

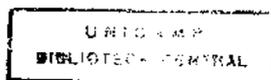
Maria de Fátima Pereira Gilberti

"REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS EM
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA"

Orientador: Profa. Dra. Irene G.H. Lorand-Metze

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Medicina — Área de
Medicina Interna da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre.

- 1994 -



ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	17
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO.....	37
RESUMO	51
SUMMARY.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICES	67

Aos meus pais,

Ivo e Lourdes

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Irene Lorand-Metze, pela presença constante e pela grande solicitude na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Konradin Metzke, pela assessoria estatística e processamento de dados.

À Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto, pela amizade, compreensão e estímulo à realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM / UNICAMP, pelo carinho e colaboração na seleção dos pacientes estudados.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia do HEMOCAMP, pela colaboração na seleção dos pacientes estudados.

À Cármen Lúcia Rodrigues Arruda e à Laudicéia Rodrigues Barijan pela grande colaboração na digitação, diagramação e editoração eletrônica deste trabalho.

Ao Ramiro, à Maria de Lourdes e à Márcia, pela tolerância, compreensão e estímulo.

INTRODUÇÃO

A estrutura descrita por Fontana em 1781 como "une tache" passou a ser definitivamente chamada de nucléolo por Valentin em 1856. Em 1852 Leydig descreveu vacúolos dentro do nucléolo de ova de *Synapta digitata* sendo o primeiro, então, a observar a complexidade desta estrutura (Schwarzacher, et al, 1983).

O nucléolo é uma estrutura visível em interfase, formada pela ação dos genes presentes nas regiões organizadoras de nucléolo (NORs). (Schwarzacher, et al, 1983). Tem como principal função a síntese e processamento do RNA ribossomal. Estudos bioquímicos mostram que, na formação de ribossomos, inicialmente é transcrita uma molécula de RNA 45S. Em seguida esta sofre metilação, liga-se às proteínas nucleares específicas e, após clivagens sucessivas, dá origem às moléculas finais de 18S e 28S. (Goessens, 1984).

Essa organela nuclear possui componentes estruturais que se diferenciam por propriedades de coloração e características ultraestruturais:

- a) **CENTROS FIBRILARES:** à microscopia eletrônica são regiões de densidade moderada, circundadas pelo componente fibrilar e que contêm DNA, enzimas como RNA polimerase I, topoisomerase, proteínas C23 e B23. São variáveis em tamanho e forma e, geralmente nas células animais, têm aspecto homogêneo;
- b) **COMPONENTE FIBRILAR:** consiste de material denso, composto por fibrilas de cerca de 4nm de diâmetro associadas ao centro fibrilar sugerindo, desse modo, uma estreita relação funcional entre esses dois componentes. Também contêm DNA e é o local de síntese do pré-RNA ribossomal (rRNA);
- c) **COMPONENTE GRANULAR:** é formado por grânulos de aproximadamente 15nm de diâmetro que parecem ser pré-ribossomos. Os mesmos são formados próximo ao componente fibrilar e posteriormente liberados como partículas pré-ribossomais e, por fim, transportados ao citoplasma como sub-unidades ribossomais;

- d) **INTERSTÍCIO NUCLEOLAR:** contém áreas esféricas de baixa densidade à microscopia eletrônica e que circundam a massa nucleolar. Parecem funcionar como local de estoque e transporte dos precursores ribossomais;
- e) **CROMATINA ASSOCIADA AO NUCLEÓLO:** separa o corpo nucleolar do nucleoplasma e é conectada com aglomerados de cromatina intranucleolar. A estrutura do DNA nucleolar foi estudada em cortes finos de hepatócitos de ratos (Derenzini et al, 1983), e observou-se a presença de aglomerados frouxos de DNA, descondensados. Essa cromatina descondensada, característica do nucléolo, foi detectada em regiões correspondentes aos centro e componente fibrilares.

No nucléolo humano cerca de 400 genes ribossomais estão presentes. Aqueles transcricionalmente ativos aparecem como unidades de transcrição repetidas e separadas por espaços que não são transcritos. A unidade de transcrição tem a forma de uma árvore na qual, o tronco, é representado por um gene que é transcrito por uma grande quantidade de RNA polimerase I ao mesmo tempo. As ramificações da árvore representam moléculas precursoras de rRNA em diferentes fases de formação (unidade 45S que é processada em unidades 18S e 28S). Estas moléculas de rRNA associam-se, rapidamente, às proteínas ribossomais e constituem os complexos de ribonucleoproteínas fibrilares (Crocker, 1990; Derenzini et Ploton, 1991).

A organização estrutural dos componentes nucleolares é variável e depende do tipo de célula e da atividade funcional da mesma. Têm sido descritos três tipos de nucléolo de acordo com a distribuição de seus componentes (Schwarzacher et al, 1983, Goessens, 1984, Hernandez-Verdun, 1986):

- a) nucléolo em forma de círculo que possui um único centro fibrilar grande e circundado por uma borda de ribonucleoproteínas de fibrilas e grânulos. Possui baixa atividade de transcrição.

- b) nucléolo tipo nucleolema no qual as ribonucleoproteínas fibrilar e granular constituem fios entrelaçados e numerosos centros fibrilares, pequenos, que estão espalhados no corpo nucleolar. Indica o início da atividade transcricional.
- c) nucléolo compacto, no qual fibrilas e grânulos estão separados e o componente fibrilar predomina. Os centros fibrilares são grandes e em pequena quantidade, circundados pelo componente fibrilar que está completamente envolvido pelo componente granular. Tem grande atividade, tendo alcançado um equilíbrio de transcrição dos precursores do rRNA, processamento e transporte ao citoplasma.

O número, tamanho e forma do nucléolo variam em função do organismo, tipo celular e estado funcional da célula. Durante a interfase, em células humanas, o número de nucléolos varia de acordo com a fase do ciclo celular em que essas células se encontram (Goessens, 1984). No fim da mitose e início de G1 eles são numerosos e vão, gradativamente, se fundindo até o começo da fase S, onde existe um só nucléolo por célula. Já o volume nucleolar dobra durante a interfase sendo que todos os seus componentes participam deste aumento. No entanto, nucléolos de vários tipos celulares diferem com relação à área ocupada por cada componente nucleolar. Segundo Jordan e McGovern (1981), o número de centros fibrilares é dependente do nível de atividade celular. Observaram que em fibroblastos humanos, mantidos em cultura, o número de centros fibrilares aumenta conforme aumenta a atividade celular (estímulo à proliferação), e o volume dos mesmos diminui. Este fato indica uma possível fusão de centros fibrilares, quando a célula está inativa. Na mitose, a síntese de DNA cessa ou decresce a valores mínimos, só se reiniciando em fases tardias da telófase. Isso explica o desaparecimento do nucléolo na prófase e seu reaparecimento na telófase em células filhas. Durante a prófase há desaparecimento do componente fibrilar, com dispersão do componente granular, o que dificulta sua detecção durante a metáfase e a anáfase. Seu reaparecimento, na telófase, dá-se em regiões específicas

dos cromossomos, usualmente relacionadas às constrictões secundárias. Inicialmente reaparece o centro fibrilar em contacto com o componente fibrilar e, mais tardiamente, o componente granular. (Goessens, 1984).

Tem sido demonstrado que as regiões organizadoras de nucléolo - NORs - são os sítios em torno dos quais o nucléolo se desenvolve ao fim da mitose (Babuk et al, 1985). Portanto essas regiões são de importância central na regulação da síntese de proteínas das células (Goessens, 1984; Smith et al, 1988; Ruschoff et al, 1989). Por meio de técnicas de hibridização "in situ" com DNA ribossomal marcado, mostrou-se que as NORs são alças de DNA responsáveis pela transcrição do rRNA com consequente formação de ribossomos e, finalmente, proteínas. Na metáfase, as NOR localizam-se nas chamadas constrictões secundárias dos cromossomos acrocêntricos humanos (pares número 13, 14, 15, 21 e 22). (Reeves et al, 1982; Crocker, 1990; Derenzini et Ploton, 1991).

As regiões organizadoras de nucléolo caracterizam-se pela presença de proteínas ácidas, não histonas, entre as quais destacam-se, por sua importância, a RNA polimerase I, proteínas C23 e B23. A nucleolina, originalmente chamada de proteína C23 é uma das mais investigadas e conhecidas. Sendo considerada a principal e mais específica dentre a proteínas nucleolares, localiza-se no componente fibrilar na interfase, e nas constrictões secundárias dos cromossomos acrocêntricos (NORs), em metáfase (Hernandez-Verdun, 1983; Jordan, 1987). Encontra-se intimamente associada às unidades pré-ribossomais 60S e 80S e tem sido encontrada em espaços não transcritos de DNA, em fragmentos próximos ao sítio de início de transcrição. A nucleolina participa diretamente da organização da região fibrilar e possui três regiões distintas detectadas após sequenciamento (Crocker, 1990):

- a) um N terminal que pode ser essencial para remover histonas H1 da cromatina condensada, preparando-a para transcrição;

- b) uma região central que se liga ao RNA e;
- c) uma região N terminal;

Tem-se sugerido que a nucleolina está envolvida na seleção e controle da RNA polimerase I (Jordan, 1987).

A proteína B23 é uma fosfoproteína, como a nucleolina, porém com uma localização mais difusa dentro do nucléolo. Embora pareça estar associada ao RNA, não tem seu papel ainda definido.

A RNA polimerase I é a enzima responsável pela transcrição dos genes ribossomais. Segundo Derenzini et Ploton (1991), localiza-se no centro fibrilar e, em menor quantidade, no componente fibrilar. Tem sido detectada nas porções transcritas e está ausente nas não-transcritas da unidade de transcrição (Goessens, 1984).

Uma propriedade importante dessas proteínas é sua grande afinidade pela prata evidenciando, deste modo, as NORs e por essa razão são chamadas de proteínas AgNOR. A reação de AgNOR foi descrita inicialmente por Goodpasture e Bloom em 1975 e por Howell et al no mesmo ano. A técnica utilizava uma coloração em três etapas e mostrava uma concordância entre os sítios detectados por hibridização e aqueles impregnados pela prata. Howell e Black (1980), modificaram o método de coloração reduzindo-o a uma etapa, à temperatura de 60°C, mostrando resultados mais reprodutíveis. Mais recentemente, Ploton et al (1986) aprimoraram a técnica, utilizando temperaturas mais baixas (20°C). Vários estudos relacionados à química das reações AgNOR têm demonstrado que, tanto os grupos carboxil como os sulfidril dessas proteínas, são essenciais para a coloração pela prata. O significado funcional desses grupos ainda é incerto, embora a flexibilidade da estrutura terciária das proteínas, associadas às NOR, seja dada pelos grupos sulfidril. (Crocker, 1990).

Embora a técnica de AgNOR seja rápida e de fácil realização, alguns fatores como fixadores (principalmente ácido acético ou acetona), pH, tempo e temperatura (tempo maior e temperaturas mais baixas), são importantes para se obter uma boa visualização das NORs. (Ploton et al, 1986; Smith et al, 1988; Derenzini et Ploton, 1991). Sabe-se que os padrões morfológicos, obtidos pela coloração pela prata, estão relacionados à fase do ciclo celular. Três tipos principais podem ser descritos tanto nas células normais, quanto nas neoplásicas (Crocker et al, 1989):

a) AgNORs completamente compactadas, formando uma estrutura argirofílica única, característica de células que não estão em proliferação. São geralmente encontradas em linfócitos em repouso e correspondem ao nucléolo.

b) Grupos de AgNOR envolvidos por uma matriz clara, chamados de "clusters", frequentemente presentes em células em proliferação. Podem ser visualizados dentro do nucléolo.

c) Pontos: são pequenos AgNOR espalhados no nucleoplasma.

Estes padrões são bem visualizados em preparações citológicas, mas também podem ser detectados, com facilidade, em cortes histológicos.

A técnica de coloração pela prata demonstra de maneira indireta, porém com grande reprodutibilidade e especificidade, as NORs. Sabemos que, dependendo da fase do ciclo celular em que a célula se encontra, o número, bem como o tamanho dos centros fibrilares varia. (Vagner-Capodano et al, 1984; Derenzini et al, 1987). Desse modo, torna-se importante, para se estabelecer a atividade das NORs, bem como o seu comportamento durante o ciclo celular, a localização dessas proteínas (AgNOR) em nível ultraestrutural (Goessens, 1984).

Durante a mitose, estudos realizados demonstram que: (Goessens, 1984)

- a) na prófase, há uma diminuição gradual do tamanho nucléolo acompanhada pelo desaparecimento do componente fibrilar e dispersão do componente granular. A ausência do componente fibrilar pode indicar, morfológicamente, parada de síntese do RNA.
- b) durante a metáfase e anáfase, o material nucleolar é difícil de ser visualizado; Podem ser detectadas pequenas quantidades do material remanescente do nucléolo em desagregação, sobre os cromossomos (na metáfase) e na periferia dos mesmos (na anáfase).
- c) durante a telófase, o nucléolo reaparece em locais específicos, geralmente próximos às constricções secundárias dos cromossomos acrocêntricos. Caracteriza-se pela nucleologênese e início da síntese de RNA.

Na interfase, as proteínas AgNOR localizam-se no centro fibrilar e, em menor quantidade no componente fibrilar (Hernandez-Verdun, 1983). Experimentos realizados com linfócitos humanos circulantes mostram que, quando a célula está em repouso (Go), somente uma NOR é visível na interfase. Após estimulação com fitohemaglutinina, os linfócitos iniciam o ciclo celular, aumentando a atividade de transcrição e o número de NORs (Arrighi et al, 1980; Schwarzacher et al, 1983; Derenzini et al, 1987); porém este aumento ocorre antes do início da síntese de DNA (Derenzini et al, 1987). Para se investigar a relação entre síntese de rRNA e as proteínas AgNOR, antes do início da síntese de DNA, Pession et al (1991) estudaram hepatócitos de ratos estimulados com cortisol, e pós hepatectomia. Observaram que, em hepatócitos de ratos estimulados com cortisol, a síntese de rRNA aumenta 1,7 vezes em relação ao controle normal; porém, a quantidade de NORs interfásicas não revela diferença significativa entre esses dois grupos. Por outro lado, analisando-se hepatócitos em regeneração observa-se que, após 12 horas de regeneração, o número de NORs interfásicas é 1,75 vezes maior do que em hepatócitos estimulados por

cortisol e, embora a aumentada, a síntese de rRNA não atinge valores semelhantes àqueles dos hepatócitos estimulados por cortisol. A injeção de ciclohexemida em ratos pós hepatectomia, previniu o aumento das AgNORs não alterando, porém, o estímulo à síntese de rRNA. Esses fatos indicam que o número de AgNORs interfásicas não está relacionado à atividade de transcrição do rRNA e podem sugerir um papel mais estrutural do que funcional para estas proteínas recém-sintetizadas (Wachtler et al, 1986; Pession et al, 1991).

Após a identificação do centro e componente fibrilares como os correspondentes interfásicos das NORs metafásicas, vários trabalhos foram realizados com o objetivo de se verificar a correlação numérica entre NORs interfásicas e metafásicas. Com essa finalidade, Vagner-Capodano et al (1984) analisaram o número de AgNORs em cultura de células de tireóide porcina interfásicas, comparando-o com o número de NORs metafásicas (reveladas por hibridização por DNA *in situ* e por impregnação pela prata). Demonstraram que, após 5 horas de cultura, o número de NORs interfásicas variava de 1 a 2 por nucléolo, tendo a maioria dos núcleos 2 NORs interfásicas, distribuídas em 1 ou 2 nucléolos. Este número não excedeu o das NORs metafásicas (máximo de 4). Após 5 dias de cultura, e administração de tireotrofina o número de NORs metafásicas aumentou respectivamente para 5,9 e 7,5. Estes dados podem indicar que há ausência de relação numérica entre NORs interfásicas e metafásicas e, principalmente, revelam que durante a interfase uma NOR metafásica pode estar distribuída em várias NORs interfásicas.

Para se estudar a correlação entre a taxa de duplicação celular e as NORs foram usadas culturas de duas linhagens de células de neuroblastoma. Quando não se acrescentava soro a estas células, elas diminuían sua atividade proliferativa, e, ao mesmo tempo, havia uma redução numérica progressiva das NORs interfásicas. Ao se acrescentar o soro à cultura, a proliferação celular aumentava e, paralelamente, o

número de NORs interfásicas. Embora estas células apresentassem níveis semelhantes de síntese de rRNA, a linhagem que proliferou mais rapidamente apresentou quantidade significativamente maior de NORs. (Derenzini et al, 1989). Esses resultados podem indicar que a quantidade de NORs interfásicas está correlacionada com a taxa de duplicação das células.

Vários estudos comparam dados de AgNOR em interfase e os de cinética celular obtidos por citometria de fluxo ou imunorreatividade ao Ki-67. Ki-67 é um anticorpo monoclonal que evidencia um componente fibrilar do nucléolo (Soomro et al, 1990) e presente somente nas células em proliferação. Estes trabalhos têm demonstrado uma boa correlação em neoplasias de pulmão (Soomro et al, 1990), tumores de mama, tireóide, fígado e cólon (Trere et al, 1991), entre as NORs e a taxa de proliferação celular medida por Ki-67. Os dados acima citados indicam que a quantidade de NORs interfásicas pode estar relacionada à taxa de proliferação celular.

Tem-se demonstrado que a análise quantitativa das AgNOR é parâmetro útil no estudo de tumores, objetivando a distinção entre neoplasias benignas e malignas bem como lesões pré-cancerosas (Crocker, 1990). Para se confirmar sua utilidade nessa área, numerosos trabalhos comparam esta técnica com outras já conhecidas e que, sabidamente, servem como parâmetro de proliferação celular. Em 27 lesões tumorais humanas de origens diferentes, as áreas de AgNOR foram comparadas com a imunorreatividade ao Ki-67 e incorporação de Bromodeoxiuridina (BrdU). Os resultados indicam que os valores de AgNOR estão relacionados de maneira linear a ambos, demonstrando claramente que a área corada pela prata está estreitamente relacionada ao tempo de duplicação celular, (Trère et al, 1991), ou seja, quando comparada com a análise de DNA por citometria de fluxo em linfomas não Hodgkin, a técnica de AgNOR também demonstrou boa correlação de resultados, sendo considerada de valor equivalente à mesma (Crocker et al, 1988).

Recentemente a técnica tem sido amplamente utilizada pelos morfologistas visando, principalmente, a diferenciação entre tumores benignos e malignos mas também para estadiamento e prognóstico dos mesmos. Deste modo foram estudados tumores de mama (Smith et Crocker, 1988; Ohri et al, 1988), tumores cutâneos (Crocker et Skilbeck, 1987; Egan et Crocker, 1988; Kanitakis et al, 1991), gástricos (Suarez et al, 1989), torácicos (Crocker et al, 1987, Crocker et al, 1988), entre outros. Aparentemente existe correlação entre o número de AgNORs por célula e o grau de malignidade dos tumores, desde que este esteja correlacionado à intensidade de proliferação celular. (Crocker et Nar, 1987; Crocker et Egan, 1988; Egan et al, 1988; Hall et al, 1988; Ohri et al, 1988; Derenzini et Ploton, 1991; Kanitakis et al, 1991; Egan et Crocker, 1992).

Em Hematologia, alguns trabalhos têm sido feitos com o objetivo de se estabelecer o padrão de AgNOR em medula óssea normal (Smetana et Livovsky, 1984; Arden et al, 1989; Nikicicz et al, 1990; Grotto et al, 1991). Observou-se que a maioria dos tipos celulares foram reconhecidos facilmente pelos critérios usuais: tamanho e forma da célula e do núcleo, presença de grânulos citoplasmáticos e tamanho do citoplasma. Contando-se diferencialmente "clusters" e pontos, cada célula apresenta seu padrão característico de AgNOR, sendo que as imaturas contêm maior quantidade de "clusters". Com o processo de maturação há diminuição do número dos mesmos, com aumento do número de pontos na célula com capacidade proliferativa. Mieloblastos e promielócitos apresentam "clusters" grandes, onde várias NORs podem ser frequentemente individualizadas. Mielócitos apresentam "clusters" menores, enquanto metamielócitos/ bastões/ neutrófilos segmentados possuem um número pequeno de pontos, com média de um por célula nestes últimos. Na série eritroblástica a distribuição de "clusters" e pontos tem padrão semelhante à da série granulocítica, com número e tamanho maiores de "clusters" em pronormoblastos que decrescem à medida que a célula se torna mais madura, até estarem ausentes em normoblastos

ortocromáticos. O número de pontos, por outro lado, atinge o seu máximo nos eritroblastos policromatófilos, e depois decresce paralelamente à maturação celular (hemoglobiogênese). (Grotto et al, 1991). Os megacariócitos apresentam numerosos AgNORs espalhados pelo núcleo refletindo, provavelmente, o estado poliplóide dos mesmos. Os linfócitos e plasmócitos mostram, geralmente, um único AgNOR compacto (Grotto et al, 1991). Segundo Nikicicz et al (1990) uma característica que distingue os precursores eritróides é a presença, nos mesmos, de "clusters" grandes e irregulares que não são observados na linhagem mielóide.

Dentre as neoplasias hematológicas, os linfomas têm sido os mais analisados com relação aos padrões morfológicos das AgNORs. A classificação dos linfomas usa medidas de proliferação celular, onde o prognóstico é estreitamente relacionado a estes parâmetros. Por esta razão, há grande interesse no estudo das características que a técnica de AgNOR pode oferecer. Crocker et al (1985), estudando 75 casos de linfomas não-Hodgkin de baixo e alto grau de malignidade, segundo a classificação de Kiel, observaram que a técnica é potencialmente útil para a distinção dos mesmos, mostrando boa correlação entre a área de AgNOR e o grau de malignidade. De acordo com Crocker et al (1987), os de baixo grau possuem quantidade significativamente menor das mesmas.

Poucos trabalhos têm sido realizados em leucemias agudas usando células em interfase. Mamaev et al (1987), encontraram resultados semelhantes entre os grupos de leucemias linfóides e não linfóides agudas e observaram grande heterogeneidade nos mesmos. Grotto et al (1993) observaram diferença entre o número de "clusters" de mieloblastos normais e os de leucemias agudas linfóide e não-linfóide, sendo os leucêmicos significativamente menores em número do que os controles normais; porém não observaram diferença entre os dois grupos de leucemias. Nakamura et al (1992), analisando AgNORs em leucemias agudas, também não observaram diferença

estatisticamente significativa entre as linfóides e não-linfóides. No entanto, comparando a contagem de AgNOR de células leucêmicas em sangue periférico e medula óssea obtiveram número maior na última, o que poderia indicar um maior potencial proliferativo da medula. Entretanto não encontraram correlação significativa entre o número de AgNOR e BrdU em células leucêmicas de 18 pacientes com leucemia linfóide aguda analisados.

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Leucemia mielóide crônica é neoplasia hematológica caracterizada por mutação somática no precursor pluripotencial envolvendo as linhagens mielóide, eritróide, megacariocítica e, algumas vezes, linfóide B, com conseqüente acúmulo de células mielóides e seus precursores. Tem característica clonal demonstrada por estudo de sistemas de polimorfismo genético, em pacientes heterozigotos para deficiência de G6PD e adenilato-quinase e que também eram portadores de LMC. (Dreazen et al, 1988).

Clínica e laboratorialmente caracteriza-se por início insidioso com esplenomegalia progressiva, anemia geralmente discreta e leucocitose às custas de aumento de neutrófilos, eosinófilos e basófilos. O número de plaquetas pode estar normal, aumentado ou diminuído. A faixa etária mais comum de aparecimento da doença é em torno de 50 anos, sem apresentar preferência por sexo. (Silver et al, 1986).

A fase inicial ou crônica, considerada "benigna", dura em média 36 meses. Nesta fase a população de granulócitos funciona como tumor "benigno" com proliferação incontrolada, porém com maturação e função aproximadamente normais. A população eritróide parece ser normal (Sokal et al, 1988). Tem-se sugerido que o

defeito biológico primário é uma maturação discordante, e não uma proliferação descontrolada das células (Silver, 1990, Fokas et al, 1991). Como consequência, há demora na maturação celular, dentro do compartimento mielóide, o que resulta no aumento do número de granulócitos. (acumulação celular). Além disso, as células parecem ter sobrevivência maior que as normais (Strife et al, 1988; Silver, 1990). Sabe-se que as células da fase crônica da LMC não são completamente autônomas, parecendo estar submetidas a algum controle regulatório (Silver, 1990). Usando C^{14} foram realizadas algumas análises para se estudar a taxa de proliferação celular em vários compartimentos da eritropoiese e granulopoiese. Observou-se que a produção de precursores granulocíticos na fase crônica é normal, não mostrando diferenças significativas com células normais quanto à proliferação e diferenciação (Andreef, 1986). O índice de marcação de C^{14} de mieloblastos em LMC, quando o número de leucócitos permanece em torno de $20.000/mm^3$, é semelhante ao normal; porém, mostra-se significativamente menor quando a contagem total de leucócitos é maior que $40.000/mm^3$. Já nos mielócitos o índice de marcação não se altera com a mudança do número de leucócitos. Conclui-se, a partir desses estudos, que a proliferação dos mieloblastos é sensível ao tamanho do compartimento mielóide. (Stryckmans et al, 1976).

O segundo estágio, ou fase acelerada, apresenta alguns sinais de progressão da doença sem, no entanto, preencher os critérios de crise blástica. É um grupo bastante heterogêneo onde pode haver tanto o desenvolvimento rápido de uma crise blástica, como também um curso mais arrastado da doença e até um controle da mesma com quimioterapia. Caracteriza-se por aparecimento de febre, dores ósseas, emagrecimento, aumento progressivo do baço e do número de leucócitos, principalmente basófilos e desenvolvimento e/ou agravamento de anemia e/ou trombocitopenia. (Sokal et al 1988).

A crise blástica caracteriza-se pela presença de mais de 20% de blastos em sangue periférico ou 30% em medula óssea ou, ainda, blastos e promielócitos em porcentagem maior que 30% em sangue periférico e maior que 50% em medula óssea. A média de sobrevivência após o início da mesma é em torno de 3 meses sendo que, em 30% dos casos, elas são de origem linfóide, geralmente de linfócitos B. (Sokal et al 1988). Em alguns casos fica evidente a capacidade de auto-amplificação dos mieloblastos (Andreef, 1986) fato este de acordo com observações de aumento de células em fase S na transformação blástica, quando comparada com a fase crônica. (Andreef, 1986).

Um achado constante (95%) na LMC é o cromossomo Filadelfia - Ph1 - que é um cromossomo 22 menor, conseqüente a uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 t(9,22) (Dreazen et al, 1988). Além desta translocação clássica, podemos encontrar translocações complexas envolvendo três ou mais cromossomos, sendo que alguns destes casos podem ser classificados, erroneamente, como Ph1 negativo (Silver 1990). Sabe-se que o cromossomo 9 está envolvido em todos os tipos de translocação detectadas na LMC. O gene do cromossomo 9 envolvido na translocação é o c-abl (um proto-oncogene), e no cromossomo 22, o bcr com função ainda desconhecida. Desta fusão resulta a produção de uma proteína de 210 KD e com atividade tirosina-quinase, semelhante à proteína viral da leucemia murina causada pelo vírus Abelson. Atualmente, sabe-se que esta proteína pode induzir transformação nas células hematopoiéticas normais (ou pré-leucêmicas), dando origem à LMC (Hughes et al, 1991). Embora a translocação c-abl tenha um papel fundamental na patogênese da leucemia mielóide crônica, ela não parece ser a única alteração responsável pela transformação maligna das células hematopoiéticas, que ocorre na LMC (Cannistra, 1990).

Trabalhos já foram realizados usando-se a técnica de AgNOR nas várias fases

de evolução da LMC, porém todos eles analisando células em metáfase. Reeves et al (1982), estudando 4 casos de LMC (sendo 3 em fase crônica e 1 em fase blástica) observaram que cerca de 50% das metáfases não se coravam. A média de AgNOR/metáfase mostrou-se semelhante àquela dos controles normais na fase crônica. No único paciente analisado em fase blástica, observaram maior porcentagem de metáfases coradas e uma média maior de AgNOR/metáfase. Mamaev et al (1985) analisando 21 pacientes portadores de LMC, sendo 14 em fase crônica e 7 em fase blástica observaram resultados semelhantes aos acima citados, o mesmo acontecendo com Sato et al (1986) ao estudar AgNOR em 14 casos de LMC na fase crônica e 6 em crise blástica. Arden et al (1989) também obtiveram resultados semelhantes aos já descritos embora tenham observado que a quantidade de metáfases coradas, bem como o número de AgNOR/metáfase, foi maior nos pacientes em crise blástica.

O único estudo realizado em pacientes portadores de LMC em interfase descreve o padrão de AgNOR obtido nos vários estágios de maturação das células sem, no entanto, mostrar se existe correlação das mesmas com as correspondentes normais e com a doença em fase blástica (Mamaev, et al, 1985).

Em vista do exposto e considerando-se a grande escassez de dados com relação à análise de AgNORs interfásicas em Leucemia Mielóide Crônica, resolvemos conduzir o presente trabalho.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- 1) Estabelecer a correlação entre as AgNORs das várias células da linhagem granulocítica do Sangue Periférico e Medula Óssea de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica.
- 2) Investigar o número de AgNOR nos elementos da série granulocítica de pacientes com LMC e compará-los com seus correspondentes normais.
- 3) Comparar o número de AgNORs em pacientes com LMC ao diagnóstico e em "recaída", após tratamento.
- 4) Comparar o número de AgNORs obtido em células blásticas de LMC fase crônica e fase blástica entre si, e com seus correspondentes normais.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Foram estudados pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica vistos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hemocentro da Unicamp.

- a) **CASOS CONTROLE:** foram analisados os esfregaços de medula óssea de 20 pacientes que não apresentaram anormalidades morfológicas das células hemopoiéticas ao exame. Foram usados casos de pacientes que haviam sido submetidos a uma punção medular para estadiamento de linfoma, casos de púrpura trombocitopênica idiopática e casos de hiperesplenismo.
- b) **Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica :**
 - b1) sangue periférico de 43 pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica na fase crônica sendo 24 ao diagnóstico (sem tratamento) e 19 na "recaída" da fase crônica após uso de busulfan. (apêndices 1 e 2, respectivamente).
 - b2) 15 medulas ósseas sendo 13 dos 24 pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica ao diagnóstico e 2 sem sangue periférico correspondente.
 - b3) sangue periférico de 16 pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em crise blástica.

As amostras de sangue periférico e medula óssea do mesmo paciente, em fase crônica, foram colhidas na mesma época.

MÉTODOS

- 1) **HEMOGRAMA:** realizadas as contagens globais: hematimetria, leucócitos e plaquetas em contadores eletrônicos Coulter T890 e Cell DYN 1.300. A análise diferencial de leucócitos e a morfologia das várias linhagens celulares foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Leishman, em microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento total de 1.000 vezes).
- 2) **MIELOGRAMA:** obtido por punção óssea em crista ilíaca posterior ou osso esternal. A coloração e análise morfológica foram realizadas de modo similar ao descrito para os esfregaços sanguíneos.

Do material obtido de cada paciente - sangue periférico e/ou medula óssea - foram usados dois esfregaços sendo um para as análises acima citadas e outro para a coloração pela prata - AgNOR.

- 3) **TÉCNICA DE COLORAÇÃO PELA PRATA - AgNOR:** realizada de acordo com método descrito por Ploton et al (1986) e Grotto et al (1991), com algumas modificações.

3.1) Fixação:

Os esfregaços foram fixados em acetona por 7 minutos, à temperatura ambiente e secos ao ar.

3.2) Solução de prata coloidal:

Solução de gelatina e ácido fórmico: a gelatina foi completamente dissolvida em água quente, deionizada, na concentração de 2%. Após seu resfriamento acrescentou-se ácido fórmico obtendo-se concentração final do mesmo de 1:100. A solução final foi alíquotada e guardada em geladeira.

Solução de nitrato de prata: preparada na concentração de 50% em água

deionizada, ao abrigo da luz e sob agitação constante, no momento de uso.

A esta solução de nitrato de prata acrescentou-se a solução de gelatina - ácido fórmico, pré-aquecida a 37° C, na proporção de 2:1, em agitador magnético para se obter-se homogeneização dos reagentes.

Após secarem ao ar os esfregaços foram cobertos com papel de filtro Whatman número 1 e a solução nitrato de prata - gelatina - ácido fórmico, passada em filtro milipore foi colocada em cima dos mesmos na quantidade de aproximadamente 8 gotas por lâmina. As mesmas foram colocadas imediatamente em câmara escura por 30 minutos a 37° C e após este tempo lavadas em água deionizada durante 10 minutos.

3.3) Contra-coloração:

Realizou-se uma contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 45 segundos, seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos e imersão rápida das lâminas em soluções sequenciais de álcool a 70%, 100% e xilol, e montadas com resina e lamínula antes de secar.

4) **CONTAGEM DAS AgNOR:** realizada em microscopia óptica sob objetiva de imersão, com aumento total de 1.000 vezes. Para cada tipo celular da granulopoiese (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados) foram contadas 30 células consecutivas. Tal procedimento foi realizado tanto na medula óssea de controles normais, como na medula óssea e sangue periférico de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. Nos pacientes em fase blástica, foram contadas 100 células blásticas consecutivas; para cada célula foi feita a distinção e contados separadamente o número de "clusters" e pontos devido ao seu significado biológico diferente e também pela dificuldade em se distinguir, em certos casos, os vários pontos contidos em um cluster (Crocker et al, 1989).

Cada esfregaço foi analisado por 2 observadores diferentes de modo duplo cego. Aceitou-se variabilidade de até 10% entre os dois observadores.

Os "clusters" foram definidos como um ou mais pontos contidos em uma matriz proteica.

Os pontos foram definidos como um AgNOR isolado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA (Glantz, S.A., 1987)

- 1) Comparação dos diversos tipos celulares da granulopoiese no sangue periférico e medula óssea de LMC fase crônica ao diagnóstico: teste de correlação e regressão linear.
- 2) Comparação entre as várias células da granulopoiese na LMC fase crônica ao diagnóstico: teste de Friedman e Student - Newman - Keuls.
- 3) Comparações entre os precursores granulopoiéticos na medula óssea normal e medula óssea de LMC fase crônica ao diagnóstico; sangue periférico de LMC fase crônica ao diagnóstico e LMC fase crônica "em recaída": utilizados testes individuais para cada tipo celular e para "clusters" e pontos: teste de Mann - Whitney.
- 4) Comparação entre mieloblastos de LMC fase crônica ao diagnóstico, LMC fase crônica em recaída e LMC em crise blástica: Teste de Kruskal - Wallis e Dunn.

RESULTADOS

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA - FASE CRÔNICA

Comparamos inicialmente os dados de medula óssea (fig. 2) e sangue periférico de pacientes com L.M.C. fase crônica ao diagnóstico (tabela I). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o número de clusters e pontos para cada tipo celular da granulopoiese. Desse modo, na L.M.C. fase crônica ao diagnóstico as células com o mesmo grau aparente de maturação têm padrões semelhantes de AgNOR na medula óssea e no sangue periférico. Globalmente houve grande correlação entre os "clusters" e pontos de um mesmo tipo celular.

O padrão de "clusters" e pontos mostrou-se característico para cada compartimento celular, revelando diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si ($p < 0,05$) tanto para o sangue periférico como para a medula óssea.

Observamos que os "clusters" estão presentes somente nas células em proliferação como mieloblastos e promielócitos sendo que os mielócitos mostraram a menor média. Com relação ao número de pontos a menor média foi observada em mieloblastos (M.O.= $0,31 \pm 0,04$ e S.P.= $0,31 \pm 0,08$) aumentando gradativamente até os mielócitos onde atingiu seu valor máximo (M.O.= $3,03 \pm 0,15$ e S.P.= $3,14 \pm 0,09$). O número de pontos decresceu novamente até neutrófilo segmentado onde a média aproximou-se de 1,0 (tabela I).

O número médio de "clusters" e pontos nos mieloblastos foi correlacionado com o número de leucócitos e porcentagem de blastos observados no sangue periférico. Os valores abaixo demonstram que não houve correlação entre:

"clusters" x leucócitos: ($r = -0,0566$)

"clusters" x blastos: ($r = -0,0010$)

pontos x leucócitos: ($r = -0,2927$)

pontos x blastos: ($r = -0,0411$)

TABELA I. Comparação entre as células da granulopoiese em LMC ao diagnóstico: sangue periférico x medula óssea.

		LMC - S.P. (n = 13)	LMC - M.O. (n = 13)
MIELOBLASTO	clusters	2,89 ± 0,14	2,89 ± 0,11
	pontos	0,30 ± 0,04	0,31 ± 0,08
PROMIELÓCITO	clusters	3,27 ± 0,13	3,29 ± 0,11
	pontos	0,64 ± 0,13	0,63 ± 0,13
MIELÓCITO	clusters	0,57 ± 0,11	0,57 ± 0,10
	pontos	3,03 ± 0,15	3,13 ± 0,09
METAMIELÓCITO	pontos	2,26 ± 0,10	2,27 ± 0,26
BASTONETE	pontos	1,16 ± 0,11	1,15 ± 0,09
SEGMENTADO	pontos	1,02 ± 0,12	1,03 ± 0,10

TESTE DE CORRELAÇÃO E REGRESSÃO LINEAR

CLUSTERS: r = 0,994 t = 58,526 p = 0,000

PONTOS: r = 0,990 t = 52,731 p = 0,000

GRANULOPOIESE NORMAL X LMC FASE CRÔNICA

Comparamos o número médio de "clusters" e pontos das células da granulopoiese entre medula óssea normal ($n = 20$) (fig. 1) e medula óssea de pacientes com LMC fase crônica ao diagnóstico ($n = 15$) (tabela II) (fig. 2).

Observamos que nos mieloblastos de medula óssea normal, o número de "clusters" foi significativamente maior do que no grupo com leucemia mielóide crônica ($p = 0,000$) o mesmo não acontecendo com relação ao número de pontos ($p = 0,098$). Já nos promielócitos e mielócitos o número de "clusters" não diferiu significativamente entre os dois grupos ($p = 0,526$ e $p = 0,738$ respectivamente) porém o número de pontos mostrou-se significativamente maior no grupo controle ($p = 0,000$). Não houve diferença significativa com relação ao número de pontos de metamielócitos, bastonetes e segmentados entre os dois grupos.

TABELA II. Comparação das médias de "clusters" e pontos nas células da granulopoiese de medula óssea normal x leucemia mielóide crônica.

		M.O Normal (n = 20)	M.O LMC (n = 15)	z	p
MIELOBLASTO	clusters	3,09 ± 0,17	2,88 ± 0,11	3,803	0,000*
	pontos	0,36 ± 0,12	0,31 ± 0,08	1,654	0,098
PROMIELÓCITO	clusters	3,21 ± 0,23	3,29 ± 0,11	0,634	0,526
	pontos	0,97 ± 0,28	0,63 ± 0,13	4,035	0,000*
MIELÓCITO	clusters	0,53 ± 0,15	0,57 ± 0,10	0,334	0,738
	pontos	3,56 ± 0,35	3,14 ± 0,09	3,369	0,000*
METAMIELÓCITO	pontos	2,31 ± 0,35	2,27 ± 0,26	0,017	0,987
BASTONETE	pontos	1,22 ± 0,15	1,15 ± 0,09	0,010	0,995
SEGMENTADO	pontos	0,99 ± 0,14	1,03 ± 0,10	0,020	0,971

Teste de Mann-Whitney.

* Foi considerado estatisticamente significante $p < 0,05$.

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA AO DIAGNÓSTICO X RECAÍDA

Foi analisado o sangue periférico de 43 pacientes com leucemia mielóide crônica em fase crônica sendo 24 ao diagnóstico (não tratados) e 19 pacientes em "recaída" da fase crônica. (tabela III).

Analisando-se os dois grupos com relação ao número médio de "clusters" e pontos nas várias células da granulopoiese observamos que o número de "clusters" de mieloblastos mostrou-se significativamente maior nos pacientes ao diagnóstico quando comparados com os em recaída, já submetidos a tratamento ($p < 0,05$). Nos promielócitos e mielócitos o número médio de "clusters" não diferiu significativamente entre os dois grupos. O número de pontos dos três tipos celulares analisados também não mostrou diferença significativa (tabela III).

TABELA III. Comparação dos precursores granulopoiéticos na LMC fase crônica ao diagnóstico, e fase crônica em "recaída" (Teste de Mann-Whitney).

		LMC DIAGNÓSTICO (n = 24)	LMC "RECAÍDA" (n = 19)	zT	p
PROMIE	clusters	3,27 ± 0,14	3,12 ± 0,20	1,872	0,061
	pontos	0,69 ± 0,17	0,70 ± 0,16	0,575	0,565
MIELO	clusters	0,62 ± 0,19	0,60 ± 0,11	0,722	0,470
	pontos	2,93 ± 0,16	3,03 ± 0,19	0,539	0,590
METAMIELO	pontos	2,32 ± 0,20	2,33 ± 0,18	0,661	0,508

PROMIE = promielócito

METAMIELO = metamielócito

MIELO = mielócito

COMPARAÇÃO DOS BLASTOS DAS DIVERSAS FASES EVOLUTIVAS NA LMC

Foram analisados, no sangue periférico, o número médio de "clusters" e pontos em mieloblastos de 24 pacientes com LMC fase crônica ao diagnóstico, 19 pacientes com LMC em "recaída" da fase crônica e 16 pacientes em crise blástica (tabela IV) (fig. 3).

Observamos que a média do número de "clusters" do grupo com LMC fase crônica ao diagnóstico mostrou-se significativamente maior quando comparada com os outros dois grupos ($p < 0,05$). Já os grupos com LMC fase crônica em recaída e em crise blástica não diferiram estatisticamente entre si.

Com relação ao número de pontos não observamos diferença significativa entre os dois grupos ($H = 2,982$ $p = 0,225$).

TABELA IV. Comparação entre mieloblastos na LMC Fase Crônica ao diagnóstico, LMC fase crônica em "recaída" e LMC crise blástica. (Teste de Kruskal-Wallis e Dunn).

		LMC DIAGNÓSTICO (n = 24)	LMC "RECAÍDA" (n = 19)	LMC CRISE BLÁSTICA (n = 16)
MIELOBLASTO	clusters	2,93±0,17	2,76±0,20	2,76±0,21
	pontos	0,28±0,08	0,26±0,09	0,32±0,12

CLUSTERS: H = 9,595 P = 0,008

	Q	P
DIAGNÓSTICO X CRISE BLÁSTICA	2,639	<0,05
DIAGNÓSTICO X "RECAÍDA"	2,598	<0,05
"RECAÍDA" X CRISE BLÁSTICA	0,118	>0,05

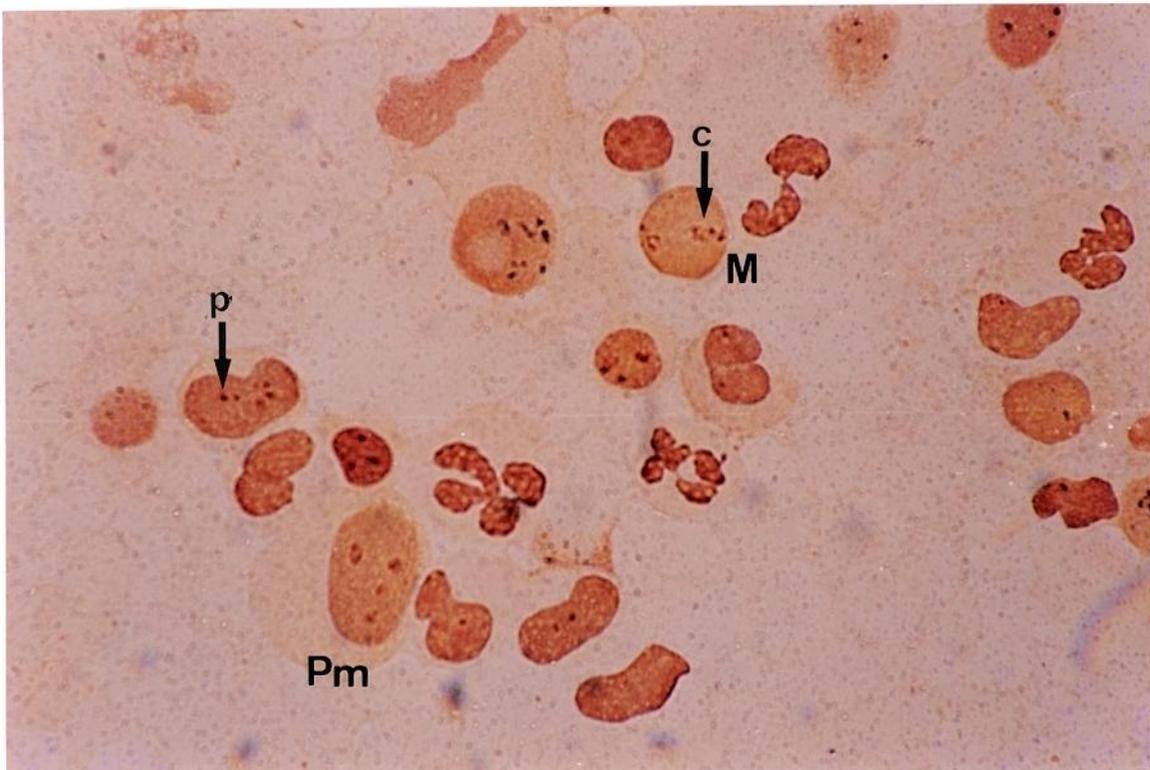


Figura 1. Medula óssea normal. M = mieloblastos; Pm = promielócitos.
As setas indicam: c = "cluster" e p = ponto

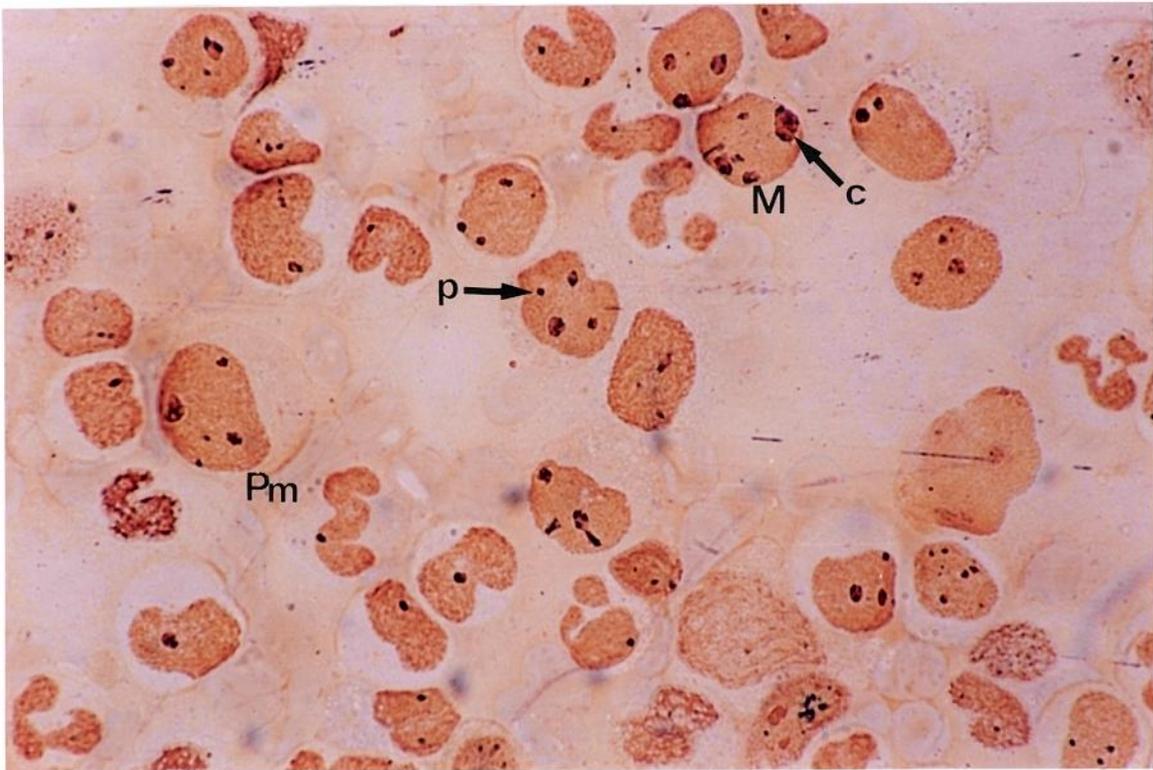


Figura 2. Medula óssea de leucemia mielóide crônica, fase crônica. M = mieloblasto; Pm = promielócito.

As setas indicam: c = "cluster" e p = ponto

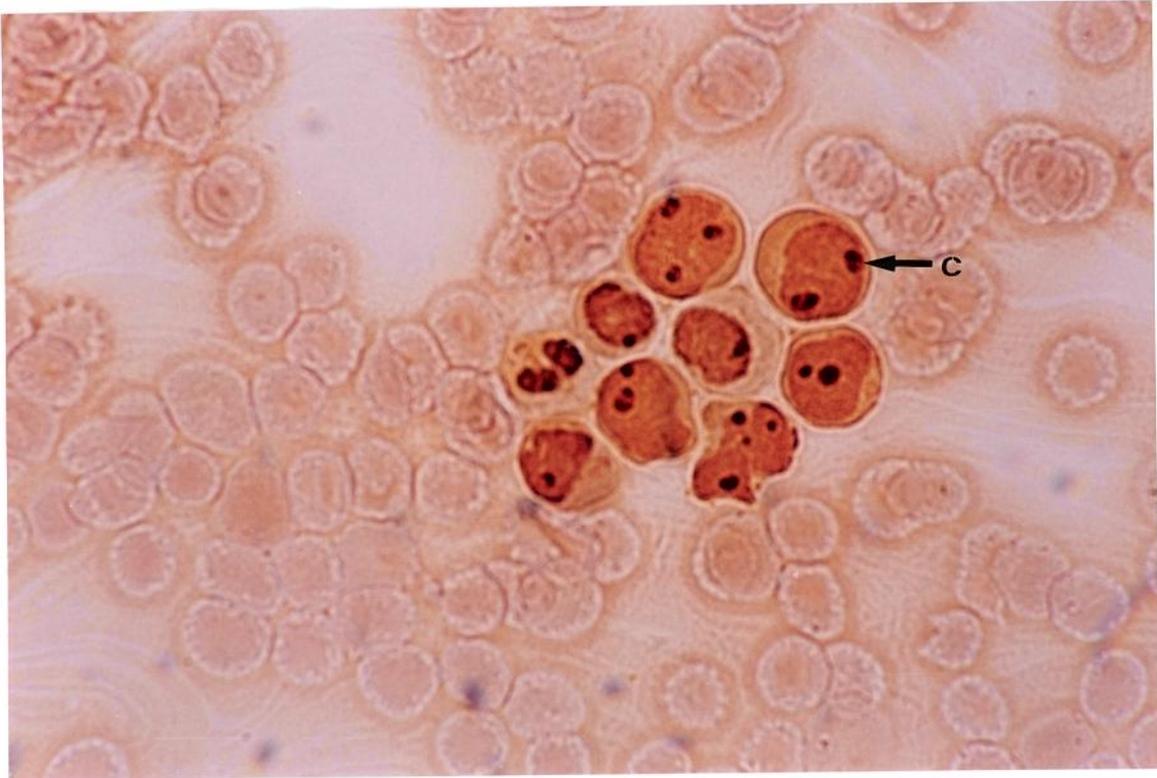


Figura 3. Sangue periférico de leucemia mielóide crônica em crise blástica.
A seta indica: c = "cluster".

DISCUSSÃO

Numerosos trabalhos têm sido publicados analisando o número e tamanho das AgNOR na tentativa de usá-los como parâmetro para diferenciar lesões benignas de malignas e, também, como parâmetro prognóstico de tumores. Assim encontramos na literatura resultados de estudos em tumores de mama (Smith et Crocker, 1988; Ohri et al, 1992), tumores cutâneos (Howat et al, 1988; Evans et al, 1991), lesões gástricas (Suarez et al, 1989), entre outros. Os dados relatados são semelhantes entre si, mostrando um número maior de AgNORs em lesões malignas quando comparados com as correspondentes benígnas. Também dentro das lesões malignas encontrou-se número maior de AgNORs em tumores de maior malignidade em bexiga (Lipponen et Eskelinen, 1992) e nos linfomas não-Hodgkin agressivos (Crocker et Nar, 1987) quando comparados com os de baixa malignidade.

Têm sido descritas características morfológicas das AgNOR que auxiliam na diferenciação das lesões. Crocker et Egan (1988) notaram relação inversa entre o tamanho das AgNOR e o número das mesmas em linfomas não Hodgkin. Derenzini et al (1988), estudando tumores epiteliais de intestino à microscopia eletrônica, demonstraram que o tecido maligno apresentava maior quantidade de AgNORs que os pólipos hiperplásicos afirmando que menor tamanho / maior número / distribuição de maneira dispersa eram características de tumores malignos. Ao contrário, número pequeno, tamanho maior e distribuição compacta caracterizavam os tumores benígnos.

Com relação à contagem de AgNOR como fator prognóstico em tumores, Egan et al (1988) estudando neuroblastomas demonstraram sua importância. Encontraram uma correlação significativa entre número de NORs e grau de diferenciação dos tumores. Também observaram aumento de sobrevida dos pacientes, relacionado à diminuição do número de NORs sugerindo, desse modo, que o número das mesmas pode ter valor prognóstico. Ruschoff et al (1990) ao analisarem carcinomas de cólon e reto mostraram que o número de AgNORs era a variável isolada mais importante para

predizer a sobrevida do paciente. Houve correlação inversa entre a taxa de sobrevida de 5 anos e o número médio de AgNOR por célula tumoral. Moran et al (1989) analisando ploidia e AgNOR em câncer de cólon e reto observaram que a sobrevida de mais de 5 anos estava relacionada com um número menor das mesmas e que, isoladamente, neste estudo, a ploidia mostrou menor valor prognóstico que a contagem de AgNORs.

Com relação às leucemias, poucos dados existem na literatura sobre estudos de AgNOR nas mesmas, principalmente no que diz respeito às células em interfase. Leucemias agudas estudadas em metáfase mostraram resultados algumas vezes conflitantes. Reeves et al (1982) compararam o número de AgNORs por metáfase em leucemias linfocíticas agudas, não-linfocíticas agudas e leucemia mielóide crônica, bem como o número de metáfases coradas nestes casos. Observaram número maior de metáfases positivas e de AgNORs/metáfase em leucemias não-linfocíticas agudas. As linfocíticas agudas comportaram-se como os controles normais. Já as LMC, também mostraram quantidade maior de metáfases com pontos impregnados pela prata do que os grupos controle e com leucemia linfocítica aguda; não significando, contudo, maior número de AgNOR/célula. Arden et al (1985) observaram resultados diferentes: o número de NORs corados mostrou-se significativamente maior em LLA do que em controles normais; mas têm-se demonstrado que não há correlação entre o número de AgNORs encontrado em metáfase e interfase (Derenzini et Ploton, 1990), pois são momentos funcionais diferentes do ciclo celular e que não podem ser comparados (Vagner-Capodano et al, 1984).

Em interfase, Nakamura et al (1992) encontraram números semelhantes de AgNORs nas leucemias agudas (linfóide e mielóide); porém, quando compararam as médias obtidas em sangue periférico e medula óssea de um mesmo caso, constataram que a última possuía uma quantidade significativamente maior de AgNORs por célula.

Estas observações são coerentes com o fato de que a célula sempre circula em Go e, na medula óssea, podemos encontrar células em vários estádios do ciclo celular (interfase). Com relação ainda às leucemias agudas, resultados semelhantes ao acima citado foram obtidos por Grotto et al (1993) onde as contagens de "clusters" não diferiram significativamente entre si nas leucemias linfóide e mielóide agudas, mas foram menores que para os mieloblastos normais.

No que diz respeito à Leucemia Mielóide Crônica, em interfase, Mamaev et al (1985) realizaram um estudo analisando AgNOR em metáfase e interfase de 21 pacientes com LMC sendo 7 deles em crise blástica, e 8 doadores normais como controle. Observaram que, o número de AgNORs por metáfase, em linfócitos do sangue periférico de pacientes com LMC e controles normais, não diferiam estatisticamente entre si. Relataram ainda heterogeneidade nas células da medula óssea, onde cerca de 67% das mesmas não continham AgNORs demonstráveis; além disso, o número de AgNORs/metáfase foi semelhante em pacientes com LMC- não tratados e em crise blástica.

No presente trabalho utilizamos a técnica das AgNOR em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica nas fases crônica e blástica em sangue periférico e medula óssea, em interfase. Observamos inicialmente que o número de "clusters" e pontos para cada tipo celular da granulopoiese é muito semelhante quando comparamos sangue periférico e medula óssea de um mesmo paciente. As células leucêmicas mostraram um padrão de "clusters" e pontos característicos para cada compartimento de maturação, semelhante aos obtidos em estudos realizados em medula óssea de indivíduos normais (Grotto et al, 1991).

Comparando-se as contagens de AgNOR de pacientes com LMC e controles normais observamos que o número médio de "clusters", em mieloblastos, foi significativamente menor nos primeiros. O número de pontos mostrou-se

significativamente menor em promielócitos e mielócitos leucêmicos. Os pacientes em crise blástica também mostraram diferença quando comparados com o grupo controle, apresentando média menor de "clusters" de AgNOR por célula blástica. Também encontramos uma aparente diferença entre o número de "clusters" em mieloblastos na LMC em fase crônica não tratados e crise blástica, sendo menor nestes últimos. Estes dados correlacionam-se com os achados de Kropff et al (1990), que estudaram mieloblastos e promielócitos de LMC em fase inicial e na crise blástica. Utilizando como metodologia citometria de varredura, e comparando-a com grau de ploidia, observaram que a quantidade de DNA aumentava de 2c, ao diagnóstico, para 2,09c na crise blástica; e que a taxa de proliferação de mieloblastos decresceu no decorrer da doença sendo de 47% ao diagnóstico e de 22,7% na crise blástica. Segundo os mesmos autores, esta queda da fração de proliferação pode permitir a previsão da crise blástica.

Ambos os grupos de pacientes leucêmicos analisados não mostram dados peculiares no que diz respeito à distribuição numérica das AgNOR, comportando-se os mesmos de maneira semelhante aos controles normais. No entanto, chamou-nos a atenção a presença de "clusters" maiores nos mieloblastos de pacientes em crise blástica.

Alguns fatores devem ser levados em consideração buscando explicar o maior número de NORs interfásicas em células neoplásicas. Elas podem estar refletindo um nível aumentado de síntese de rRNA, que frequentemente caracteriza essas células quando comparadas com as normais. Derenzini et al (1987) demonstraram que após a estimulação de linfócitos com fitohemaglutinina, o número de NORs aumenta progressivamente; porém, não está relacionado à duplicação dos genes ribossomais uma vez que este aumento numérico ocorre antes que a síntese se inicie. Wachtler et al (1986) demonstraram, através de hibridização *in situ*, que em linfócitos em repouso,

a maior parte da cromatina ribossomal tem localização extranucleolar. Após estímulo desses linfócitos com fitohemaglutinina e, antes do início da síntese de DNA, há uma redução progressiva da cromatina ribossomal extranucleolar, paralela ao aumento da cromatina ribossomal nucleolar associada às proteínas AgNOR. Estes dados indicam que o aumento das AgNORs interfásicas, em células estimuladas a proliferar, não necessariamente deve ser consequente ao aumento da síntese de rRNA. Podem sugerir, porém, um papel estrutural para essas proteínas recém sintetizadas (Pession et al, 1991). Resultados semelhantes foram obtidos por Pession et al (1991) usando hepatócitos de ratos estimulados por cortisol e hepatócitos em regeneração. Estes últimos mostraram um aumento de NORs entre 4 e 12 horas após hepatectomia parcial. No entanto, a injeção de ciclohexemida 4 horas após a hepatectomia, impediu o aumento das NORs sem modificar a quantidade de síntese de pré-RNA.

Derenzini et al (1989) estudaram a relação entre AgNORs interfásicas, atividade de síntese nucleolar, cariótipo e taxa de crescimento em 2 linhagens de células de neuroblastoma em cultura. Observaram que a taxa de síntese de RNA ribossomal, o número de cromossomos portadores de NOR e a quantidade de genes ribossomais era a mesma para as 2 linhagens. Porém o número de AgNORs por célula era 4 vezes maior na linhagem com tempo de duplicação celular mais curto. Concluíram desse trabalho que o número de NORs interfásicas não está relacionado com a atividade de síntese nucleolar ou com o número de cromossomos que as carregam, mas sim, estritamente relacionados com a capacidade de duplicação celular. Quanto maior o número de NORs, menor o tempo de duplicação celular.

Essa correlação também foi confirmada utilizando-se outros parâmetros conhecidos de cinética celular como comparação do número de NORs e células em fase S (Crocker et al, 1988), e Ki 67 (Hall et al, 1988), entre outros.

Os dados acima citados levam à conclusão de que a quantidade de AgNORs

interfásicas parece representar um bom marcador da capacidade de proliferação celular.

Em Leucemia Mielóide Crônica vários estudos relacionados à cinética celular têm sido realizados. Stryckmans et al (1976) determinaram o índice de marcação com timidina, *in vitro*, de mieloblastos e promielócitos de 9 pacientes hematologicamente normais e 21 pacientes portadores de LMC. Separando os últimos em grupos, baseado no número de leucócitos do sangue periférico observaram que, com contagem de leucócitos igual ou inferior a 20.000/mm³, o índice de marcação de mieloblastos não diferiu do grupo controle. Porém nos pacientes com contagens superiores à 40.000/mm³ esse índice foi significativamente menor (20,9%) do que nos pacientes normais (49,9%). Com relação aos mielócitos observou-se que os mesmos não eram influenciados pelo número global de leucócitos do sangue periférico mostrando valores de marcação semelhantes em LMC com contagens baixas (16,6%), altas (15,4%) e nos controles normais (18,5%). Resultados semelhantes foram observados comparando sub-populações de células progenitoras de granulócitos e monócitos de medula óssea de indivíduos normais e com LMC Ph1 positiva. As sub-populações foram separadas por gradiente de sedimentação com base em tamanho celular e mediu-se sua capacidade proliferativa através da técnica de formação de colônias. Concluiu-se que na LMC há deficiência da capacidade de proliferação dos progenitores mais imaturos da granulopoiese, concomitantemente a um aumento no número de progenitores mais maduros (Strife et al, 1983). Em 1988, o mesmo grupo de autores (Strife et al, 1988) sugeriu que o defeito biológico primário na LMC é uma maturação discordante das células. Foi demonstrado que mieloblastos, promielócitos e mielócitos da medula óssea de pacientes portadores de LMC apresentavam índice mitótico e de marcação com timidina, menores que os correspondentes normais indicando um menor potencial proliferativo dos precursores Ph1 positivos. O aumento do número total de leucócitos na LMC seria consequente a um maior número de células mais maduras da linhagem

granulocítica (bastões e neutrófilos segmentados), por acumulação celular. (Strife e Clarkson, 1988). Observações realizadas à microscopia eletrônica, indicam que a maturação das células na LMC pode ser assíncrona, sendo que o citoplasma amadurece mais rapidamente que o núcleo. Uma maturação citoplasmática mais rápida pode ser responsável pela entrada precoce dos progenitores nos compartimentos mais tardios, porém o retardo de maturação nuclear permite que a célula continue possuindo a capacidade de divisão. Além disso, estas células apresentariam tempo de circulação mais prolongado (Striffe et Clarkson, 1988).

Os resultados obtidos em nosso trabalho estão de acordo com os estudos de cinética celular realizados em LMC. Obtivemos um número de "clusters" significativamente menor em mieloblastos leucêmicos quando comparados com os correspondentes normais. Isso poderia denotar um ciclo celular mais longo e uma menor atividade proliferativa dos mesmos pois, sabemos que o número de "clusters" está relacionado à duração do ciclo celular e, conforme já citado por Derenzini et al (1988), o número de NORs interfásicas está relacionado à taxa de proliferação celular. Nos mielócitos encontramos um número de "clusters" semelhante ao dos controles normais, o que favorece os resultados obtidos por Stryckmans et al (1976). Segundo o mesmo autor, a ausência de um controle regulatório em mielócitos, o qual ocorre em mieloblastos, é um reflexo do estágio de maturação mais tardio dos mesmos. Por outro lado, comparados com o grupo controle, obtivemos um número menor de pontos em promielócitos e mielócitos em LMC ao diagnóstico. Na célula proliferante, observamos que quanto mais madura, maior é o número de pontos, pois estes estão relacionados ao grau de maturação celular das células proliferativas. No nosso caso, obtivemos um número de pontos menor em promielócitos e mielócitos de LMC ao diagnóstico, sugerindo um atraso de maturação dessas células (citoplasma maduro e núcleo ainda proliferante).

Como em nosso caso selecionamos somente pacientes com número de leucócitos iguais ou superiores a $30.000/\text{mm}^3$ no sangue periférico, não pudemos fazer a comparação do número de AgNOR por célula entre pacientes com níveis mais baixos (até 40.000) e mais altos (>40.000) de leucócitos.

Resultados interessantes foram obtidos quando comparamos os grupos de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em recaída, com os casos ao diagnóstico. O número médio de "clusters" de mieloblastos dos pacientes tratados mostrou-se significativamente menor do que os casos ao diagnóstico. O número de "clusters" de promielócitos e mielócitos, bem como o número de pontos nos três tipos celulares estudados mostrou-se semelhante nos dois grupos.

Embora a média do número de leucócitos difira bastante nos dois grupos (em recaída = $86,700/\text{mm}^3$ e novos = $284,734/\text{mm}^3$) ambas encontram-se na faixa em que o número dos mesmos no sangue periférico poderia exercer um controle negativo no índice de proliferação de mieloblastos muito embora não explicando, dessa maneira, o menor número de "clusters" encontrado nos pacientes já tratados (Stryckmans et al, 1976).

Por outro lado nossos pacientes, embora tratados, não se apresentavam num estado considerado "de remissão" uma vez que neste, o número de leucócitos permanece em torno de $15.000/\text{mm}^3$ e as propriedades funcionais e bioquímicas dos mesmos aproximam-se do normal (Pedersen, 1982). Esperar-se-ia nesse caso que também o número médio de "clusters" de mieloblastos nos pacientes em "remissão" ficasse próximo ao dos controles normais, o que não aconteceu. Outra hipótese que poderia explicar a diferença do número de "clusters" entre esses dois grupos de pacientes seria o uso de medicação alquilante. Stryckmans et al (1976) questionando a relação entre tratamento e índice normal de marcação de mieloblastos com timidina, em pacientes com leucócitos periféricos abaixo de $40.000/\text{mm}^3$, estudaram mielócitos

do sangue de 3 pacientes com LMC durante o uso de busulfan. Observaram que o índice de marcação dos mieloblastos nunca aumentou durante o tratamento; como confirmação deste fato relataram, no mesmo estudo, o caso de 2 pacientes com índice de marcação normal após longo tempo sem a medicação. Desta maneira concluíram que o tratamento não teria efeito direto na normalização do índice de marcação de mieloblastos. O Busulfan é um agente citotóxico, que pertence ao grupo dos agentes alquilantes e promove a quebra do DNA, independente da fase do ciclo celular em que a célula se encontre. Seu efeito pode estar presente no organismo, mesmo um ano após a interrupção do tratamento. (Buzaid et al, 1991). Os dados acima, não excluem a possibilidade de que, no nosso caso, o número de "clusters" tenha diminuído nos pacientes tratados como consequência da medicação, uma vez que essas células possuem capacidade proliferativa.

Quando comparamos os blastos da LMC na fase crônica e crise blástica, encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, sendo a média de "clusters" menor nos mieloblastos da crise blástica. Em um único caso da nossa amostragem, analisado em fases crônica e blástica, obtivemos resultados semelhantes aos acima citados: média de 3,08 para fase crônica e 2,78 para fase blástica. Também observamos que a média de "clusters" de mieloblastos de pacientes tratados, é semelhante à dos mieloblastos de pacientes em crise blástica. Embora não possamos excluir o efeito da medicação nos pacientes tratados, este achado levanta a hipótese de que, essa diminuição progressiva de "clusters" nos mieloblastos, seja consequente à própria evolução da doença.

Seria necessário, talvez, acompanhamento de um número significativo de pacientes durante as várias fases da doença (vários momentos evolutivos de um mesmo paciente) para possibilitar conclusões mais definidas e que nos permitam entender melhor a cinética celular da LMC, bem como o comportamento das NORs nos

vários estadios evolutivos da mesma.

Embora tenhamos obtido dados diferentes daqueles encontrados em vários tipos de tumores e que mostram um número maior de "clusters" em células tumorais malignas, salientamos que, em nosso trabalho, comparamos células normais e neoplásicas com o mesmo grau de diferenciação (mieloblastos, promielócitos e mielócitos) o que pode explicar os achados obtidos nesse estudo, aparentemente paradoxais, embora plenamente de acordo com os conceitos -universais- da cinética de proliferação de células tumorais.

CONCLUSÕES

- 1) Ao compararmos as células do sangue periférico e medula óssea de um mesmo paciente com LMC na fase crônica, ao diagnóstico, observamos que as mesmas possuem padrões semelhantes de AgNOR.
- 2) Nas células da linhagem granulocítica da LMC observamos um padrão característico de "clusters" e pontos para cada tipo celular, semelhante ao observado nas correspondentes normais.
- 3) Embora tenhamos obtido um número estatisticamente diferente entre as médias de "clusters" por blasto, entre mieloblastos normais e na LMC, não é possível, para cada blasto individualmente, distinguir uma célula normal de uma neoplásica. Há uma faixa de sobreposição de valores entre os dois grupos.
- 4) Observamos que o número de "clusters" de mieloblastos de LMC na fase crônica mostrou-se significativamente menor (a nível de 5%) nos pacientes em recaída quando comparados com os casos analisados ao diagnóstico.
- 5) Em LMC o número de "clusters" e pontos não mostrou correlação com o número de leucócitos do sangue periférico.
- 6) O número de "clusters" de mieloblastos na crise blástica da doença, diferiu significativamente dos pacientes com LMC ao diagnóstico, mas mostrou-se

semelhante, quando comparado com os blastos de fase crônica em recaída.

- 7) Por meio deste trabalho conseguimos entender melhor a citocinética em LMC pois, pela contagem diferencial de "clusters" e pontos nas células da granulopoiese, pudemos ver que :
- a) as diferenças encontradas entre os elementos normais e os de LMC refletem os distúrbios de maturação já descritos nesta doença,
 - b) o número de "clusters" nos blastos, maior ao diagnóstico, e com diminuição progressiva no decorrer da fase crônica e na crise blástica, correlaciona-se com os achados sobre proliferação celular já descritos pela análise de DNA em citometria de varredura.

RESUMO

As regiões organizadoras de nucléolo - NORs - são alças de DNA responsáveis pela síntese de RNA ribossomal (RNAr) durante a interfase. Caracterizam-se pela presença de proteínas não histonas ligadas ao RNAr que se coram pela prata - proteínas AgNORs - com grande especificidade permitindo, desse modo, a localização e consequente observação das NORs durante o ciclo celular com relação a sua atividade e comportamento.

À microscopia ótica podem ser visualizadas como pontos isolados ou agrupados em uma matriz proteica sendo então denominados "clusters".

As AgNORs estão relacionadas à taxa de duplicação celular e vários estudos têm demonstrado que sua análise quantitativa é útil na distinção de neoplasias benignas e malignas bem como no prognóstico e estadiamento das últimas.

Com o objetivo de estudarmos melhor a citocinética celular em L.M.C. analisamos as AgNOR em células da linhagem granulocítica de 43 sangues periféricos e 15 medulas ósseas de pacientes com LMC fase crônica, 16 sangues periféricos de pacientes com LMC em crise blástica e 20 medulas ósseas de pacientes controles.

Observamos que os padrões de "clusters" e pontos em LMC foram semelhantes entre sangue periférico e medula óssea de um mesmo caso, permitindo a comparação entre vários grupos. Observamos também que existe um padrão característico de "clusters" e pontos para cada tipo celular da granulopoiese.

O número de "clusters" de mieloblastos do grupo controle mostrou-se significativamente maior do que nos casos de LMC analisados ao diagnóstico. O número de pontos mostrou-se semelhante em mieloblastos, porém significativamente menor em promielócitos e mielócitos dos pacientes com LMC fase crônica ao diagnóstico, quando comparados com o grupo controle. (Tabela II).

No grupo com LMC fase crônica os casos analisados ao diagnóstico mostraram número significativamente maior de clusters em mieloblastos quando comparados com os em recaída já tratados e em crise blástica. Os dados obtidos sugerem ser a evolução da doença a responsável pela diminuição do número de clusters. Porém estes dois últimos grupos não diferiram entre si com relação ao número de clusters.

O número de pontos mostrou-se semelhante nos mieloblastos dos três grupos estudados.

SUMMARY

The nucleolar organizer regions (NORs) are loops of DNA, that are responsible for the synthesis of the ribosomal RNA.

A special silver-staining technique identifies the acidic non-histone proteins (AgNORs) associated with the sites of rRNA transcription, such as RNA polymerase I, C23 and B23 proteins. This method has been widely used for the observation of the NORs during the cell cycle in different normal and pathologic lesions. The AgNORs show different patterns in interphase nuclei: 1 - solitary rounded argyrophilic structures corresponding to a small nucleolus in resting cells, 2 - clusters of NORs within a matrix, corresponding to nucleoli, 3 - small dots (true AgNORs) scattered throughout the nucleoplasm.

The pattern of AgNORs is related to the duplication rate and to maturation stage of cells. Several studies have demonstrated that its analysis is useful in distinguishing benign from malignant lesions and for the grading of tumors.

We have analysed the pattern of AgNORs of granulopoietic cells in chronic myeloid leukemia (CML) and compared it to the normal granulopoiesis. The peripheral blood cells of 24 cases of CML in chronic phase at diagnosis, 19 cases with relapse of chronic phase and 16 cases in blast crisis were studied. On the other hand, the granulopoiesis in bone marrow of 15 cases of CML at diagnosis was compared to 20 cases of normal bone marrow.

The pattern of AgNORs was similar in the peripheral blood and bone marrow in all granulopoietic precursors of the same maturation stage, in CML at diagnoses.

As in the normal bone marrow, the granulopoietic precursors of CML in chronic phase, revealed a characteristic pattern of clusters and dots for the cells in each maturation stage.

Compared to normal granulopoiesis only the myeloblasts of CML in chronic phase at diagnosis had significantly less clusters. The dots however showed a similar number in blasts, matamyelocytes, band forms and segmented neutrophils. They were less numerous in promyelocytes and myelocytes.

The blasts of CML at diagnoses showed significantly more clusters than those at relapse after treatment of chronic phase. These, however, had a similar pattern of AgNORs than that seen in blast crisis.

The number of clusters which are only present in proliferative cells is inversely related to cell cycle duration. The number of dots increases with cell maturation in proliferating cells and decreases again after the stop of proliferative activity. In view of these data the analysis of the pattern of AgNORs in CML discloses the discordant maturation described in this disease. On the other hand the number of clusters of blast crisis in CML is lower than in normal myeloblasts and keeps decreasing continuously during the course of the disease. This pattern is similar to that described in acute myeloid leukemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREEF, M. Cell kinetics of leukemia. **Seminars in Hematology**, **23**: 300-314, 1986 .
- ARDEN, K.C., JOHNSTON,D.A.,CORK,A.,PATHAK,S. Differential nucleolus organizer activity in normal and leukemic bone marrow. **Am J Hematol**, **30**: 164-173, 1989.
- ARDEN,K.C.,PATHAK,S.,FRANKEL,L.S.,ZANDER,A. AgNOR 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.
- BABU, K.A., VERMA, R.S. Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. **Int Rev of Cytol**, **94**: 151-176, 1985.
- BUZAID, C.A., CADMAN, E. Pharmacology of antineoplastic agents and mechanisms of multidrug resistance in Hoffman, R et al (eds) **Hematology, basic principles and practice**. Churchill and Livingstone New York 1991, 669 -683.
- CANNISTA, S.A. : Chronic myelogenous Leukemia as a model for the genetic basis of cancer. **Hemat Oncol**, **4**: 337 - 357,1990.
- CROCKER,J. Nucleolar organizer regions. **Current Topics in Pathology**, **82**: 91-149, 1990.
- 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. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**, **158**: 185-188, 1989.

- CROCKER, J., EGAN,M. Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas. **J Pathol**, **156**: 233-239, 1988.
- CROCKER,J., JONES,E.L., CURRAN,R.C. A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. **J Clin Pathol**, **36**: 298-302, 1983.
- 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., 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.
- DERENZINI,M., FARABEGOLI,F., PESSION,A., NOVELLO,F. Spatial 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., HERNANDEZ-VERDUN,D., PESSION,A., NOVELLO,F. Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolema-like and compact ribonucleoprotein distribution. **J Ultrastruct Res**, **84**: 161-172, 1983.
- DERENZINI,M., PESSION,A., FARABEGOLI,F., TRERE,D., BALDIALDI,M., DEHAN,P. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. **Am J Pathol**, **134**: 925-932, 1989.

- DERENZINI,M., PESSION,A., TRERE,D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Lab Invest**, **63**: 137-140, 1990.
- DERENZINI,M., PLOTON,D. Interphase nucleolar regions in cancer cells. **Int Rev Exp Pathol**, **32**: 149-192, 1991.
- DERENZINI,M., ROMAGNOLI,T., MINGAZZINI,P., MARINOZZI,V. Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. **Virchows Arch B Cell Pathol**, **54**: 334-340, 1988.
- DERENZINI,M., TRERE,D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchows Arch B Cell Pathol**, **61**: 1-8, 1991.
- DREAZEN,O., CANAANI,E., GALE,R.P. Molecular biology of chronic myelogenous leukemia. **Sem in Hemat**, **25**: 35-49, 1988.
- EGAN,M.J., CROCKER,J. Nucleolar organizer region in cutaneous tumors. **J Pathol**, **154**: 247-253, 1988.
- EGAN,M.J., CROCKER,J. Nucleolar organizer regions in pathology. **Br J Cancer**, **65**: 1-7, 1992.
- EGAN,M.J., RAAFAT,F., CROCKER,J., WILLIAMS,D. Comparative study of degree of differentiation of neuroblastoma and mean numbers of nucleolar organizer regions. **J Clin Pathol**,**41**: 527-531, 1988.
- EVANS,A.T., ORRELL,J.M., GRANT,A. Re-evaluating silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions: a study with quantitation and pattern analysis. **J Pathol**, **165**: 61-67, 1991.

- FAKAN,S. HERNANDEZ-VERDUN,D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Biol Cell**, **56**: 189-204, 1986.
- FOKAS AS, Keller JB, Clarkson BD. Mathematical model of granulocytopoiesis and chronic myelogenous leucemia. **Cancer Res**, **51**:2084-2091, 1991.
- GLANTZ, S.A: 1987 Primer of Biostatistics, 2nd ed. MC Graw-Hill Information Services Company. New York.
- GOESSENS,G. Nucleolar structure. **Int Rev Cytol**, **87**: 107-158, 1984.
- GROTTO,H.Z.W., LORAND-METZE,I., METZE,K. Nucleolar organizer regions in normal hematopoiesis: relationship to cellular proliferation and maturation. **Nouv Rev Franç Hemat**, **33**: 1-4, 1991.
- GROTTO,H.Z.W., METZE,K., LORAND-METZE,I. Pattern of nucleolar organizer regions in human leukemic cells. **An Cell Pathol**, **5**: 203-212, 1993.
- HALL,P.A., CROCKER,J., WATTS,A., STANSFIELD,A.G. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathol**, **12**: 373-381, 1988.
- HERNANDEZ-VERDUN,D. The nucleolar organizer regions. **Biol Cell**, **49**: 191-202, 1983.
- 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.
- HUGHES, T.P.; GOLDMAN, J.M.: Chronic myeloid leukemia in Hoffman, R. et al (eds) **Hematology, basic principles and practice**. Churchill and Livingstone New York, 1991, 854-869.

JORDAN,G. At the heart of nucleolus. **Nature**, **329**: 489-490, 1987.

JORDAN, G; Mc Govern, J.H.: The quantitative relationships of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low dosis of actinomycin D in cultured human fibroblasts. **J. Cell Sci**, **52**: 373 - 389, 1981.

KANITASIS,J., HOYO,E., HERMEN,C., CHOUVET,B., THIVOLET,J. Nucleolar organizer region enumeration in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin. **Cancer**, **69**: 2937-2941, 1992.

KROPFF,M., WENZLER,Th., WAGNER,A., MULLER C.P., BOCKING,A. Bedeutung DNA-zytometrischer parameter zur vorhersage eines blastenschubs im verlauf chronisch-myeloischen leukamie. **Verh Dtsch Ges Path**, **74**: 126-129, 1990.

LIPPONEN,P.K., ESKELINEN,M.J. Argyrophilic nucleolar organizer regions in transitional cell bladder tumors related to established prognostic factors, progression and independent prognostic values. **Oncology**, **49**: 133-138, 1992.

MAMAEV,N.N., MAMAEVA,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.

MAMAEV,N.N., MAMAEVA,S., LIBURKINA,I., KOZLOVA,T., MEDVEDEVA,N., NAKARKINA,G. The activity of nucleolar organizer regions of human bone marrow cells studied with silver staining. I chronic myelocytic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, **16**: 311-320, 1985.

- MORAN,K., COOKE,T., FORSTER,G., GILLEN,P., SHEEHAN,S., DERVAN,P., FITZPATRICK,J.M. Prognostic value of nucleolar organizer regions and ploidy values in advanced colorectal cancer. **Br J Surg**, **76**: 1152-1155, 1989.
- NAKAMURA,S., TAKEDA,Y., OKABE,Y., YOSHIDA,T., OHTAKE,S., KOBAYASHI,K., KANNO,M., MATSUDA,T. argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions in acute leukemias and its relation to the S-phase fraction of leukemic cells. **Acta Haemat**, **87**: 6-10, 1992.
- NIKICICZ,E.P., NORBACK,D.H. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. **J Clin Pathol**, **43**: 723-727, 1990.
- OHRI,A.K., OHRI,S.K., HERBERT,A., ROYLE,G., TAYLOR,I. The relationship between clinical staging, oestrogen receptor status and silver-binding nucleolar organizer region (AgNOR) in breast carcinoma. **European J Surg Oncol**, **18**: 103-107, 1992.
- PEDERSEN,B. Functional and biochemical phenotype in relation to cellular age of differentiated neutrophils in chronic myeloid leukemia. **Br J Haemat**, **51**: 339-344, 1982.
- PESSION,A., FARABEGOLI,F., TRERE,D., NOVELLO,F., MONTANARO,L., SPERTI,S., RAMBELI,F., DERENZINI,M. The AgNOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli. **Chromosoma**, **100**: 242-250, 1991.
- PLOTON,D., MENAGER,M., JEANNESSON,P., PIGEON,F., ADNET,J.J. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins 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 Cytogenet**, **6**: 223-230, 1982.
- RUSCHOFF,J., BITTINGER,A., NEWMANN,K., SCHIMITZ-MOORMANN,P. Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. **Pathol Res Pract**, **186**: 85-91, 1990.
- 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.
- 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 chromosome-positive chronic myelocytic leukemia patients. **Cancer Genet Cytogenet**, **23**: 37-45, 1986.
- SCHWARZACHER,H.G., WACHTLER,F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Hum Genet**, **63**: 89-99, 1983.
- SILVER,R.T. Chronic myeloid leukemia. A perspective of the clinical and biologic issues of the chronic phase. **Hemat/Oncol**, **4**: 319-335, 1990.
- SILVER,R.T., GALE,R.P. Chronic myeloid leukemia. **Am J Med**, **80**: 1137-1147, 1986.
- SMETANA,K., LIVOVSKY,Z. Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. **Cell Tissue Res**, **237**: 367-370, 1984.
- SMITH,R. AND CROCKER,J. 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 AgNOR technique. **J Pathol**, **155**: 109-112, 1988.
- SOKAL,J.E. BACCARANI,M., RUSSO,D., TURA,S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. **Seminars in Hemat**, **25**: 49-61, 1988.
- SOOMRO,I.N., WHIMSTER,W.F. Growth fraction in lung tumors determined by Ki 67 immunostaining and comparison with AgNOR scores. **J Pathol**, **162**: 217-222, 1990.
- STRIFE,A., CLARKSON,B. Biology of chronic myelogenous leukemia: is discordant maturation the primary defect? **Seminars in Hemat**, **25**: 1-19, 1988a.
- STRIFE,A., LAMBEK,C., WISNIEWSKI,D., ARLIN,Z., THALER,H. CLARKSON,B. Proliferative potential of subpopulations of granulocyte-macrophage progenitor cell in normal subjects and chronic myelogenous leukemia patients. **Blood**, **62**: 389-397, 1983.
- STRIFE,A., LAMBEK,C., WISNIEWSKI,D., WACHTER,M., GULATI, S.C., CLARKSON,B. Discordant maturation as the primary biological defect in chronic myelogenous leukemia. **Cancer Res**, **48**: 1035-1041, 1988b.
- STRYCKMANS,P., DEBUSSCHER,L., SOQUET,M. Regulation of bone marrow myeloblast proliferation in chronic myeloid leukemia. **Cancer Res**, **36**: 3034-3038, 1976.
- SUAREZ,V., NEWMAN,J., HILEY,C., CROCKER,J. & COLLINS,M. The value of NOR numbers in neoplastic and non-neoplastic epithelium of the stomach. **Histopathol**, **14**: 61-66, 1989.

THAM,K.T., PATH,F.R.C., PAGE,D.L. Editorial. AgNOR and Ki 67 in breast lesions. **Am J Clin Pathol**, **92**: 518-520, 1989.

TREERE,D., FARABEGOLI,F., CANCELLIERI,A., CECCARELI,C., EUSEBI,V., DERENZINI,M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumors correlates with the proliferative activity evaluating by bromodeoxyuridine labelling and Ki 67 immunostaining. **J Pathol**,**165**: 53-59, 1991.

VAGNER-CAPODANO, A.M, HENDERSON, A.S. LISSITZKYS; STHAL, A. The relationship between ribosomal genes and fibrillar centers in Thyroid Cells cultured in vitro. **Biol. Cell**, **51**:11-22, 1984.

WACHTLER, F; HOPMAN, A.H.N.; WIEGANT, J.; SCHWARZACHER, H.G. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. **Exp. Cell. Res.**, **167**:227-240, 1986.

APÊNDICES

Apêndice 1. Pacientes com LMC ao diagnóstico

Sangue periférico.

Nome	Sexo	% Blastos	Leucócitos/ mm³	"Cluster" Blastos	Ponto Blastos
1) J.S.F	F	3,5	400.000	3,13	0,27
2) A.B.B.	F	1,0	121.300	3,00	0,38
3) M.R.V.S.	F	1,0	195.300	3,07	0,39
4) C.C.	F	3,0	246.000	2,77	0,12
5) E.F.	F	3,0	800.000	2,83	0,25
6) O.S.P.	M	4,0	215.000	3,27	0,30
7) A.C.G.	M	1,0	385.000	2,95	0,21
8) I.M.	F	4,0	154.000	3,04	0,10
9) I.F.S.	F	2,0	86.500	2,80	0,33
10) N.G.	M	3,0	202.000	3,01	0,30
11) A.S.	F	0,0	130.000	2,83	0,32
12) J.V.	M	4,0	305.000	3,08	0,37
13) J.S.	M	2,0	63.500	2,86	0,38
14) I.G.	M	3,0	479.000	2,79	0,30
15) E.S.	M	2,0	134.000	3,00	0,30
16) M.B.F.	F	9,0	174.500	2,75	0,39
17) R.C.D.	F	7,0	224.000	3,34	0,29
18) M.M.	F	5,0	343.000	2,90	0,20
19) J.F.F.	M	8,0	478.000	2,76	0,22
20) H.P.S.	M	6,0	407.000	2,98	0,30
21) O.F.S.	F	7,0	210.000	2,71	0,28
22) L.S.	F	6,0	436.000	3,18	0,29
23) M.N.G.	F	9,0	78.100	2,83	0,27
24) F.V.L.	M	0,0	73.600	2,41	0,45

Apêndice 2. Pacientes com LMC tratados Sangue periférico

Nome	Sexo	% Blastos	Leucócitos/ mm³	"Cluster" Blastos	Ponto Blastos
1) Z.M.S.	F	0,5	80.000	2,73	0,23
2) J.R.S.	M	1,0	96.000	2,81	0,34
3) J.F.S.	M	8,0	216.000	2,43	0,12
4) B.L.	M	7,0	400.000	2,97	0,24
5) M.A.S.	M	2,0	98.500	2,92	0,24
6) M.G.M.	F	0,0	49.500	2,88	0,30
7) A.C.C.S.	F	1,0	50.700	3,00	0,26
8) P.C.B.A.	M	2,5	80.000	2,49	0,21
9) C.L.F.	F	2,0	54.800	2,71	0,74
10) S.V.B.	F	2,0	70.800	2,82	0,48
11) E.O.	M	1,0	65.500	2,47	0,17
12) N.F.P.	M	4,0	72.600	3,08	0,31
13) L.L.	M	0,0	79.900	2,70	0,23
14) C.S.N.	M	1,5	157.000	2,52	0,39
15) L.L.C.	M	0,5	31.100	2,48	0,13
16) T.C.	F	6,0	75.500	2,80	0,28
17) C.F.N.	F	5,0	83.000	3,07	0,18
18) J.A.C.B.	M	0,0	79.000	2,7	0,2
19) S.S.P.	M	4,0	93.700	2,81	0,34