

Marcelo Addas de Carvalho

**REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS COMO
ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NAS
LEUCEMIAS AGUDAS**

Tese apresentada ao Curso de pós-graduação em
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Medicina, Área de
Clínica Médica.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas

1997

Marcelo Addas de Carvalho

**REGIÕES ORGANIZADORAS DE
NUCLÉOLOS COMO ÍNDICE DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR NAS
LEUCEMIAS AGUDAS**



UNICAMP

1997

CIDADE RC
 CHAMADA:
Unicamp
253r
 Nº BC/31406
 A. 28/1/97
 C ☐ D ☒
 VALOR R\$ 11,00
 DATA 18/09/97
 CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM-00101237-1

C253r Carvalho, Marcelo Addas de
 Regiões organizadas de nucléolos como índice de proliferação celular
 nas leucemias agudas / Marcelo Addas de Carvalho. Campinas, SP :
 [s.n.], 1997.

 Orientadores : Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze e
 Konradin Metze

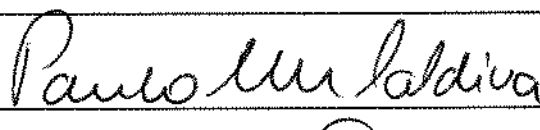
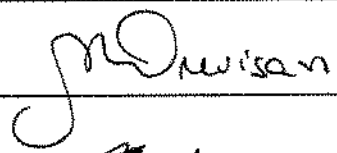
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

 1. Ciclo celular. 2. Bromodesoxiuridina - análise. 3. Técnica
 imunológica. I. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze. II.
 Konradin Metze. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Irene Gyongyver H. Lorand Metze

Membros:

1. Prof. Dr. Paulo H. N. Saldanha 
2. Profa. Dra. Miriam A. da S. Juvenon 
3. Profa. Dra. Irene G. H. Metze 

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data:

04.06.97

Agradecimentos

A meus pais Norma e Edgard pelo apoio constante e indispensável;

À minha orientadora Profa. Dra. Irene, minha admiração e agradecimento pela compreensão e apoio em minha formação profissional e no desenvolvimento deste trabalho;

À Maria Isabel e à Aglaê pelo apoio técnico na padronização das técnicas utilizadas;

Aos médicos e residentes do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, pelo auxílio e estímulo;

À Rosana, à Sandra e à minha amiga Cármem Lúcia, pelo grande auxílio na elaboração desta tese.

FAEP (*Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP*)

Sumário

Resumo.....	01
Introdução	03
Conceitos gerais: leucemia aguda.....	04
Cinética celular das células neoplásicas ênfase em leucemias agudas	06
Métodos de avaliação da cinética celular nas LA.....	09
Nucléolo e Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs)	12
Objetivos.....	21
Material e métodos	23
Casuística	24
Coloração pela prata das Regiões Organizadoras de Nucléolos	25
Avaliação quantitativa e morfométrica das AgNORs.....	26
Incorporação da bromodeoxiuridina pelas células leucêmicas “in vitro”	29
Estudo estatístico.....	31
Resultados	32
Discussão	50
Conclusões	62
Summary.....	65
Referências bibliográficas	67

Lista de Ilustrações

Figura 1	07
Figura 2	14
Figura 3	17
Figura 4	34
Figura 5	36
Figura 6	40
Tabela Ia	37
Tabela Ib.....	38
Tabela II	41
Tabela III	43
Tabela IV	45
Tabela V	46
Tabela VI	47
Tabela VII	49

Lista de Abreviaturas

Sigla	Descrição
LA	Leucemia Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LI	Índice de incorporação
%FS	Porcentagem de células na fase S do ciclo celular
TDC	Tempo de Duplicação Celular
TC	Tempo de Ciclo Celular
TS	Tempo de Síntese de DNA
RP	Razão de Produção celular
FCT	Fração de Crescimento Tumoral
TPot	Tempo de Duplicação Potencial
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
BrdU	Bromodeoxiuridina
UrdU	Iododeoxiuridina
TT	Timidina Tritiada
CSF	Fatores de Crescimento
PCNA	Antígeno Nuclear de Células Proliferantes
NOR	Região Organizadora de Nucléolo
CF	Centro Fibrilar
CoF	Componente Fibrilar
CG	Componente Granular
IN	Interstício Nucleolar
MN	Matriz Nucleolar
mAgNORs	Média do número de AgNORs por célula

Sigla	Descrição
pAgNORs	Porcentagem de células com número de AgNORs maior ou igual a 5
UAgNORs	Porcentagem de células com AgNOR "cluster" único
ANuclear	Área Nuclear
AAgNORs	Área Total de AgNORs por célula
mAAgNORs	Área média por AgNORs
%AAgNuclear	Porcentagem da área nuclear ocupada por AgNORs
AAgNuclear $\geq$ 8%	Porcentagem de células blásticas com %AAgNuclear igual ou superior a 8%
IRmod	Índice de Rüschoff modificado
IBrdU	Incorporação "in vitro" da bromodeoxiuridina
IUrdU	Incorporação "in vitro" da iododeoxiuridina

RESUMO

RESUMO

O presente trabalho investigou através da técnica de impregnação pela prata das Regiões Organizadoras de Nucléolos (AgNOR) com análise quantitativa e qualitativa e análise morfométrica 20 aspirados de medula óssea de pacientes portadores de leucemias agudas (LMA e LLA), além do estudo da incorporação da bromodeoxiuridina (IBrdU) em 14 destes casos. Os diferentes resultados foram comparados.

Encontramos na análise quantitativa um número médio de "clusters" de AgNORs igual a $2,47 \pm 0,51$ (1,68 - 3,45) e de pontos $0,34 \pm 0,12$ (0,12 - 0,58) além da porcentagem de blastos leucêmicos com "cluster" único de $18,10\% \pm 13,31\%$ (2% - 44%). A análise morfométrica das células neoplásicas dos esfregaços por técnica convencional mostrou uma média da porcentagem de área nuclear ocupada pelas AgNORs de $7,49\% \pm 1,89\%$ (2,69 - 10,58%) e um índice de Rüschoff modificado de $0,48 \pm 0,33$ (0,10 - 1,43).

A avaliação da cinética celular do material colhido através da medida do IBrdU (fração de células em fase S do ciclo celular) mostrou resultados heterogêneos quando comparamos caso a caso, com uma faixa de 2,7% a 18,5% (média=7,55% e desvio padrão=4,0%). A comparação dos parâmetros de AgNORs com o IBrdU mostrou resultado estatisticamente significativo quando utilizamos o índice de Rüschoff modificado, onde encontramos uma correlação positiva entre estes parâmetros ($R=0,6716$). Isto nos leva a crer que o IBrdU está diretamente relacionado com o número de AgNORs total e inversamente com a área de AgNORs e que estes dois parâmetros só têm significado quando associados. Através de estudo estatístico, os parâmetros de AgNORs puderam ser agrupados em 4 grupos: parâmetros relacionados com a área de AgNORs, com o número de "clusters", com o número de pontos e com a área nuclear.

Conclui-se com este estudo que o único parâmetro morfométrico que tem relação com a fração de células em fase S é o índice de Rüschoff, portanto as AgNORs e principalmente sua área dentro dos núcleos dos blastos leucêmicos provavelmente relaciona-se mais com o tempo de ciclo celular e não com a fração de células em ciclo (capacidade proliferativa).

INTRODUÇÃO

Leucemia é a proliferação de células hematopoiéticas que ocorre após uma mutação somática de uma única célula progenitora precursora que promove o surgimento de um clone neoplásico (Bain, 1990). Este clone é severamente deficiente e contém células progenitoras incapazes de maturação. A proliferação destas células progenitoras neoplásicas é excessiva em termos absolutos, isto é, o número total de células blásticas proliferantes (Williams et al, 1996). As manifestações clínicas são devidas direta ou indiretamente à proliferação das células leucêmicas e sua infiltração em diferentes tecidos levando a alterações metabólicas e disfunções de vários órgãos. São devidas também à supressão de células hematopoiéticas normais, causando anemia, infecções e hemorragias, muitas vezes fatais.

As leucemias agudas (LA) compreendem um grupo heterogêneo de condições que diferem no diagnóstico, patogênese, história natural e prognóstico. Conforme as células de origem, podem ser divididas em Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA). O grupo cooperativo Francês-Americano-Britânico classificou as LA com base em achados morfológicos, número de células blásticas e suas características citoquímicas, porcentagem de células maduras além da porcentagem de células com componente monocítico na medula óssea (Bennett et al, 1985 a, b; Bain e Catovsky, 1990). Atualmente deve-se levar também em consideração para essa classificação achados à microscopia eletrônica, imunofenotípicos, citogenéticos e até marcadores a nível de genética molecular (Bain e Catovsky, 1990; Catovsky et al, 1991).

A causa das leucemias agudas é desconhecida e provavelmente mais de um fator está envolvido. Possivelmente deve ser resultado da associação de fatores como: susceptibilidade individual, fatores químicos ou físicos levando a lesões cromossomais e também da incorporação de informações genéticas de origem viral nas células progenitoras (Williams et al, 1996).

Três mecanismos estão envolvidos na substituição do tecido hematopoiético normal pelo neoplásico:

- maior fração de crescimento, isto é, uma porcentagem maior de células neoplásicas estão em ciclo celular, associado a uma perda parcial ou total da diferenciação celular;
- sensibilidade maior aos fatores de crescimento. Esta característica pode ser secundária a mutações ou ativação de oncogenes que levam a um aumento da expressão de receptores dos fatores de crescimento (Williams et al, 1996);
- as mesmas mutações gênicas descritas anteriormente podem levar a uma diminuição da morte celular programada (apoptose) levando a uma “imortalidade” celular (Sachs e Lotem, 1993).

Vários fatores estão associados com o prognóstico dos pacientes portadores de LA, como: idade ao diagnóstico, outras doenças associadas, contagem de leucócitos ao diagnóstico, alterações citogenéticas dos blastos leucêmicos, achados imunofenotípicos, além do comportamento cinético das células blásticas neoplásicas (Williams et al, 1996). As características da cinética celular nas leucemias agudas têm sido estudadas com as finalidades de definir seu valor prognóstico e de permitir a elaboração de esquemas quimioterápicos mais adequados e eficientes. Alguns parâmetros são frequentemente avaliados como: índice de incorporação de análogos da timidina (LI), porcentagem de células em fase de síntese de DNA (%FS) avaliadas através do uso de citometria de fluxo, tempo de duplicação celular (TDC), tempo de síntese de DNA (TS), razão de produção celular (RP), fração de crescimento tumoral (FCT), entre outros, porém o seu significado ainda está pouco definido (Raza et al, 1987, 1990 a; Riccardi, 1991; Brons et al, 1993; Giordano et al, 1993; Trerè et al, 1994). Estes fatores prognósticos em combinação podem levar a identificação de grupos de maior ou menor risco e a partir desta caracterização a aplicação de protocolos terapêuticos distintos.

Cinética celular nas células neoplásicas: ênfase nas leucemias agudas

A divisão celular envolve duas ocorrências importantes:

- duplicação do DNA celular;
- divisão física da célula em 2 células-filhas.

Estes eventos caracterizam o ciclo celular que pode ser dividido em 4 períodos:

G₁ - intervalo entre a divisão nuclear prévia e o início da síntese de DNA;

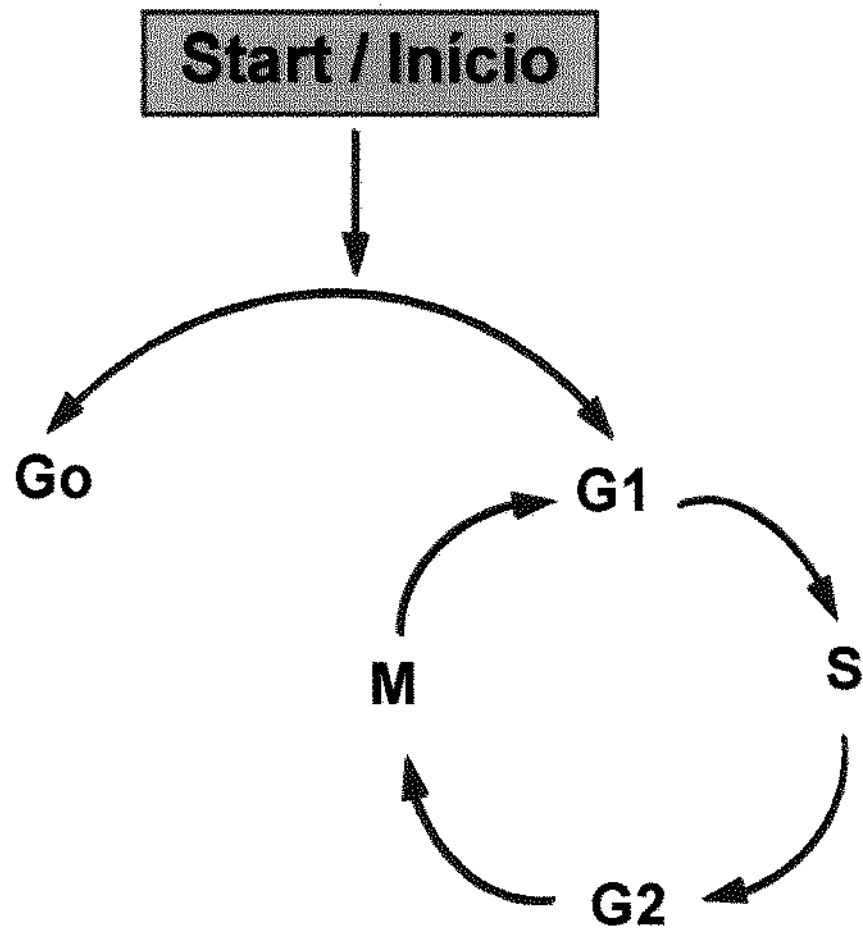
S - período de síntese do DNA;

G₂ - intervalo entre a duplicação do DNA e a divisão nuclear;

M - mitose - os cromossomos são separados com formação de 2 células filhas.

Uma porcentagem variável das células permanecem quiescentes, fora do ciclo celular (G₀). Este intervalo permite o reparo dos danos do DNA que por ventura ocorram durante a divisão celular (Figura 1). As células que permanecem em ciclo celular são chamadas de fração de crescimento tumoral (FCT).

As células neoplásicas diferem das células normais por algumas características importantes como: perda da capacidade de diferenciação, aumento da capacidade invasiva e diminuição da sensibilidade a drogas. Estas alterações por sua vez são desencadeadas por mutações ocorridas em um grupo de genes responsáveis pela manutenção e checagem da integridade gênica durante o ciclo celular (Darnell et al, 1990; Hartwell et al, 1994). Essas alterações são secundárias a uma instabilidade genética e evolução acelerada das células, além de uma inadequação dos mecanismos de reparo dos danos do DNA, o que permitem a manutenção destas mutações.



- Ciclo celular de células neoplásicas = 10-20hs
- S + G2 + M 10hs
- M = fase controlada pela proteína Nucleolina

Figura 1: Esquema das fases do ciclo celular

Nas leucemias agudas, os parâmetros de cinética celular são de difícil comparação com a hematopoiese normal, Andreeff (1986) discute em artigo de revisão vários achados cinéticos das leucemias:

- o tempo de síntese de DNA (TS) das LMAs apresentam resultados comparáveis aos obtidos nos blastos normais (média de 13,8 hs e 13,2 hs respectivamente); com relação aos blastos das LLAs, observa-se um tempo de síntese maior quando comparado com o obtido de linfoblastos normais de diferentes tecidos (timo de 7,9 hs, baço de 10,5 hs, linfonodo de 12,7 hs, medula óssea de 13,5 hs);
- a fração de células na fase de síntese de DNA (fase S) parece ser semelhante entre as LMAs e LLAs porém alguns autores encontraram um índice de incorporação de BrdU (% fase S) menor nas LMAs quando comparado com blastos normais (Giordano et al, 1993). Além disso encontra-se uma menor fração quando se analisa as células neoplásicas circulantes no sangue periférico;
- a fração de crescimento tumoral medido através da incorporação prolongada de timidina tritiada (TT) é maior nas LMAs quando comparadas com as LLAs (42,6% e 28%, respectivamente).

Porém estes achados necessitam de confirmação com outros estudos, pois existem resultados conflitantes.

O controle da proliferação e da diferenciação das células hematopoiéticas normais se faz através da ação de fatores de crescimento (CSF) e de produtos proteicos sintetizados a partir da tradução de informações de proto-oncogenes. Através destes 2 fatores associados temos: indução da proliferação celular, controle da replicação do DNA e da divisão celular (oncogenes: c-myc), modulação da diferenciação celular (G-CSF, GM-CSF) e regulação da apoptose (oncogenes: bcl-2, p53), porém nas leucemias agudas estes mecanismos de controle podem estar comprometidos (Vellenga e Griffin, 1987; Sachs, 1990; Ogawa, 1993; Sachs e Lotem, 1993).

Métodos de avaliação da cinética celular nas doenças neoplásicas: Ênfase para as leucemias agudas

O estudo da proliferação celular, associado com outros eventos que circundam o ciclo celular, tem se mostrado importante na avaliação das doenças neoplásicas, e pode ser promissor na caracterização do comportamento clínico das leucemias agudas. Vários métodos podem ser usados para avaliar as características cinéticas nestas doenças.

Métodos que reconhecem determinadas fases do ciclo celular

Tem por finalidade caracterizar a porcentagem de células na massa tumoral que se situam em um dado momento em um período específico do ciclo celular. Estes métodos representam um momento isolado e não funcionam como método de avaliação do ciclo celular como um todo.

- **Contagem de mitoses:** é o método mais tradicional, pode ser utilizado em cortes histológicos de tecidos neoplásicos. Algumas dificuldades podem ser encontradas como: reconhecimento das figuras de mitose e diferenciação destas de células apoptóticas e/ou picnóticas. Além disso a mitose representa um período curto do ciclo celular subestimando deste modo a população celular em proliferação (Rabenhorst et al, 1993; Trerè, 1993).
- **Antígeno Nuclear de Células Proliferativas (PCNA):** este antígeno é uma proteína nuclear auxiliar da DNA polimerase. Tem sido descrito que a quantidade desta proteína aumenta durante a fase G_1 do ciclo celular atingindo seu maior nível durante a fase S e declinando na fase G_2 até sua completa ausência na mitose e nas células quiescentes

(G₀). Sua presença pode ser detectada através do uso de anticorpos monoclonais e métodos de imunocito e imunohistoquímica. A desvantagem deste método é que a meia vida do PCNA é longa (aproximadamente de 20 horas) e isto pode prejudicar sua sensibilidade em neoplasias com alta velocidade de divisão celular (Rabenhorst, 1993; Trerè, 1993; Thiele e Fischer, 1993). Este método tem sido usado com bons resultados em doenças hematopoiéticas como: leucemias agudas, doenças mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas (Thiele e Fischer, 1993).

- **Incorporação de pirimidinas ao DNA celular:** estes métodos se baseiam na incorporação ao DNA recém sintetizado de substâncias marcadas que vão ser passíveis de detecção. Desta maneira é possível detectar as células que durante a exposição a estas substâncias estavam na fase S do ciclo celular. A substância mais conhecida e utilizada é a timidina tritiada, material radioativo e que apresenta dificuldades técnicas no seu manuseio, portanto seu uso é limitado (Trerè, 1993). A bromodeoxiuridina (BrdU) é um análogo da timidina e pode ser detectada pelo emprego de anticorpos monoclonais. Este método foi descrito inicialmente por Gratzner (1982) que mostrou bons resultados com a incorporação “in vitro”. Segundo este autor, o método permite a utilização da citometria de fluxo e da microscopia. A associação deste método com outros marcadores ou com a quantificação do DNA nuclear através da citometria de fluxo permite a derivação de alguns parâmetros do ciclo celular como: tempo de síntese de DNA (TS), tempo de ciclo celular (TC), índice de incorporação e duração das fases do ciclo celular (Dolbeare, 1995 a, b). A detecção e quantificação da BrdU incorporada através de técnicas de imunoquímica depende de alguns fatores: (1) afinidade e especificidade do anticorpo monoclonal, (2) método de fixação do material a ser analisado, (3) método de desnaturação parcial do DNA, pois a ligação do anticorpo monoclonal necessita da exposição da BrdU em fita única do DNA e (4) disponibilidade da BrdU no tecido a ser estudado (Dolbeare, 1995 a, b; Powell et al, 1990). Nos últimos anos a técnica de incorporação da BrdU tem sido utilizada para o estudo da cinética celular nas leucemias agudas, com incorporação “in vitro” e “in

vivo” com bons resultados na avaliação das frações de células em fase S e dos tempos de síntese de DNA e do ciclo celular (Raza, 1984; Raza et al, 1987; Falini et al, 1988; Nakamura et al, 1991; Sekine et al, 1996).

Fração de crescimento tumoral

O anticorpo monoclonal denominado Ki-67 identifica um ou vários antígenos nucleares ainda não bem caracterizados e presentes em todo o ciclo celular exceto na fase G₀ (células quiescentes). Vários estudos têm mostrado que este anticorpo pode ser utilizado como fator prognóstico em algumas doenças neoplásicas, porém existem algumas dificuldades nesta técnica pois estes antígenos parecem ser muito sensíveis a qualquer procedimento de fixação (Rabenhorst et al, 1993; Trerè, 1993).

Avaliação do tempo do ciclo celular

Durante o ciclo celular as células necessitam de maior quantidade de RNA com a finalidade de produzir crescimento citoplasmático e síntese de DNA e de proteínas estruturais da célula. Portanto observamos uma ampliação e superexpressão dos genes ribossomais revelados pela presença de grande quantidade de proteínas associadas, que têm a propriedade de serem argentofílicas. Vários estudos demonstram que estas proteínas chamadas de AgNORs, apresentam uma relação inversa entre sua quantidade e a duração do ciclo celular.

Nucléolo e regiões organizadoras de nucléolos

O nucléolo é uma estrutura evidenciada na interfase celular e descrita inicialmente por Fontana (1781). A formação desta estrutura é controlada pela ação de um grupo de genes presentes em alguns cromossomos e que se concentram numa região nucleolar específica denominada Região Organizadora de Nucléolo (NOR). Esta estrutura é de grande importância na transcrição do DNA ribossomal (DNAr) que uma vez transcrito em RNA (RNAr) constituirá os ribossomos envolvidos na síntese proteica (Crocker, 1990).

Os nucléolos são constituídos por vários componentes com características morfológicas e composição específicas à microscopia eletrônica (Goessens, 1984; Fakan e Hernandez-Verdun, 1986) (Figura 2):

- a. **CENTROS FIBRILARES (CF):** localiza-se na região central do componente fibrilar denso e apresenta estrutura fibrilar. Este componente é constituído por proteínas enzimaticamente digeríveis e por pequena quantidade de DNA (caracterizado como DNA ribossomal). As proteínas presentes neste componente apresentam uma característica própria que é a argentofilia (DNA polimerase I, topoisomerase, proteína C23 e B23). Este componente corresponde às regiões organizadoras de nucléolos (NORs) evidenciadas na interfase;
- b. **COMPONENTE FIBRILAR (CoF):** envolve os centros fibrilares e é composto por material fibrilar denso (fibras de aproximadamente 4 nm de diâmetro). Este componente é constituído predominantemente por RNA;

- c. **COMPONENTE GRANULAR (CG):** é formado por grânulos de aproximadamente 15 nm de diâmetro, que representam os ribossomos citoplasmáticos. Portanto este componente é constituído por ribonucleoproteínas (RNP);
- d. **INTERSTÍCIO NUCLEOLAR (IN):** são áreas mais ou menos esféricas, de baixa densidade, rodeada pela massa nucleolar e tem sido referido como regiões de estoque e transporte dos precursores pré-ribossomais;
- e. **CROMATINA ASSOCIADA AO NUCLEÓLO:** esta cromatina constituída por DNA Parece estar envolvida na síntese de RNA ribossomal;
- f. **MATRIZ NUCLEOLAR (MN):** esta estrutura está envolvida com o suporte dos outros componentes nucleolares. Este carioesqueleto é constituído por proteínas insolúveis.

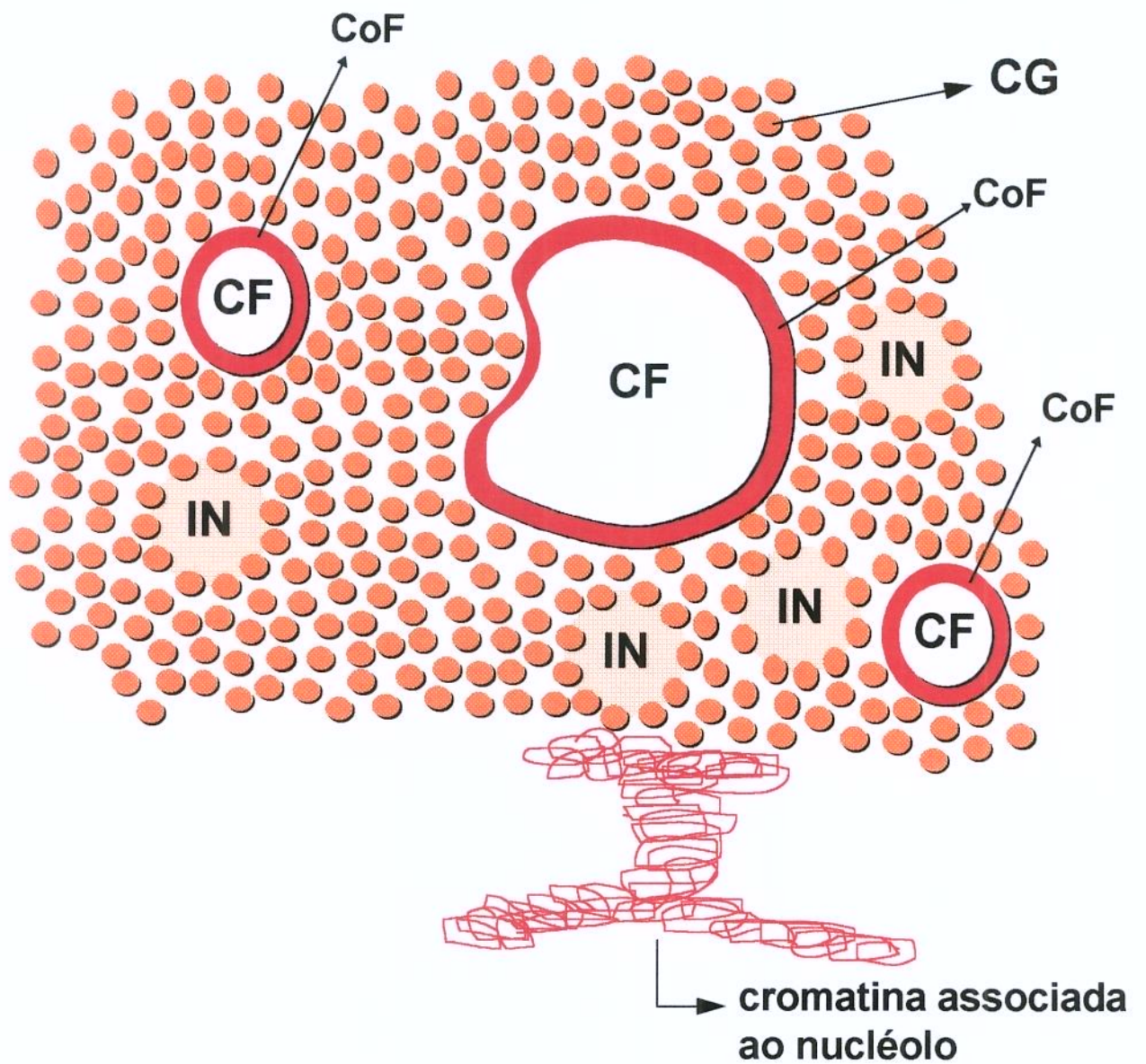


Figura 2. Esquema da estrutura de nucléolos de células eucarióticas

As NORs foram descritas pela primeira vez por Heitz (1931) e por McClintock (1934) em células de vegetais. Em torno destas regiões é que ocorre a organização do nucléolo durante a telófase. Correspondem às constrições secundárias dos cromossomos das células eucarióticas. No homem estão localizadas no braço curto dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22. Demonstrou-se também que estas regiões contêm genes ribossomais e que são ricas em proteínas argentofílicas. Correspondem aos centros fibrilares e componente fibrilar evidenciado nos nucléolos em interfase (Derenzini e Ploton, 1991; Mamaev e Mamaeva, 1990). A distribuição intranuclear diferente dos componentes nucleolares constituídos por RNP e a mudança nas suas proporções têm sido relacionadas com diferenças na síntese e processamento do RNA ribossomal. Portanto a característica morfológica dos nucléolos se deve às diferenças de distribuição das NORs na interfase (Derenzini e Ploton, 1991).

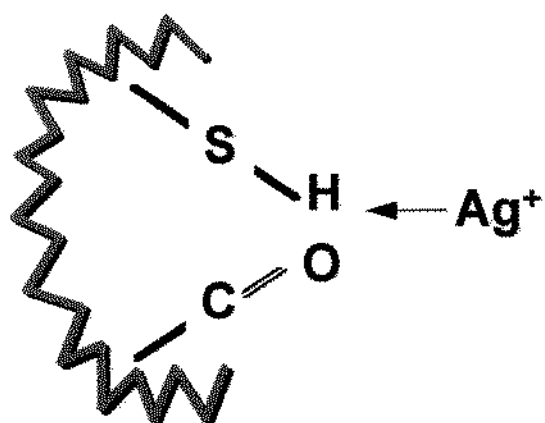
As NORs são constituídas por 3 diferentes elementos que têm função distintas (Derenzini e Ploton, 1991; Fakan et al, 1986; Hernandez-Verdun, 1983):

- a. Cromatina ribossomal: em células humanas em torno de 400 genes ribossomais estão presentes nas células em divisão e estão envolvidos com a síntese de proteínas ribossomais;
- b. RNA polimerase I e topoisomerase I: enzimas seletivamente responsáveis pela transcrição dos genes ribossomais e que se localizam nos centros fibrilares;
- c. Proteínas C23 (nucleolina) e B23. Existem algumas evidências de que estas proteínas são responsáveis pela transferência das partículas de RNP do componente fibrilar para o granular no nucléolo e como estão associadas ao RNA e DNA ribossomais, também podem estar envolvidas com o controle da razão de transcrição dos genes ribossomais mediando o estado de fosforilação destes.

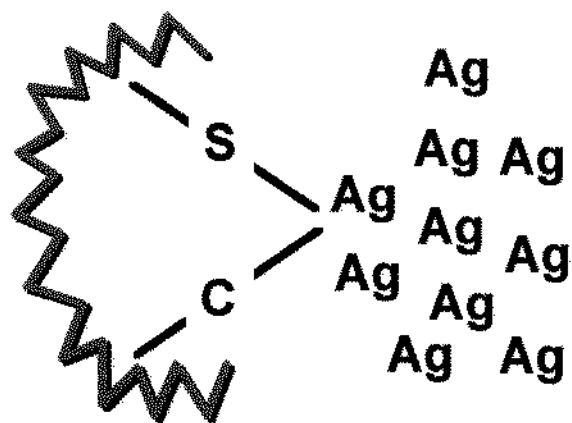
As principais proteínas relacionadas aos NORs são a RNA polimerase (subunidade I), a nucleolina e a B23. Estas apresentam características argentofílicas e através da análise das proteínas nucleares durante o ciclo celular por técnicas de eletroforese em gel

de policrilamida, Roussel e Hernandez-Verdun (1994) observaram que na interfase a argentofilia das NORs se deve principalmente às proteínas nucleolina e B23, proteínas não relacionadas a atividades de transcrição dos genes ribossomais e sim estruturais. Já na mitose celular a principal proteína argentofílica é a RNA polimerase I (Roussel e Hernandez-Verdun, 1994).

A característica de argentofilia destas proteínas não histônicas referidas se deve provavelmente aos grupos sulfidril e carboxil e a característica terciária destas. (Figura 3) (Crocker, 1990). A técnica de coloração utilizada inicialmente descrita por Goodpasture e Bloom em 1975 utilizava 2 estágios distintos onde o primeiro permitia a ligação da prata às proteínas argentofílicas e no segundo realizava-se a redução da prata com revelação da coloração (Crocker, 1990). Recentemente Ploton e colaboradores (1986) modificaram a técnica permitindo a coloração em estágio único com bons resultados. O princípio básico desta técnica é o uso combinado da prata com o revelador associado a um protetor coloidal (gelatina) permitindo uma redução da instabilidade da solução e uma menor inespecificidade. Mais recentemente alguns autores obtiveram uma maior sensibilidade do método de impregnação pela prata utilizando contra-coloração azulada (contendo cloridato de ferro, hexacianoferrato de potássio e ácido oxálico) (Yekeler et al, 1995). Alguns fatores interferem no padrão de coloração pela técnica de impregnação pela prata como a fixação do material, temperatura utilizada e tempo de exposição à prata (Smith et al, 1988; Crocker et al 1989, Crocker, 1990).



**captação dos íons prata (Ag^+)
pelos grupos carboxil ($-\text{C}=\text{O}$)
e sulfidril ($-\text{S}-\text{H}$)**



processo de nucleação

Figura 3. Esquema demonstrando o processo de coloração pela prata das proteínas argentofílicas nucleares

Outro fator envolvido na avaliação dos AgNORs é o método de contagem das imagens coradas. Pode-se evidenciar 3 tipos de AgNORs (Crocker et al, 1989):

- estrutura única, compacta e que corresponde ao nucléolo de células em G₀;
- grupo de vários pontos corados intensamente, envoltos por matriz menos corada, encontrado em células proliferantes e correspondendo aos nucléolos destas, chamados de “cluster”;
- estruturas argentofílicas isoladas de pequeno tamanho, distribuídas dentro do núcleo com coloração intensa, chamados de pontos. Estes pontos de AgNORs estão dispersos, não associados a nucléolos.

Frente à grande variedade de parâmetros envolvidos na técnica de coloração e dos padrões de apresentação das AgNORs, vários autores têm tentado criar uma padronização na sua contagem. Algumas formas podem ser utilizadas:

- contagem de todas as AgNORs dentro e fora de nucléolos, sem diferenciação em “clusters” e pontos (Derenzini e Trerè, 1991). Este método pode ser usado em material citológico ou histológico;
- contagem diferencial de “clusters” e pontos (Crocker et al, 1989).

As NORs, como já descrito anteriormente, correspondem aos centros fibrilares (CF), região rica em DNAr e que aumentam de número com o aumento da atividade de transcrição do nucléolo. Tem sido sugerido também que os CF aumentam de número por sua fragmentação e diminuem por sua fusão ou associação. Zatsepina e colaboradores (1988) demonstraram que o volume individual dos CF correlacionam-se inversamente com a atividade do nucléolo. Além disso observaram também, estudando o aspecto dos CF durante o ciclo celular, que o volume total dos CF por célula no período G₀ do ciclo é a metade do volume que no período G₂ (diplóide). Estes mesmos autores observaram que analisando-se o volume total de CF, a completa inatividade dos genes ribossomais na mitose resulta na diminuição do volume total de CF por célula. Estes achados levam a relacionar a capacidade proliferativa das células com quantidade de CF e esta corresponde

à quantidade de AgNORs. Vários estudos (Derenzini e Trerè, 1991; Öfner et al, 1992; Derenzini, Pession e Trerè, 1990; Reeves et al, 1984; Mourad et al, 1994) encontram correlação entre características proliferativas e o número e a área de AgNORs presentes no núcleo de células normais e neoplásicas. Uma correlação direta entre o número de AgNORs e a porcentagem de células em fase S do ciclo celular foi encontrada por alguns autores (Trerè et al, 1991; Mourad et al, 1993).

Estudos da área de AgNORs têm mostrado uma maior sensibilidade e objetividade na avaliação dos parâmetros cinéticos. O uso de equipamentos para análise de imagem assistida por computador tem sido preconizado como método ideal para avaliação das AgNORs (Rüschoff et al, 1990; Derenzini e Trerè, 1991). Existe uma correlação direta entre a área de AgNOR e/ou a porcentagem da área nuclear ocupada pelas AgNORs e parâmetros cinéticos como: porcentagem de células em fase S do ciclo celular (%FS) medidas por citometria de fluxo, velocidade de duplicação celular (TDC), fração de crescimento tumoral (FCT) além de outros parâmetros, porém estas correlações são encontradas somente em algumas linhagens celulares ou neoplasias analisadas (Rüschoff et al, 1989; Arden et al, 1989; Derenzini e Trerè, 1991; Charpin et al, 1992; Rüschoff et al, 1993). Com base nessas medidas de morfometria, Rüschoff e colaboradores (1989) propõem a criação de um índice que leva em consideração não só o número mas também a área de AgNORs. Este índice parece ser mais sensível na avaliação do grau de malignidade de determinadas neoplasias e assim indiretamente de parâmetros cinéticos destas células (Rüschoff et al, 1989; Rüschoff et al, 1993).

A avaliação quantitativa e/ou morfométrica das AgNORs tem sido utilizada em trabalhos e na rotina na tentativa de definir parâmetros para o diagnóstico do grau de malignidade, evolução clínica e prognóstico de determinadas neoplasias como: doenças linfoproliferativas (Crocker e Paramjit-Mar, 1987; Mourad et al, 1992; Pich et al, 1992; Freeman et al, 1993; Jakie-Razumovic et al, 1993; Pich et al, 1994), doença hepática (Anselmi et al, 1990), melanoma maligno (Howat et al, 1988), carcinoma renal (Delahunt et al, 1991), neoplasia pulmonar (Derenzini et al, 1989; Soomro et al, 1991), carcinoma de mucosa oral e glândulas salivares (Fujita et al, 1992; Schwint et al, 1994), neoplasia de

tireóide (Karmakar e Dey, 1995) e carcinoma de mama (Bockmühl, 1991; Mourad et al, 1992; Aaltomäe et al, 1993). Os estudos das AgNORs na hematopoiese normal e anormal é escasso e sem homogeneidade nos resultados.

Na hematopoiese normal, através da avaliação do número de “clusters” e pontos, Grotto e colaboradores (1991) observaram um padrão específico para cada tipo celular na linhagem de granulopoiese e eritropoiese. Estes autores observaram uma diminuição do número de “clusters” durante o amadurecimento da célula sendo estes substituídos por pontos nos elementos mais maduros. A diminuição do número de AgNORs também está relacionado com a diminuição da capacidade proliferativa das células hematopoiéticas (Smetana e Likovsky, 1984; Nikicicz e Norback, 1990; Grotto, Lorand-Metze e Metze, 1991). Nas leucemias agudas, alguns autores observaram que os blastos neoplásicos apresentam um menor número de AgNORs quando comparados com células normais. Isto vem de encontro a achados de cinética celular (Grotto et al, 1993), porém outros autores não demonstraram essa associação (Nakamura et al, 1992).

Como encontramos controvérsias na literatura quanto ao comportamento das AgNORs nas leucemias agudas e sua correlação com os achados de cinética celular, decidimos estudar o padrão de AgNOR nas leucemias agudas, estudo quantitativo à microscopia ótica e morfométrico, e a quantificação da porcentagem de blastos leucêmicos em fase de síntese de DNA (%FS).

OBJETIVOS

1. Caracterizar o padrão das AgNORs nos blastos leucêmicos através de vários parâmetros de contagem e medidas de áreas como: número médio de AgNORs “clusters” e pontos, porcentagem de células com número de AgNORs maior ou igual a 5 (pAGNORs), porcentagem de células com AgNOR “cluster” único (UAgNORs), área nuclear (Anuclear), área total de AgNORs (AAgNORs), área média AgNORs (mAAgNORs), porcentagem da área nuclear ocupada por AgNORs (%AAgNuclear), porcentagem de células blásticas com %AAgNuclear igual ou superior a 8% ($\text{AAgNuclear} \geq 8\%$) e índice de Rüschoff modificado (IRmod);
2. Estudar o comportamento da cinética celular (quantificação da células em fase de síntese de DNA) pelo método de incorporação “in vitro” da bromodeoxiuridina (IBrdU) nas células blásticas da medula óssea dos portadores de leucemias agudas;
3. Verificar as possíveis correlações entre o IBrdU e os diversos parâmetros de AgNORs;
4. Verificar as inter-relações entre os diversos parâmetros de AgNORs (contagens e medidas de área);
5. Verificar a possível associação dos parâmetros das AgNORs (contagens e medidas de áreas).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 20 pacientes adultos portadores de leucemia aguda acompanhados pela Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP no período de 1992 a 1994. De cada caso foram analisados dados clínicos e hemograma. Não foi analisado o seguimento clínico dos pacientes pois existia diferenças nos protocolos de tratamento e a casuística era pequena, o que em patologias de alta mortalidade como as leucemias agudas, inviabiliza a análise de sobrevida. Além disso foi realizado aspirado de medula óssea em todos os casos ao diagnóstico com estudo morfológico e citoquímico, sendo realizada a classificação segundo os critérios FAB.

B.1. Coloração pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs):

Esta coloração foi realizada segundo o método descrito por Ploton e colaboradores (1986) e por Smith e Crocker (1988), e adaptado para preparações citológicas.

As lâminas de esfregaço de medula óssea foram fixadas em solução de ácido acético:metanol (1:3) por 10 minutos. Foram secas a temperatura ambiente por 10 minutos. Realizou-se lavagem em solução Triton[®] 100 a 5% em tampão fosfato (PBS) por 10 minutos com a finalidade de remover substâncias proteicas extracelulares e assim diminuir o precipitado de fundo da coloração. Esta padronização foi desenvolvida neste trabalho e se mostrou eficaz.

A coloração foi realizada com solução aquosa filtrada de nitrato de prata a 50% em solução de gelatina 2% e ácido fórmico a 1% (proporção 2:1) por 10 minutos a 60°C em câmara escura. Depois realizou-se lavagem com água deionizada, desidratação, clarificação. As lâminas foram montadas com Entellan[®].

B.2. Avaliação quantitativa e morfométrica das AgNORs

As lâminas foram analisadas por dois observadores pelo método duplo cego. Foram contados separadamente em 100 blastos consecutivos os “clusters” e os pontos de AgNORs. Foram definidos como pontos as estruturas argentofílicas isoladas de pequeno tamanho com coloração intensa distribuídas dentro do núcleo e os “clusters” como o grupo de pontos corados intensamente e envoltos por matriz menos corada.

Três avaliações a microscopia ótica (aumento de 1000X de imersão) em equipamento Zeiss® foram realizadas:

- Média do número de estruturas de AgNORs (pontos e “clusters” contados separadamente) por núcleo: mAgNOR ponto e mAgNOR “clusters”;
- Porcentagem de blastos leucêmicos que exibem número maior ou igual a 5 AgNORs por núcleo (pAgNOR), este parâmetro foi utilizado pois Mourad e colaboradores (1992a, 1992b, 1993, 1994) obtiveram em estudos com linfomas e tumores sólidos uma correlação deste índice e a capacidade proliferativa destas neoplasias avaliada pela porcentagem de células em fase de síntese de DNA (fase S do ciclo celular);
- Porcentagem de blastos leucêmicos com um único “cluster” de AgNORs (UAgNORs).

A avaliação morfométrica foi realizada utilizando-se fotos realizadas em microscópio ótico Zeiss® modelo Axioskop e máquina fotográfica Zeiss® modelo MC-100 35mm com aumento de 1000X e revelação no tamanho 17 X 12 cm. Estas fotos foram utilizadas para transferência em papel milimetrado usando-se papel carbono dos contornos nucleares e dos AgNORs de 50 blastos leucêmicos. Os contornos das estruturas coradas pela prata (AgNORs) utilizados para avaliação da área das AgNORs foram definidos como toda estrutura inclusive a matriz dos “clusters” corada fracamente. Este método possibilita uma

diminuição do erro na identificação das estruturas AgNORs fortemente coradas dentro dos “clusters” que, frequentemente, são de difícil definição e variam com a intensidade de coloração (fixação e tempo de coloração).

Foram medidas as áreas nucleares e dos AgNORs em mm^2 das imagens fotográficas com cálculo das seguintes médias e desvios padrões:

- Área nuclear (ANuclear) de cada blasto: foi medido a área nuclear de 50 blastos consecutivos de cada paciente e calculado a média e o desvio padrão para cada caso;
- Área AgNORs (AAgNORs): área total corada pela prata por núcleo medida de cada célula analisada (total de 50 células por caso) e calculado a média e o desvio padrão;
- Área média de AgNORs (Área AgNORs/número de AgNORs) (mAAgNORs): este parâmetro foi calculado dividindo-se a área de AgNORs corada pelo número total de estruturas argentofílicas (“clusters” e pontos somados), após foi calculada a média e o desvio padrão de todos os casos estudados;
- Porcentagem da área nuclear ocupada por AgNORs (%AAgNuclear): para este parâmetro cada caso foi estudado separadamente com medida de 50 blastos por caso e o cálculo da média e do desvio padrão de cada caso;
- Porcentagem de células blásticas com %AAgNuclear maior ou igual a 8% ($\text{AAgNuclear} \geq 8\%$). Este parâmetro foi definido através de estudo preliminar dos 5 primeiros casos, onde analisamos o índice de incorporação de bromodeoxiuridina (IBrdU). Observamos que a definição de dois grupos com ponto de corte da porcentagem da área nuclear ocupada pelas AgNORs (%AAgNuclear) de 8% apresentava uma melhor correlação com o parâmetro de cinética celular estudado (IBrdU)

- Índice de Rüschoff modificado (IRmod) calculado segundo a seguinte fórmula:

$$IRm = \frac{\sum AgNORs / \text{número de células analisadas}}{\sum AAgNORs / \sum AgNORs}$$

OBS: este índice é chamado de modificado pois os “clusters” são computados como granulações únicas além das medidas serem realizadas em mm² das imagens fotográficas ampliadas.

C. Método de incorporação "in vitro" da bromodeoxiuridina pelas células leucêmicas

Foi obtido de 14 casos aspirado de medula óssea em seringa heparinizada. Esse material era imediatamente diluído em meio RPMI-1640 e realizada a separação das células mononucleares através de gradiente de Ficoll-Hipaque.

Após lavagem das células obtidas com meio RPMI-1640 gelado (4° C), a concentração final era ajustada para 5×10^6 células/ml e então 1 ml desta suspensão era incubado em meio contendo 5 mM de bromodeoxiuridina (DAKO®) e soro bovino fetal (15% v/v) por 60 minutos a 37° C em banho maria. Ao final da incubação, as células eram lavadas novamente em meio RPMI-1640 gelado e ressuspensas em TBS. A seguir eram feitas as preparações em citocentrífuga ("cito spin"). Estas foram secas e armazenadas a -30° C até a realização da imunocitoquímica.

Técnica Imunocitoquímica: As lâminas foram fixadas em acetona a 4°C por 10 minutos e secas a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos. Após a lavagem com TBS, foi realizada denaturação parcial do DNA nas lâminas com solução de NaOH 0,07M por 30 segundos seguido de um banho com tampão Bórax 0,1M por 2 minutos. Esta padronização foi desenvolvida neste trabalho e se mostrou necessária pois o anticorpo primário a ser utilizado se mostrou incapaz de reagir sem este procedimento.

Após a denaturação, foi realizada lavagem com TBS, incubação com soro de cavalo normal a 2% por 30 minutos e a seguir incubação com anticorpo primário: anti-bromodeoxiuridina monoclonal de camundongo (clone Bu20a - DAKO®) a uma diluição de 1:50 por 30 minutos em TBS.

Após lavagem, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina (anti-IgG) de camundongo policlonal (de cavalo - VECTOR® Laboratories) a uma diluição de 1:100 por 30 minutos e a seguir pelo mesmo tempo com o

complexo avidina-biotina-fosfatase alcalina (VECTOR[®] Laboratories). Após realizou-se incubação com substrato cromogênico (VECTOR[®] Laboratories) por 20 minutos em câmara escura e a contra-coloração com hematoxilina diluída (1:2). As lâminas foram montadas com Entellan[®].

O índice de incorporação da bromodeoxiuridina (IBrdU) foi calculado através da contagem de no mínimo 500 células consecutivas (variando de 500-2000 células) em aumento 400X à microscopia ótica.

$$\text{IBrdU} = \frac{\text{número células positivas}}{\text{número de células contadas}} \times 100$$

A positividade apresentou grau de intensidade variável, porém nunca os resultados apresentaram diferenças inter-observadores superiores a 10%.

Inicialmente foi realizada estatística descritiva calculando-se médias e desvios padrões de cada parâmetro. Os objetivos do estudo estatístico foram: 1- analisar as interrelações entre o índice de proliferação celular conhecido (índice de incorporação “in vitro” da BrdU) e os parâmetros de coloração das AgNORs estudados e 2- analisar as interrelações entre os diversos parâmetros da coloração das AgNORs. Como estas metas têm caráter exploratório, optamos pela seguinte estratégia:

- a) Calcular para 1 e 2 separadamente todas as correlações entre parâmetros usando o teste não paramétrico de Spearman. Como várias variáveis são calculadas em forma de porcentagens, elas ferem a normalidade e por isso testamos o conjunto não parametricamente. Para diminuir o nível de erro tipo I foi feita a correção do nível de significância utilizando-se a seguinte fórmula: $\alpha^* = \alpha (h \cdot x + 1)^{-1}$, sendo α o nível de significância escolhido ($p=0,05$), h o número de testes realizados e x o número de testes com significância não corrigida (método de Cross e Chaffin) (Cross e Chaffin, 1982).
- b) Com a finalidade de diminuir o erro tipo II usamos somente testes unilaterais, devido ao conhecimento de resultados previos na literatura. Com o objetivo de detectar possíveis interdependências entre variáveis, calculamos como segundo passo as correlações parciais mantendo constantes: área nuclear, número de AgNORs “clusters” ou número de pontos e num terceiro passo realizamos uma análise fatorial incluindo todas as variáveis pelo método da análise do eixo principal. Para a extração de fatores usamos o “scree test”. Neste procedimento, criamos um diagrama bidimensional com as seguintes coordenadas: eixo X - número de cada fator, eixo Y - o valor próprio de cada fator. O número de fatores a serem analisados foi determinado pela inflexão da curva obtida. A rotação dos fatores foi feita pelo processo Varimax. Variáveis com “factor loadings” acima de 0,5 foram incluídos nos respectivos fatores.

Para todos os cálculos usamos o “software” Win STAT versão 3.1 (Kalmia Co. Inc.USA).

RESULTADOS

Estudo quantitativo e qualitativo das AgNORs

Foram analisados aspirados de medula óssea de 20 pacientes portadores de leucemias agudas (LAs). Destes, 16 casos foram de leucemia mielóide aguda e 4 casos de leucemia linfóide aguda. Foram calculadas as médias (M) e o desvio padrão (DP) ($M \pm DP$) para os parâmetros quantitativos analisados:

- blastos leucêmicos em sangue periférico $55,87 \times 10^3 \pm 65,34 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (faixa de $0,5 - 230 \times 10^3 / \text{mm}^3$),
- AgNORs “clusters” $2,47 \pm 0,51$ (faixa de 1,68 - 3,45),
- AgNORs pontos $0,34 \pm 0,12$ (faixa de 0,12 - 0,58),
- pAgNORs (porcentagem de blastos com número total de AgNORs maior ou igual a 5) $9,85\% \pm 9,17\%$ (faixa de 0 - 32%),
- UAgNORs (porcentagem de blastos com “cluster” único) $18,10\% \pm 13,31\%$ (faixa de 2 - 44%).

A figura 4 mostra o padrão de coloração obtido pela técnica de impregnação pela prata realizada onde podem ser diferenciados os AgNORs “clusters” e os pontos.

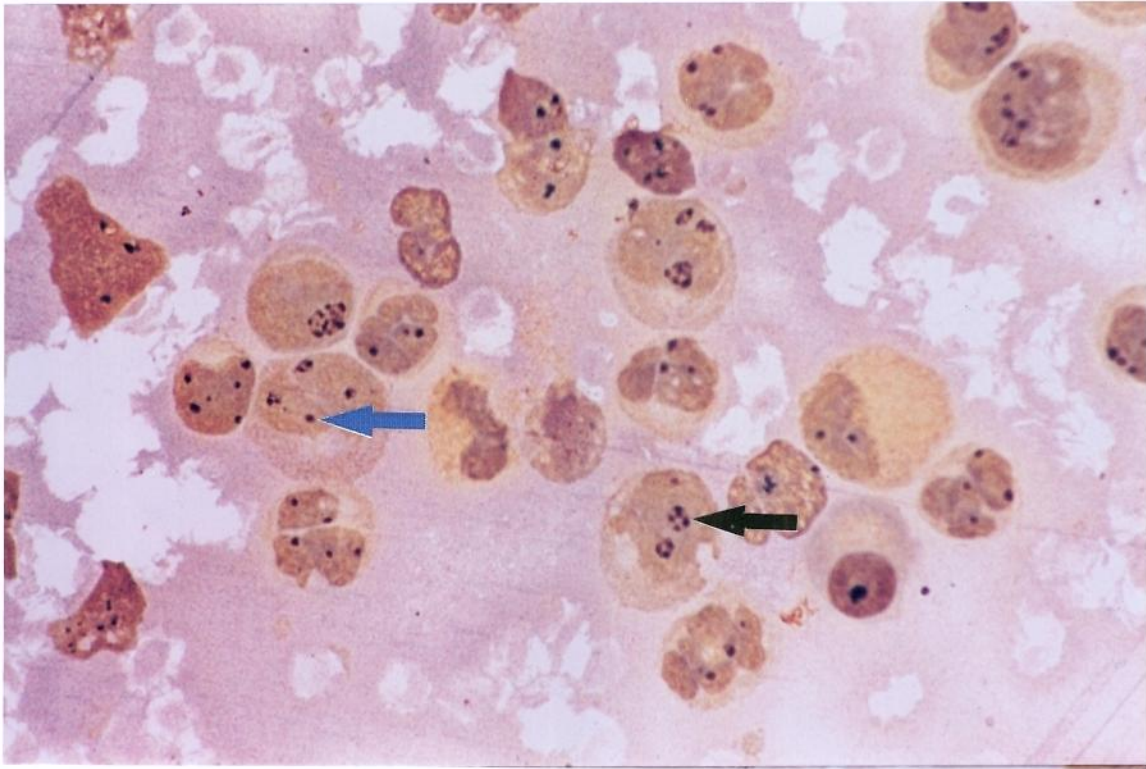


Figura 4. Coloração de esfregaço de medula óssea corado pela impregnação pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (AgNORs). “clusters” → e pontos →

O método de análise morfométrica realizado se mostrou trabalhoso porém eficaz (Figura 5). Na análise dos 5 primeiros casos não houve variação significativa dos resultados obtidos intra-observador a nível de 10 %. Para os parâmetros morfométricos (medidas de áreas) foram calculadas as médias (M) e os desvios padrões (DP) ($M \pm DP$) e encontramos:

- área nuclear (ANuclear) medidas em mm^2 : $273,32 \text{ mm}^2 \pm 64,82 \text{ mm}^2$ (159,04 - 392,00 mm^2),
- área total de AgNORs (AAgNORs): $25,24 \text{ mm}^2 \pm 22,93 \text{ mm}^2$ (7,75 - 36,96 mm^2),
- área média das AgNORs (mAAgNORs): $7,32 \text{ mm}^2 \pm 2,69 \text{ mm}^2$ (2,58 - 14,00 mm^2),
- porcentagem da área nuclear ocupada pelos AgNORs (% AAgNORs): $7,49\% \pm 1,89\%$ (2,69 - 10,58%),
- porcentagem de blastos com área nuclear ocupada pelos AgNORs superior ou igual a 8% (% AAgN $\geq 8\%$): $39,59\% \pm 26,40\%$ (0 - 87,1%),
- índice de Rüschoff modificado (IRmod): $0,48 \pm 0,33$ (0,10 - 1,43) (tabela I).

Em estudo preliminar, a porcentagem de blastos com área nuclear ocupada pela AgNORs maior ou igual a 8% (% AAgN $\geq 8\%$) foi definido como parâmetro a ser analisado. Observou-se que a definição de 2 grupos onde o ponto de corte era de 8% apresentava uma melhor correlação com o parâmetro cinético estudado (IBrdU “in vitro”). Na análise com o grupo completo, esta correlação não foi observada.

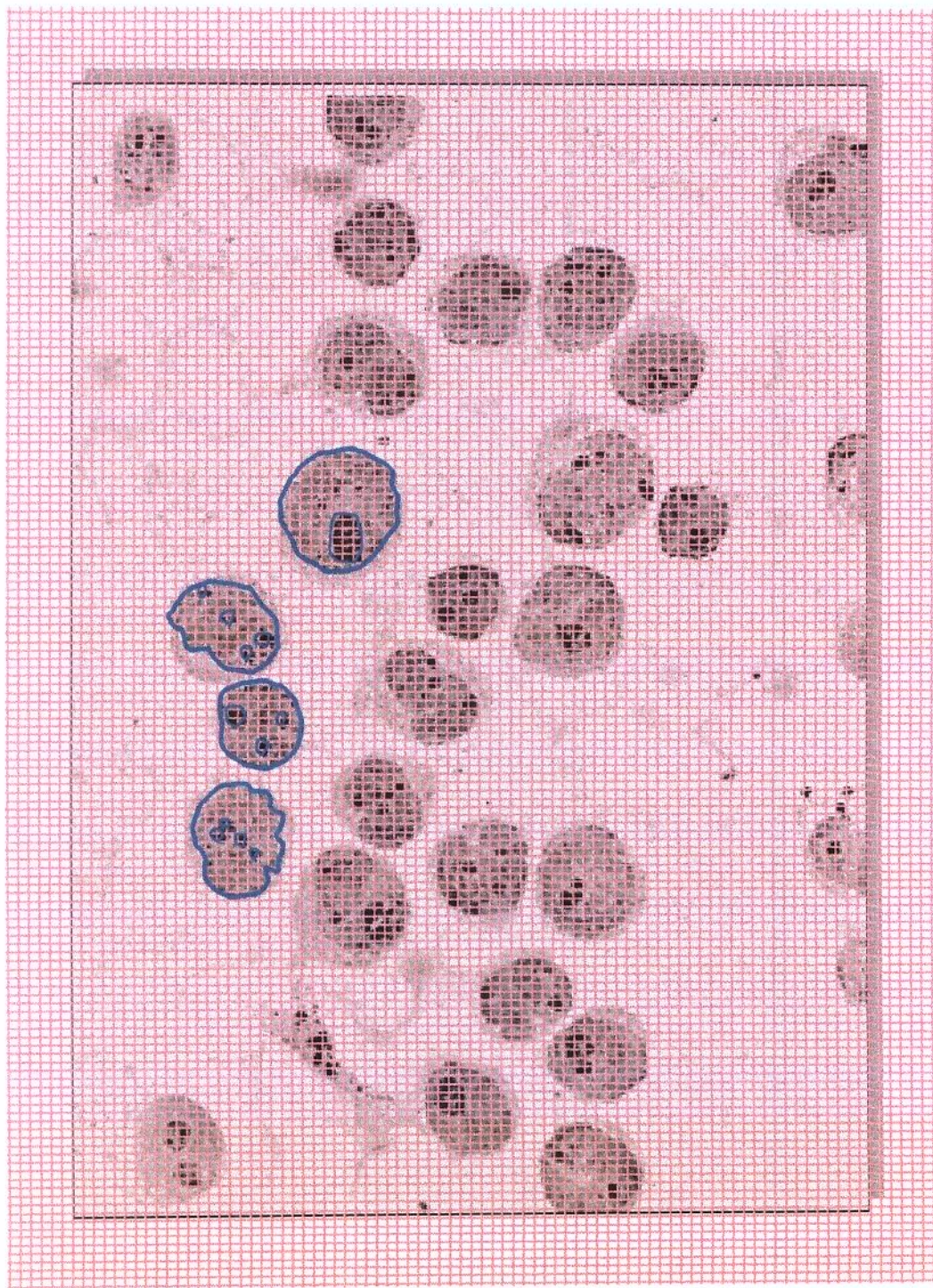


Figura 5. Coloração de AgNORs. Método utilizado para análise morfométrica.

Tabela Ia. Resultados das análises dos casos de leucemias agudas (LA)

cito número	Blastos sg periférico	AgNORS clusters	AgNORS pontos	pAgNOR (%)	UAgNOR (%)	Área Nuclear (mm ²)	Área AgNORS (mm ²)	mAgNOR (mm ²)	%AAgN (%)	% AAgN ≥ 8% (%)	IRmod	I-BrdU (%)
292/92	0,5 x 10 ³	2,42 ± 1,35	0,22 ± 0,41	12	30	392,0 ± 118,2	36,96 ± 16,92	14,00	9,61 ± 3,67	68	0,10	9,5
448/92	1,5 x 10 ³	2,34 ± 1,13	0,31 ± 0,54	6	30	201,8 ± 7,24	20,82 ± 7,24	7,85	10,58 ± 3,03	87	0,29	5,2
466/92	135 x 10 ³	2,44 ± 0,83	0,31 ± 0,52	14	9	291,32 ± 58,78	18,06 ± 8,18	6,5678	6,02 ± 2,09	18	0,53	10,2
536/92	115 x 10 ³	2,23 ± 0,88	0,37 ± 0,48	6	19	240,90 ± 97,87	18,70 ± 11,39	7,19	7,73 ± 3,49	30	0,33	8,9
539/92	5 x 10 ³	2,78 ± 1,04	0,58 ± 0,66	15	8	208,78 ± 47,40	11,40 ± 4,46	3,39	5,38 ± 1,49	2	1,30	18,5
569/92	45 x 10 ³	2,46 ± 0,65	0,54 ± 0,61	1	2	298,79 ± 68,19	7,75 ± 3,59	2,58	2,69 ± 1,34	0	1,43	10,4
630/92	150 x 10 ³	2,25 ± 0,83	0,25 ± 0,45	4	18	209,16 ± 53,03	19,04 ± 7,48	7,21	8,91 ± 2,22	64	0,38	6,25
669/92	230 x 10 ³	3,31 ± 1,33	0,28 ± 0,54	24	7	257,36 ± 72,58	19,88 ± 6,69	5,53	7,75 ± 1,79	42	0,55	7,7
670/92	120 x 10 ³	1,68 ± 0,69	0,28 ± 0,47	1	44	276,36 ± 66,16	18,70 ± 9,72	9,54	6,60 ± 2,39	30	0,23	3,9
846/92	90 x 10 ³	3,12 ± 1,11	0,25 ± 0,45	17	3	384,72 ± 84,28	25,66 ± 12,26	7,61	6,65 ± 2,46	32	0,44	5,1
926/92	4,5 x 10 ³	2,06 ± 0,81	0,34 ± 0,55	6	19	214,66 ± 48,10	14,58 ± 7,06	6,07	6,70 ± 2,72	28	0,39	6
689/93	60 x 10 ³	2,58 ± 1,03	0,54 ± 0,70	59	20	325,20 ± 83,47	19,78 ± 17,12	6,34	5,71 ± 3,66	18	0,49	2,7
1094/93	0,5 x 10 ³	2,78 ± 0,97	0,36 ± 0,74	9	7	374,28 ± 59,12	30,96 ± 10,56	9,86	8,21 ± 2,30	54	0,31	7,7
1109/93	110 x 10 ³	2,30 ± 1,05	0,22 ± 0,41	2	14	278,66 ± 70,03	29,30 ± 13,68	11,62	10,11 ± 3,44	70	0,21	3,7
média	75,50 x 10 ³	2,48	0,33	8,71	16,42	282,38	20,82	7,52	7,33	38,84	0,49	7,55
desvio padrão	70,83 x 10 ³	0,42	0,15	6,80	11,94	66,44	7,74	3,01	2,11	26,48	0,38	4,00

Resultados

Tabela Ib. Resultado da análise de 6 casos de leucemias agudas (LA), onde não foi realizado a técnica de incorporação de BrdU “in vitro” (I-BrdU)

cito número	Blastos sg periférico	AgNORs clusters	AgNORs pontos	pAgNORs (%)	UAgNOR (%)	Área Nuclear (mm ²)	Área AgNORs (mm ²)	mAgNOR (mm ²)	%AAgN (%)	% AAaN ≥ 8% (%)	IRmod	I-BrdU (%)
737/92	0,5 x 10 ³	1,64 ± 0,59	0,48 ± 0,62	0	42	159,04 ± 35,65	11,76 ± 7,66	5,54	8,01 ± 7,59	26	0,39	NR
798/92	45 x 10 ³	1,82 ± 0,83	0,25 ± 0,51	2	40	293,04 ± 66,06	16,18 ± 6,24	7,81	6,60 ± 6,75	6	0,28	NR
961/92	0,5 x 10 ³	2,40 ± 1,03	0,12 ± 0,32	4	12	307,78 ± 54,71	25,90 ± 8,53	10,27	8,48 ± 2,61	66	0,30	NR
983/93	45 x 10 ³	3,45 ± 1,12	0,47 ± 0,71	32	2	220,72 ± 58,63	22,16 ± 7,41	5,65	10,09 ± 2,41	84	0,65	NR
490/93	0,5 x 10 ³	3,28 ± 1,39	0,44 ± 0,64	27	10	309,50 ± 84,48	22,06 ± 7,11	5,93	7,30 ± 2,19	38	0,66	NR
736/93	50 x 10 ³	2,21 ± 1,34	0,35 ± 0,57	10	26	222,44 ± 51,51	15,34 ± 6,79	5,99	6,73 ± 2,02	28	0,36	NR

	Blastos sg periférico	AgNORs clusters	AgNORs pontos	pAgNORs (%)	UAgNOR (%)	Área Nuclear (mm ²)	Área AgNORs (mm ²)	mAgNOR (mm ²)	%AAgN (%)	% AAaN ≥ 8% (%)	IRmod	BrdU-I (%)
média	55,87	2,47	0,34	9,85	18,10	273,32	25,24	7,32	7,49	39,59	0,48	NR
desvio padrão	65,36	0,51	0,12	9,17	13,31	64,82	22,93	2,69	1,89	26,40	0,33	NR

O comportamento cinético celular foi estudado através do método de incorporação “in vitro” da bromodeoxiuridina (IBrdU) que avalia a porcentagem de células na fase de síntese de DNA (fase S) no momento da coleta do material (figura 6). Esta técnica foi possível em 14 casos de LAs (12 de LMA e 2 de LLA). O IBrdU apresentou uma faixa de 2,7% a 18,5% (média = 7,55% e desvio padrão = 4,0%). Os resultados são mostrados na tabela I.

A correlação múltipla pelo teste de Spearman se mostrou estatisticamente significativa (nível de significância corrigido menor que 0,005) somente entre o índice de Rüschhoff modificado e o IBrdU, como mostra a tabela II. As demais correlações não mostraram significado. Esta correlação mostrou um coeficiente positivo ($R=+0,6716$). Isto significa que quanto maior o IBrdU, isto é, maior a porcentagem de células blásticas em fase S do ciclo celular, maior será o IRmod. Analisando os parâmetros envolvidos no cálculo deste índice observamos que existe uma correlação positiva entre o IBrdU e o número de AgNORs total e negativa entre aquele parâmetro cinético e a área de AgNORs, porém este significado estatístico só ocorre no âmbito da fórmula e não com os parâmetros isolados.

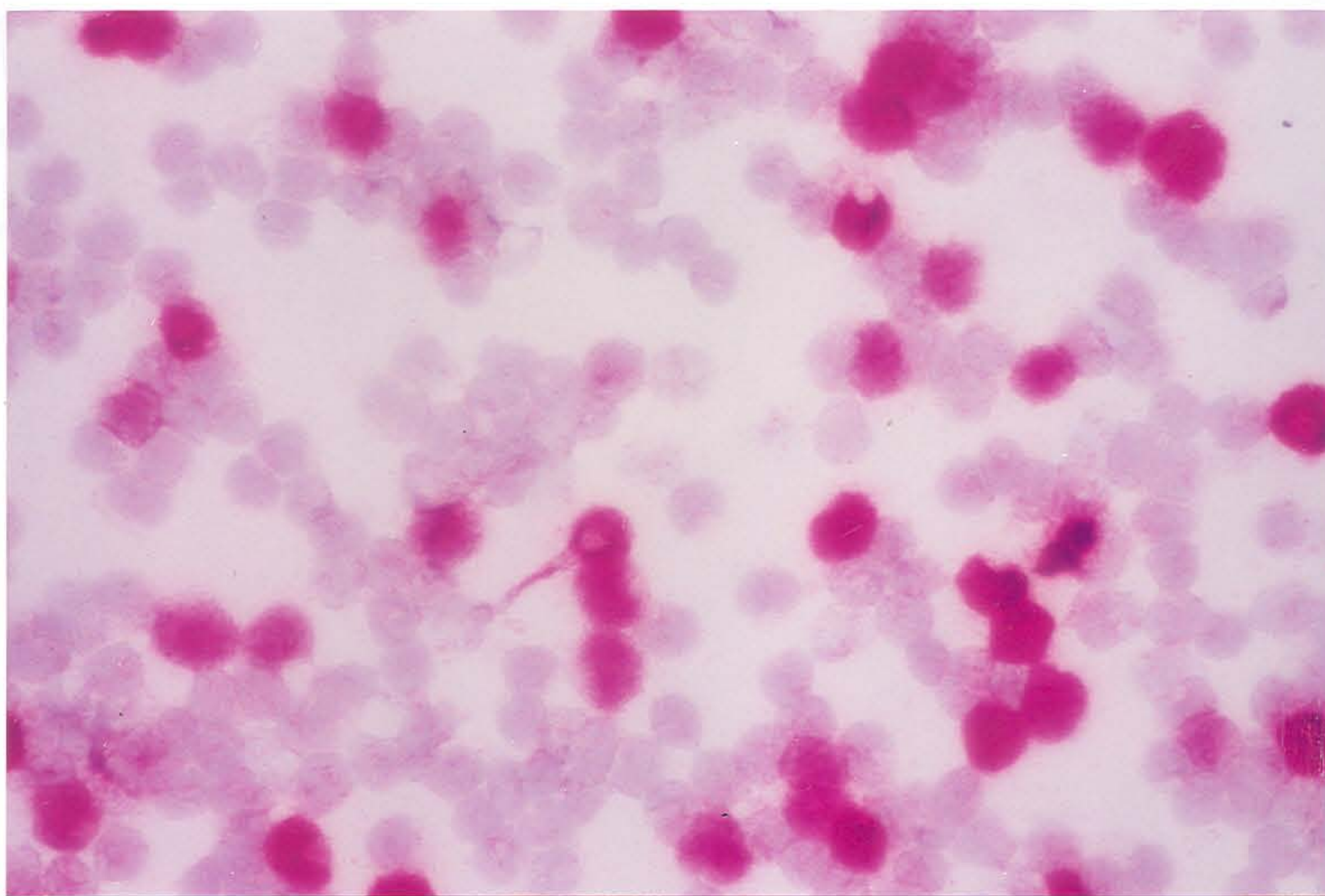


Figura 6. Incorporação de bromodeoxiuridina (IBrdU). Coloração de imunocitoquímica pela técnica complexo avidina-biotina-fosfatase alcalina

Tabela II. Correlação múltipla com significância unilateral pelo método de Spearman entre o IBrdU e parâmetros de hemograma e AgNORs

Blastos em sangue periférico	R = -0,22052 p = 0,22434	NS
mAgNORs “clusters”	R = 0,26075 p = 0,18394	NS
mAgNORs pontos	R = 0,47225 p = 0,04408	NS
pAgNORs	R = 0,37944 p = 0,09043	NS
UAgNOR	R = -0,38571 p = 0,08658	NS
ANuclear	R = -0,17311 p = 0,27698	NS
AAgNORs	R = -0,34185 p = 0,11578	NS
mAAgNORs	R = -0,30651 p = 0,14324	NS
% AAgNuclear	R = -0,36499 p = 0,09971	NS
% AAgNucl ≥ 8%	R = -0,44977 p = 0,05330	NS
IRmod	R = 0,67164 p = 0,00426	p < 0,005

NS = não significativo

p = 0,005 Nível de significância corrigido calculado por $\alpha^* = \alpha \cdot (h - x + 1)^{-1}$

Estudo das inter-relações entre os parâmetros de AgNORs

Esta análise teve por finalidade detectar possíveis correlações entre os 9 parâmetros de AgNORs estudados (mAgNORs “clusters”, mAgNORs pontos, UAgNORs, AAgNORs, mAgnORs, % AAgNuclear, % AAgNucl $\geq$ 8% e IRmod). Encontrou-se correlações positivas significativas entre: o número médio de “clusters” de AgNORs (mAgNORs “clusters”) e a porcentagem de células com AgNORs único (UAgNORs); entre o número médio de pontos AgNORs (mAgNORs pontos) e o índice de Rüschoff modificado (IRmod); entre a área média das AgNORs (mAgnORs) e a área total das AgNORs (AAgNORs) e a porcentagem de área nuclear ocupada pelas AgNORs (% AAgNuclear) e entre a porcentagem de área nuclear ocupada pelas AgNORs (% AAgNuclear) e a porcentagem de células com AAgNORs maior ou igual a 8% (% AAgNucl $\geq$ 8%). Correlações negativas foram encontradas entre o número médio de pontos de AgNORs (mAgNORs pontos) e a área média das AgNORs (mAgnORs) e entre o índice de Rüschoff modificado (IRmod) e a área total das AgNORs (AAgNORs) e a porcentagem de área nuclear ocupada pela AgNORs (% AAgNuclear).

Os valores dos coeficientes de correlação e do nível de significância estão mostrados na tabela III.

Tabela III. Correlação múltipla entre os parâmetros de AgNORs (n = 20)

	AgNOR pontos	UAgnOR	ANuclear	AAgnOR	mAgnOR	%AAgNucl	%AAg≥8%	IRmod
AgNOR "cluster"	R = 0,2085 p = 0,1887 (NS)	R = -0,8069 p = $8,55 \times 10^{-6}$ *	R = 0,3013 p = 0,0983 (NS)	R = 0,2845 p = 0,1119 (NS)	R = -0,1491 p = 0,2651 (NS)	R = 0,0817 p = 0,3659 (NS)	R = 0,2372 p = 0,1569 (NS)	R = 0,3552 p = 0,0621 (NS)
AgNOR pontos	R = -0,1949 p = 0,2050 (NS)		R = -0,2803 p = 0,1156 (NS)	R = -0,5708 p = 0,0042 (NS)	R = -0,6421 p = 0,0011 *	R = -0,4909 p = 0,0139 (NS)	R = -0,4654 p = 0,0193 (NS)	R = 0,7283 p = $1,35 \times 10^{-4}$ *
UAgnOR			R = -0,2589 p = 0,1350 (NS)	R = -0,996 p = 0,3380 (NS)	R = 0,3131 p = 0,0893 (NS)	R = 0,1641 p = 0,2446 (NS)	R = -0,0595 p = 0,4016 (NS)	R = -0,5344 p = 0,0075 (NS)
ANuclear				R = 0,6509 p = $9,40 \times 10^{-4}$ *	R = 0,5037 p = 0,0117 (NS)	R = -0,1244 p = 0,3006 (NS)	R = $5,29 \times 10^{-5}$ p = 0,4999 (NS)	R = -0,1539 p = 0,2585 (NS)
AAgnOR					R = 0,8641 p = $4,52 \times 10^{-7}$ *	R = 0,6488 p = $9,83 \times 10^{-4}$ *	R = 0,6791 p = $4,95 \times 10^{-4}$ *	R = -0,6088 p = 0,0021 *
mAgnOR						R = 0,6083 p = 0,0022 *	R = 0,5673 p = 0,0045 (NS)	R = -0,7228 p = $1,58 \times 10^{-4}$ *
%AAgNucl							R = 0,9161 p = $7,13 \times 10^{-9}$ *	R = -0,6641 p = $7,01 \times 10^{-4}$ *
%AAg≥8%								R = -0,5108 p = 0,0106 (NS)

NS = não significativo * = $p < 0,0027$ ($2,7 \times 10^{-3}$) valores em negrito $p < 0,0027$ (p corrigido)

Correlação parcial

- **Área Nuclear:** quando este parâmetro foi definido como constante houve manutenção da correlação da maioria das análises realizadas, porém aquelas entre a área média de AgNORs (mAgNORs) e % AAgNucl $\geq 8\%$ e entre a UAgNORs e o IRmod apresentaram correlações significantes antes não observadas ($p = 8,28 \times 10^{-4}$ com $R = +0,6567$ e $p = +0,0024$ com $R = -0,6017$ respectivamente). Observou-se também um aumento nas correlações entre AAgNORs total e a % AAgNuclear ($R = 0,96$), a %AAgN $\geq 8\%$ ($R = 0,89$) e o IRmod ($R = -0,67$), o sentido destas correlações foi mantido.(tabela IV)
- **Número médio de “clusters” de AgNORs por caso (mAgNORs “clusters”):** mantendo-se o parâmetro mAgNORs “clusters” constante observou-se que apareceram correlações entre AAgNORs total e o número de AgNORs pontos, entre mAAgNORs e a % AAgNucl $\geq 8\%$ e entre a % AAgNucl $\geq 8\%$ e o IRmod. Nesta mesma análise obtivemos um aumento da correlação com manutenção do sentido entre AAgNORs total e AAgNORs média e o IRmod.(tabela V)
- **Número médio de pontos de AgNORs por caso (mAgNORs pontos):** quando este parâmetro foi definido como constante, verificamos uma diminuição das correlações entre AAgNORs total e ANuclear e entre aquele parâmetro e a AAgNORs média porém com manutenção do sentido. Porém houve uma perda de correlação entre AAgNORs total e % AAgNuclear, % AAgNucl $\geq 8\%$ e IRmod, entre % AAgNuclear e AAgNORs média e IRmod e entre AAgNORs média e IRmod. As únicas correlações que permaneceram foram: AgNORs “clusters” e UAgNORs ($R = -0,7988$), AgNORs total e AAgNORs média ($R = +0,7905$) e entre %AAgNuclear e %AAgNucl $\geq 8\%$ ($R = +0,8918$). Todos estes parâmetros são variáveis dependentes pois são elaboradas levando-se em conta o número de AgNORs “clusters” ou a área das AgNORs ou ainda a área nuclear ocupada pelas AgNORs. (tabela VI).

Tabela IV. Correlação parcial com Área Nuclear (Anuclear) mantida constante

	AgNOR pontos	UAgNOR	AAGNOR	mAAGNOR	%AAGNucl	%AAGN $\geq$ 8%	IRmod
AgNOR "clusters"	R = 0,3201 p = 0,0843 (NS)	R = -0,7914 p = $1,61 \times 10^{-5}$ *	R = 0,1221 p = 0,3039 (NS)	R = -0,3653 p = 0,2982 (NS)	R = 0,1260 p = 0,2982 (NS)	R = 0,2488 p = 0,1450 (NS)	R = 0,4262 p = 0,0304 (NS)
AgNOR pontos		R = -0,2880 p = 0,1085 (NS)	R = -0,5329 p = 0,0077 (NS)	R = -0,6041 p = 0,0023 *	R = -5520 p = 0,0050 (NS)	R = -0,4848 p = 0,0151 (NS)	R = 0,7224 p = $1,60 \times 10^{-4}$ *
UAgNOR			R = 0,0940 p = 0,3465 (NS)	R = 0,5317 p = 0,0079 (NS)	R = 0,1376 p = 0,2814 (NS)	R = -0,0615 p = 0,3982 (NS)	R = -0,6017 p = 0,0024 *
AAGNOR				R = 0,8176 p = $5,33 \times 10^{-6}$ *	R = 0,9686 p = $1,12 \times 10^{-12}$ *	R = 0,8946 p = $5,14 \times 10^{-8}$ *	R = -0,6781 p = $5,07 \times 10^{-4}$ *
mAAGNOR					R = 0,7829 p = $2,24 \times 10^{-5}$ *	R = 0,6567 p = $8,28 \times 10^{-4}$ *	R = -7560 p = $5,75 \times 10^{-5}$ *
%AAGNucl						R = 0,9233 p = $3,27 \times 10^{-9}$ *	R = -0,6970 p = $3,18 \times 10^{-4}$ *
%AAG $\geq$ 8%							R = -0,5170 p = 0,0097 (NS)

NS = não significativo * = $p < 0,0027$ ($2,7 \times 10^{-3}$) valores em negrito = $p < 0,0027$ (p corrigido)

Tabela V. Correlação parcial com número médio de AgNORs “clusters” mantida constante

	UAgNOR	ANuclear	AAGNOR	mAAGNOR	%AAGNucl	%AAGN $\geq$ 8%	IRmod
AgNOR pontos	R = -0,0461 p = 0,4823 (NS)	R = -0,3680 p = 0,0551 (NS)	R = -0,6721 p = 5,84x10 ⁻⁴ *	R = -0,6318 p = 0,0014 *	R = -0,5211 p = 0,0092 (NS)	R = -0,5419 p = 0,0067 (NS)	R = -0,7156 p = 1,93x10 ⁻⁴ *
UAgNOR		R = -0,0281 p = 0,4531 (NS)	R = 0,2297 p = 0,1649 (NS)	R = 0,3302 p = 0,0775 (NS)	R = 0,3908 p = 0,0441 (NS)	R = 0,2300 p = 0,1646 (NS)	R = -0,4488 p = 0,0235 (NS)
ANuclear			R = 0,6183 p = 0,0018 *	R = 0,5819 p = 0,0035 (NS)	R = -0,1568 p = 0,2542 (NS)	R = -0,0771 p = 0,3732 (NS)	R = -0,2927 p = 0,1051 (NS)
AAGNOR				R = 0,9563 p = 2,31x10 ⁻¹¹ *	R = 0,6547 p = 8,65x10 ⁻⁴ *	R = 0,6567 p = 8,28x10 ⁻⁴ *	R = -0,7922 p = 1,56x10 ⁻⁵ *
mAAGNOR					R = 0,6297 p = 0,0014 *	R = 0,6274 p = 0,0015 *	R = -0,7247 p = 1,50x10 ⁻⁴ *
%AAGNucl						R = 0,9262 p = 2,34x10 ⁻⁹ *	R = -0,7440 p = 8,44x10 ⁻⁵ *
%AAGN $\geq$ 8%							R = -0,6554 p = 8,53x10 ⁻⁴ *

NS = não significativo

* = p < 0,00027 (2,7 x 10⁻³)

valores em negrito = p* < 0,0027 (p corrigido)

Tabela VI. Correlação parcial com número médio de AgNORs “pontos” mantido constante

	UAgNOR	ANuclear	AAgNOR	mAAgNOR	%AAgNucl	%AAgN≥8%	IRmod
AgNOR clusters	R = -0,7988 p = 1,20x10⁻⁵*	R = 0,3832 p = 0,0476 (NS)	R = 0,5026 p = 0,0119 (NS)	R = -0,0202 p = 0,4620 (NS)	R = 0,2161 p = 0,1800 (NS)	R = 0,3862 p = 0,0462 (NS)	R = 0,3033 p = 0,0967 (NS)
UAgNOR		R = -0,3331 p = 0,0755 (NS)	R = -0,2618 p = 0,1323 (NS)	R = 0,2500 p = 0,1438 (NS)	R = 0,0800 p = 0,3686 (NS)	R = -0,1730 p = 0,2327 (NS)	R = -0,5839 p = 0,0034 (NS)
ANuclear			R = 0,6229 p = 0,0016*	R = 0,4399 p = 0,0261 (NS)	R = -0,3133 p = 0,0892 (NS)	R = -0,1535 p = 0,2591 (NS)	R = 0,0764 p = 0,3743 (NS)
AAgNOR			R = 0,7905 p = 1,67x10⁻⁵*	R = 0,5153 p = 0,0100 (NS)	R = 0,5689 p = 0,0044 (NS)	R = -0,3431 p = 0,0692 (NS)	
mAAgNOR				R = 0,4389 p = 0,0264 (NS)	R = 0,3956 p = 0,0420 (NS)	R = -0,4857 p = 0,0149 (NS)	
%AAgNucl					R = 0,8918 p = 6,46x10⁻⁸*	R = -0,5136 p = 0,0102 (NS)	
%AAgN≥8%						R = -0,2834 p = 0,1129 (NS)	

NS = não significativo * = $p^* < 0,0027 (2,7 \times 10^{-3})$ valores em negrito = $p^* < 0,0027$ (p corrigido)

Análise fatorial

Pelo “scree test” vimos que o melhor agrupamento de parâmetros ocorreu quando os separamos em 4 grupos (fatores). Na prática, esta subdivisão parece também ser a mais lógica, pois agrupa os parâmetros em fatores relacionados com a área de AgNORs corada, o número de AgNORs “clusters”, o número de AgNORs pontos e a área nuclear. Os valores de cada variável após o processo de rotação estão na tabela VII.

Os parâmetros foram associadas do seguinte modo:

- **FATOR 1 - Parâmetros de área de AgNORs:** área total de AgNORs (AAgNORs), área média das AgNORs (mAAgNORs), porcentagem da área nuclear ocupada pela AgNORs (% AAgNuclear), porcentagem de células com área nuclear ocupada pelas AgNORs maior ou igual a 8% (% AAgNucl $\geq$ 8%) e índice de Rüschoff modificado (IRmod);
- **FATOR 2 - Parâmetros de número de “clusters” de AgNORs:** número médio de AgNORs “clusters” (mAgNORs “clusters”), porcentagem de células com AgNORs “clusters” único (UAgNORs) e índice de Rüschoff modificado (IRmod);
- **FATOR 3 - Parâmetros de área nuclear:** área nuclear (ANuclear), área de AgNORs total (AAgNORs) e área de AgNORs média (mAAgNORs).
- **FATOR 4 - Parâmetros de número de pontos:** número médio de pontos de AgNORs;

Estes quatro fatores perfazem um total de 93,9% da variância.

Tabela VII. Análise fatorial com os valores de cada variável analisada

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
mAgNORs “clusters”	0,15078	-0,85986	0,14638	0,14904
mAgNORs pontos	-0,32607	-0,17181	-0,25943	0,99449
UAgNOR	0,08789	0,95331	-0,04548	-0,01650
ANuclear	-0,13752	-0,22187	0,91977	-0,12506
AAgNORs	0,62915	-0,12096	0,75733	-0,19446
mAAgNORs	0,54500	0,30992	0,66618	-0,23758
%AAgNuclear	1,00000	0,07227	0,00852	-0,15121
%AAgN$\geq$8%	0,90008	-0,13724	0,08769	-0,17283
IRmod	-0,55192	-0,50208	-0,30874	0,38105

Valores do “factor loadings” das variáveis analisadas em negrito são $> 0,5$ ou $< -0,5$ e portanto foram incluídos no grupamento dos fatores

DISCUSSÃO

As doenças neoplásicas apresentam um comportamento característico de proliferação de suas células levando a um crescimento tumoral descontrolado. O processo de diferenciação, de morte celular programada (apoptose) e a regulação da proliferação celular estão envolvidos nos mecanismos homeostáticos que regulam o crescimento celular e que estão comprometidos nos tecidos neoplásicos. O estudo destes mecanismos pode trazer novos conhecimentos úteis na condução dos pacientes portadores de doenças neoplásicas. As características da dinâmica de crescimento tumoral pode ser estudada através de diferentes métodos onde define-se alguns índices como: porcentagem de mitoses, fração de crescimento tumoral, tempo potencial de duplicação celular entre outros. Estes parâmetros auxiliam na criação de protocolos de tratamento específicos podendo melhorar os resultados terapêuticos (Norton et al, 1985; Watson et al, 1991; Norgaard et al, 1996).

Os mesmos mecanismos de alteração da dinâmica de crescimento tumoral que ocorre nos tumores sólidos, também podem influenciar o comportamento das leucemias agudas. Desde a década de 80, vários autores têm estudado, utilizando-se de vários métodos, o comportamento cinético dos blastos leucêmicos. Raza e colaboradores (1987a) estudando um paciente portador de leucemia mieloide aguda (LMA), através da incorporação da bromodeoxiuridina (BrdU) "in vitro", obteve um dos primeiros resultados em cinética celular das células blásticas leucêmicas onde encontrou um índice de incorporação de 25% para material obtido por biópsia de medula óssea e de 7% por aspirado e utilizando-se do método de incorporação dupla (BrdU e timidina tritiada - TT). Encontrou ainda uma duração de fase S (TS) nos mieloblastos leucêmicos de 4 horas e um tempo de ciclo celular total (TC) de 16 horas. No mesmo ano, Raza e colaboradores (1987b) publicaram um estudo mais amplo utilizando as técnicas descritas anteriormente onde analisaram 40 casos de LMA e observaram uma grande variedade dos tempos do ciclo celular quando os pacientes eram analisados individualmente e que não havia uma relação direta entre a duração do ciclo celular (TC) e a porcentagem de células ativamente sintetizantes de DNA (% de células em fase S - %FS). Detectaram também que os pacientes que apresentavam

mieloblastos com um TC muito curto ou muito longo apresentaram-se resistentes ao tratamento quimioterápico.

Na década de 90, alguns pesquisadores (Riccardi et al, 1991; Giordano et al, 1993) utilizando-se da técnica de incorporação da BrdU e análise através de citometria de fluxo e estudo concomitante do conteúdo de DNA celular estudaram o comportamento cinético dos mieloblastos leucêmicos. Estes autores encontraram índice de incorporação menor no material de medula óssea de LMA quando comparado com o de hematopoiese normal ($6,1 \pm 2,9\%$ e $11,8 \pm 3,1\%$ respectivamente) além de um tempo de fase S e de ciclo celular total maior no material leucêmico. Estes parâmetros analisados mostraram importância prognóstica, principalmente quando se realiza a análise corrigida excluindo-se as células neoplásicas em fase G_0 (Giordano et al, 1993). Observaram um melhor prognóstico (tempo de remissão completa e de sobrevida) quando o índice de incorporação (LI) era maior e o tempo de fase S (TS) e tempo de duplicação potencial (TPot) eram menores, portanto com maior atividade proliferativa. Estes achados cinéticos como parâmetros prognósticos ainda necessitam de confirmação pois outros autores não encontraram correlação.

Brons e colaboradores (1993) não observaram, na análise de 33 pacientes portadores de LMA, correlação com a resposta a terapêutica quimioterápica. Estes autores observaram uma correlação negativa entre o índice de incorporação de iododeoxiuridina (IUrdU) e o tempo potencial de duplicação celular (TPot). Encontraram ainda uma relação altamente significativa da capacidade clonogênica espontânea de crescimento leucêmico “in vitro” e o índice de resposta a quimioterapia (correlação positiva), porém sem significado quando se analisa a curva de sobrevida. Hunter e colaboradores (1993) observaram um pior prognóstico (menor resposta a quimioterapia e menor sobrevida) no grupo de pacientes portadores de LMA que apresentava crescimento clonogênico neoplásico “in vitro” , isto é, capacidade proliferativa autônoma. A hipótese para este comportamento é que as células neoplásicas e/ou células acessórias (monócitos) teriam a capacidade de produção autócrina de fatores de crescimento celular.

Nas leucemias linfóides agudas, Scarffe e colaboradores (1980) utilizando técnicas de citometria de fluxo para o cálculo da porcentagem de células em fase S do ciclo celular (%FS) observaram que este parâmetro apresentava importância prognóstica, podendo até definir um grupo de maior risco e menor tempo de remissão quando a %FS era superior a 6%, e que este parâmetro era independente de outros fatores prognósticos como marcadores celulares B ou T, leucocitose em sangue periférico, nível de hemoglobina, dor óssea, etc. Outros trabalhos, em anos seguintes, confirmaram estes achados (Dow et al, 1982) e também observaram que o comportamento cinético dos blastos circulantes no sangue periférico era diferente dos presentes na medula óssea (menor atividade proliferativa), questionando portanto a relação entre massa tumoral nas LLAs e a contagem de células blásticas circulantes.

O estudo das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) através de técnicas de impregnação pela prata permite uma avaliação de características cinéticas do tecido analisado (Derenzini et al, 1990; Öfner et al, 1992; Roussel e Hernandez-Verdun, 1994; Hofstädter et al, 1995). Vários estudos mostram que a maior quantidade de proteínas argentofílicas associadas às NORs (AgNORs) está relacionada com uma maior capacidade de proliferação celular (Trerè et al, 1991; Öfner et al, 1992; Mourad et al, 1993) e isto pode explicar o fato de haver uma relação entre o prognóstico de várias doenças neoplásicas com a quantidade de AgNORs avaliada quantitativamente e/ou através de estudos morfométricos (Howat et al 1988; Bocksmühl et al, 1991; Delahunt et al, 1991).

No tecido hematopoiético alguns autores estudaram o comportamento das AgNORs na hematopoiese normal e neoplásica. Smetana e Likovsky (1984) em estudo de material de medula óssea de indivíduos normais observaram uma diminuição do número de AgNORs durante a maturação das células progenitoras das linhagens eritroblástica e granulocítica, o que está de acordo com a diminuição progressiva da sua capacidade proliferativa. Este mesmo achado foi encontrado por Grotto e colaboradores (1991), que através de uma análise diferenciada das AgNORs em “clusters” e pontos, observou que

havia uma diminuição do número de “clusters” e aumento progressivo de pontos, com a diferenciação celular, justificando deste modo a contagem separada destes elementos.

Nas leucemia agudas, Arden e colaboradores (1989) estudaram a atividade das NORs em células em metáfase através da técnica de impregnação pela prata em material de medula óssea e observaram uma maior atividade das NORs (maior número de AgNORs) nas LLAs quando comparado com os controles normais. Esta diferença não foi encontrado no material de LMA. Em interfase, as células leucêmicas apresentam “clusters” de AgNORs representando seus evidentes nucléolos e estas estruturas são frequentemente polimórficas (Mamaev e Mamaeva, 1990). Poucos estudos são encontrados e com resultados conflitantes, Nakamura e colaboradores (1992) não encontraram uma diferença significativa entre o número de AgNORs nos blastos de LMA e LLA (médias de 2,76 e 2,63 por célula, respectivamente), porém quando comparou esta análise entre material de sangue periférico e de medula óssea observou um menor número de AgNORs nos blastos circulantes (2,48 e 2,78, respectivamente). Esta diferença apresentava significado estatístico, o que está de acordo com estudos anteriores (Andreeff, 1986; Nakamura et al, 1992; Giordano et al, 1993) mostrando haver maior atividade proliferativa nos blastos medulares que nos do sangue periférico.

Com a análise diferenciada de “clusters” e pontos, Grotto e colaboradores (1993) observaram um menor número de “clusters” nos blastos leucêmicos (LMA) quando comparados com mieloblastos normais e também não obtiveram diferenças significativas entre os achados em material de medula óssea de pacientes portadores de LMA e LLA. Estes autores concluem que a contagem da AgNORs deve ser feita separadamente em “clusters” e pontos e que estes achados relacionam-se com os achados cinéticos nas leucemias agudas onde observa-se um tempo de fase S do ciclo celular maior nos blastos leucêmicos que nos mieloblastos normais, representando uma menor atividade proliferativa (Andreeff, 1986).

No presente estudo a análise das AgNORs foi realizada em 20 casos de leucemias agudas, com estudo quantitativo e qualitativo à microscopia ótica. Encontramos uma média de “clusters” ($2,47 \pm 0,51$) e pontos ($0,34 \pm 0,12$) comparáveis a outros relatos da literatura. Também foi realizado a contagem da porcentagem de blastos leucêmicos com número de AgNORs maior ou igual a 5 (pAgNOR). Este índice foi definido em diferentes trabalhos por Mourad e colaboradores (1992a, 1992b, 1993, 1994) para materiais obtidos de linfomas, adenocarcinomas de mama e outros tumores sólidos em estudo do comportamento cinético das células neoplásicas analisadas através de citometria de fluxo ou incorporação da bromodeoxiuridina “in vivo” e comparados à análise da AgNORs. Esses autores observaram que este método de avaliação das AgNORs apresentava maior correlação com os resultados das análises cinéticas onde existia uma correlação positiva entre a porcentagem de células com número de AgNORs maior ou igual a cinco (pAgNORs) e fração de células em fase S. Estes resultados não foram observados em nossa análise. Encontramos uma grande heterogeneidade de resultados com média de 9,85% (faixa de variação de zero a 32%), resultado comparável aos estudos em tumores sólidos, não existem na literatura relatos deste tipo de análise em material de leucemias agudas.

Quando correlacionamos o número de blastos presentes no sangue periférico e o índice de incorporação de BrdU “in vitro” não observamos uma correlação significativa. Isto vem de encontro com trabalhos mais recentes (Berger et al, 1994) que demonstram que a quantidade de leucócitos no sangue periférico nos casos de LMA não está relacionado com a capacidade proliferativa e sim com as alterações da fluidez da membrana celular e a capacidade de adesão desta aos componentes da matrix extracelular. Como em nossa casuística predominavam os casos de LMA, este achado seria o esperado.

À microscopia ótica, também realizamos uma quantificação de blastos leucêmicos que apresentavam AgNORs “cluster” único (UAgNORs) que têm sido caracterizados como células que se encontra na fase quiescente (G_0) e início do ciclo celular (início de G_1) onde ocorre baixa síntese proteica (Grotto et al, 1993). Este tipo de padrão é

observado em linfócitos circulantes estimulados com fitohemaglutinina (Wachtler et al, 1986) e nas células que representam a fração de proliferação das LLC (Lorand-Metze e Metze, 1996). Em nossa casuística encontramos uma média (M) e desvio padrão (DP) ($M \pm DP$) de $18,10 \pm 13,31\%$ (faixa de 2 - 44%) de UAgNORs, o que leva-nos a considerar que nas leucemias agudas encontramos uma porcentagem grande de células quiescentes, quando a análise é feita de maneira instantânea, o que já foi demonstrado em estudos anteriores (Andreeff, 1986).

O pAgNOR apresenta, nos trabalhos de Mourad e colaboradores, uma correlação com a fração de células em fase S. Neste estudo comparamos em 14 casos este índice com a IBrdU onde encontramos somente uma tendência a correlação positiva ($R=0,37944$) porém sem significado estatístico. Uma tendência a correlação inversa ($R=-0,38571$), também sem significado estatístico, foi observada entre a porcentagem de blastos leucêmicos com AgNORs “cluster” único (UAgNORs) e a fração em fase S (IBrdU). A análise conjunta destes dois parâmetros leva-nos a crer que os parâmetros quantitativos das AgNORs não são isoladamente representativos da fração de células em fase S do ciclo celular nas leucemias agudas. Estes parâmetros quantitativos de AgNORs assim como a contagem absoluta de blastos circulantes no sangue periférico não apresentaram correlação estatisticamente significativa quando comparamos com a fração de células em síntese de DNA (IBrdU).

Alguns parâmetros morfométricos foram analisados neste trabalho, como a área nuclear (ANuclear), área total de AgNORs (AAgNORs), área média de AgNORs por estrutura corada (“clusters” e pontos) (mAgNORs), porcentagem de área nuclear ocupada por estruturas coradas - AgNORs (%AAgNuclear) e a porcentagem de área nuclear ocupada por estruturas coradas maior ou igual a 8% (%AAgNucl $\geq$ 8%).

A área e o volume nuclear variam diretamente em função das quantidades de RNA e de proteínas não-histônicas, ambos indicadores da capacidade de síntese proteica de uma célula. Portanto a medida da área nuclear tem sido relacionada com a capacidade

proliferativa das células neoplásicas e não neoplásicas, células com área nuclear maior apresentam um índice de proliferação maior (Mello e Vidal, 1980). No presente trabalho foram analisados 20 casos de LA, com medidas de área nuclear em 50 blastos nos casos onde obtivemos uma $M \pm DP$ de $273,32 \pm 64,82 \text{ mm}^2$ (medidas em papel milimetrado de fotos ampliadas do material à microscopia ótica) (faixa de $159,04 - 392,00 \text{ mm}^2$). Nesta análise quando comparamos com o índice de incorporação da BrdU não encontramos correlação. Além disto observamos que nas LAs existe uma variação grande do tamanho nuclear e também do tamanho das células neoplásicas o que pode estar relacionado com outros fatores além da capacidade proliferativa e da atividade de síntese protéica medidas através da porcentagem de células em fase S do ciclo celular.

Analizamos a área de AgNORs (AAgNORs e mAAgNORs) inclusive a sua correlação com o tamanho nuclear (%AAgNuclear e %AAgNucl $\geq 8\%$). Estes parâmetros apresentaram grande variação entre os casos. A %AAgNuclear, parâmetro que melhor representa a quantidade de AgNORs em função do tamanho celular e nuclear, apresentou uma $M \pm DP$ de $7,49 \pm 1,89 \%$ (faixa de $2,69 - 10,58\%$). Estudos de vários autores (Derenzini et al, 1990, Trerè et al, 1991, Öfner et al, 1992), com linhagens de células neoplásicas observaram uma relação direta entre a área de AgNORs medidas e a capacidade proliferativa das células avaliadas através do índice de incorporação de BrdU, de timidina tritiada (TT), do tempo de duplicação da população celular e da fração de crescimento tumoral (Ki-67). As análises comparativas no presente trabalho destes parâmetros morfométricos com o IBrdU não se mostraram significativas na casuística de 14 casos estudados. Observamos uma tendência de correlação negativa sem significado estatístico onde as áreas de AgNORs maiores representam um IBrdU menor, portanto uma capacidade proliferativa menor (menor porcentagem de blastos leucêmicos em fase S do ciclo celular). Isto provavelmente se deve ao fato de que nos casos de células com tempo de ciclo celular mais longo observamos uma maior agregação das estruturas argentofílicas levando a menores áreas de AgNORs medidas através do método utilizado neste trabalho

ciclo celular) o que vem de encontro a achados de vários autores que estudaram outras neoplasias.

No presente estudo, onde a análise foi realizada através da incorporação de BrdU “in vitro”, encontramos uma tendência a correlação negativa sem significado estatístico, entre a quantidade de AgNORs medidas através da área total destas estruturas e o IBrdU, parece-nos que deste modo que a área de AgNORs total nas leucemias agudas não está relacionada com duração e fração de células em fase S do ciclo. Portanto, a presença de estruturas coradas pela prata, únicas e agrupadas, só é possível se a duração de ciclo celular permitir este agrupamento, a presença de “clusters” de AgNORs, estruturas com áreas maior que os pontos, pode caracterizar um ciclo celular mais longo. Trabalhos com o estudo de um número maior de casos podem reforçar estes achados. Uma análise recente de Trerè e colaboradores (1994) estudando a área das AgNORs nos blastos em crianças portadoras de LLA mostrou que este parâmetro apresenta valor prognóstico onde observaram uma sobrevida menor nos casos que apresentaram uma área de AgNORs maior.

A análise da correlação entre diferentes parâmetros quantitativos de AgNORs mostrou algumas relações interessantes como a correlação positiva entre o número médio de pontos e o índice de Rüschoff modificado. Esta correlação mostra que o número destas estruturas argentofílicas influencia significativamente o IR modificado e portanto como este parâmetro tem relação com a porcentagem de células em fase S do ciclo, o número de pontos tem importância na caracterização da capacidade proliferativa dos blastos leucêmicos. Esta correlação se mantém mesmo quando fixamos outros parâmetros como a área nuclear e o número médio de “clusters”. A mesma correlação porém com relação inversa é observada entre parâmetros de área (mAgnORs e %AgnORs) e o índice de Rüschoff modificado, então a área de AgNORs tem correlação indireta com a capacidade proliferativa, esta correlação se mantém constante mesmo quando fixamos a área nuclear e o número de “clusters” porém esta desaparece quando fixamos o número de pontos, isto reforça a importância deste parâmetro na análise da cinética celular.

A área nuclear está relacionada com a capacidade de síntese proteica da célula e a quantidade de material ribossomal, este parâmetro apresentou correlação com a área total de AgNOR, este achado é interessante pois permite-nos concluir que os parâmetros que analisam a área de AgNORs sem levar em conta o tamanho nuclear devem ser avaliados de maneira cuidadosa e que a quantidade de RNA nuclear (proporcional a área nuclear) tem realmente correlação com a área de estruturas nucleares coradas pela prata (AgNORs).

Quando mantemos os pontos constantes na análise estatística, as correlações entre os parâmetros de AgNORs desaparecem, mantendo significado estatístico somente as correlações entre o número de “clusters” e o UAgNORs, a área nuclear e a área total de AgNORs, a área total de AgNORs e a área média de AgNORs e entre a %AAgNucl e a %AAgN $\geq$ 8%, todas estas correlações são óbvias. Portanto, parece-nos que o número de pontos de AgNORs tem grande significado no comportamento das estruturas argentofílicas nucleares. Na hematopoiese normal, Grotto e colaboradores (1991) encontraram relação com a maturação celular (pontos presentes em células maduras). Nos blastos leucêmicos, estas estruturas parecem estar relacionadas com a capacidade proliferativa destas células, associada a outros fatores.

No estudo através da análise fatorial dos valores de importância e associação de cada variável observamos o agrupamento em 4 grupos: 1- parâmetros relacionados com a área das estruturas coradas (área das AgNORs): área total e média de AgNORs, porcentagem da área nuclear ocupada pelas AgNORs, porcentagem da área nuclear ocupada pelas AgNORs maior ou igual a 8% e o IR modificado; 2- parâmetros relacionados com o número de “clusters”: número médio de AgNORs “clusters”, porcentagem de células com AgNORs “cluster” único e IR modificado; 3- parâmetros relacionados com a área nuclear: área nuclear, área de AgNORs total e média (AAgNORs e mAAgNORs, respectivamente) e 4- parâmetros relacionados com o número de pontos. No grupo relacionado com a área nuclear encontramos as variáveis AAgNORs e mAAgNORs por estruturas coradas que diretamente não estão relacionadas com a área

nuclear, porém através da análise de correlação múltipla observamos uma correlação direta e significativa entre área nuclear e a AAgNOR total e desta última com a mAAgNORs.

O estudo das regiões organizadoras de nucléolos nas leucemias agudas se mostra informativo do comportamento cinético destas células neoplásicas. Outros fatores podem estar envolvidos com o padrão de distribuição e a quantidade de proteínas argentofílicas coradas. Métodos mais práticos e reprodutíveis podem ser necessários para a implantação na rotina da análise das AgNORs.

CONCLUSÕES

1. O estudo da cinética celular das leucemias agudas através da incorporação de BrdU para quantificação da porcentagem de células em fase S do ciclo celular é um método adequado e nos permite observar que as leucemias agudas apresentam um padrão cinético extremamente heterogêneo;
2. No presente estudo não observamos correlação estatisticamente significativa entre a contagem de células blásticas circulantes no sangue periférico, do número médio de AgNORs “clusters” e pontos em blastos da medula óssea, a porcentagem de células blásticas de medula óssea com número de AgNORs superior ou igual a 5 (pAgNORs) e da porcentagem de células com AgNORs com “cluster” único (UAgNOR) com a porcentagem de células em fase S do ciclo celular (IBrdU). Também não foi observada correlação deste parâmetro de cinética celular com os índices morfométricos nucleares ou das AgNORs como área nuclear, área de AgNORs, porcentagem de área nuclear ocupada pelas AgNORs e porcentagem de células com área nuclear ocupada por AgNORs maior ou igual a 8%;
3. A fração de células blásticas da medula óssea em fase S do ciclo celular (IBrdU) mostrou correlação direta significativa com o índice de Rüschoff modificado que é calculado levando-se em conta o número de AgNORs e a área destas AgNORs, portanto este índice pode se utilizado para avaliação cinética nas leucemias agudas;
4. Observamos uma tendências a correlação direta, porém sem significado estatístico, do índice de incorporação de BrdU e os parâmetros de número de AgNORs e uma tendência a correlação inversa entre aquele parâmetro e a porcentagem de área corada pela prata por núcleo, o que leva-nos a crer, associado a correlação com o índice de Rüschoff modificado, que o ciclo celular mais lento de algumas células blásticas permite que haja um confluência dos AgNORs diminuindo assim seu número e aumentando a área ocupada e células com ciclo celular mais rápido não permitiriam

esta confluência, caracterizando desta forma células com grande quantidade de AgNORs porém área total menor;

5. Observamos uma associação entre os vários parâmetros qualitativos e morfométricos das AgNORs nas LAs, os de maior significado são a correlação direta entre a área nuclear e a área das AgNORs. Esta correlação pode estar relacionada com a capacidade proliferativa das células analisadas. Já o número de pontos de AgNORs parece ter grande importância nas correlações entre os parâmetros podendo significar que nestes casos as AgNORs não estariam associadas aos nucléolos pois as células apresentariam um ciclo celular rápido (blastos com ciclo celular curto);
6. O estudo através da análise fatorial dos parâmetros analisados nos permitiu a associação dos diferentes parâmetros estudados em 4 grupos: parâmetros de área nuclear, de número de AgNORs “clusters”, de número de AgNORs pontos e de área de AgNORs.

SUMMARY

The present work investigated the use of the Silver Staining of Nucleolar Organiser Regions (NORs) Technique (Ag-NORs) with quantitative, qualitative, and also morphometric analysis of 20 Bone Marrow aspirations of acute Leukaemia (LMA and LLA) patients. The incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) Labelling Index (BrdU-LI) in 14 of these cases was also studied, and the different results were then compared.

In the quantitative analysis, we found a mean number of AgNORs "clusters" equal to 2.47 ± 0.51 (1.68 - 3.45) and of dots equal to 0.34 ± 0.12 (0.12 - 0.58) in addition to the percentage of Leukemic blasts with a unique "cluster" of $18.10\% \pm 13.31\%$ (2% - 44%). The morphometric analysis of the neoplastic cells using the conventional smearing technique showed a mean percentage of $7.49\% \pm 1.89\%$ (2.69 - 10.58%) of nuclear area occupied by AgNORs and a modified Rüschoff index of 0.48 ± 0.33 (0.10 - 1.43).

The cellular kinetic evaluation of the collected material using BrdU-LI (S-phase cell fraction in the cell cycle) showed heterogeneous results when each case was compared with a range of 2.7% to 18.5% (means value = 7.55% and standard deviation = 4.0%). The comparison between parameters of AgNORs and BrdU-LI showed statistically significant results when the modified Rüschoff index was used. A positive correlation between these parameters ($R=0.6716$) was found, this leads us to believe that BrdU-LI is related directly to the total number of AgNORs and inversely related to the AgNORs area and furthermore, that these two parameters are significant only when associated. The statistical study, permitted us to group the AgNORs parameters into 4 groups: parameters related with the AgNORs area, with the number of "clusters", with the number of dots, and with the nuclear area.

This study makes it possible to conclude that the only morphometric parameter related to the cell S-phase fraction is the Rüschoff index, therefore AgNORs and mainly their area inside the Leukemic blasts nuclei are probably more related to the cell cycle time than to the cell fraction in cycle (proliferating capacity).

Referências Bibliográficas

- Aaltomaa A, Lipponen P, Syrjänen K. Nucleolar organizer regions related to morphometry, flow cytometry, sex steroid receptor content, tumour histology and prognosis in female breast cancer. **Path Res Pract** 189:416-421, 1993.
- Andreeff M. Cell kinetics of leukemia. **Semin in Hematol**, 23(4):300-314, 1986.
- Anselmi L, Sementa AR, Borgiani L, Banderoli A, Rovida S. Nucleolar organizer regions (NORs) in normal and pathological liver: a quantitative analysis. **Pathologica**, 82:653-662, 1990.
- Arden KC, Bucana CD, Johnston DA, Pathak S. Computer-assisted image analysis of silver staining in normal and leukemic bone marrow. **Int J Cancer**, 43:395-398, 1989.
- Bain B, Catovsky D. Current concerns in haematology 2: Classification of acute leukaemia. **J Clin Pathol**, 43:882-887, 1990.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). **Ann Intern Med**, 103(3):460-462, 1985.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. **Ann Intern Med**, 103(4):620-629, 1985.
- Berger M, Motta C, Boiret N, Aublet-Cuvelier B, Bonhomme J, Travade P. Membrane fluidity and adherence to extracellular matrix components are related to blast cell count in acute myeloid leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, 15:297-302, 1994.
- Bocksmühl U, Theissig F, Dimmer V, Kunze D. The impact of nucleolar organizer region for the lymphnode spread and prognosis of invasive ductal mammary carcinoma. **Path Res Pract**, 187:437-443, 1991.

- Borgiani L, Casazza S (ed). Regioni organizzatrici del nucleolo. **Pathologica**, **81**:225-229, 1989.
- Brain BJ. Leukaemia-Diagnosis. A guide to the FAB classification. Gower Medical Publishing, London, England, 1990.
- Brons PPT, Haaven C, Boezeman JBM, Muus P, Holdrinet RSG, Pennings AHM, Wessels HMC, Witte T. Proliferation patterns in acute myeloid leukemia: leukemia clonogenic growth and *in vivo* cell cycle kinetics. **Ann Hematol**, **66**:225-233, 1993.
- Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, Shetty V, Hanslip J, Yoshida N, Morilla R. A classification of acute leukaemia for the 1990's. **Ann Hematol**, **62**:16-21, 1991.
- Charpin C, Bonnier P, Piana L, Kouzerami H, Devictor B, Lavant MN, Andrac L, Allasia C. Correlation of nucleolar organizer regions and nuclear morphometry assessed by automatic image analysis in breast cancer with aneuploidy, Ki67 immunostaining histopathologic grade and lymph node involvement. **Path Res Pract**, **188**:1009-1017, 1992.
- Crocker J, Paramjit-Mar. Nucleolar organizer regions in lymphomas. **J Pathol**, **151**:111-118, 1987.
- Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**, **158**:185-188, 1989.
- Crocker J. Nucleolar organizer regions (Ed.) Underwood JCE. **Current Topics in Pathology**, **82**:91-149, 1990.
- Cross E M, Chaffin W W. Use of the binomial theorem in interpreting results of multiple testes of significance. **Educat Psycotol Measur**, **42**: 25-34, 1982.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular cell biology. Scientific American Books. 2nd Ed., New York, 1990.

- Delahunt B, Ribas JL, Nacey JN, Bethwaite PB. Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma. **J Pathol**, 163:31-37, 1991.
- 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 non neoplastic reactive cells in human effusion. **Acta Cytol**, 33(4):491-498, 1989.
- Derenzini M, Pession A, Trerè D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Laboratory Investigation**, 63(1):137-140, 1990.
- Derenzini M, Trerè D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchows Archiv B Cell Pathol**, 61:1-8, 1991.
- Derenzini M, Trerè D. Standardization of interphase Ag-NOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. **J Pathol**, 165:337-342, 1991.
- Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. **Histochem J**, 27: 339-369, 1995a.
- Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part II: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis. **Histochem J**, 27: 923-964, 1995b.
- Dow LW, Chang LJA, Tsiatis AA, Melvin SL, Bowman WP. Relationship of pretreatment lymphoblast proliferative activity and prognosis in 97 children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 59(6): 1197-1202, 1982.
- Fakan S, Hernandez-Verdun D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Biol Cell**, 56: 189-204, 1986.

- Falini B, Canino S, Sacchi S, Ciani C, Martelli MF, Gerdes J, Stein H, Pileri S, Gobbi M, Fagioli M, Minelli O, Flenghi L. Immunocytochemical evaluation of percentage of proliferating cells in pathological bone marrow and peripheral blood samples with the Ki-67 ant-bromo-deoxyuridine monoclonal antibodies. **Brit J Haematol**, 69:311-320, 1988.
- Freeman J, Kellock DB, Yu CC-W, Crocker J, Levison DA, Hall PA. Proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organiser regions in Hodgkin's disease: correlation with morphology. **J Clin Pathol**, 46:446-449, 1993.
- Fujita S, Takahashi H, Okabe H. Nucleolar organizer regions in malignant salivary gland tumors. **Acta Pathol**, 42(10):727-733, 1992.
- Gilberti MFP, Metze K, Lorand-Metze I. Changes of nucleolar organizer regions in granulopoietic precursors during the course of chronic myeloid leukemia. **Ann Hematol**, 71:275-279, 1995.
- Giordano M, Danova M, Mazzini G, Gobbi P, Riccardi A. Cell kinetics with *in vivo* bromodeoxyuridine assay proliferating cell nuclear antigen expression and flow cytometric analysis. **Cancer**, 71(9):2739-2745, 1993.
- Goessens G. Nucleolar structure. **Intern Review of Cytol**, 87:107-153, 1984.
- Greipp PR, Witzig TE, Gonchoroff NJ. Immunofluorescent plasma cell labeling indices (LI) using a monoclonal antibody (BU-1). **Am J Hematol**, 20:289-292, 1985.
- Grotto HZW, Lorand-Metze I, Metze K. Nucleolar organizer regions in normal hematopoiesis: relationship to cellular proliferation and maturation. **Nouv Rev Fr Hematol**, 33:1-4, 1991.
- Grotto HZW, Metze K, Lorand-Metze I. Patern of nucleolar organizer regions in human leukemia cells. **Anal Cell Pathol**, 5:203-212, 1993.

- Hernandez-Verdun D. The nucleolar organizer regions (Review article). **Biol Cell**, **49**:191-202, 1983.
- Hofstädter F, Knüchel R, Rüschoff J. Cell proliferation assessment in oncology. **Virchows Arch**, **427**: 323-341, 1995.
- Howat AC, Giri DD, Wright AL, Underwood JCE. Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. **J Pathol**, **156**:227-232, 1988.
- Hunter AE, Rogers SY, Roberts IAG, Barret AJ, Russel N. Autonomous growth of blast cell is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. **Blood**, **82**:899-903, 1993.
- Jakie-Razvmovic J, Tentor D, Petroveckí M, Radman I. Nucleolar organizer regions and survival in patients with non-Hodgkin's lymphomas classified by the Working Formulation. **J Clin Pathol**, **46**:943-947, 1993.
- Karmakar T, Dey P. Role of AgNORs in diagnosis of thyroid follicular neoplasms on fine-needle aspiration smears. **Diagn Cytopathol**, **12**(2):148-151, 1995.
- Leek RD, Alison MR, Sarraf CE. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissue. **J Pathol**, **165**:43-51, 1991.
- Lichtman MA. Classification and clinical manifestation of the hemopoietic stem cell disorders. In: Williams JW et al, Hematology, 5th.Edition, 229-238, MacGraw-Hill Publishing Company, New York, 1996.
- Lorand-Metze I, Metze K. AgNORs clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukemia. **J Clin Pathol Mol Pathol**, **49**: M357-M360, 1996.

- Mamaev NN, Mamaeva SE. Nucleolar organizer region activity in human chromosomes and interfase nuclear of normal leukemic, and tumor cells as evaluated by silver staining. **Intern Review of Cytol**, **121**:233-266, 1990.
- Mello MLS, Vidal BC. Noções Fundamentais de Cariometria. In: Práticas de Biologia Celular, Editora FUNCAMP 1ª edição, 1980.
- Meyer JS, Nauert J, Koehn S, Hughes J. Cell kinetics of human tumors by *in vitro* bromodeoxyuridine labeling. **J Histochem Cytochem**, **37**: 1449-1454, 1989.
- Mourad WA, Katz RL, Sembera D, Atkinson N, El-Waggar AK. Two AgNOR counts in fine-needle aspirates of lymphoproliferative disorders compared with acridine orange flow cytometry. **Diagn Cytopathol**, **8(2)**:128-134, 1992.
- Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingston S, Shoukri M, Cox CE, Nicosia SV, Rowlands DT. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. **Cancer**, **69(7)**:1739-1744, 1992.
- Mourad WA, Connelly JM, Sembera DL, Atkinson N, Bruner JM. The correlation of two argyrophilic nucleolar organizer region counting methods with bromodeoxyuridine-labeling index. **Hum Pathol**, **24(2)**:206-210, 1993.
- Mourad WA, Setrakian S, Habs ML, Abdulla M, Trucco G. The argyrophilic nucleolar organizer regions in ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Cancer**, **74(6)**: 1739-1745, 1994.
- Nakamura S, Takeda I, Okobe Y, Yoshida T, Ohtake S, Kobayashi K, Kanno M, Matsuda T. Argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region in acute leukemias and its relation to the S-phase fraction of leukemic cells. **Acta Haematol**, **87(1)**:6-10, 1992.
- Nikicicz EP, Norback DM. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) staining in normal marrow cells. **J Clin Pathol**, **43**:723-727, 1990.

- Norgaard JM, Langkjer ST, Palshof T, Clausen N, Pedersen B, Hokland P. Relation of blast cell survival and proliferation to chemotherapy resistance in AML. **Br J Haematol**, 93:888-897, 1996.
- Norton L. Implications of kinetic heterogeneity in clinical oncology. **Semin in Oncol**, 12:231-249, 1985.
- Öfner D, Hittmain A, Marth C, Öfner C, Tötsch M, Dexehbichler G, Mikuz G, Margreiter R, Schmidt KW. Relation between quantity of silver stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. **Path Res Pract**, 188:742-746, 1992.
- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, 81(11):2844-2853, 1993.
- Pich A, Chiarle R, Chiusa L, Palestro G. Argyrophilic nucleolar organizer region counts predict survival in thymoma. **Cancer**, 74:1568-1574, 1994.
- Pich A, Mormont F, Chiusa L, Cappello N, Resegotti I, Navone R. Argyrophilic nucleolar organizer region counts and prognosis in multiple myeloma. **Br J Haematol**, 82:681-688, 1992.
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J**, 18:5-14, 1986.
- Rabenhorst SH, Burini RC, Schmitt FCL. Marcadores da proliferação celular. **Rev Bras Pat Clin**, 29(1): 24-29, 1993.
- Raza A, Maheshwari Y, Preisler HD. Differences in cell cycle characteristics among patients with acute nonlymphocytic leukemia. **Blood**, 69(6): 1647-1653, 1987.

- Raza A, Maheshwari Y, Yasin Z, Mandava N, Mayers G, Preisler HD. A new method for studying cell cycle characteristics in ANLL using double-Labeling with BrdU and 3HTdr. **Leukemia Research**, 11(12):1079 -1087, 1987.
- Raza A, Preisler HD, Day R, Yasin Z, White M, Lykins J, Kukla C, Barcos M, Bennett J, Browman G, Goldberg J, Grunwald H, Larson R, Vardiman J, Vogler R. Direct relationship between remission duration in acute myeloid leukemia and cell cycle kinetics: a leukemia intergroup study. **Blood**, 76(11):2197, 1990.
- Raza A, Preisler H, Lapkin B, Lykins J, Kubla C, Gartside P, Shekh Y, Yousulf N, White M, Barcos M, Bennetti J, Browman G, Goldberg J, Grunwald H, Larson R, Varceiman J, Vogler R. Clinical and prognostic significance of *in vivo* differentiation in acute myeloid leukemia. **Am J Hematol**, 42:147-157, 1993.
- Reeves BR, Casey G, Honeycombe JR, Smith S. Correlation of differentiation state and silver staining of nucleolar organizers in the promyelocytic leukemia cell line HL-60. **Cancer Genet and Cytogen**, 13:159-166, 1984.
- Riccardi A, Giordano M, Danova M, Girino M, Brugnattelli S, Ucci G, Mazzini G. Cell kinetics with *in vivo* bromodeoxyuridine and flow cytometry: clinical significance in acute non-lymphoblastic leukaemia. **Eur J Cancer**, 27(7):882-887, 1991.
- Roussel P, Hernandez-Verdun D. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. **Exp Cell Res**, 214:465-472, 1994.
- Rüschoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C. Nucleolar organizer regions (NORs) basic concepts and practical application in tumor pathology. **Path Res Pract**, 185:878-885, 1989.
- Rüschoff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. **J Pathol**, 161:113-118, 1990.

- Rüschhoff J, Prasser C, Cortez T, Höhe HM, Hohenberger W, Hofstädter F. Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: comparison of evaluation methods and nucleolar features. **Am J Surg Path**, 17(12):1281-1288, 1993.
- Sachs L. The control of growth and differentiation in normal and leukemic blood cells. **Cancer**, 65(10):2196-2206, 1990.
- Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. **Blood**, 82(1):15-21, 1993.
- Scheer U, Benavente R. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. **BioEssays**, 12 (1): 14-21.
- Schwarzacher HG, Wachtler F. The nucleolus. **Anatomy and Embryology**, 188: 515-536, 1993.
- Schwint AE, Savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff E, Cabrini RL, Itoiz ME. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent squamous cell carcinoma of human oral mucosa. **Cancer**, 73(11):2674-2679, 1994.
- Scarffe JH, Hann IM, Evans DIK, Monis-Jones P, Palmer MK, Lilleyman JS, Crowther D. Relationship between the pretreatment proliferative activity of marrow blast cells and prognosis of acute lymphoblastic leukemia of childhood. **Br J Cancer**, 41: 764-771, 1980.
- Sekine J, Sano K, uehara M, Inokuchi T. Detection of S-phase cells in smear cytology using *in vitro* bromodeoxyuridine labeling. **Biotechnic and Histochemistry**, 71(3): 152-156, 1996.
- Smetana K, Likovsky. Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. **Cell Tissue Res**, 237:367-370, 1984.

- Smith PJ, Skilbeck N, Harrison A, Crocker J. The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. **J Pathol**, **155**:109-112, 1988.
- Smith R, Crocker J. Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. **Histopathol**, **12**:113-125, 1988.
- Soomro I, Patel N, Whimster WF. Distribution and estimation of nucleolar organizer regions in various human lung tumours. **Path Res Pract**, **187**:68-72, 1991.
- Thiele J, Fischer R. Bone marrow tissue and proliferation markers: results and general problems. **Virchow Arch A**, **423**: 409-416, 1993.
- Trerè D. Critical analysis of the methods commonly employed in the assessment of cell proliferation: advantages of the NOR silver-staining technique in routine cyto-histopatology. **Analyt Cell Pathol**, **5**: 191-201, 1993.
- Trerè D, Pession A, Basso G, Rondelli R, Masera G, Paolucci G, Derenzini M. Prognostic relevance of pretreatment proliferative rapidity of marrow blast cells in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Cancer**, **70**:1198-1202, 1994.
- Vellenga E, Griffin JD. The biology of acute myeloblastic leukemia. **Semin in Oncol**, **14**(4):365-371, 1987.
- Wachtler F, Schvayacher H C, Ellinger A. The influence of the cell cycle on structure and number of nucleoli in cultured human lymphocytes. **Cell Tiss Res** **225**: 155-163, 1982.
- Watson JV. Tumour growth dynamics . **Brit Med Bull**, **47**:47-63, 1991.
- Yekeler H, Erel Ö, Yumbul AZ, Doymaz MZ, Dogan Ö, Özercan MR, Iplikçi A. A sensitive staining meghod for NORs. **J Pathol**, **175**:449-452, 1995.

Zatsepina O, Hozak P, Babadjanyan D, Chentsov Y. Quantitative ultrastructural study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle (G_0 period; G_2 period mitosis). **Biol of the Cell**, 62:211-218, 1988.