), e na formação do nucléolo imediatamente após a divisão celular (MCCLINTOCK, 1934). A transcrição em RNA ocorre no componente fibrilar denso (LA COUR et CRAWLEY, 1965, SCHAWARZACHER et WACHTLER, 1983). Usando uridina marcada, o centro fibrilar mostra marcação somente na sua periferia, no limite com o componente fibrilar denso (HERNANDEZ-VERDUN et al, 1980). Conseqüentemente, o componente fibrilar não pode ser dissociado do centro fibrilar, uma vez que juntos constituem uma unidade funcional (GOESSENS, 1984).

O RNAr transcrito como molécula 45 S é metilado e conjugado a proteínas nucleolares específicas, formando um complexo de RNP 80 S, chamado pré-ribossoma (GOESSENS, 1984). A partícula 45 S de RNAr sofre algumas alterações durante o percurso iniciado no componente fibrilar, passando para o componente granular até alcançar o citoplasma. Assim, a molécula inicial é clivada em partículas 18 S e 32 S. A 18 S alcança o citoplasma imediatamente, enquanto a 32 S é convertida em 28 S antes de deixar o nucléolo (TORELLI et al, 1971).

As NDRs têm grande afinidade pela prata, devido a presença de proteínas não-histônicas associadas ao RNAr recentemente transcrito, denominadas Ag-NDRs (HOWELL, 1977). Os primeiros relatos sobre a identificação dessas proteínas datam de 1979. HUBBELL et al (1979) observaram 3 bandas proteicas, através de gel de poliacrilamida, extraídas de

nucléolo de hepatoma de Novikoff: C₂₃ e B₂₃ e uma terceira banda, designada "proteína Ag-NOR" por ter a maior afinidade pela prata. LISCHWE et al (1979), usando o mesmo material e submetendo-o à separação com gel de poliacrilamida bi-dimensional detectaram somente 2 bandas: C₂₃ e B₂₃. Em 1982, WILLIAMS et al relataram que grandes subunidades de RNA polimerase I seriam as responsáveis pela argirofilia das NORs.

A partir da constatação da insolubilidade em ácido e solubilidade em álcali diluído, pôde-se concluir que as NORs possuem uma fração proteica que é essencialmente de natureza não-histônica (BUSCH et ROTHBLUM, 1982). O componente responsável pela redução dos íons Ag⁺ em prata metálica (Ag⁰) parece ser o grupo carboxil das proteínas ácidas envolvidas no processo de transcrição do RNAr (OLERT et al, 1979, SMITH et al, 1988).

A função das proteínas Ag-NORs ainda não está bem esclarecida. Alguns autores defendem que elas estariam envolvidas no agrupamento e processamento do RNA pré-ribossomal (LISCHWE et al, 1979), uma vez que estão associadas ao RNAr recentemente transcrito (HOWELL, 1977). Outros propõem que elas seriam responsáveis pela transferência de partículas de RNP do componente fibrilar para o granular do nucléolo ou fariam parte do complexo de transcrição em RNAr (HUBBELL et HSU, 1977). Mais recentemente tem sido demonstrado que as proteínas argirofílicas têm uma função estrutural, estando provavelmente envolvidas com a manutenção da cromatina

ribossomal na configuração estendida, o que favorece o fenômeno da transcrição (HERNANDEZ-VERDUN et al, 1984, HERNANDEZ-VERDUN et DERENZINI, 1983).

A propriedade dessas proteínas associadas ao RNAr recentemente transcrito de se corarem pela prata, tem possibilitado várias observações a respeito das NORs, tanto no que se refere à sua atividade, como ao seu comportamento durante o ciclo celular. Assim, durante a intérfase, há grande depósito de grânulos de prata no nucléolo (GOESSENS, 1984). A M.E. observa-se que os principais sítios de acúmulo da prata são os centros fibrilares e poucos grânulos são vistos no componente fibrilar denso. Não há coloração no componente granular e nos vacúolos nucleolares. Ao fim da intérfase começa a desagregação do nucléolo e o componente fibrilar denso não é mais visível. A prata acumula-se no centro fibrilar e em algumas estruturas fibrilares espalhadas pelo nucleoplasma (HERNANDEZ-VERDUN et al, 1980).

Durante a prófase, com a desagregação do nucléolo, este diminui de tamanho e se deforma e o componente fibrilar começa a se dispersar, sinal morfológico da parada de síntese do RNA (GOESSENS, 1984). As proteínas Ag-NORs podem ser observadas em parte do componente fibrilar e nas extrusões nucleolares, que ficam em contato direto com os cromossomas, formando estruturas retorcidas na superfície dos mesmos (PLOTON et al, 1985).

Na metáfase pequenas manchas de prata podem ser vistas, correspondentes às proteínas Ag-NORs localizadas sobre cromossomas condensados, somente onde os componentes de RNP fibrilar possuem forma e tamanho irregulares (HERNANDEZ-VERDUN et al, 1980, GOESSENS, 1984, PLOTON et al, 1985). Na anáfase, como na metáfase, a NOR permanece visível, mas com muito pouco depósito de prata (SCHWARZACHER et al, 1978). À M.E. observa-se que as proteínas Ag-NORs formam agregados redondos de 0,1 a 0,2 um de diâmetro, centralmente localizados nos componentes de RNP fibrilares situados na periferia da massa de cromatina. Ao final da anáfase esses agregados de Ag-NORs são dispostos em depressões como pequenas bolsas, sendo que a membrana nuclear em formação está ausente ao nível dessas bolsas (PLOTON et al, 1985).

A telófase é caracterizada pela nucleogênese. O nucléolo surge num locus específico da constrição secundária do cromossoma (GOESSENS, 1984). Através da incorporação da uridina durante a reativação de eritrócito de galinha, foi observado que o nucléolo origina-se no centro fibrilar, que corresponde ao NOR, associado à cromatina condensada. Em seguida aparece o pré-nucléolo, tendo o componente fibrilar marcado, mostrando pela primeira vez a síntese de RNA. Finalmente, no nucléolo desenvolvido, o componente fibrillogranular é diferenciado e os vacúolos nucleolares aparecem. A incorporação da uridina é encontrada nos componentes fibrilar e fibrillogranular do nucléolo (HERNANDEZ-

VERDUN et BOUTEILLE, 1979). Isso reforça a hipótese das fibrilas representarem a origem dos grânulos (HERNANDEZ-VERDUN et al, 1980, GOESSENS, 1984). As proteínas Ag-NORs formam massas esféricas de 0,1 μ m de diâmetro, localizadas centralmente nas estruturas esféricas de RNP fibrilares dispersas na cromatina. Ao final da telófase o nucleoplasma aumenta de volume e os agregados esféricos de proteínas Ag-NORs ficam em contato com a cromatina, podendo ser interpretadas como corpos pré-nucleolares (PLOTON et al, 1985). O aumento de depósito corado pela prata nessa fase do ciclo celular sugere que na telófase as NORs e a transcrição são reativados, produzindo novo material argirofílico (PLOTON et al, 1985, SHWARZACHER et al, 1978).

Na intérfase precoce os corpos pré-nucleolares são maiores, irregulares, menos numerosos e com menos coloração pela prata quando comparados com o núcleo interfásico, uma vez que a grande produção de proteínas Ag-NORs ocorre na intérfase, acompanhando a síntese do RNAr na fase G_2 do ciclo celular (PLOTON et al, 1985). Nessa fase, através da técnica de impregnação pela prata, as proteínas Ag-NORs podem apresentar 3 tipos de configurações: na primeira delas as NORs estão agregadas formando uma estrutura arredondada e solitária, correspondendo ao próprio nucléolo, onde, ultra-estruturalmente, pode ser observado um pequeno Centro Fibrilar circundado por pouco material fibrilar denso e, devido à pequena quantidade de RNP ribossomal processada, escasso

componente granular. A atividade transcricional nessas células é baixa.

Num segundo tipo, as NORs são vistas dentro do nucléolo, como pontos corados inseridos numa matriz nucleolar. O componente fibrilar denso forma uma grande rede, provavelmente correspondendo a NOR totalmente distendida e os Centros Fibrilares são muito pequenos ou ausentes, sugerindo a possibilidade das proteínas em estoque estarem sendo utilizadas para a formação do nucleolonema. Essa configuração é indicativa de estar se iniciando a atividade transcricional.

Finalmente, as proteínas Ag-NORs podem apresentar-se como vários pontos compactos distribuídos pelo núcleo, correspondendo a numerosos Centros Fibrilares rodeados por material fibrilar denso nos quais as NORs estendidas estão localizadas, correspondendo a alta atividade transcricional (SHWARZACHER et al, 1978, RUSCHOFF et al, 1987 CROCKER et al, 1989).

Essa heterogeneidade de apresentação das proteínas Ag-NORs tem causado dificuldade na sua enumeração. Assim, pode-se optar por contar todas as estruturas coradas, mas quando agrupadas em um "cluster" contá-las como uma única estrutura, ou contar cada Ag-NOR como uma unidade ou um ponto corado, independentemente de estar localizado dentro ou fora do nucléolo (CROCKER et al, 1989). Não existe na literatura uma uniformidade nesse procedimento.

Mais recentemente, tem-se associado à contagem das Ag-NORs a determinação, através de estudos morfométricos, da área que ocupam dentro do núcleo. Esses dados têm possibilitado a observação das alterações que ocorrem quando uma célula passa do estado de repouso à estimulada, onde, além da elevação no número, há redução do tamanho dos Centros Fibrilares (DERENZINI et al, 1987). Além disso, pôde-se verificar que em células malignas, as áreas ocupadas pelas Ag-NORs são menores do que nas células benignas correspondentes ou de menor malignidade (CROCKER et EGAN, 1988, DERENZINI et al, 1988).

Com o objetivo de analisar a validade da contagem das Ag-NORs na investigação do grau de proliferação celular, CROCKER et al (1988) compararam os resultados obtidos através da citometria de fluxo para DNA e a contagem do número de Ag-NORs em células de linfoma não-Hodgkin e encontraram uma correlação linear entre o número de Ag-NORs e a porcentagem de células em fase S, sugerindo que o primeiro método complementaria o segundo.

Com a mesma finalidade HALL et al (1988) analisaram o grau de proliferação celular através da imunoreatividade do anticorpo monoclonal Ki-67 que evidencia um antígeno presente no núcleo das células em todas as fases do ciclo, exceto G₀. Os autores observaram uma relação linear entre a porcentagem de células imunoreativas e a contagem de Ag-NORs em células de linfoma não Hodgkin. Portanto, as proteínas ácidas associadas ao RNAr e coradas pela prata poderiam refletir o grau de

proliferação celular.

Dutros fatores que provavelmente estão envolvidos com o comportamento das Ag-NORs nas células seriam o grau de atividade celular, capacidade transcricional, nível de diferenciação celular e ploidia (HUBBELL et al, 1977, SCHWARZACKER et al, 1978, SMETANA et LIKOVSKY, 1984 DERENZINI et al, 1987, UNDERWOOD et GIRI, 1988)

A técnica de Ag-NOR há muito conhecida pelos citogeneticistas na investigação da banda NOR nos cromossomas dos grupos D e G, sofreu algumas modificações (GOODPASTURE et BLOOM, 1975, HOWELL et BLACK, 1980) e tem sido bastante utilizada pelos patologistas, principalmente na tentativa de se diferenciar tumores malignos de benignos, de acordo com o número e/ou morfologia das NORs. Desse modo, foram estudados cortes histológicos de tumores cutâneos (CROCKER et SKILBECK, 1987, EGAN et CROCKER, 1988, LEONG et GILHAM, 1989), linfomas (CROCKER et NAR, 1987, CROCKER et EGAN, 1988, HALL et al, 1988), tumores de mama (SMITH et CROCKER, 1988), de intestino (DERENZINI et al, 1988), de fígado (CROCKER et McGOVERN, 1988), entre outros.

Aparentemente existe uma correlação entre o número de Ag-NOR por célula e o grau de malignidade dos tumores (CROCKER et NAR, 1987, CROCKER et EGAN, 1988, EGAN et al, 1988, HALL et al, 1988). Este dado também tem sido avaliado como parâmetro prognóstico nos tumores (CONTRACTOR et al, 1989, GRIFFITHS et al, 1989).

Os resultados obtidos até o momento, tanto na investigação de células de tumores sólidos como do tecido hematopoético são inconclusivos, tanto no que diz respeito à técnica de impregnação e contagem das Ag-NORs, como na interpretação dos dados obtidos. Analisando o número de Ag-NORs em células hematopoéticas em diversos estágios de diferenciação e maturação, foi possível se estabelecer um declínio gradual no número dos grânulos corados pela prata durante o processo de maturação, tanto da série eritrocítica como granulocítica (SMETANA et LIKOVSKY, 1984). Os autores concluíram que o número de Ag-NORs, que foram contados como pontos individuais, pode ser um marcador da atividade biossintética nucleolar das células sanguíneas em diferenciação e maturação. Resultados semelhantes foram observados por MAMAEV et al (1987), onde, além de quantificar os grãos de Ag-NORs em células normais, compararam as contagens em blastos normais com blastos de leucemia linfóide e não linfóide agudas. Os autores observaram grande heterogeneidade nos valores das Ag-NORs nas células blásticas, com sobreposição dos resultados entre os 2 tipos de leucemias.

ARDEN et al (1989a), utilizando analisador de imagens computadorizado, compararam núcleos interfásicos de células de M.D. de 6 pacientes com Leucemia Linfóide Aguda e 3 indivíduos normais. Além de terem constatado uma forte correlação entre as Ag-NORs metafásicas e interfásicas, houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos.

Os trabalhos que analisam as Ag-NORs somente em células leucêmicas metafásicas são controversos, tanto no que se refere à ocorrência ou não de diferença significativa entre células normais e leucêmicas, como entre os diferentes tipos de leucemias (REEVES et al, 1982, ARDEN et al, 1985, SATO et al, 1986, ARDEN et al, 1989b).

Mais recentemente tem havido uma tentativa de se padronizar as contagens e de se definir as estruturas observadas à M.óptica, a fim de que seja possível a comparação dos dados obtidos dentro e entre os laboratórios que têm trabalhado na investigação das NORs através da impregnação pela prata (HOWAT et al, 1988, SMITH et CROCKER, 1988, CROCKER et al, 1989, RUSCHOFF et al, 1990b).

A agregação das Ag-NORs dentro de um ou mais nucléolos, que dificultam a sua distinção, a intensidade da impregnação que pode obscurecer pequenos pontos corados, o efeito de alguns reagentes utilizados na fixação dos cortes de parafina que podem interferir na reação do grupo carboxil das proteínas não-histônicas e a espessura do corte, tem merecido a atenção dos histologistas e patologistas, já que são importantes fatores envolvidos na variabilidade da técnica e nos conseqüentes resultados obtidos (SMITH et al, 1988, UNDERWOOD et GIRI, 1988, CROCKER et al, 1989).

A possibilidade de algumas Ag-NORs serem sub-estimadas devido a sua posição na célula submetida à secção do bloco de parafina, é minimizada quando o material examinado é

proveniente de uma preparação citológica, onde a célula inteira é observada. Analisando células de efusões pleurais e peritoneais, DERENZINI et al (1989a) obtiveram bons resultados nas contagens de Ag-NORs, possibilitando a diferenciação de células de mesotelioma e adenocarcinoma, de células mesoteliais reativas.

Para a investigação de células hematopoéticas é possível utilizar a técnica da impregnação pela prata em preparações citológicas de M.O., eliminando a possibilidade de parte da célula não ser observada. Do mesmo modo que as contagens de Ag-NORs têm sido amplamente utilizadas na diferenciação de lesões benignas e malignas, inclusive na graduação da malignidade e no prognóstico dos tumores, parece-nos interessante investigar como os Ag-NORs se comportam em diferentes tipos de leucemias agudas.

Alterações na diferenciação e maturação celulares, ritmo de proliferação, grau de ploidia, entre outros, são fatores que, de acordo com os dados de literatura, interferem no número e morfologia das Ag-NORs (SCHWARZACHER et al, 1978, SMETANA et LIKOVSKY, 1984). Uma vez que nas leucemias agudas várias dessas alterações ocorrem, causando uma diversidade de apresentações, com vários sub-tipos de leucemias agudas, seria de interesse verificar se os resultados da investigação das Ag-NORs poderiam colaborar no conhecimento da atividade biológica dessas células, sua classificação e prováveis evolução e prognóstico.

Consoante o exposto, e levando em consideração a escassez de dados na literatura com relação ao estudo das NORs em células interfásicas no tecido hematopoético normal e patológico, especialmente nas leucemias agudas, resolvemos conduzir o presente trabalho.

II- OBJETIVOS

1. Padronizar a técnica de identificação das Ag-NORs em esfregaços de M.O obtidos por punção aspirativa.

2. Caracterizar o padrão de Ag-NOR em células hematopoéticas normais em M.O e correlacioná-lo com a proliferação e diferenciação celulares.

3. Caracterizar o padrão de Ag-NOR em blastos de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e compará-lo com mieloblastos normais, verificando também a possibilidade da técnica de identificação das Ag-NORs ser utilizada como método auxiliar na diferenciação de células blásticas normais e malignas da M.O.

4. Verificar se a técnica de identificação das Ag-NORs pode ser utilizada na diferenciação de blastos de diversas linhagens.

III- CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Para a obtenção dos valores controles do número de Ag-NDRs em células hematopoéticas foram estudados 10 indivíduos adultos, 4 homens e 6 mulheres, atendidos no Serviço de Hematologia do HC-UNICAMP, cujo aspirado de M.O foi realizado para esclarecimento diagnóstico das seguintes doenças: hiperesplenismo (2), estadiamento de linfomas (4), Púrpura Trombocitopênica Idiopática (3) e anemia a esclarecer (1). (Tabela I). Essas alterações não comprometem as características morfológicas normais das células estudadas.

Foram estudados 47 indivíduos portadores de leucemia aguda atendidos no Serviço de Hematologia do HC-UNICAMP, no Centro Infantil de Investigações Hematológicas "Dr. Domingos A. Boldrini" e no Hospital A.C. Camargo (SP). Dos 47 pacientes, 26 apresentavam Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e 21 Leucemia Linfóide Aguda (LLA). (Tabelas II e III). O estudo foi realizado ao diagnóstico, antes que os pacientes fossem submetidos a quimioterapia.

Tabela I: Grupo de pacientes controles.

N.	NOME	IDADE (anos)	SEXO	JUSTIFICATIVA DO ASPIRADO DE M.O.
1	I J S	51	M	Hiperesplenismo
2	C J C M	34	M	Estadiamento de linfoma de Hodgkin
3	D P	54	M	Estadiamento de linfoma de Hodgkin
4	N F C	37	F	Púrpura trombocitopênica Idiopática
5	A A B	62	F	Púrpura trombocitopênica Idiopática
6	J A M	75	M	Investigação de anemia
7	M A R B	58	F	Estadiamento de linfoma de Hodgkin
8	O M C	58	F	Estadiamento de linfoma de Hodgkin
9	C T D	85	F	Púrpura trombocitopênica Idiopática
10	A X	53	F	Hiperesplenismo

Tabela II : Grupo de pacientes com L M A

Nº	NOME	IDADE (anos)	SEXO	Hb (g/dl)	LEUCÓCITOS (x10 ⁹ / mm ³)	Bl no SP %	Bl na MO %	CLASSIFICAÇÃO F A B
1	M G R	70	M	5.5	2.4	18.0	55.0	M 1
2	C J M	63	M	9.6	86.4	67.0	substituída	M 5a
3	A S V	40	F	-	-	-	75.0	M 1
4	J C F	61	M	9.2	19.5	60.0	63.5	M 4
5	A A B	38	M	8.4	39.3	91.0	90.5	M 1
6	M I G	44	F	-	-	-	substituída	M 1
7	T F	-	M	3.4	183.0	72.0	substituída	M 2
8	M Z V	68	F	6.9	4.5	33.0	52.0	M 2
9	K C P	15	F	7.2	98.7	80.0	substituída	M 4
10	A C D C	35	M	8.3	5.2	26.0	66.5	M 1
11	A C M	-	M	13.4	5.6	62.0	substituída	M 4
12	M G	20	M	13.5	71.2	87.0	85.5	M 1
13	J B S	70	M	9.7	9.0	47.0	74.0	M 1
14	C A	30	M	11.4	225.0	96.0	substituída	M 1
15	M E T S	68	F	-	375.0	81.0	substituída	M 5
16	J R	-	M	-	-	-	75.5	M 2
17	M A V B	-	F	-	-	-	substituída	M 2
18	D G R	74	M	-	-	-	substituída	M 1
19	B L G	40	M	8.0	35.0	43.0	56.5	M 2
20	A L C	53	F	6.1	16.9	69.0	75.0	M 1
21	R G P	20	M	10.6	180.0	90.0	70.0	M 2
22	M R M A	34	F	-	-	-	substituída	M 1
23	J L C R	17	M	9.0	4.6	54.0	84.5	M 2
24	F L	86	M	6.7	20.0	2.0	68.0	M 2
25	L S M	22	F	7.0	107.0	82.5	47.0	M 2
26	S C J	-	F	8.2	25.7	61.0	81.5	M 1

Bl = blasto

SP = sangue periférico

Tabela III : Grupo de pacientes com L L A

Nº	NOME	IDADE (anos)	SEXO	Hb (g/dl)	LEUCÓCITOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	B1 no SP %	B1 na MO %
1	A C S	20	M	8.8	19.8	68.0	substituída
2	F R S	6	F	7.6	4.5	26.0	93.0
3	M A F	-	F	-	-	40.0	46.3
4	P R C	34	M	10.9	39.7	75.5	190.0
5	S A C	23	F	8.2	2.1	0.0	substituída
6	C N	-	M	-	-	-	-
7	A N	46	M	9.2	366.0	95.5	substituída
8	C G P	33	F	-	-	40.0	substituída
9	E A R R	19	F	-	-	-	84.0
10	V G B	45	F	-	-	-	-
11	J P	2	F	8.8	13.6	11.0	81.0
12	P H V	9	M	10.9	37.3	91.0	-
13	C Z	3	F	9.4	93.0	94.0	97.0
14	R L A S	3	M	14.2	8.1	57.0	99.0
15	K C P	5	F	5.1	10.6	56.0	98.0
16	H C F	15	M	9.6	13.5	75.0	substituída
17	D B S	11	F	13.6	5.8	19.0	86.0
18	F L C B	14	M	10.0	140.0	90.0	substituída
19	F J F F	7Meses	M	6.7	120.0	90.0	88.0
20	V B	18	M	7.5	7.7	34.0	substituída
21	P G S	4	M	2.4	79.7	90.0	99.0

B1 = blastos

SP = sangue periférico

MÉTODOS

1. Hemograma

Os valores do sangue periférico: contagem de glóbulos vermelhos, leucócitos e plaquetas, dosagem de hemoglobina e determinação do hematócrito, foram obtidos através de contadores eletrônicos marca Coulter, modelos D₂ e T 890.

2. Mielograma

Foi obtido por punção óssea em crista ilíaca posterior ou osso esternal. Após a coloração com Leishman (2,5 g de corante diluídos em 1000 ml de metanol), o esfregaço de M.O foi observado à M.óptica, com objetiva de imersão (100 x), para análise qualitativa e quantitativa dos elementos celulares. Um segundo esfregaço foi submetido à técnica de impregnação argêntica para Ag-NOR.

A classificação das leucemias foi feita de acordo com as normas propostas pelo grupo FAB (BENNETT et al, 1985) e a caracterização das células blásticas foi realizada através das seguintes reações citoquímicas:

- Reação de PAS
- Coloração de Sudan Black B
- Reação de Mieloperoxidase
- Reação de Esterase (alfa-naftol-acetato esterase, ph 7.6) (DACIE et LEWIS, 1984).

3. Técnica de Ag-NOR

A fim de que fosse obtida uma impregnação de boa qualidade, que possibilitasse a distinção das Ag-NORs, sem interferência de artefatos e precipitados de prata e concomitantemente permitisse o reconhecimento dos diversos tipos celulares, foram feitas algumas modificações no método originalmente descrito por GOODPASTURE et BLOOM (1975) e amplamente utilizado pelos citogeneticistas para o reconhecimento da banda NOR. Assim, a metodologia por nós empregada foi:

a) Fixação

Solução de 1 volume de ácido acético:3 volumes de metanol.

Os esfregaços de M.O foram imersos nessa solução por 10 minutos, em seguida retirados para secagem ao ar.

b) Coloração

-Solução de nitrato de prata a 50% em água desionizada.

O nitrato de prata foi dissolvido sob agitação e protegido da luz. Esse procedimento deve ser realizado na hora de uso da solução.

-Solução de gelatina e ácido fórmico: a gelatina foi dissolvida a 2% em água desionizada aquecida. Após o resfriamento da solução, foi acrescentado ácido fórmico a 1%. A solução final foi dividida em alíquotas de 3 ml e guardada em geladeira. Na hora de uso foi novamente dissolvida em banho-maria a 37°C.

As lâminas fixadas e secas foram dispostas em câmara escura e sobre cada esfregaço foram colocadas 4 gotas da solução de nitrato de prata filtrado em filtro Millipore (0,2 μ m) e 2 gotas da solução de gelatina e ácido fórmico. Foi feita uma delicada homogeneização com tubo capilar, a câmara escura foi fechada e colocada em estufa a 56° C por 15 minutos, procedendo-se, então, à lavagem em água desionizada por 10 minutos.

c) Contracoloração

-Hematoxilina de Harris por 45 segundos, seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos.

d) Montagem com resina e lamínula.

4. Contagem das Ag-NORs: realizada à M. óptica, utilizando objetiva de imersão (100 x), seguindo os seguintes critérios:

4.1. Grupo controle

Foram analisados 10 aspirados de M.O. controle. De cada amostra foram contados 30 elementos consecutivos de cada uma das seguintes categorias celulares: mieloblasto, promielócito, mielócito e metamielócito. Foi demonstrado estatisticamente que esse número de células contadas era suficiente para amostrar o tipo celular estudado. Dos bastonetes e neutrófilos segmentados foram contadas 20 células consecutivas, uma vez que o número de Ag-NORs apresentou-se bastante homogêneo.

Da série eritroblástica, sempre que possível, foram contados 30 elementos de cada tipo celular (pronormoblasto, normoblasto basófilo, normoblastos policromatófilo e ortocromático). Eventualmente, não foi possível totalizar as 30 células de um determinado tipo celular, devido à escassez de tal elemento no material analisado. Nesses poucos casos, foram computados os dados obtidos, independente do seu número.

Quanto aos megacariócitos, foi feita uma análise descritiva das Ag-NORs, devido à impossibilidade da contagem individual das mesmas, uma vez que nessas células elas se apresentam como numerosos e diminutos pontos espalhados pelo núcleo. Além disso, o número de megacariócitos por lâmina foi

pequeno e o tamanho e forma do núcleo foram muito variáveis, devido aos diferentes graus de ploidia.

4.2. Grupo de pacientes leucêmicos

Foram estudados 26 pacientes com LMA e 21 com LLA. De cada aspirado de M.O. foram contadas 100 células blásticas consecutivas.

5. Avaliação das Ag-NORs.

Foi feita a distinção entre pontos e "clusters", segundo CROCKER et al (1989). Os pontos corresponderam a 1 Ag-NOR isolado, representado por 1 ponto de coloração bem distinto. Os "clusters" foram definidos como um ou mais pontos, inseridos numa única matriz, formando um agregado de fundo pálido, contornos regulares, com um número variável e nem sempre discernível de pontos (Figuras 1 e 2 dos Resultados). Em cada núcleo celular foram contados o número de pontos e/ou "clusters", separadamente. Optamos por essa padronização de contagem porque, aparentemente, os "clusters" e pontos representam diferentes atividades fisiológicas da célula (CROCKER et al, 1989). Além disso, elimina-se a possibilidade de subestimar o número de pontos inclusos no "cluster", que frequentemente apresentam-se agregados, impossibilitando a sua individualização.

6. Análise estatística

6.1. Grupo controle: foram calculadas a média e desvio padrão do número de "clusters" e pontos de cada tipo celular. Após ter sido constatada a distribuição normal dos dados, as médias foram comparadas através do teste t (Student, 1908).

6.2. Grupos de LMA e LLA: Foram calculadas média e desvio padrão do número de "clusters" e pontos/célula blástica de cada caso. Para a comparação das médias foi usado o teste de Wilcoxon para 2 grupos.

A análise estatística foi realizada através do programa Microstat, em microcomputador PC-SID 502.

6.3. Reprodutibilidade do método: as lâminas de aspirado de M.O. foram avaliadas por 2 observadores, com e sem o auxílio de retículo na lente ocular. As diferenças de contagens foram sempre inferiores a 10%.

IV- RESULTADOS

IV.1. A.M.O. controle

1. Série granulocítica (Fig. 1)

De acordo com os dados da Tabela IV, o mieloblasto apresentou o maior número de "clusters" ($\bar{x} = 3,21 \pm 0.16$), número esse que foi decrescendo à medida que as células se tornavam mais maduras. Metamielócitos, bastonetes e segmentados não apresentaram "clusters". Por outro lado, a média do número de pontos observada por célula foi menor no mieloblasto ($\bar{x} = 0,36 \pm 0.13$), crescendo paulatinamente até mielócito ($\bar{x} = 3,78 \pm 0,27$), onde atingiu o número máximo e novamente decresceu, ficando próximo a 1 nos neutrófilos segmentados (Gráfico I). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre um compartimento celular e o seguinte na escala de maturação, tanto nas médias de "clusters" como de pontos, exceto entre "clusters" de mieloblastos e promielócitos ($p = 0,008$) (tabela V).

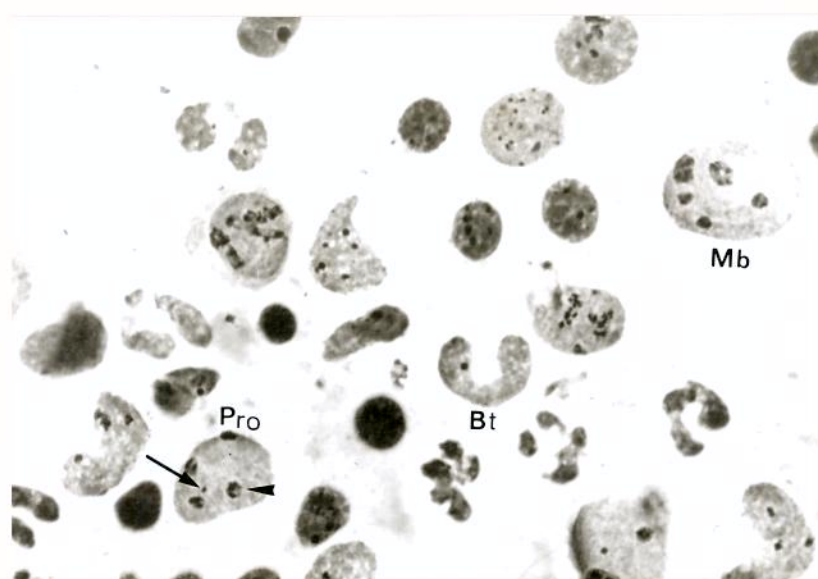


Figura 1: Promielócito (Pro), com 4 "Clusters" (➤) e 1 ponto (●); Mieloblasto (Mb), com 5 "Clusters" e Bastonete (Bt), com 1 ponto. M.O. controle. Técnica de Ag-NOR, 850 x.

Tabela IV : Contagens de Ag-NORs em células da série granulocítica do grupo controle.

TIPO CELULAR	"Clusters"		Pontos	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Mieloblasto	3,21	0,16	0,36	0,13
Promielócito	3,01	0,18	1,11	0,42
Mielócito	0,45	0,20	3,78	0,27
Metamielócito	0	-	2,26	0,41
Bastonete	0	-	1,32	0,15
Segmentado	0	-	0,80	0,14

n = 10

$\bar{x}$ = média

s = desvio padrão

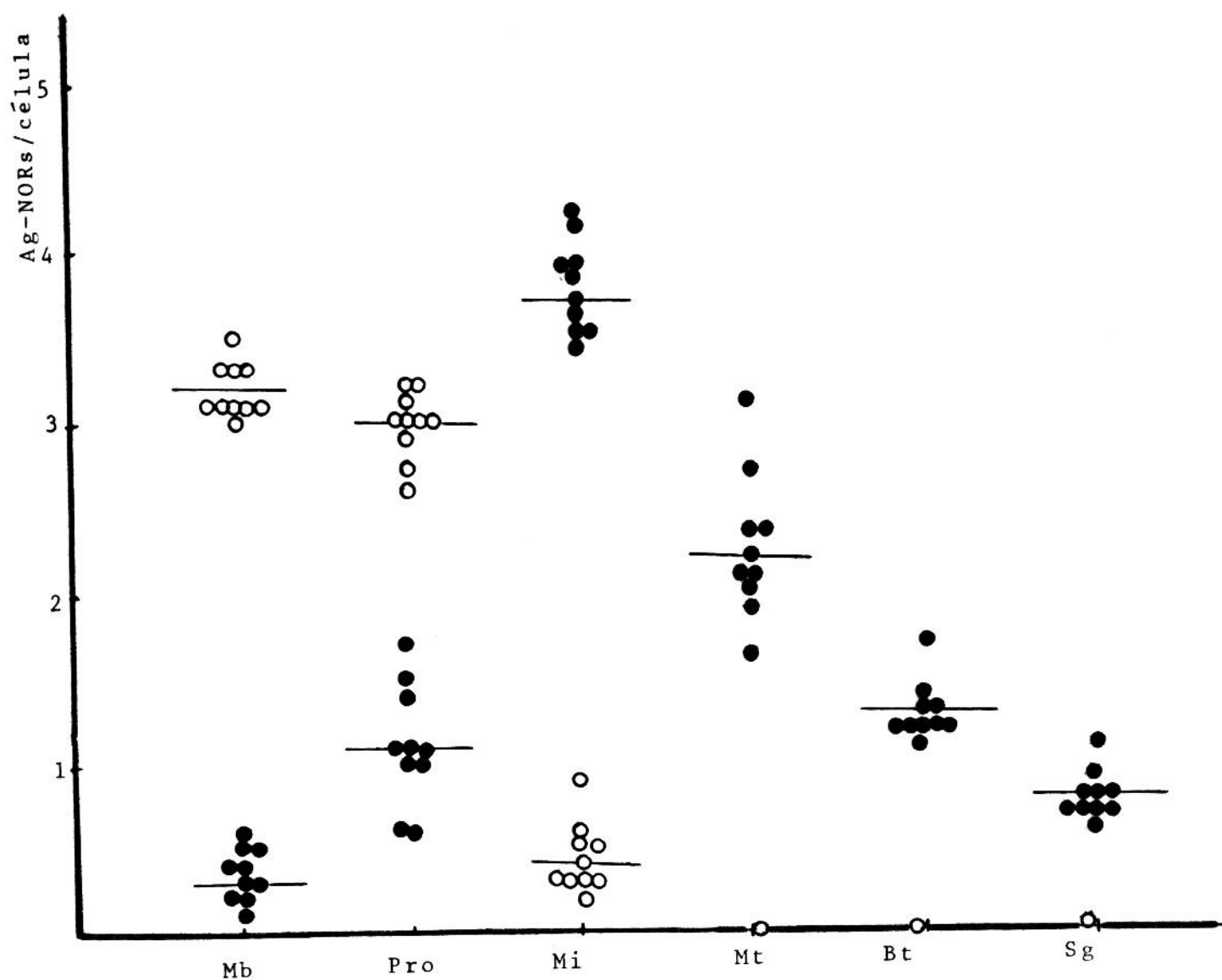


GRÁFICO I: Distribuição das médias de Ag-NORs nas células da série granulocítica do grupo controle.

● PONTOS

○ "CLUSTERS"

Mb: Mieloblasto

Pro: Promielócito

Mi: Mielócito

Mt: Metamielócito

Bt: Bastonete

Sg: Segmentado

Tabela V: Análise estatística para comparação das médias das contagens de Ag-NORs em células da linhagem granulocítica. Teste t (Student).

Células comparadas	"Clusters"	pontos
Mb x Pro	t = 2,62; p=0,008	t = 6,33; p<0,001
Pro x Mielo	t = 29,37; p<0,001	t = 18,28; p<0,001
Mielo x Meta	-	t = 9,65; p<0,001
Meta x Bastão	-	t = 6,69; p<0,001
Bastão x Seg.	-	t = 7,74; p<0,001

Mb : mieloblasto
 Pro : promielócito
 Mielo : mielócito

Meta : metamielócito
 Bastão: bastonete
 Seg.: segmentado

2. Série eritroblástica (Fig. 2)

A distribuição de "clusters" e pontos nas células da linhagem eritroblástica obedeceu ao mesmo padrão da série granulocítica, ou seja, os "clusters" foram observados em maior número nos pronormoblastos ($\bar{x} = 3,87 \pm 0,40$), decrescendo esse valor à medida que as células tornavam-se mais maduras, estando ausentes nos normoblastos ortocromáticos. As contagens de pontos tiveram um comportamento inverso, uma vez que os mesmos foram mais numerosos nas células mais maduras, com contagens máximas nos normoblastos policromatófilos ($\bar{x} = 3,81 \pm 0,21$) (Tabela VI e Gráfico II). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre um estágio de maturação e o seguinte, tanto no que diz respeito às médias das contagens de "clusters" como de pontos, excetuando-se a comparação das médias de "clusters" dos normoblastos policromatófilos e ortocromáticos (ambos próximos de zero), onde a diferença não foi significativa (Tabela VII).

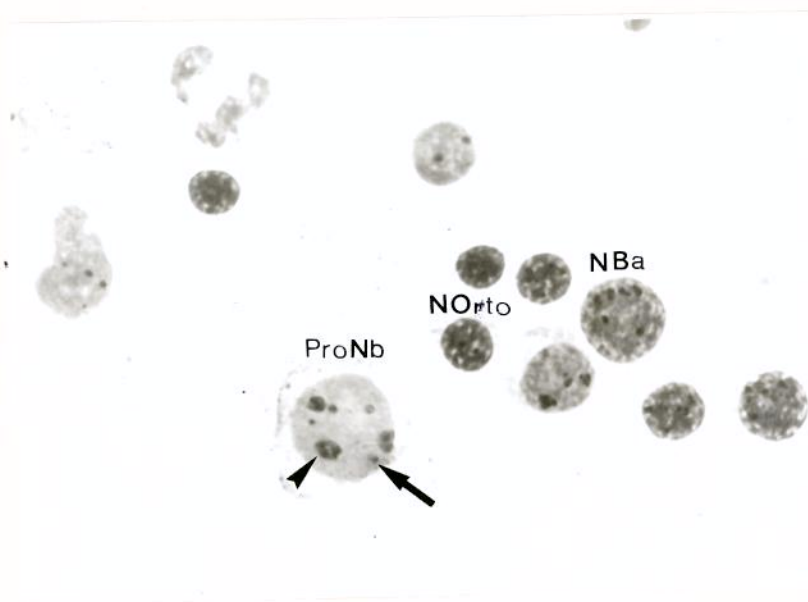


Figura 2: Pronormoblasto (ProNb), com 3 "Clusters" (➤) e 4 pontos (➡), Normoblasto Basófilo (NBa), com 3 "Clusters" e 2 pontos e Normoblasto Ortocromático (NOorto) com 2 pontos M.O. controle. Técnica de Ag-NOR, 850 x.

Tabela VI : Contagens de Ag-NDRs em células da série eritroblástica do grupo controle.

TIPO CELULAR	"Clusters"		Pontos	
	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
Pronormoblasto	3,87	0,40	0,72	0,37
Normoblasto basófilo	3,07	0,49	2,21	0,41
Normoblasto policromatófilo	0,01	0,03	3,81	0,21
Normoblasto ortocromático	0	0	2,35	0,38

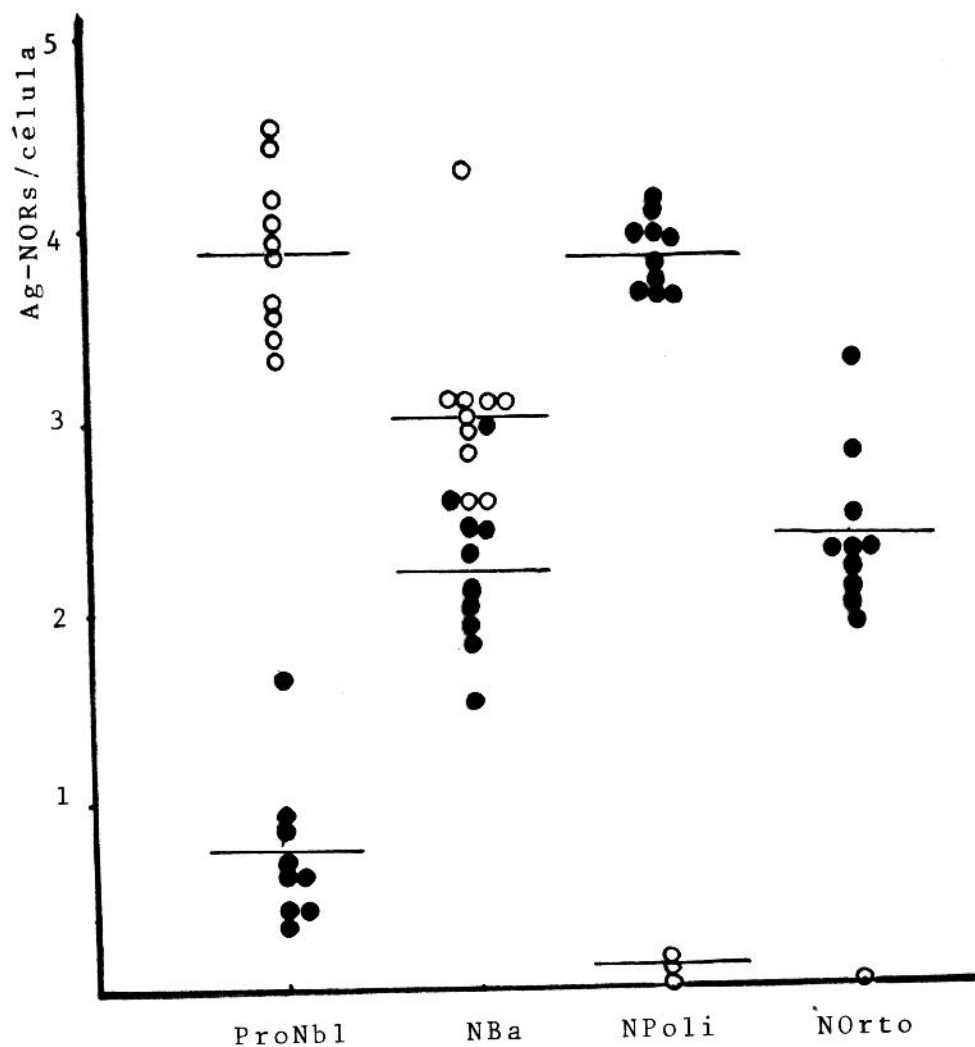


GRÁFICO II: Distribuição das médias de Ag-NORs nas células da série eritroblástica do grupo controle.

● PONTOS

○ "CLUSTERS"

ProNbl: Pronormoblasto

NBa: Normoblasto basófilo

NPoli: Normoblasto policromatófilo

NOrto: Normoblasto ortocromático

Tabela VII : Análise estatística para comparação das médias das contagens de Ag-NORs em células da linhagem eritroblástica. Teste t (Student).

Células comparadas	"Clusters"	pontos
ProNbl x NBa	t = 3,98; p < 0,001	t = 8,46; p < 0,001
NBa x NPoli	t = 19,71; p < 0,001	t = 10,93; p < 0,001
NPoli x NOrto	t = 1,28; p = 0,21 * n.s.	t = 10,41; p < 0,001

* n.s. = não significativo

ProNbl : pronormoblasto
 NBa : normoblasto basófilo
 NPoli : normoblasto policromatófilo
 NOrto : normoblasto ortocromático

3. Série megacariocítica

Como pode ser observado na Figura 3, os megacariócitos caracterizaram-se por apresentar numerosas Ag-NORs, na forma de pontos espalhados pelo núcleo, tornando difícil a individualização e conseqüente contagem dos mesmos. Em vista disso, essas células foram observadas somente qualitativa e não quantitativamente.

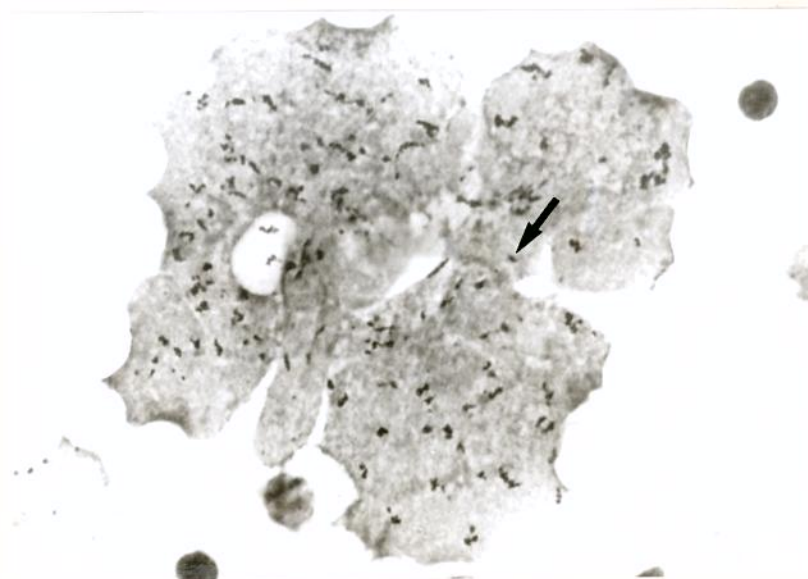


Figura 3: Megacariócito apresentando numerosos pontos (→) de Ag-NORs dispersos pelo núcleo.

M.O. controle. Técnica de Ag-NOR, 850 x.

IV.2 Mieloblastos no grupo controle

Na Tabela VIII estão representadas as médias de contagens de Ag-NORs obtidas em 10 esfregaços de M.O controle.

Tabela VIII : Contagem de Ag-NORs em células blásticas do grupo controle.

PACIENTE N.	"Clusters"		Pontos	
	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
1	3.11	1.17	0.50	0.86
2	3.33	1.47	0.30	0.65
3	3.10	1.18	0.56	0.93
4	3.30	1.17	0.40	0.62
5	3.13	1.33	0.50	0.90
6	3.10	1.32	0.40	0.67
7	3.30	1.29	0.26	0.58
8	3.03	1.35	0.30	0.65
9	3.56	1.30	0.20	0.48
10	3.13	1.13	0.16	0.46
n = 10	3.20	0.16	0.36	0.13

IV.3. Células blásticas na LMA (Fig.4)

Tanto as contagens de "clusters" como as de pontos mostraram grande heterogeneidade de resultados, com valores de média que variaram de 1,90 a 3,77 para os "clusters" e de 0,05 a 0,50 para os pontos (Tabela IX e Gráfico III).

Além da heterogeneidade quantitativa, foram observados também padrões morfológicos diversos de "clusters", tanto no que diz respeito ao tamanho como quantidade de pontos e individualização ou não dos mesmos dentro dos "clusters". Essas diversificações morfológicas aparentemente não estão correlacionadas com a classificação das LMA pelo critério FAB ou com outras variáveis, como número de leucócitos ou blastos no sangue periférico.

As médias obtidas das contagens de "clusters" e pontos foram submetidas ao teste de correlação com o número de leucócitos e blastos observados no sangue colhido na mesma ocasião em que foi feita a punção de M.O. Todas as correlações foram negativas, com os seguintes valores:

- Correlação "clusters" x leucócitos: $r = -0,0708$
- Correlação "clusters" x blastos: $r = -0,0925$
- Correlação pontos x leucócitos: $r = -0,203$
- Correlação pontos x blastos: $r = -0,1836$

Dos 26 pacientes avaliados quanto ao número de Ag-NORs, em 21 foi possível o levantamento das pastas e a verificação do número de leucócitos no sangue periférico. Na tabela X estão relacionados os pacientes estudados, com as respectivas contagens e a classificação das leucemias pelo critério FAB. Nesse grupo foi realizado o teste de correlação entre "clusters" e leucócitos. Subdividindo o grupo entre os pacientes com leucócitos superiores e inferiores a $30000/\text{mm}^3$ e comparando-se as médias de "clusters" dos 2 sub-grupos, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,452$). Do mesmo modo, agrupando os casos classificados como M_1 e M_2 , onde há pouca diferenciação celular e os M_3 e M_4 , onde existe diferenciação e comparando-se as médias de "clusters" dos 2 grupos, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,4569$).

Comparando as médias gerais (Tabela XI), foram observadas menores valores na LMA, tanto nas contagens de "clusters" ($\bar{x} = 2,99 \pm 0,48$) como na de pontos ($\bar{x} = 0,16 \pm 0,12$) quando comparados com os normais ("clusters": $\bar{x} = 3,20 \pm 0,16$; pontos: $\bar{x} = 0,35 \pm 0,13$). Estatisticamente não foi significativa a diferença entre os "clusters", entretanto, entre pontos de blastos normais e leucêmicos houve diferença ($p < 0,001$) (Tabela XII).

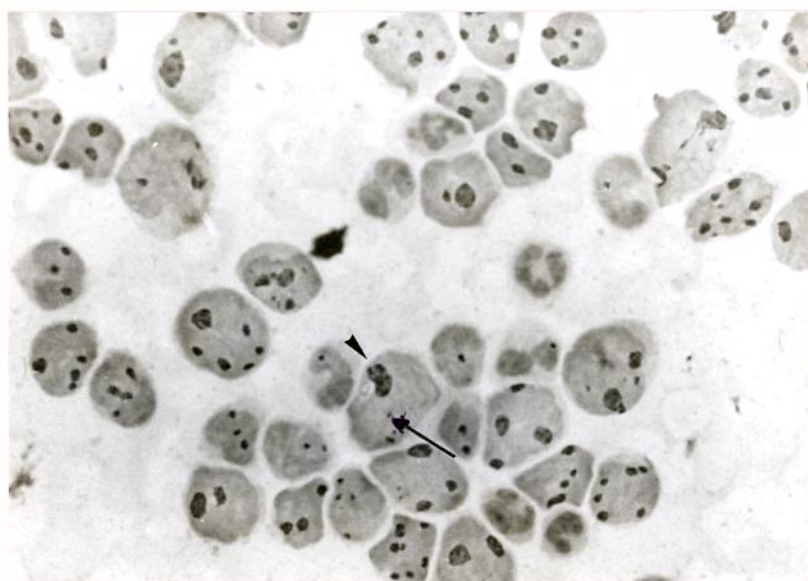


Figura 4: Blastos apresentando "clusters" (➤) e pontos (↔)
Aspirado de M.O. LMA. Técnica de Ag-NOR, 850 x.

Tabela IX : Contagem de Ag-NORs/célula blástica
em esfregaços de M.O. na L M A.

PACIENTE Nº	$\bar{X}$ "Clusters"	S	$\bar{X}$ pontos	S
1	2.43	1.18	0.13	0.41
2	3.77	1.00	0.10	0.36
3	2.60	1.00	0.08	0.36
4	3.59	1.19	0.30	0.62
5	3.34	1.08	0.50	0.94
6	2.46	0.93	0.08	0.27
7	3.22	0.91	0.05	0.21
8	2.98	1.10	0.14	0.44
9	3.23	1.10	0.11	0.44
10	3.75	1.13	0.08	0.30
11	2.69	1.13	0.28	0.66
12	2.78	1.07	0.17	0.47
13	3.38	1.08	0.14	0.42
14	2.71	0.91	0.48	0.77
15	2.85	0.89	0.11	0.31
16	2.92	1.04	0.08	0.27
17	3.83	1.18	0.21	0.43
18	2.05	1.04	0.07	0.25
19	3.07	1.03	0.11	0.34
20	2.73	1.08	0.06	0.27
21	3.09	1.08	0.14	0.42
22	1.90	0.80	0.37	0.74
23	3.02	1.06	0.05	0.21
24	3.37	1.26	0.21	0.40
25	3.20	1.17	0.06	0.23
26	2.92	1.07	0.12	0.38
n = 26	2.99	0.48	0.16	0.12

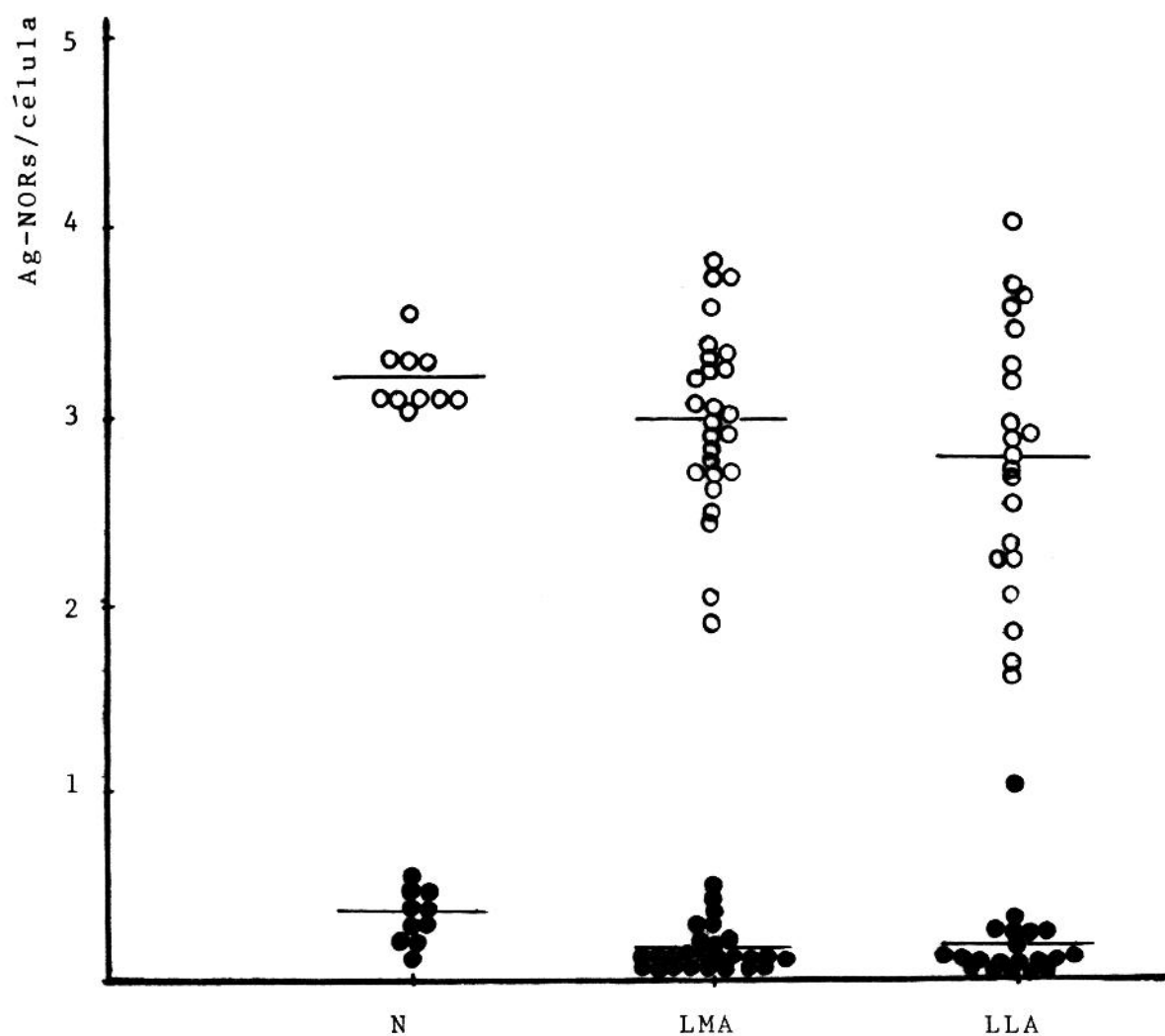


GRÁFICO III: Médias de "clusters" e pontos observados em blastos normais (N), nas Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Linfóide Aguda (LLA).

● PONTOS

○ "CLUSTERS"

Tabela X : Contagens de leucócitos no SP, "Clusters" em blastos
da M.O. e classificação FAB dos pacientes com L.M.A.

Nº	NOME	IDADE (anos)	LEUCÓCITOS (/mm ³)	"Clusters" ($\bar{x} \pm s/100$ células)	CLASSIFICAÇÃO F A B
1	M G R	70	2400	2,43 $\pm$ 1,18	M 1
2	C J M	63	86400	3,77 $\pm$ 1,00	M 5
3	J C F	61	19500	3,59 $\pm$ 1,19	M 4
4	A A B	38	39300	3,34 $\pm$ 1,08	M 1
5	T F	-	183000	2,61 $\pm$ 1,03	M 2
6	M Z V	68	4500	2,98 $\pm$ 1,10	M 2
7	K C P	15	98700	3,23 $\pm$ 1,10	M 4
8	A C D C	35	5200	3,75 $\pm$ 1,13	M 1
9	A C M	-	5600	2,69 $\pm$ 1,13	M 4
10	M G	20	71200	2,78 $\pm$ 1,07	M 1
11	J B S	70	9000	3,38 $\pm$ 1,08	M 1
12	C A	30	225000	2,71 $\pm$ 0,91	M 1
13	N E T S	68	375000	2,85 $\pm$ 0,89	M 5
14	B L G	40	35000	3,07 $\pm$ 1,03	M 2
15	A L C	53	16900	2,73 $\pm$ 1,08	M 1
16	R G P	20	180000	3,09 $\pm$ 1,08	M 2
17	J L C R	17	4600	3,02 $\pm$ 1,06	M 2
18	F L	86	20000	3,37 $\pm$ 1,26	M 2
19	L S M	22	107000	3,20 $\pm$ 1,17	M 2
20	S C J	-	25700	2,92 $\pm$ 1,07	M 1

Tabela XI : Médias gerais das contagens de Ag-NORs
("Clusters" e Pontos) em células blásticas
de M.O.

	N	"Clusters"		Pontos	
		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
NORMAL	10	3,20	0,16	0,35	0,13
L M A	26	2,99	0,48	0,16	0,12
L L A	21	2,76	0,68	0,17	0,22

Tabela XII : Análise estatística para comparação das médias
das contagens de Ag-NOR em células blásticas
(teste de Wilcoxon).

Grupos comparados	"Clusters"	pontos
N x L M A	Z = 1,519; p=0,064 * n.s.	Z = 3,461; p<0,001
N x L L A	Z = 1,775; p=0,038 * n.s.	Z = 3,359; p<0,001
L M A x L L A	Z = 1,177; p=0,119 * n.s.	Z = 0,610; p=0,271 * n.s.

* n.s. = não significativo

IV.4. Células blásticas na LLA

Como pode ser observado na Tabela XIII e no Gráfico III, as médias das contagens de "clusters" e pontos em células blásticas de M.O provenientes de pacientes com LLA, apresentaram uma distribuição bastante heterogênea, com valores variando de 1,62 a 4,01 para os "clusters" e de 0,02 a 1,02 para os pontos.

Morfologicamente foi possível observar que alguns casos foram caracterizados pela predominância de 1 dos seguintes padrões de "clusters": no 1º deles células com poucos "clusters" e no 2º células apresentando-os numerosos "clusters" e pontos (Figuras 5 e 6).

Ao contrário do observado na LMA, foi obtida uma pequena correlação positiva ($r=0,25$) entre as médias de "clusters" e pontos nos blastos de LLA, assim como foram positivas as correlações entre:

- "clusters" x leucócitos: $r=0,453$
- "clusters" x blastos: $r=0,444$

As correlações entre pontos e blastos e entre pontos e leucócitos, embora positivas, mostraram valores muito baixos ($r=0,036$ e $0,0470$, respectivamente).

Considerando como fator prognóstico o número de leucócitos no sangue periférico (tabela XIV), os pacientes foram subdivididos em 2 grupos: baixo risco (<25000 leucócitos/mm³ de sangue) e alto risco (>25000 leucócitos/mm³ de sangue). Dos 21 pacientes avaliados quanto ao número de Ag-NORs nas células blásticas, somente 16 foram submetidos à análise de correlação com o número de leucócitos, devido ao extravio dos prontuários necessários à coleta dos dados. Comparando as médias de "clusters" em blastos da M.O. dos 2 grupos, baixo e alto risco, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,008$).

As médias de "clusters" e pontos foram menores na LLA ($\bar{x} = 2,76 \pm 0,68$ e $\bar{x} = 0,16 \pm 0,22$, respectivamente) quando comparadas aos normais ($\bar{x} = 3,20 \pm 0,16$ para os "clusters" e $\bar{x} = 0,35 \pm 0,13$ para os pontos) (Tabela XI). Essas diferenças, não foram estatisticamente significativas quanto aos "clusters", mas foram significativas quanto aos pontos ($p < 0,001$).

As diferenças de contagens de Ag-NORs não foram estatisticamente significativas entre os 2 tipos de leucemias (Tabela XII).

Os gráficos IV e V representam a distribuição das frequências das médias de "clusters" e pontos nos 3 grupos estudados. Como pode ser observado, no grupo normal 90% dos casos tiveram seus valores de "clusters" entre 3,0 e 3,5/célula, enquanto nos 2 grupos com leucemia essa

distribuição teve um intervalo de variação bastante alargado. Adicionalmente, na distribuição dos pontos, a frequência das médias foi bastante heterogênea nos 3 grupos estudados, havendo uma tendência a se concentrarem em valores menores do que 0,30 nas leucemias e valores maiores do que esse no grupo normal.

Tabela XIII : Contagem de Ag-NDRs em células blásticas em esfregaços de M.O. na L L A.

PACIENTE		"Clusters"		Pontos	
N.		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
1		1.62	0.67	0.09	0.28
2		1.69	0.69	0.17	0.40
3		2.25	0.83	0.11	0.31
4		4.01	1.09	0.13	0.39
5		2.55	0.97	0.34	0.63
6		2.21	0.80	0.02	0.14
7		3.59	1.60	0.01	0.10
8		3.20	0.92	0.03	0.17
9		2.66	0.91	0.09	0.28
10		1.84	0.86	0.07	0.25
11		2.73	1.07	0.25	0.70
12		2.94	1.13	0.21	0.51
13		2.88	0.86	0.21	0.53
14		3.29	1.23	0.20	0.49
15		2.89	0.99	0.03	0.22
16		2.30	0.79	0.03	0.17
17		2.06	0.80	0.12	0.40
18		3.56	1.24	1.02	1.12
19		3.68	1.08	0.08	0.27
20		3.47	1.16	0.25	0.45
21		2.60	1.13	0.08	0.27
n = 21		2.76	0.68	0.17	0.22

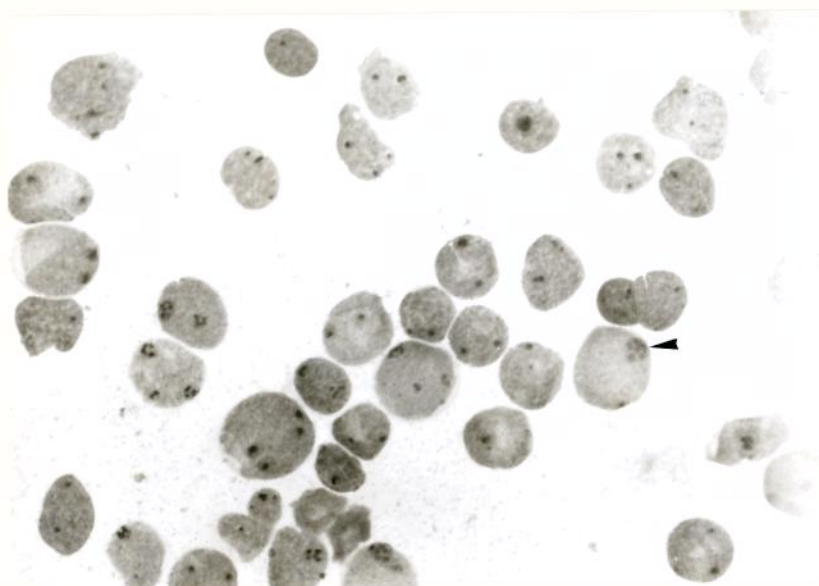


Figura 5: Blastos na LLA, apresentando poucos "clusters" (►)
Aspirado de M.O. Técnica de Ag-NDR, 850 x.

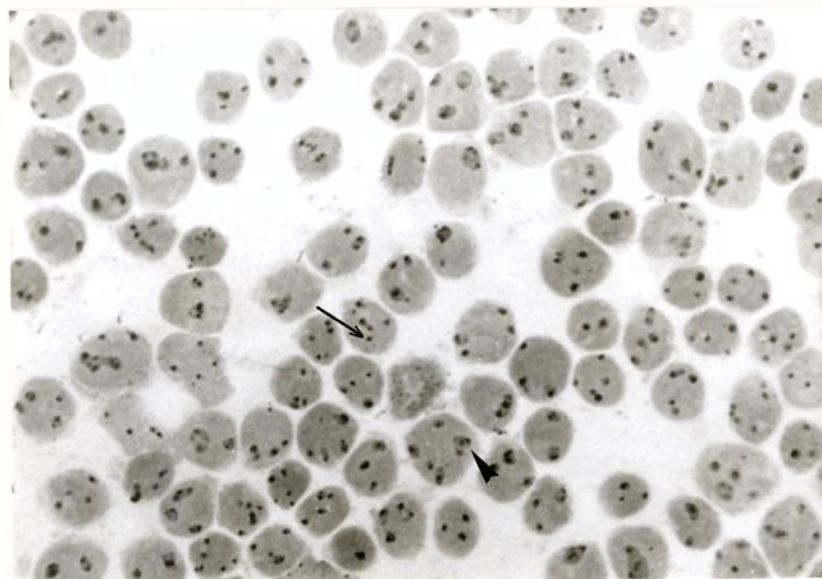


Figura 6: Blastos na LLA, apresentando vários "clusters" (►)
e pontos (→).
Aspirado de M.O.. Técnica de Ag-NDR, 850 x.

Tabela XIV: Contagem de leucócitos no SP e de "Clusters" em blastos da M.O. em paciente com L.L.A.

N.	NOME	IDADE	LEUCÓCITOS	"Clusters"
		(anos)	(/ mm ³)	($\bar{x} \pm s / 100$ células)
1	F R S	6	4500	$1,69 \pm 0,69$
2	S A C	23	2100	$2,55 \pm 0,97$
3	J P	2	13600	$2,73 \pm 1,07$
4	R L A S	3	8100	$3,29 \pm 1,23$
5	K C P	5	10600	$2,99 \pm 0,99$
6	H C F	15	13500	$2,30 \pm 0,79$
7	D B S	11	5800	$2,06 \pm 0,80$
8	V B	18	4700	$3,47 \pm 1,16$
9	A C S	20	19800	$1,62 \pm 0,67$
10	P R C	34	39700	$4,01 \pm 1,09$
11	A N	46	366000	$3,59 \pm 1,60$
12	P H V	9	37300	$2,94 \pm 1,13$
13	C Z	3	93000	$2,88 \pm 0,86$
14	F L C B	14	140000	$3,56 \pm 1,24$
15	F J F F	7 meses	120000	$3,68 \pm 1,08$
16	P G S	4	79700	$2,63 \pm 1,13$

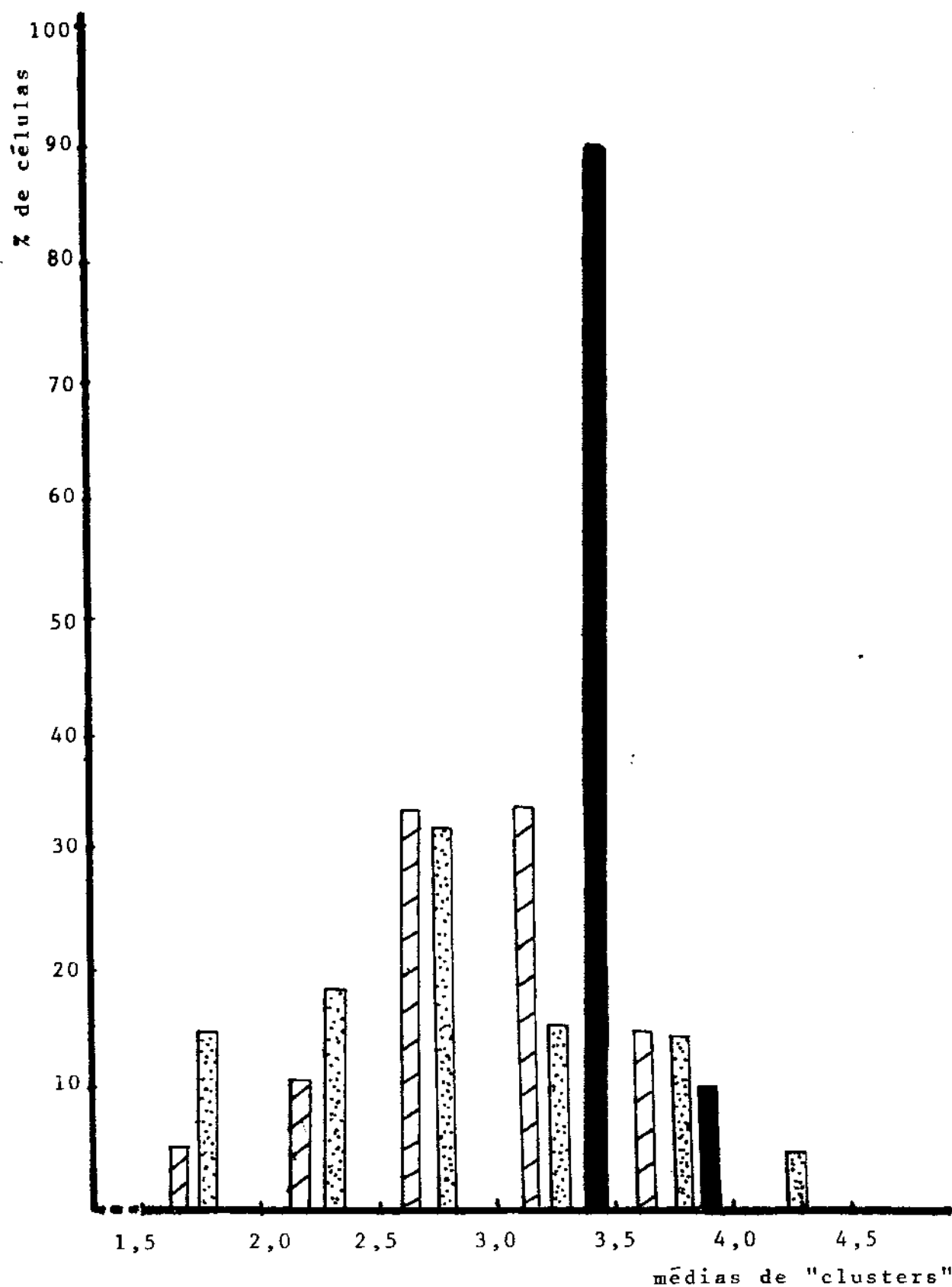


GRÁFICO IV: Distribuição das frequências das médias de "clusters" de Ag-NORs em células blásticas nos grupos controle, LMA e LLA



CONTROLE



LMA



LLA

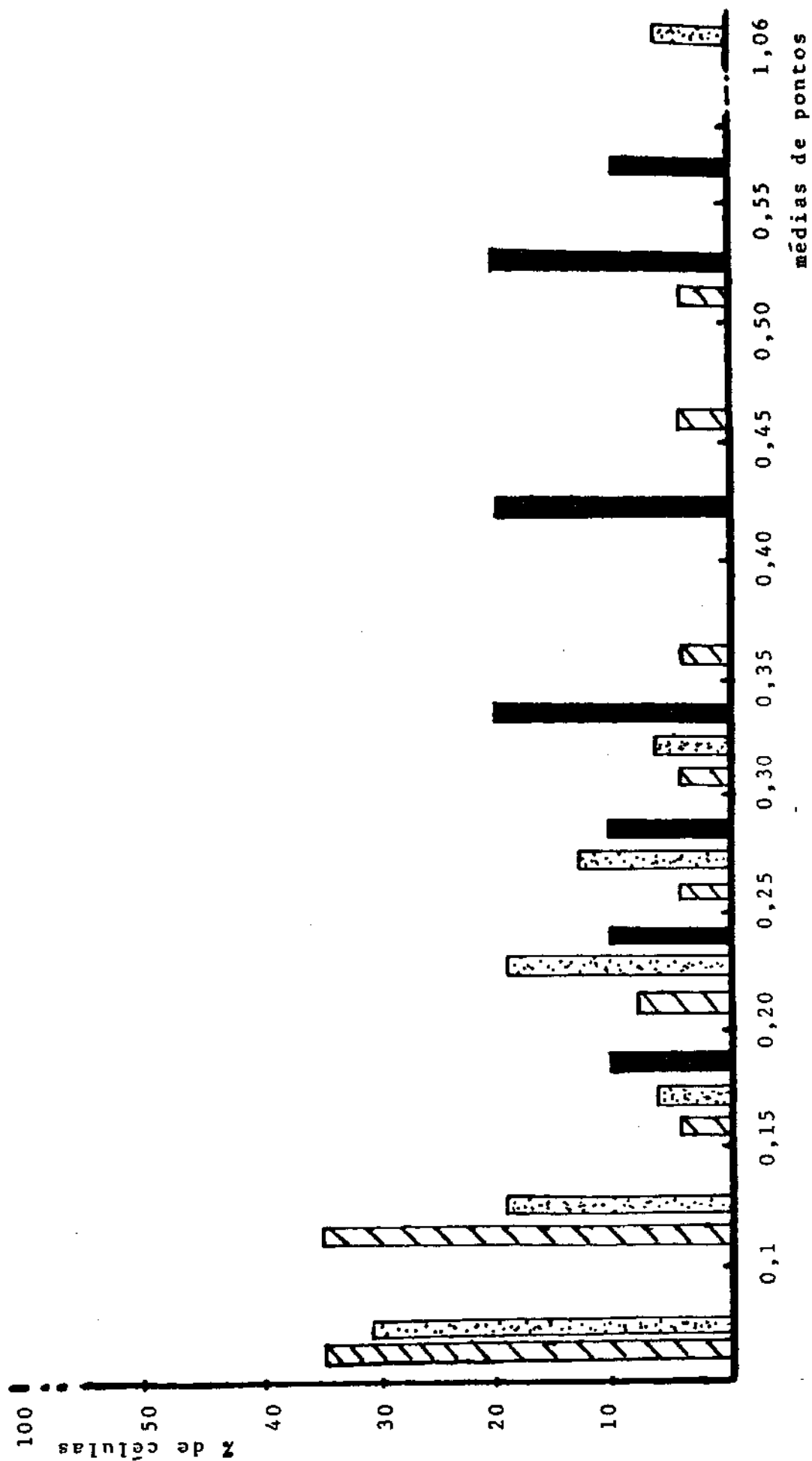


GRÁFICO V : Distribuição das frequências das médias de pontos de Ag-NORs em células blásticas nos grupos controle, LMA e LLA.

V- DISCUSSÃO

1. A HEMATOPOESE NORMAL

Observando diferentes células das séries eritroblástica e granulocítica do grupo controle, pudemos verificar a presença dos 3 tipos de distribuição de Ag-NORs descritos por CROCKER et al (1989): o primeiro seria representado por um agregado de NORs, formando uma estrutura arredondada e solitária, correspondendo ao próprio nucléolo. Esse padrão pode ser observado nos linfócitos ou outras células em repouso. Um segundo tipo seria representado pelas NORs no interior do nucléolo de células em proliferação, podendo ser visualizados pontos isolados dentro de uma matriz nucleolar ("cluster"). Finalmente, o terceiro tipo, freqüentemente observado em células malignas, apareceria como pequenas Ag-NORs dispersas livremente pelo núcleo. No presente trabalho, nos precursores mais imaturos de ambas as séries, foi característica a presença de pontos de Ag-NORs dentro de uma matriz, formando "clusters", embora houvesse diferenças quanto ao número e tamanho dos mesmos. Nos pronormoblastos estes eram maiores e em número mais elevado quando comparados com os mieloblastos.

Com a maturação celular o número de "clusters" declinou, dando lugar a pontos pequenos e dispersos dentro do núcleo, até que nas células que sabidamente não sofrem mais divisão

celular, a média de pontos ficou próxima de 1 na série granulocítica e de 2 na série eritroblástica.

Os mielócitos e os eritroblastos policromatófilos apresentaram as maiores contagens de pontos ($\bar{x} = 3,78 \pm 0,27$ e $\bar{x} = 3,81 \pm 0,21$, respectivamente). Curiosamente, o mielócito é a última célula do compartimento mitótico dos granulócitos e a que sofre maior número de divisões, tornando o "pool" de mielócitos até 4 vezes maior que o de promielócitos, além de ser ativa a síntese de componentes dos grânulos específicos citoplasmáticos (GOLDE, 1983). O normoblasto policromatófilo, embora possa sofrer divisão celular, tem como função principal a síntese de hemoglobina (BESSIS et al, 1983). Portanto, essas 2 células ainda se dividem, mas a síntese de componentes citoplasmáticos é intensa. Esta atividade celular foi acompanhada de poucos "clusters" e muitos pontos.

Adicionalmente, sabe-se que tanto o mielócito como o normoblasto policromatófilo não apresentam nucléolo à M.óptica. Os pontos corados pela prata podem ser resultantes da dissociação com posterior fragmentação do nucléolo. Segundo THAM et al (1989) o fator mais importante que afeta o número de Ag-NDRs é a associação e dissociação nucleolares.

A relação das NDRs com o processo de diferenciação celular foi observada em linfócitos mantidos em cultura e estimulados com fitohemaglutinina. Foi possível verificar que o número e o tamanho das áreas coradas pela prata aumentavam à medida que se estendia o tempo de exposição ao agente estimulante (ARRIGHI et

al, 1980), assim como foi observado que nos diferentes estágios de transformação do linfócito em célula blástica, havia um sincronismo entre a ativação e o tamanho da massa nucleolar corada pela prata. Células blásticas mostraram grandes áreas prata positivas, enquanto que no linfócito não ativado essas áreas eram diminutas (SCHWARZACHER et al, 1978).

Os hormônios participam da regulação da atividade dos genes RNAr, estimulando a sua síntese. DeCAPOA et al (1985), estudando fibroblastos humanos mantidos em cultura, sob a ação do hormônio de crescimento e submetidos à técnica de impregnação pela prata, observaram que o número de NORs positivos por célula era estatisticamente maior do que em células não estimuladas, uma vez que este hormônio aumenta a fração de ribossomas envolvidos na síntese de peptídeos e estimula a síntese de novo RNAr. O mesmo comportamento tiveram as células submetidas à ação de glicocorticóides, tendo em vista que há elevação de síntese de RNAr e RNAm.

Um modelo bastante útil no estudo ultra-estrutural da diferenciação nucleolar é proposto por HERNANDEZ-VERDUN et BOUTEILLE (1979) onde o eritrócito de galinha, que possui micronúcleolos mas que não sintetiza RNA, sofre um processo de fusão com uma célula hospedeira para onde são transferidas essas estruturas. Pela ação de proteínas citoplasmáticas do hospedeiro, há reativação dos micronúcleolos, com conseqüente síntese de RNA e o aparecimento de novas estruturas nucleolares. Assim, foi verificado que durante a diferenciação

o nucléolo podia ser descrito sob 3 aspectos característicos: o "nucléolo desenvolvido", visto nos estados mais tardios de reativação, e que era constituído pelo centro e componente fibrilares, cromatina condensada e componente granular; o "pré-nucléolo", que é seu precursor, é menor e desprovido de grânulos, e uma terceira estrutura constituída somente pelo centro fibrilar adjacente à cromatina condensada, mas sem componente fibrilar ou granular. Esse último elemento corresponde, durante a intérfase, ao NOR dos cromossomas em mitose.

Por outro lado, através da exposição a agentes inibidores da síntese de RNA nucleolar foi observado que células de sarcoma de rato expostas à actinomicina D, apresentavam diminuição gradual do número de grânulos corados pela prata à medida que aumentava a dose da droga administrada. Do mesmo modo, quando as células foram expostas à ciclofosfamida, que altera a síntese de DNA e também a transcrição do RNA, o número de grânulos argirofílicos diminuiu, confirmando a relação do número de Ag-NORs com o estado de síntese do RNA nucleolar (KACEROVSKA et al, 1981).

Nas células eritróides e granulocíticas humanas, a distribuição dos "clusters" e pontos parece coincidir com o próprio comportamento do nucléolo durante o processo de diferenciação e maturação celulares. Assim, naquelas células onde o nucléolo é visível à coloração usual, é característica a presença de "clusters". Os detalhes morfológicos destes podem

ser melhor vistos na reação de Ag-NOR do que na coloração de Leishman de rotina.

Na primeira célula do processo de maturação onde não aparece o nucléolo, há uma desagregação dos "clusters", com a presença apenas de pontos dispersos. À medida que a célula se torna mais madura, até estar totalmente diferenciada em neutrófilo segmentado na série granulocítica e normoblasto ortocromático na série eritroblástica, há uma tendência à diminuição, ou mesmo ausência de pontos. A presença desses poucos e pequenos pontos argirofílicos nas células maduras, sem nucléolo à M.óptica, provavelmente se deve ao fato de que mesmo em restos de estruturas nucleolares existem proteínas cuja afinidade pela prata reflete uma atividade do gene RNAr, embora não haja síntese ativa desse RNA (ZENTGRAF et al, 1975). Através de análise ultra-estrutural foi possível verificar que o componente nucleolar que tem afinidade pela prata e que pode ser identificado mesmo que o nucléolo esteja desagregado, é o centro fibrilar (HERNANDEZ-VERDUN et al, 1980).

Os dados obtidos nesse trabalho são coincidentes com os de SMETANA et LIKOVSKY (1984), que analisaram 5 M.O normais. Embora a metodologia de contagem das Ag-NORs tenha sido diferente daquela por nós adotada, uma vez que os autores consideraram os grânulos corados individualmente, sem separar em "clusters" e pontos, a diferenciação e maturação das células foi caracterizada por um declínio gradual no número de grânulos corados, com os menores valores correspondendo às células onde

se sabe que foi perdida a capacidade de divisão. As células precursoras mais imaturas das linhagens eritróide e granulocítica continham 3 a 4 vezes o número de Ag-NDRs das células nos últimos estágios de diferenciação, podendo os grânulos representar estoques de partes ativas de NORs a serem utilizadas em estágios mais tardios. Os autores concluem que o número de estruturas coradas pela prata parece ser um marcador conveniente da atividade biossintética em células individuais em diferenciação e maturação.

Utilizando metodologia semelhante de contagem de Ag-NDRs, com a determinação de "grãos corados pela prata", MAMAEV et al (1987) observaram atividade de NOR maior em células eritróides imaturas, intermediária em promielócitos e mínima em normoblastos policromatófilos e mielócitos. Nos normoblastos ortocromáticos, metamielócitos, bastonetes e neutrófilos segmentados as Ag-NDRs estavam ausentes ou somente 1 ponto pôde ser detectado.

Quanto aos megacariócitos, observamos numerosos pontos distribuídos pela célula, por vezes inseridos em uma pequena matriz, formando diminutos "clusters", exibindo uma morfologia distinta das outras células hematopoéticas. Durante o processo de maturação do promegacarioblasto, passando a megacarioblasto até o megacariócito maduro, acontece o fenômeno de poliploidização. Assim, o promegacarioblasto que é $2N$, vai anteceder o megacarioblasto $4N$, que por sua vez, através de poliploidizações sucessivas, vai dar origem a uma célula de até

64 N, que é a célula mais madura. Nesse estágio, chamado III ou megacariócito maduro, acidófilo ou granular, o núcleo é irregular, com cromatina densa, o citoplasma é abundante, contendo grânulos alfa e o nucléolo é inexistente (PAULUS et ASTER, 1983).

Os dois fatores, poliploidia e dispersão nucleolar, explicam a distribuição das Ag-NORs por nós observada: numerosos pontos espalhados pelo núcleo celular. Entretanto, para um melhor conhecimento do comportamento das Ag-NORs na série megacariocítica, relacionado aos diferentes estágios de maturação celular e correspondentes graus de ploidia, haveria a necessidade de se ampliar o estudo, o que não constituiu objetivo do presente trabalho.

Portanto, na hematopoese normal, padrões de "clusters" e pontos caracterizam não só a proliferação, mas também o estágio de maturação celular, onde os "clusters" predominaram nas células imaturas e proliferantes, enquanto os pontos nas células em estágios finais de diferenciação.

2. Ag-NORs nas Leucemias Agudas

Inúmeros trabalhos têm sido publicados onde a análise das Ag-NORs é empregada principalmente na tentativa de diferenciar lesões benignas e malignas, e como possível parâmetro prognóstico de tumores (RUSCHOFF et al, 1990a). Assim são descritos dados obtidos através da análise de: tumores cutâneos (EGAN et CROCKER, 1988), carcinoma de pulmão (CROCKER et al, 1987), lesões melanocíticas dérmicas (CROCKER et SKILBECK, 1987), lesões gástricas (SUAREZ et al, 1989), carcinoma de mama (SMITH et CROCKER, 1988), entre outros. Os dados obtidos são semelhantes, uma vez que os valores de Ag-NORs são maiores nas lesões malignas quando comparadas ao tecido normal. São descritas, ainda, características morfológicas que auxiliam na distinção das lesões. Desse modo, DERENZINI et al (1988), analisando células de tumor de intestino, observaram que nas lesões benignas, as Ag-NORs são caracterizadas por pontos grandes, em pequeno número e distribuídos em "clusters", enquanto nas lesões malignas elas se apresentam pequenas, em grande número e espalhadas pelo núcleo da célula. Nos pólipos adenomatosos a distribuição das NORs mostrou um padrão intermediário entre as lesões francamente benignas e malignas.

PLOTON et al (1986), estudando células de cultura de leucemia promielocítica e "promieloblástica" humanas (HL 60 e K 562, respectivamente), submetidas à impregnação pela prata, mostraram que as células cancerosas apresentavam nucléolo grande, com vários pontos corados pequenos, enquanto células hiperplásicas possuíam 2 nucléolos pequenos, contendo 1 ponto grande no seu interior.

A mesma apresentação das estruturas com tamanho maior quando únicas ou duplas e menor quando múltiplas foi relatada por EGAN et CROCKER (1988) no estudo de Ag-NORs em tumores cutâneos. Foi possível fazer a distinção entre células basais carcinomatosas, que apresentam mais NORs/núcleo, dos outros tipos de tumores, embora não tenha tido uma diferença significativa entre os demais tipos tumorais.

A possibilidade de utilizar as contagens de Ag-NORs como auxiliar no diagnóstico de tumores de células pequenas da infância foi testada por EGAN et al (1987). Os autores encontraram diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos em neuroblastoma, sarcoma de Ewing e rabdomiossarcoma.

A utilização da técnica de Ag-NOR como parâmetro prognóstico foi testada em carcinomas de colon sigmóide e reto (RUSCHOFF et al, 1990a). Houve uma correlação significativa entre a taxa de sobrevida de 5 anos e o número médio de Ag-NORs por célula tumoral ($p < 0,001$) e entre o tamanho médio dos pontos corados pela prata e a análise de sobrevida de Kaplan-

Meier ($p < 0,05$). Os autores sugerem que a técnica de Ag-NOR pode ter uma utilização potencial na avaliação do grau de agressividade da doença.

Em cancer prostático também foi observado o significado prognóstico da referida técnica (CONTRACTOR et al, 1989), com resultados positivos.

Entretanto, GRIFFITHS et al (1989), analisando 100 amostras de adenocarcinoma retal, não demonstraram uma relação entre Ag-NORs e prognóstico, índice de proliferação celular ou ploidia. Do mesmo modo, estudando cortes histológicos de melanoma maligno em diferentes estágios de evolução, HOWAT et al (1988) concluíram que a técnica de Ag-NOR não é de valor prognóstico nesse tipo de tumor.

Há poucos dados na literatura sobre o comportamento das NORs em leucemias, principalmente em células de M.O em intérfase. A técnica de Ag-NOR aplicada a células de M.O e/ou de sangue periférico em cultura, com posterior análise das metáfases e do número de NORs nos cromossomas, tem sido utilizada com uma certa frequência. Assim, REEVES et al (1982), compararam a porcentagem de metáfases prata positivas e o número de Ag-NORs/célula em LLA, leucemia aguda não linfoblástica e leucemia mielóide crônica (LMC). Observaram maior número de Ag-NORs/célula, assim como maior porcentagem de células coradas nas leucemias não linfoblásticas, especialmente dos tipos M_4 e M_5 , enquanto o grupo com LLA foi semelhante ao controle e o grupo com LMC apresentou maiores proporções de

células impregnadas pela prata do que os controles ou LLA.

Esses resultados diferem daqueles encontrados por ARDEN et al (1985), quando metáfases de células de M.O. normal apresentaram menor atividade das NORs do que os pacientes com LLA. Esses dados foram confirmados num outro estudo, mais amplo, utilizando a mesma metodologia, comparando um número maior de casos de LLA, LMC, LMA e normais. A maior quantidade de metáfases positivas e a maior média de Ag-NORs/metáfase foram observadas na LLA, tanto nas fases inicial como na recaída da doença, sem diferença significativa quando comparadas à LMC na fase blástica. Os pacientes com LMC na fase acelerada mostraram valores intermediários, enquanto os menores números foram observados na LMA, LMC fase crônica e normais, sem diferença significativa entre os 3 grupos.

Em células interfásicas, MAMAEV et al (1987) compararam o número de Ag-NORs em blastos de leucemias linfoblástica e não linfoblástica agudas. Relatam que a impregnação das NORs pela prata revelaram nucléolo ativo em muitos blastos, independente do seu diâmetro. Observaram alto polimorfismo tanto entre os indivíduos como entre as células de uma mesma amostra de M.O. Como regra, os elementos blásticos apresentaram o nucléolo aumentado com nucleolonema, muitos dos quais contendo um número elevado de grãos corados pela prata. Alguns blastos tinham nucléolo tanto do tipo nucleolonema como compacto, enquanto em

outros, todos os nucléolos eram compactos. Contando os pontos de prata individualmente, houve sobreposição dos resultados entre os 2 tipos de leucemias. Embora o trabalho não forneça os resultados em termos de número de Ag-NDRs por célula interfásica de cada um dos 35 casos de leucemia aguda, foi evidenciada grande heterogeneidade, com alguns núcleos contendo de 40 a 60 grãos e em outros casos não excedendo 20 a 30 grãos por célula blástica.

No presente trabalho, aplicando-se a técnica de Ag-NDR em células de esfregaço de M.O de pacientes com leucemia aguda, foram obtidos resultados interessantes. Estatisticamente não houve diferença significativa entre as médias das contagens de Ag-NDRs ("clusters" e pontos) dos blastos normais quando comparados aos blastos leucêmicos, assim como entre os 2 grupos de leucemias agudas.

Além das médias gerais das contagens de Ag-NDRs nas leucemias terem sido menores do que a dos blastos normais, tanto em relação aos "clusters" quanto aos pontos, os 2 grupos de leucemias tiveram um comportamento diverso do grupo normal. Foi observada grande heterogeneidade na distribuição numérica, com um intervalo de variação maior do que no grupo normal, assim como padrões diferentes de distribuição dos "clusters" e pontos dentro dos núcleos.

Analisando a variabilidade numérica das Ag-NDRs nas leucemias, vale ressaltar quais os possíveis fatores envolvidos que, de alguma forma, estariam influenciando o comportamento

das NORs na célula. Uma vez que as Regiões Organizadoras de Nucléolo são porções cromossômicas que contêm os genes nucleolares que codificam as moléculas de RNAr durante a interfase (MILLER et al, 1976), a sua avaliação fornece informações quanto ao grau de atividade celular, capacidade transcricional e nível de diferenciação celulares (SCHWARZACHER et al, 1978, SMETANA et LIKOVSKY, 1984). Assim, altas contagens de Ag-NORs corresponderiam a grande capacidade sintética ou proliferativa das células.

DERENZINI et al (1989b) num elegante estudo analisaram velocidade de duplicação celular, cariótipo, síntese de RNA e DNA, além de análise à M.E de 2 linhagens de células de neuroblastoma em cultura e observaram que o número de NORs interfásicos não está relacionado com a atividade sintética do núcleo, número de cromossomas que carregam a NOR ou com a quantidade de sequências de DNAr. A única relação observada foi com o tempo de duplicação da célula: o número de NORs interfásicos é inversamente proporcional a esse tempo. Assim, quanto menor o intervalo entre uma duplicação e outra, maior multiplicação da célula e maior o número de NORs. Ampliando a investigação, os autores compararam o número de Ag-NORs em 13 linhagens de células de neuroblastoma, com diferentes tempos de replicação em cultura. Confirmaram que maiores quantidades de proteínas coradas pela prata estão relacionadas com proliferação mais rápida. Uma diferença de apenas 4 horas no tempo de duplicação celular foi suficiente para determinar uma

variação estatisticamente significativa na quantidade de Ag-NORs (THERE et al, 1989)

Esse conceito é coincidente com os achados de SIGMUND et al (1979) que observaram que na intérfase prolongada há uma tendência dos cromossomas acrocêntricos se associarem para formar o nucléolo. Isso resulta na formação de maiores Ag-NORs, embora em menor número, porque 2 ou mais NORs de cromossomas associados podem ser vistos como um único grande Ag-NOR. Por outro lado, o processo de dissociação resulta na fragmentação do nucléolo e aparecimento de múltiplos Ag-NORs, cada uma representando um cromossoma acrocêntrico. Portanto, a ocorrência de dissociação nucleolar está relacionada com a proliferação celular, mais nos ciclos subseqüentes do que no anterior.

Um defeito no processo de associação nucleolar pode produzir o mesmo efeito da dissociação quanto à proliferação celular e pode ser um evento freqüente nos processos neoplásicos (THAM et al, 1989).

Um outro fator que parece estar relacionado às diferentes contagens das Ag-NORs nas neoplasias quando comparadas às células normais, são as alterações no processamento do RNAr. Em células de crescimento rápido ou células estimuladas, a síntese, metilação e clivagem dos precursores moleculares ribossomais ocorrem muito rapidamente. Assim, quando precursores de RNA são marcados com material radioativo, a fração 45 S aparece após cerca de 5 a 15 minutos, enquanto as

frações 28 S e 18 S são marcadas após períodos mais longos (TORELLI et al, 1971). Sabe-se que nas células blásticas leucêmicas o ritmo de síntese do RNA é mais lento (GAVOSTO et al, 1960). Nesse sentido, investigando a distribuição das várias moléculas de RNA pré-ribossomal e ribossomal marcadas com uridina e metil-metionina, em diferentes tipos de leucemia aguda, foi possível concluir que o RNA 45 S é processado muito mais lentamente nas células leucêmicas do que em células normais. As outras frações mostraram igualmente um retardo no aparecimento da radioatividade, além de ter sido extremamente baixo o ritmo de transformação do RNA 32 S em 28 S. Essa última fração provavelmente é degradada antes de sua formação, uma vez que não foi obtido um pico definitivo de radioatividade em nenhum dos casos.

Adicionalmente ao reduzido processamento dos precursores ribossomais, parece haver um acúmulo de moléculas não metiladas nos limites dos precursores RNAr. Isso sugere um desequilíbrio entre o processamento dos precursores RNAr e o ritmo de síntese, causando um acúmulo de precursores não metilados nas células blásticas leucêmicas circulantes (TORELLI et al, 1971).

Uma outra questão que se impõe é a seguinte: na célula neoplásica há elevação da síntese proteica, da basofilia citoplasmática, do tamanho e número dos nucléolos. Essas modificações nucleolares implicam que a quantidade de DNAr ou a síntese dos RNAr 28 S e 18 S devem ser aumentadas para atender à demanda da elevação de síntese proteica no tumor. Um dos

mecanismos utilizados seria a duplicação dos cromossomas NORs (HUBBELL et HSU, 1977). Haveria, portanto, uma correlação entre o grau de ploidia da célula e o número de Ag-NORs. Essa correlação foi demonstrada em células tumorais humanas, onde foi observada uma elevação proporcional do número de Ag-NORs com o número cromossomal (TRENT et al, 1981). Portanto, o grau de ploidia interfere no número de Ag-NORs. Entretanto, alguns dados da literatura sugerem que existe uma diferença, em células tumorais, entre o número de cromossomas dos grupos D e G que potencialmente poderiam ser corados pela prata e os que efetivamente o são, uma vez que, em várias linhagens de células tumorais, onde o número de cromossomas estava aumentado, a quantidade deles corados pela prata permaneceu como o controle normal. Portanto, a prata detectaria mais a função do que a estrutura dos genes ribossomais. Como na gênese tumoral há alterações na constituição cromossomal da célula, haveria também mudanças na distribuição das NORs, enquanto se mantém constante o número de NORs coradas (HUBBELL et HSU, 1977).

Todos esses fatores: grau de diferenciação e proliferação celulares, velocidade de duplicação, alteração no processo de associação e dissociação nucleolares, defeito no processamento de RNAr e grau de ploidia, que interferem no número e morfologia das Ag-NORs, podem estar de algum modo participando e causando alterações no comportamento das Ag-NORs das células leucêmicas. Estudos utilizando metodologia específica seriam necessários para avaliar com exatidão cada um desses aspectos

em relação aos blastos leucêmicos, numa tentativa de explicar a grande heterogeneidade das contagens de Ag-NORs por nós observada.

Essa grande variabilidade no número e na intensidade da coloração de Ag-NORs em células leucêmicas, tanto entre como intra-indivíduos, foi também verificada por MAMAEV et al (1987). Os autores sugerem que nas células de leucemia aguda pode haver uma elevação da atividade de proteases envolvidas na separação dos cromossomas acrocêntricos entre células irmãs. Isso resultaria em autólise total das proteínas nucleolares argentofílicas e insuficiente coloração das NORs pelo nitrato de prata que era ativo na intérfase.

Essa menor proporção de metáfases Ag-NORs positivas em células de M.O de indivíduos com leucemia aguda foi também observada por REEVES et al (1982), que sugerem que esse padrão indica uma supressão relativa de transcrição de DNAr em muitas das células que estão se dividindo. Essa supressão resulta na redução ou ausência de AgNORs.

Dados da literatura sobre contagens de Ag-NORs em células leucêmicas interfásicas são escassos e os existentes usam como metodologia de contagem a enumeração dos pontos ou grãos corados, independentemente da sua localização no núcleo. Como optamos pela identificação das Ag-NORs em "clusters" e pontos, contando as 2 estruturas separadamente, uma vez que representam estados fisiológicos distintos da célula, a comparação com os dados existentes fica prejudicada.

O fato de não ter sido constatada uma diferença estatisticamente significativa entre as médias de "clusters" do grupo normal e os grupos com leucemia, mostrou que a técnica de Ag-NOR não auxilia na distinção entre blastos normais e leucêmicos.

SCHMID et al (1966) e mais recentemente HENDERSON (1983), mostraram que o potencial proliferativo das células leucêmicas é mais baixo que o dos precursores hematopoéticos normais. Como o número de Ag-NORs está inversamente correlacionado com o tempo de duplicação celular (DERENZINI et al, 1989b), nas células leucêmicas haveria maior associação das NORs, reduzindo o seu número e aumentando o seu tamanho. Observando os dados obtidos no presente trabalho, notamos que cerca de 66% das células na LLA e 50% na LMA apresentam médias de contagens de "clusters" menores do que 3,00, enquanto nos normais a menor média obtida foi 3,03, o que poderia ser expressão de um ciclo celular mais lento nestas patologias. Seriam necessários estudos citocinéticos comparando número de "clusters" e porcentagem de células em fase S e tempo de duração do ciclo celular, para um melhor esclarecimento.

Uma outra evidência neste sentido foi a correlação positiva encontrada entre "clusters" e contagem periférica de leucócitos observada nos casos de LLA. O grau de leucocitose sanguínea é um dado prognóstico bem conhecido nesta doença. Porém, quando dividimos os pacientes em 2 grupos, um com menos de 25000 leucócitos/mm³ e um com mais de 25000 leucócitos/mm³,

a média dos "clusters" não foi estatisticamente diferente entre eles.

Na LMA nenhuma correlação pôde ser encontrada: nem com os grupos FAB, nem com o grau de leucocitose periférica. A LMA, porém, é um grupo de doenças muito heterogêneo com diferentes linhagens celulares e diferentes padrões de proliferação e diferenciação envolvidos. Entretanto, pensamos que uma análise mais detalhada sobre a correlação entre as Ag-NORs e parâmetros prognósticos em ambos tipos de Leucemias Agudas, exige o estudo de um número maior de casos, com uma amostra representativa dos diversos sub-grupos da classificação FAB.

O fato de termos observado uma tendência a menores contagens de Ag-NORs nos blastos leucêmicos reforça o conceito que a velocidade de proliferação celular está bastante envolvida com o comportamento das Ag-NORs, uma vez que as células leucêmicas freqüentemente apresentam um ritmo de duplicação mais lento do que os blastos normais.

O tipo de análise realizado no presente trabalho difere daquela feita quando da avaliação das Ag-NORs em cortes histológicos de vários tipos de tumores (CROCKER et NAR, 1987, EGAN et al, 1988, HALL et al, 1988). Tem sido descrita uma elevação das contagens de Ag-NORs nos tumores malignos, com uma correlação positiva entre o grau de malignidade e a quantidade de estruturas impregnadas pela prata. Isso é esperado, uma vez que a comparação é feita entre células normais, com predomínio

de elementos diferenciados e, por outro lado, células tumorais mais indiferenciadas, e com potencial proliferativo maior. Em nosso estudo comparamos células normais e neoplásicas que, do ponto de vista morfológico apresentam o mesmo grau de diferenciação celular (blastos). Este fato seria responsável pelos nossos resultados, aparentemente conflitantes, com os achados descritos nos estudos histopatológicos. No presente trabalho, o número de Ag-NORs também foi maior, quanto mais indiferenciada e proliferante a célula analisada, dentro da mesma linhagem, e mesmo entre elementos normais.

Em seu conjunto, os resultados desse trabalho permitiram caracterizar o padrão de desenvolvimento das Ag-NORs nas linhagens eritroblástica e granulocítica normais e nas leucemias. Embora essa metodologia não permita a distinção entre células blásticas normais e leucêmicas, auxilia na maior compreensão dos mecanismos conducentes à proliferação das células leucêmicas. A grande heterogeneidade dos resultados obtidos, sugerem que essa investigação seja ampliada, com o estudo de um maior número de casos e, se possível, associada a outras técnicas e metodologias que auxiliem o entendimento da apresentação e comportamento das Regiões Organizadoras de Nucléolo nas Leucemias Agudas.

CONCLUSÕES

1. Nas células hematopoéticas da M.O normal foram observados 2 padrões distintos de Ag-NORs: "clusters" e pontos. Os "clusters" foram característicos das células proliferativas, diminuindo a sua contagem à medida que a célula tornava-se mais madura. Os pontos ocorreram em todos os tipos celulares, com as maiores contagens observadas no mielócito e normoblasto policromatófilo, e então decrescendo gradativamente até próximo de 1 no neutrófilo segmentado e de 2 no normoblasto ortocromático.

2. Os megacariócitos foram caracterizados por numerosos pontos e pequenos "clusters" dispersos pelo núcleo, exibindo um padrão distinto das demais células hematopoéticas. O número destas estruturas foi muito variável, tendo possivelmente uma relação com o grau de poliploidização nuclear.

3. Através da técnica de Ag-NOR não foi possível fazer a distinção individual dos blastos normal e leucêmico, uma vez que houve grande sobreposição de resultados, assim como morfológicamente não existe um padrão de malignidade das células, no que diz respeito à distribuição, tamanho e número de Ag-NORs

4. Na LLA foram observados 2 tipos de distribuição das Ag-NORs: poucos e grandes "clusters", e muitos e diminutos "clusters".

5. Através do estudo das Ag-NORs nas células hematopoéticas foi possível um maior entendimento da proliferação e maturação das células normais da M.O, assim como das células blásticas das leucemias agudas.

RESUMO

A Técnica de Ag-NOR foi empregada em 10 aspirados de M.O. controles, 26 com LMA e 21 com LLA. Convencionou-se contar separadamente as Ag-NORs como "clusters" e como pontos.

Na M.O. controle, tanto na série granulocítica como eritroblástica as maiores médias de "clusters" foram observadas nas células mais imaturas (mieloblasto: $x = 3,21 \pm 0,16$; pronormoblasto: $x = 3,87 \pm 0,40$), decrescendo à medida que as células se tornavam mais maduras. Por outro lado, os pontos foram predominantes nos mielócitos e normoblastos basófilos, com pequenas contagens nas células mais imaturas, assim como nas bem diferenciadas.

Os megacariócitos caracterizaram-se por apresentar numerosas Ag-NORs, na forma de diminutos "clusters" e pontos, dificultando a individualização e contagem dos mesmos, daí sua análise apenas qualitativa.

Portanto, na hematopoese normal, padrões de "clusters" e pontos caracterizam a proliferação e maturação celulares, onde os "clusters" predominam nas células imaturas e proliferantes, enquanto os pontos nas células em estágios finais de diferenciação.

Foi observada grande heterogeneidade quantitativa e qualitativa das Ag-NORs nos blastos leucêmicos. Embora as médias de "clusters" tendessem a menores valores nas leucemias, não houve diferença estatisticamente significativa

entre os blastos normais e os leucêmicos.

Na LLA foram observados 2 padrões de distribuição das Ag-NDRs: pequenos e numerosos "clusters", e poucos e grandes "clusters".

Em seu conjunto, os resultados desse trabalho permitiram caracterizar o padrão de desenvolvimento das Ag-NDRs nas linhagens eritroblástica e granulocítica normais e nos blastos de leucemias agudas. Por outro lado, os dados obtidos sugerem que o estudo seja ampliado, com análise de um maior número de casos, se possível associando-se com outras metodologias que auxiliem na interpretação da apresentação e comportamento das Regiões Organizadoras de Nucléolo nas células hematopoéticas normais e patológicas.

SUMMARY

The silver staining method was carried out on bone marrow smears of 10 controls, 26 Acute Myelogenous Leukemia (LMA) and 21 Acute Lymphocyt Leukemia (LLA). The procedure was standardized to include separate count of clusters and dots of Ag-NORs.

Higher means clusters was observed in immature cells (myeloblast: $\bar{x} = 3,21 \pm 0,16$; proerythroblast: $\bar{x} = 3,87 \pm 0,40$), with gradual reduction according the cells maturation in both erythrocyte and granulocyte series of control's bone marrow. On the other hand, dots were predominants in neutrophilic myelocyte and basophilic erythroblast and showed lower counts for immature cells than for advanced maturation stages of cells.

A characteristic pattern was observed in megakaryocytes, where Ag-NORs were numerous, with appeareance of small clusters and dots, precluding their individualization and enumeration.

Therefore, in normal hemopoiesis, pattern of clusters and dots characterizes the steps of cell proliferation and maturation: clusters abound in immature and proliferayting cells, while dots in latter differentiation stages cells.

A high degree of qualitative and qualitative heterogeneity was seen in leukemic cells. The difference

between normal and leukemic blast cells were not statistically significant, although the number of clusters in leukemic cells seem to be smaller than normals cells.

Two kinds of Ag-NORs distributions patterns were observed in LLA: small and numerous or few and large clusters.

Taking together the results characterize the development pathern of Ag-NORs in the normal erithroblastic and granulocitic cells and in blast cells from acute leukemia. Moreover, suggest that this study should be continued in a larger series of patients and in association with others procedures for investigation of the role of Ag-NORs.

BIBLIOGRAFIA

- ARDEN, K.C., BUCANA, C.D., JOHNSTON, D.A., PATHAK, S. Computer-assisted image analysis of silver staining in normal and leukemic bone marrow. Inst J Cancer, 43: 395-398, 1989a.
- ARDEN, K.C., JOHNSTON, D.A., CORK, A., PATHAK, S. Differential nucleolus organizer activity in normal and leukemic bone marrow. Am J Hematol, 30: 167-173, 1989b.
- ARDEN, K.C., PATHAK, S., FRANKEL, L.S., ZANDER, A. Ag-NOR staining in human chromosomes: differential staining in normal and leukemic bone-marrow samples. Int J Cancer, 36: 647-649, 1985.
- ARRIGHI, F.E., LAU, Y-F., SPALLONE, A. Nucleolar activity in differentiated cells after stimulation. Cytogenet Cell Genet, 26: 244-250, 1980.
- BEIGUELMAN, B. Citogenética humana. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1982.

- BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M-T et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann Intern Med, 103: 626-629, 1985.
- BESSIS, M. et al. Morphology of the erytron. In: WILLIAMS, W. et al. Hematology. 3rd ed. McGraw-Hill Book Company. New York, cap. 29: 257-279, 1983.
- BOURGEOIS, C.A., HERNANDEZ-VERDUN, D., HUBERT, J., BOUTEILLE, M. Silver staining of NORs in electron microscopy. Exp Cell Res, 123: 449-452, 1979.
- BUSCH, H., ROTHBLUM, L. The cell nucleus, vol. XI. Academic press. New York, 1982.
- CONTRACTOR, H., RUSCHOFF, J., SCHULZE-SEEMANN, X., ULSHOFER, B. Prognostic significance of NOR analysis in prostatic cancer. Urol Res, 17: 327, 1989.
- CROCKER, J., AYRES, J., MCGOVERN, J. Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus. Thorax, 42: 972-975, 1987.
- CROCKER, J., BOLDY, D.A.R., EGAN, M.J. How should we count Ag-NORs? Proposals for a standardized approach. J. Pathol, 158: 185-188, 1989.

CROCKER, J., EGAN, M. J. Correlation between ncr sizes and numbers in Non-Hodgkin's lymphomas. J Pathol, 156: 233-239, 1988.

CROCKER, J., MACARTNEY, J.C., SMITH, P.J. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in Non-Hodgkin's lymphomas. J Pathol, 154: 151- 156, 1988.

CROCKER, J., McGOVERN, J. Nucleolar organizer regions in normal, cirrotic, and carcinomatous livers. J Clin Pathol, 14: 1044-1048, 1988.

CROCKER, J. et NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. J Pathol, 151: 111-118, 1987.

CROCKER, J., SKILBECK, N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. J Clin Pathol, 40: 885-889, 1987.

DACIE, J.V., LEWIS, S.M. Practical Haematology, 6th end. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1984.

DeCAPOA, A., BALDINI, A., MARLEKAJ, P., NATOLI, C., ROCCHI, M., ARCHIDIACONO, N., CIANFARANI, S., SPADONI, G.L., BOSCHERINI, B. Hormone-modulated rRNA gene activity is visualized by selective staining of the NORs. Cell Biol, 9: 791-796, 1985.

DERENZINI, M., FARABEGOLI, F., PESSION, A., NOVELLO, F. Spacial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centres of human circulating lymphocytes after stimulation of transcription. Exp Cell Res, 170: 31-41, 1987.

DERENZINI, M., NARDI, F., FARABEGOLI, F., OTTINETTI, A., RONCAROLI, F., BUSSOLATI, G. Distribution of silver stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. Acta Cytologica, 33: 491-498, 1989a.

DERENZINI, M., PESSION, A., FARABEGOLI, F., THERE, D., BADIALI, M., DEHAN, P. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. Am J Pathol, 134 (n° 4): 925- 932, 1989b.

DERENZINI, M., ROMAGNOLI, T., MINGAZZINI, P., MARINOZZI, V. Interphasic nucleolar region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. Virchows Archiv B Cell Pathol, 54: 334-340, 1988.

EGAN, M.J. et CROCKER, J. Nucleolar organizer region in cutaneous tumours. J Pathol, 154: 247-253, 1988.

EGAN, M.J., RAAFAT, F., CROCKER, J., SMITH, K. Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. J Clin Pathol, 41: 31-33, 1988.

- GAVOSTO, F., MARAINI, G., PILERI, A. Nucleic acids and protein metabolism in acute leukemia cells. Blood, 16: 1555-1563, 1960.
- GHOSH, S. The nucleolar structure. Int Rev Cytol, 44: 1-28, 1976.
- GOESSENS, G. Nucleolar structure. Int Rev Cytol, 87: 107-158, 1984.
- GOLDE, D.W. Production, distribution, and fate of neutrophils. In: WILLIAMS, W. J. et al. Hematology, 3rd ed. McGraw-hill Company, new York, cap.: 84: 759-764, 1983.
- GRIFFITHS, A. P., BUTLER, C. W., ROBERTS, P., DIXON, M. F., QUIRKE, P. Silver-stained structures (Ag-NORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. J Pathol, 150: 121-127, 1989.
- HALL, P. A., CROCKER, J., WATTS, A., STANSFELD, A.G. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. Histopathol, 12: 373-381, 1988.
- HAM, A.W., CORMACK, D.H. O núcleo e a divisão celular. In: Histologia. 8^a ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1983.

- HENDERSON, E.S. Acute leukemia - general considerations. In: WILLIAMS, W.J. et al. Hematology, 3rd ed. McGraw-Hill Book Company, New York, cap. 27: 221-239, 1983.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. et BOUTEILLE, M. Nucleologenesis in chick erythrocyte nuclei reactivated by cell fusion. J Ultrastruct Res, 69: 164-179, 1979.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. et DERENZINI, M.C. Non-nucleosomal configuration of chromatin in nucleolar organizer regions of metaphase chromosomes in situ. Eur J Cell Biol, 31 : 360-365, 1983.
- HERNANDEZ-VERDUN, D., DERENZINI, M. et BOUTEILLE, M. Relationship between the Ag-NOR proteins and ribosomal chromatin in situ during drug-induced RNA synthesis inhibition. J Ultrastruct Res, 88: 55-65, 1984.
- HERNANDEZ-VERDUN, D., HUBERT, J., BOURGEOIS, C.A., BOUTEILLE, M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. Chromosoma, 79: 349-362, 1980.
- HOWAT, A.J., GIRI, D.D., WRIGHT, A.L., UNDERWOOD, J.C.E. Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. J Pathol, 156: 227-232, 1988.

- HOWELL, W.M. Visualisation of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. Chromosoma, 62: 361-367, 1977.
- HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver colloid staining of nucleolar organising regions with a protective colloidal developer; a one-step method. Experimentia, 36: 1014, 1980.
- HUBBELL, H.R., HSU, T.C. Identification of nucleolus organizer regions (NORs) in normal and neoplastic human cells by the silver-staining technique. Cytogenet Cell Genet, 19: 185-196, 1977.
- KACEROVSKA, H., LIKOVSKY, Z., SMETANA, K. Nucleolar silver stained granules in rat Yoshida sarcoma cells after RNA synthesis inhibition. Neoplasma, 28: 513-516, 1981.
- LaCOUR, L.F., CRAWLEY, J.W.C. The site of rapidly labelled ribonucleic aci in nucleoli. Chromosoma, 16: 124-132, 1965.
- LEONG, A.S.Y., GILHAM, P. Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. Hum Pathol, 20: 257-262, 1989.
- LISCHWE, M.A., SMETANA, K., OLSON, M.O.J., BUSCH, H. Proteins C₂₃ and B₂₃ are the major nucleolar silver staining proteins. Life Sciences, 25: 701-708, 1979.

MAMAEV, N.N., MAMEV, S.E., GRABOVSKAYA, I.L., MAKARKINA, G.N., KOZLOVA, T.V., MEDVEDEVA, N.V., MARYNETS, O.V. The activity of nucleolar organizer regions of human bone marrow cells studied with silver staining. II. Acute leukemia. Cancer Genet Cytogenet, 25: 65-72, 1987.

McCLINTOCK, B.: The relation of a particular chromosomal element to the development of nucleoli in Zea Mays. Z Zellforsch, 21: 294-328, 1934.

MILLER, D.A., DEV, V.G., TANTRAHAHI, R., MILLER, O.J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. Experim Cell Res, 101: 235-243, 1976.

OLERT, J., SAWATZKI, G., KLING, H., GEBAYER, J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). Histochemistry, 60: 91-99, 1979.

PAULUS, J-M., ASTER, R.H., Production, distribution, life-span, and fate of platelets. In: WILLIAMS, W. et al. Hematology, 3rd ed., Mc-Graw-Hill Book Company, New York, cap. 130: 1185-1196, 1983.

PLOTON, D., MENAGER, M., ADNET, J.J. Simultaneous ultrastructural localization of Ag-NOR (Nucleolar organizer region) proteins and ribonucleoproteins during mitosis, in human breast cancerous tissues. J Cell Sci, 74: 239-256, 1985.

PLOTON, D., MENAGER, M., JEANNESSON, P., HIMBER, G., PIGEON, F., ADNET, J.J. Improvement in the visualization of the argyrophilic protins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochemical J, 18: 5-14, 1986.

REEVES, B.R., CASEY, G., HARRIS, H. Variations in the activity of nucleolar organizers in different tissues, demonstrated by silver staining of human normal and leukemic cells. Cancer Genet and Cytogen, 6: 223-230, 1982.

RÜSCHOFF, J., BITTINGER, A., NEUMANN, K., SCHMITZ-MOORMANN, P. Prognostic significance of nucleolar organizer regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. Pathol Res Pract, 186: 85-91, 1990a.

RUSCHOFF, J., PLATE, K., BITTINGER, A., THOMAS, C. Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. Pathol Res Pract, 185: 878-885, 1989.

- RUSCHOFF, J., PLATE, K., CONTRACTOR, H., THOMAS, C., Letter to the editor. Silver-stained structures (Ag-NORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. J Pathol, 161: 89-90, 1990b.
- SATO, Y., ABE, S., KUBOTA, K., SASAKI, M., MIURA, Y. Silver-stained nucleolar organizer regions in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of Philadelphia chromosoma positive chronic myelocytic leukemia patients. Cancer Genet Cytogenet, 23: 37-45, 1986.
- SCHMID, J.R., KIELY, J.M., TAUXE, W.N., OWEN JR., C.A. Cell proliferation in leukemia during relapse and remission. I. DNA and RNA synthesis of leukemic cells in the bone marrow in vitro. Acta haematol, 36: 313-322, 1966.
- SCHWARZACHER, H.G., MIKESAAR, A.V., SCHNEDL, W. The nature of the Ag- staining of nucleolus organizer regions. Cytogenet Cell Genet, 20: 24-39, 1978.
- SCHWARZACHER, H.G., WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. Hum Genet, 63: 89-99, 1983.
- SIGMUND, J., SCHWARZACHER, H.G., MIKELSAAR, A.J. Sattellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR activity. Hum Genet, 50: 81-91, 1979.

- SMETANA, K., LIKOVSKY, Z. Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. Cell Tissue Res, 237: 367-370, 1984.
- SMITH, R. et CROCKER, L. Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. Histopathol, 12: 113-125, 1988.
- SMITH, P.J., SKILBECK, N., HARRISON, A., CROCKER, J. The effect of a series of fixatives on the Ag-NOR technique. J Pathol, 155: 109-112, 1988.
- SUAREZ, V., NEWMAN, J., HILEY, C., CROCKER, J., COLLINS, M. The value of NOR numbers in neoplastic and non-neoplastic epithelium of the stomach. Histopathology, 14: 61-66, 1989.
- THAM, K.T., PATH, F.R.C., PAGE, D.L. Editorial. Ag-NOR and Ki-67 in breast lesions. Am J Clin Pathol, 92: 518-520, 1989.
- THERE, D., PESSION, A., DERENZINI, M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. Exp Cell Res, 184: 131-137, 1989.
- TORELLI, U.L., TORELLI, G.M., ANDREOLI, A., MAURI, C. Impaired processing of ribosomal precursor RNA in blast cells of acute leukemia. Acta Haematol, 45: 201-208, 1971.

- TRENT, J.M., CARLIN, D.A., DAVIS, J.R. Expression of silver-staining nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in human cancer. Cytogenet Cell Genet, 30: 31-38, 1981.
- UNDERWOOD, D.C.E., GIRI, D.D. Editorial: nucleolar organizer regions as a diagnostic discriminants for malignancy. J Pathol, 155: 95-96, 1988.
- WILLIAMS, M.A., KLEINSCHMID, J.A., KROHNE, G., FRANCKE, W.W. Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of Xenopus laevis oocytes identified by gel electrophoresis. Exp Cell Res, 137: 341-351, 1982.
- ZENTGRAF, H., SCHEER, U., FRANKE, W.W. Characterization and localization of the RNA synthesis in mature avian erythrocytes. Exp Cell Res, 96: 81-95, 1975.