



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Cléber Fontoura Marcolan

ASSOCIAÇÕES TELOMÉRICAS COMO INDICADORES DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM PACIENTES COM LEUCEMIAS MIELÓIDES E SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Cléber Fontoura Marcolan e aprovada pela Comissão Julgadora.

14/12/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christine Hackel

1999

M333a

Ex.			
MB0 BC/	40414		
DOC.	278/2000		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
RECO	08.11.00		
DATA	17-02-00		
CPD			

CM-00138009-3

Marcolan, Cléber Fontoura

M334a Associações teloméricas como indicadores de instabilidade cromossômica em pacientes com leucemias mielóides e síndromes mielodisplásicas/Cléber Fontoura Marcolan. -- Campinas, SP: 97p. 2000.

f: ilus.

Orientador: Christine Hackel

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1.Neoplasias. 2.Hematologia. 3.Leucemia. I. Hackel, Christine. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

DATA DE DEFESA: 14 / 12 / 1999

BANCA EXAMINADORA:

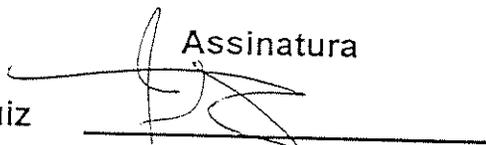
TITULARES:

Profa. Dra. Christine Hackel (orientadora)



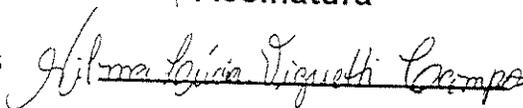
Assinatura

Profa. Dra. Fátima Aparecida Bottcher Luiz



Assinatura

Profa. Dra. Nilma Lúcia Viguetti Campos



Assinatura

SUPLENTE

Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada



Assinatura

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese àquele que sempre esteve comigo em todas as horas, fossem elas alegres ou tristes; aquele que nos momentos de maiores dificuldades sempre teve uma palavra de consolo, um palavra de ânimo, uma palavra de incentivo; aquele que sustentou e ainda sustenta o meu viver, que me criou a sua imagem e conforme a sua semelhança e que me adotou como filho, através de seu sacrifício vicário na Cruz. Dedico esta tese ao meu Senhor e Salvador **JESUS CRISTO**, o único e verdadeiro Deus, que pelo sua maravilhosa Graça fez-me mais que vencedor.*

“Mas em todas estas coisas, somos mais do que vencedores, por Aquele que nos amou”.

Romanos 8:37

“O amor jamais acaba; mas havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará; ... Agora, pois permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor ...pois Deus é amor.”

1 Coríntios 13:8,13 e 1 João 4:8

AGRADECIMENTOS

Encontrar palavras para expressar minha gratidão as pessoas que me apoiaram e ajudaram para a realização desse trabalho torna-se difícil, por isso limitar-me-ei a mencioná-los, com a certeza de que serei compreendido.

- Profa. Lorena Teresinha Consalter Geib , M.D. Diretora do ICB-UPF
- Profa. Dra. Tais Leiroz Codenotti
- Prof. Dr. Agostinho Didonet
- Prof. MSc. Dileta Cecchetti
- Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, Coordenadora do Mestrado em Biologia Celular
- Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel
- Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho
- Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello
- Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal
- Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada
- Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder
- Prof. Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo
- Profa. Dra. Laurecir Gomes

Os amigos do Instituto de Biologia-UNICAMP: Cidinha, Arnaldo, Klélia, Luciana, Mário e Lilian.

Os amigos do Departamento de Genética Médica da FCM - UNICAMP:
Henry, Jo e Dra. Nilma Lúcia Viguetti Campos.

Os médicos do Hospital Universitário São Vicente de Paulo de Passo
Fundo-RS, Dr. Marco Antônio Ruas Schilling, Dr. Lieverson Augusto Guerra
e Dra. Denise Almeida

A Bióloga Anita Moro, do Laboratório de Patologia e Genética - HSVP

Os colegas de pós-graduação: Adil, Marta, Estacia, Maristela, Fogaça,
Suzana, Eduardo, Mara, Paulo, Tadeu, Verardi, Simone, Carmen e Vera.

Os funcionários do ICB-UPF, Marcinha, Patrícia, Roni, Raquel, Neuza,
Elaine e Maria de Lourdes

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço, em especial, a minha orientadora, Profa. Dra. Christine Hackel, pela sua paciência, prestatividade, boa-vontade, disponibilidade e amizade e pela enorme compreensão que demonstrou para comigo durante todo o período do mestrado. Que Deus possa retribuir toda essa dedicação e carinho.

Como não poderia faltar, agradeço de todo meu coração aos meus pais, Domingos e Jessy, pela força, pelo carinho, pelo amor, pela dedicação, pela fé e pelas orações que fizeram em meu favor, sem jamais deixar de lembrar todo o sacrifício que passaram para que eu pudesse chegar até aqui. Que o Senhor Jesus venha recompensá-los por tudo o que realizaram por mim e para mim. **Mãe e Pai, eu os amo!**

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Síndromes Mielodisplásicas	3
1.2 - Leucemia Mielóide Aguda	11
1.3 - Leucemia Mielóide Crônica	15
1.4 - Exposição Ocupacional à Defensivos Agrícolas e Achados Citogenéticos	18
1.5 - Telômeros	20
1.6 - Telomerase e Câncer	22
1.7 - Associações Teloméricas	24
1.8 - Justificativa do Trabalho	27
2 - OBJETIVOS	29
3 - CASUÍSTICA	30
4 - MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 - Metodologia	32
4.1.1 - Técnica de Obtenção de Células em Metáfase a partir de Aspirado de Medula Óssea em cultura de 24 horas	32
4.2 - Análise Cromossômica	33
4.2.1 - Técnica de Obtenção de Bandas G	33
4.2.2 - Critérios Adotados para a Classificação e Análise dos Resultados	34

5 - RESULTADOS	37
5.1. Análise cromossômica e freqüência de <i>tas</i> nas amostras provenientes de pacientes com Síndromes Mielodisplásicas	41
5.2. Análise cromossômica e freqüência de <i>tas</i> nas amostras provenientes de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda	46
5.3. Análise cromossômica e freqüência de <i>tas</i> nas amostras provenientes de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica	49
5.4. Análise Estatística	52
6 - DISCUSSÃO	53
6.1 - Alterações Cromossômicas Numéricas	54
6.1.1 - Hipodiploidias e Hiperdiploidias de Natureza Clonal	54
6.1.2 - Hipodiploidias e Hiperdiploidias Não-específicas	55
6.2 - Alterações Cromossômicas Estruturais	57
6.2.1 - Alterações Estruturais de Natureza Clonal	57
6.2.2 - Alterações Estruturais de Natureza Não-clonal	59
6.3 - Associações Teloméricas	60
7 - CONCLUSÕES	67
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ABREVIATURAS

- SMD** = Síndromes mielodisplásicas
- LMA** = Leucemias mielóides agudas
- LMC** = Leucemias mielóides crônicas
- Ph** = Cromossomo Philadelphia
- tas** = Associações teloméricas
- t** = Translocação
- del** = Deleção
- ins** = Inserção
- inv** = Inversão
- i** = Isocromossomo
- idic** = Isocromossomo dicêntrico
- add** = Adição
- pcd** = Separação precoce de centrômero
- chtb** = Quebra cromatídica
- mar** = Cromossomo marcador
- min** = Cromossomos "minutes"
- p** = Braço curto dos cromossomos
- q** = Braço longo dos cromossomos
- dup** = duplicação de material genético
- r** = cromossomo em anel
- pb** = pares de base
- +** = Ganho de um cromossomo
- = Perda de um cromossomo

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Critério de classificação das associações teloméricas

Figura 2 – Metáfase 46,XX, add(2)(q37), add(4)(q35), t(9;12)(p11;p13) do paciente 5 (SMD)

Tabela I: Classificação das Síndromes Mielodisplásicas,

Tabela II: Alterações cromossômicas numéricas e estruturais recorrentes em SMD.

Tabela III: Classificação da Leucemia Mielóide Aguda

Tabela IV: Rearranjos estruturais recorrentes em LMA

Tabela V: Distribuição dos pacientes quanto ao sexo, idade, origem, profissão e diagnóstico hematológico.

Tabela VI: Cariótipos dos pacientes com SMD, LMA e LMC

Tabela VII: Número de células analisadas e frequência de *fas* em pacientes com SMD

Tabela VIII: Descrição das metáfases com *fas* em pacientes com SMD

Tabela IX: Número de células analisadas e frequência de *fas* em pacientes com LMA

Tabela X: Descrição das metáfases com *fas* em pacientes com LMA

Tabela XI: Número de células analisadas e frequência de *fas* em pacientes com LMC

Tabela XII: Descrição das metáfases com *fas* em pacientes com LMC

RESUMO

Do ponto de vista citogenético, as associações entre alterações cromossômicas específicas e diferentes tipos de neoplasias hematológicas estão bem estabelecidas. Porém, as associações teloméricas (*tas*), que são associações que envolvem as regiões terminais dos cromossomos, conhecidas como telômeros, são observadas esporadicamente em processos neoplásicos, questionando-se seu potencial como indicador biológico de exposição ocupacional à agentes genotóxicos do meio ambiente. Tais associações podem ser derivadas da redução do comprimento do telômero e da inibição da telomerase, refletindo-se em instabilidade cromossômica.

Com o objetivo de analisar o cariótipo e verificar a ocorrência das *tas* em SMD e leucemias mielóides, foram analisadas metáfases de células de aspirado de medula óssea de 30 pacientes (10 SMD, 10 LMA e 10 LMC), em sua maioria, provenientes da zona rural. A comparação dos dados relativos a freqüência de *tas* nos diferentes grupos de neoplasias hematológicas foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, adotado o nível de significância de 5%.

Na análise do cariótipo das SMD, as alterações clonais encontradas foram a monossomia do cromossomo 7, associada à monossomia dos cromossomos 13 e 20, a trissomia dos cromossomos 21, 15 e 19 e a tetrassomia do cromossomo 22. Também foram observados novos rearranjos estruturais envolvendo as regiões 2q37, 4q35, 7p22, 9p11, 12p13, e 12q24. Dentre as alterações cromossômicas de natureza clonal encontradas em LMA, destacaram-se a trissomia do cromossomo 14 e as monossomias dos cromossomos 1, 7 e 22, a deleção do braço longo do cromossomo 7 e a presença do cromossomo Philadelphia. Nas LMC, os resultados da análise do cariótipo revelaram a presença do cromossomo Philadelphia (Ph), como principal alteração de natureza clonal, sendo observado também, um segundo cromossomo Ph e a nulissomia do Y como alterações cromossômicas

secundárias em alguns pacientes. Outras alterações de natureza não-clonal foram observadas ocasionalmente, como poliploidias, hipo e hiperdiploidias, cromossomos marcadores, quebras cromatídicas e separação precoce de centrômero.

Em relação às *tas*, nossos resultados mostraram a presença desse fenômeno em todos os pacientes com SMD e LMA e em 8 dos 10 pacientes com LMC. A frequência de *tas* foi mais elevada nas SMD; as LMA apresentaram frequência intermediária e as LMC apresentaram frequência mais baixa. A comparação das frequências de metáfases com associações teloméricas entre os três grupos de neoplasias hematológicas apresentou diferença significativa entre SMD e LMC ($p < 0.01$), enquanto não foram observadas diferenças significativas das LMA em relação às SMD ($p > 0.05$) e das LMA em relação às LMC ($p > 0.05$).

Tendo em vista os resultados obtidos, é possível que os agroquímicos possam ser inibidores da atividade de telomerase, atingindo preferencialmente as células tronco da medula óssea, desencadeando assim uma perda de repetições teloméricas, cuja expressão citogenética inicial seria representada pelas *tas*. Desse modo, as *tas* poderiam ser consideradas indicadores de instabilidade cromossômica relacionada à exposição aos genotóxicos do meio ambiente. No entanto, nossos dados são apenas indicativos, pois na casuística por nós examinada há um predomínio de indivíduos do meio rural, não sendo possível comparar os dados com indivíduos não-expostos ocupacionalmente a esses produtos, sendo necessário posteriores estudos citogenéticos e moleculares para a investigação do encurtamento dos telômeros e da atividade da telomerase nas *tas*, em indivíduos expostos e não expostos a agroquímicos.

ABSTRACT

The associations between specific chromosomal abnormalities and different types of hematological neoplasias are well established. However, telomeric associations (*tas*), which are associations between termini regions of chromosomes (telomeres), are sporadically observed in neoplasias, leading to the question about their role as a biological indicator of occupational exposure to environmental genotoxic agents. These associations can arise in consequence of shortening telomere length and the inhibition of telomerase activity, reflecting in chromosomal instability.

The objective of this work was to determine the karyotype and to verify the occurrence of *tas* in MDS and acute or chronic myeloid leukemias (AML and CML). Metaphases of bone marrow cells of 30 patients (10 with MDS, 10 with AML and 10 with CML) were analyzed. The comparison of *tas* frequency data in these different hematological neoplasias was realized by the Kruskal Wallis test with significance level of 5%.

In the MDS patients, the clonal cytogenetic abnormalities findings were: monosomy of chromosome 7 in association with monosomy of chromosomes 13 and 20, trisomy of chromosomes 15, 19, 21, and tetrasomy of chromosome 22. New structural rearrangements were observed involving the 2q37, 4q35, 9p11, 12p13, 7p21 and 12q24 regions.

Non-clonal chromosomal abnormalities were observed in AML, such as the trisomy of chromosome 14 and monosomy of chromosomes 1, 7 and 22, deletion of short arm of chromosome 7 and the presence of Philadelphia (Ph) chromosome. In CML, the results showed the presence of Ph chromosome as the principal clonal abnormality, as expected. An extra Ph chromosome and monosomy of chromosome Y, which are secondary chromosomal abnormalities, were also observed in some patients. Other

non-clonal abnormalities such as poliploidy, hipodiploidy, hiperdiploidy, marker chromosome, chromatid break and precoce centromere division were occasionally observed.

With regard to *fas*, our results showed the presence this phenomenon in all patients with MDS, AML and in eight among ten patients with CML. The frequency of metaphases with *fas* was higher in MDS; AML showed intermediate frequency and CML lower frequency. The comparison of these data showed significative difference between MDS and CML ($p < 0.01$), whereas no significative levels between AML regard to MDS ($p > 0.05$) and CML ($p > 0.05$) were detected.

Considering our results, it's possible to suppose that agrochemicals can be inhibitors of telomerase activity, preferentially attaining the stem cells of bone marrow, leading to the loss of telomeric sequences and to the cytogenetic expression of *fas*. Thus, *fas* can be considered an indicator of chromosomal instability, related to environmental exposure to pesticides. However, our data are only indicative, because in the present study, there was a predominancy of individuals from rural zone, not allowing us to compare these data with occupational non-exposed individuals. Additional cytogenetics and molecular studies should be performed to investigate the relationship between telomerase activity and shortening telomere length with *fas*, in patients with hematological disease, exposed or non-exposed to environmental genotoxic agents such as pesticides.

I. INTRODUÇÃO

Todas as células possuem um sistema de regulação de seu crescimento e proliferação, controlado pelos sistemas de checagem do ciclo celular. Durante o desenvolvimento, as células se proliferam, fazendo com que os órgãos cresçam até atingirem seu tamanho adequado, parando seu crescimento. Eventualmente, algumas células escapam desse sistema de regulação e começam a proliferar descontroladamente, desencadeando um processo chamado neoplasia.

As neoplasias classificam-se em benignas ou malignas. As benignas possuem crescimento limitado, e portanto não se disseminam em tecidos adjacentes nem formam metástases, podendo entretanto, através de pressão mecânica, causarem problemas ao indivíduo. As neoplasias malignas, por outro lado, apresentam crescimento ilimitado, podendo invadir tecidos vizinhos e também entrar na corrente sangüínea ou linfática, atingindo outros órgãos e desenvolver um novo foco do tumor (metástase) (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 1993).

As leucemias são neoplasias malignas, caracterizadas pela proliferação descontrolada de células do tecido hematopoiético em estágios diferentes de maturação, que vão substituindo gradativa e progressivamente os elementos celulares normais. São doenças universais, cuja incidência varia entre as diferentes nações, estando no nosso meio em torno de 5 casos novos por 100.000 habitantes por ano (MARINHO, 1983). Classificam-se de acordo com a linhagem celular afetada, em linfóides ou mielóides e, segundo a maturidade das células em agudas (células imaturas com aumento da atividade proliferativa) ou crônicas (células diferenciadas). Dessa forma, as leucemias podem ser classificadas em quatro grandes

grupos (a) Leucemia mielóide aguda (LMA); (b) Leucemia mielóide crônica (LMC); (c) Leucemia linfóide aguda (LLA) e (d) Leucemia linfóide crônica (LLC). (ROBBINS et al., 1996).

Outras características também podem ser utilizadas para a classificação das leucemias, entre elas citam-se a morfologia celular, a imunohistoquímica, a presença de marcadores de membranas ou de enzimas, a análise citogenética e a análise direta de DNA (HEIM & MITELMAN, 1995).

Uma outra categoria de doenças hematológicas são as síndromes mielodisplásicas (SMD) que formam um grupo heterogêneo de doenças hematopoiéticas monoclonais, originadas de uma célula-tronco da linhagem mielóide (PELLIER *et al.*, 1996, MARTINEZ-CLIMENT, 1997), com um alto poder proliferativo

A análise citogenética das doenças neoplásicas ou tumores é uma das áreas que mais tem se desenvolvido nos últimos anos. Essa rápida progressão teve início em meados de 1970, após a aplicação das técnicas de bandamento cromossômico para o estudo do cariótipo. Antes desse período, a interpretação dos cariótipos nas doenças hematológicas era desanimador, por ser impossível a identificação dos marcadores cromossômicos e também por não se encontrar uma explicação do porque células leucêmicas apresentavam cariótipos aparentemente normais (WIERNIK *et al.*, 1991).

A compreensão das aberrações cromossômicas específicas, presentes em cada tipo de neoplasia, resultou de um esforço colaborativo internacional entre citogeneticistas, clínicos e morfologistas, sendo o

reconhecimento do cariótipo de grande importância para o estabelecimento do diagnóstico da doença, do prognóstico clínico e do direcionamento da terapia (RAIMONDI, 1993).

A descrição do cariótipo é realizada por meio de especificações das alterações clonais, sendo um clone definido como uma população celular derivada de uma célula progenitora comum (HEIM & MITELMAN, 1995).

1.1 Síndromes Mielodisplásicas (SMD)

Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são alterações hematológicas adquiridas com defeitos na maturação, na divisão celular e na proliferação das séries eritroblásticas, granulocíticas e megacariocíticas, que podem ser identificadas em cerca de 25 a 50% dos pacientes que desenvolvem leucemia mielóide aguda (LMA). As SMD ocorrem predominantemente em indivíduos do sexo masculino com idade superior a 50 anos, sendo de evolução crônica e refratária a várias modalidades de tratamento (OLIVEIRA, 1988).

As alterações mielodisplásicas mais notáveis no hemograma são: 1) anemia macrocítica, sem sinais de regeneração, 2) trombocitopenia com plaquetas dismórficas; trombocitose na síndrome 5q-, 3) neutrófilos com hipersegmentação, formas agranuladas, segmentação nuclear pelgeróide, excesso de baquetas, pode haver neutrocitose ou neutropenia, 4) monocitose; quando acentuada, progressiva e com formas intermediárias entre monócitos e precursores mielóides, designa-se leucemia monocítica subaguda ou crônica (LMMoC), 5) blastos no sangue: raros inicialmente,

aumentando com a leucemização, 6) anemia sideroblástica, e 7) megacariócitos, ou restos no sangue (FAILACE, 1995).

As alterações citológicas encontradas na medula óssea de portadores de SMD, a qual pode ser hiper ou hipocelular, são muito difíceis de caracterizar, podendo incluir :1) aspectos megalóides, 2) hipoplasia eritróide, com células binucleadas e mitoses anormais, 3) aumento de mieloblastos e promielócitos, 4) monoblastos e promonócitos em alta percentagem; 5) megacariocitopenia com ou sem formas anormais, 6) megacariocitose, com micromegacariócitos com hipoploidia na síndrome 5q⁻ e 7) aumento das reservas de ferro e presença de sideroblastos em anel (na anemia sideroblástica) (FAILACE, 1995).

HEIM & MITELMAN (1995) relatam que as SMD foram inicialmente descritas como anemia pré-leucêmica por Hamilton-Paterson, em 1949, e pré-leucemia por Block e colaboradores em 1953. Desde então, esses termos passaram a ser utilizados como sinônimos por Saarni & Linman em 1973, entre outros. Thiele e colaboradores e Georgi e colaboradores na década de 80, propuseram a substituição das designações anteriores por displasia mielóide, uma vez que os estudos realizados por esses autores permitiram constatar a existência de alterações morfológicas comuns na medula óssea de pacientes que evoluíram para LMA ou LMC. Em 1982, o grupo cooperativo francês - americano - britânico (FAB) introduziu o termo síndrome mielodisplásica, que passou a ser utilizado pela maioria dos pesquisadores. Esse mesmo grupo FAB, também propôs um critério diagnóstico para as SMD, que reconhece cinco diferentes subgrupos mielodisplásicos :

a) anemia refratária sem excesso de blastos (AR),

- b) anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) ou anemia sideroblástica idiopática adquirida (ASIA),
- c) anemia refratária com excesso de blastos (AREB)
- d) anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e,
- e) leucemia mielomonocítica crônica (LMMC).

A classificação FAB tem sido a mais aceita atualmente (BENNETT, 1982, HEIM & MITELMAN, 1995). Os critérios de classificação das SMD se encontram na Tabela I.

Duas classificações citogenéticas são normalmente usadas: uma, baseada na complexidade do cariótipo (normal, com alterações únicas, duplas ou complexas) e outra baseada no “status” clonal (todas as metáfases normais, anormais ou misturadas, normais e anormais). A presença de defeitos complexos está associada com a redução da sobrevida e um alto risco para transformação leucêmica. A presença de dois defeitos cromossômicos pode constituir uma entidade citogenética independente, provavelmente associada com um pior prognóstico. A evolução cariotípica geralmente, representa um pior fator de risco (JOTTERAND & PARLIER, 1996). Na maioria dos casos de SMD, são observadas perdas ou ganhos de material genético, representados por monossomias e trissomias totais ou parciais, embora existam alguns rearranjos estruturais recorrentes (Tabela II).

Tabela I: Classificação FAB das Síndromes Mielodisplásicas, descrito por WOOD & BUNN (1996).

	Sangue Periférico		Medula Óssea	
	% blastos circulantes	% monócitos	% blastos	% sideroblastos em anel
Anemia Refratária (AR)	< 1	Não aumentados	< 5	< 15
Anemia Refratária com sideroblastos em Anel (ARSA)	< 1	Não aumentados	< 5	> 15
Leucemia Mielomononúctica crônica (LMMC)	< 5	> 10 ⁹ / L	≥ 20	Insignificantes
Anemia Refratária com excesso de Blastos (AREB)	< 5	Não aumentados	5 – 20	Insignificantes
Anemia refratária com excesso de Blastos em transformação (AREB-t)	≥ 5	Não aumentados	20 – 30 e/ou Bastões de Auer	Insignificantes

Tabela II: Alterações cromossômicas numéricas e estruturais recorrentes em SMD.

Alterações Estruturais			
Alterações Numéricas	Deleções	Translocações e outros rearranjos	
+ 6	del(5q)	t(1;3)(p36;q21)	inv(16)(p13q22)
+ 8	del(7q)	t(1;7)(q10;p10)	t(3;3)(q21;q26)/ inv(3)(q21q26)
+ 9	del(11q)	t(6;9)(p23;q34)	t(5;12)(q33;p12- 13)/ t(10;12)(q24;p13)
+ 11	del(12p)	t(9;22)(q34;q11)	ins(3;3)(q21;q21q2 6)
+ 14	del(13q)	t(16;16)(p13;q22)	i(17q)
+ 19	del(16q)	t(2;11)(p21;q23)	idic(X)(q13)
+ 21	del(20q)	t(11;21)(q24;q11)	der(1;7)(q10;p10)
- 5	del(21q)		der(1;3)(q10;q10)
- 7			der(1;5)(q10;q10)
- X			der(16)t(1;16)(q11; q11)
- Y			der(Y)t(1;Y)(q12;q1 2) Trissomia 1q

Fonte: Adaptado de HEIM & MITELMAN (1995) e JOTTERAND & PARLIER (1996)

Existem alterações cromossômicas comuns aos 5 subgrupos, mas algumas aberrações são características de cada subgrupo. Em pacientes com AR, é difícil estabelecer a frequência de cariótipos com anomalias cromossômicas, uma vez que a maioria dos estudos descreve somente os achados anormais (HEIM & MITELMAN, 1995). As alterações cromossômicas mais freqüentemente detectadas são deleção do braço longo do cromossomo 5 (deleções intersticiais entre q11 e q35), monossomia do cromossomo 7 e trissomia do cromossomo 8.

A deleção de 5q em pacientes com AR foi primeiramente relatada em 1974, por van den Berghe e colaboradores, e o mesmo grupo, 10 anos mais tarde, revisou extensivamente as características clínicas, hematológicas e citogenéticas desse subtipo hematológico (HEIM & MITELMAN, 1995). Esta alteração também ocorre em outras doenças tais como LMA, mas a relação desta alteração com SMD, especialmente com AR é, sem dúvida, a mais consistente. Isso resultou no uso comum do termo "Síndrome 5q" para o conjunto de características clínico-hematológicas em que o marcador citogenético é mais freqüentemente encontrado.

Já nos casos de ARSA, existem poucos dados disponíveis em relação à proporção de pacientes com este subtipo de SMD com anormalidades citogenéticas clonais de medula óssea (HEIM & MITELMAN, 1995). Em uma série de 174 casos estudados por KNAPP *et al.*(1985), apenas 20% dos pacientes com ARSA exibiram clones anormais, em oposição a quase 40% em SMD como um todo. Até 1995, somente 150 pacientes com ARSA e anormalidades cromossômicas haviam sido relatados na literatura (HEIM & MITELMAN, 1995).

As alterações cariotípicas que ocorrem em ARSA, não diferem essencialmente das observadas nos outros tipos de SMD, havendo predomínio de 5 aberrações : trissomia do 8, deleção do braço longo do cromossomo 5, a monossomia do cromossomo 7, a deleção do braço longo do cromossomo 11 e deleção do braço longo do cromossomo 20 (HEIM & MITELMAN, 1995). Para a monossomia do cromossomo 7, esse valor se encontra abaixo da média das SMD como um todo, mas para 11q⁻ e 20q⁻ essa incidência em ARSA é mais alta do que para outros subgrupos de SMD. Além disso, há relatos de pacientes com ARSA exibindo deleção do braço longo do 8 e trissomia do cromossomo 9 (MANSOOR *et al.*, 1993)

Como nas outras categorias de SMD, a frequência real de anomalias cromossômicas em cariótipo de pacientes com AREB ou AREBt ainda não foi estabelecida (HEIM & MITELMAN, 1995). Em estudos realizados por KNAPP *et al.*(1985), 45% dos pacientes com AREB e 60% dos pacientes com AREBt tem aberrações cromossômicas, em oposição a 30% e 20% de AR e ARSA, respectivamente.

A distribuição das aberrações cromossômicas em AREBt é claramente não casual. As mesmas aberrações que dominam em outras SMD também ocorrem em AREBt. A deleção do braço longo do cromossomo 5, a mais freqüente alteração estrutural em ARSA e, em particular em AR, está presente em 25% dos casos de AREBt. A monossomia do cromossomo 5 é comum nas diversas SMDs (10%) mas é rara em AREBt como aberração isolada. A monossomia do cromossomo 7, por outro lado, é mais comum em AREBt (25%) do que em outras SMD. A frequência de monossomia parcial do cromossomo 7 é semelhante à monossomia completa, sendo mais comumente encontrada associada a

outras aberrações (5%) do que como a única alteração (HEIM & MITELMAN, 1995).

Finalmente, a trissomia do cromossomo 8 é comum em AREBt como em outras categorias de SMD diagnosticadas, embora menos do que em ARSA. A trissomia do cromossomo 8 pode ser particularmente freqüente em pacientes com Síndrome de Down que desenvolvem mielodisplasia com subsequente transformação para leucemia megacarioblástica aguda (ZIPURSKY *et al.*, 1994; HEIM & MITELMAN, 1995).

Em relação aos casos de LMMC, embora mais de 200 casos, citogeneticamente anormais, já tenham sido relatados, as freqüências de anormalidades cromossômicas detectadas neste subgrupo são variáveis. Em um grande estudo retrospectivo colaborativo realizado pelo *Groupe Français de Cytogénétique Hématologique*, em 1991, as alterações citogenéticas clonais foram encontradas em 36 de 120 pacientes com LMMC (30%) (HEIM & MITELMAN, 1995) e segundo uma revisão feita por JOTTERAND & PARLIER (1996), de 266 casos de LMMC relatados, 36% desses apresentavam cariótipos com aberrações cromossômicas clonais.

As aberrações cromossômicas correspondem àquelas vistas em SMD em geral. As mais comuns são a monossomia do cromossomo 7 e a trissomia do cromossomo 8, ocorrendo em 1/5 dos cariótipos anormais. A terceira alteração mais comum é perda do cromossomo Y, que é duas vezes mais freqüente neste grupo do que nos outros subtipos de SMD (HEIM & MITELMAN, 1995). Além disso, translocações ou deleções envolvendo o braço curto do cromossomo 12 parecem ser mais freqüentemente observadas em LMMC (HEIM, 1990).

É de grande valor enfatizar que a aberração cromossômica mais característica associada à SMD, del(5q), é pouco freqüente em LMMC (<5% dos casos anormais). Esta relativa falta de envolvimento do cromossomo 5 em LMMC, diferente dos outros grupos de SMD, é um ponto de muita relevância a ser levado em consideração, na contínua discussão sobre se é mais apropriado considerar estes pacientes como tendo uma mielodisplasia ou uma doença mieloproliferativa (HEIM & MITELMAN, 1995).

1.2. Leucemia Mielóide Aguda

A hematopoiese em LMA é caracterizada pelo acúmulo de blastos imaturos, que falham na diferenciação para granulócitos e monócitos (GRIFFIN & LOWENBERG, 1986). É uma doença com predomínio em adultos, tendo um risco de incidência aumentado a partir da idade de 55-60 anos. A incidência total de LMA, em todas as idades combinadas, é de 2.5 casos por 100.000 por ano. Os homens são mais freqüentemente afetados do que as mulheres (HEIM & MITELMAN, 1995).

Os fatores patológicos mais salientes da LMA, são o acúmulo excessivo de células precursoras de medula óssea não-linfáticas imaturas, na própria medula, em sangue periférico e algumas vezes, também em outros tecidos. Isto se deve ao aumento da atividade proliferativa ou a redução da morte celular. Estudos cinéticos, indicam que o último mecanismo é mais importante na maioria dos casos (HEIM & MITELMAN, 1995).

Várias tentativas tem sido feitas, para classificar a LMA com base na similaridade entre as células leucêmicas e as células precursoras que

podem ser identificadas nos vários estágios de desenvolvimento na hematopoiese normal. O grupo cooperativo FAB, em 1976 propôs uma série de critérios, que tem subseqüentemente sido aceitos na classificação das LMA. Originalmente seis subtipos foram reconhecidos, todos dependendo do caminho de diferenciação predominante e do grau de maturação apresentado pelas células leucêmicas. Nos subgrupos M1-M3, predomina a diferenciação granulocítica, diferindo somente com respeito a maturação. Em M4 a diferenciação é em parte granulocítica, e em parte monocítica, enquanto se observa um predomínio da diferenciação monocítica em M5. Em M6 o quadro é dominado não apenas por mieloblastos, mas também por um componente eritroblástico proeminente.

A classificação FAB das LMA encontra-se explanada na Tabela III, descrita por WOOD & BUNN(1996).

Tabela III: Classificação da Leucemia Mielóide Aguda

M0	Leucemia Mielóide Aguda com diferenciação mínima
M1	Leucemia Mielóide Aguda sem maturação
M2	Leucemia Mielóide Aguda com maturação
M3	Leucemia Promielocítica Hipergranular Aguda
M4	Leucemia Mielomonocítica Aguda
M5	Leucemia Monocítica
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia Megacarioblástica Aguda

As primeiras descrições de alterações cromossômicas em LMA foram feitas por volta de 1950, quando ainda não haviam boas condições para avaliar individualmente os cromossomos anormais. Quando os primeiros bandamentos foram realizados, no início de 1970, aproximadamente 50% de todos os pacientes com LMA mostravam aberrações clonais. Uma estimativa conservativa poderia ser de que no mínimo 2/3 dos pacientes, mas não todos, com LMA exibem anormalidades cromossômicas ao diagnóstico (HEIM & MITELMAN, 1995).

As aberrações numéricas mais freqüentes nas LMA são trissomia do cromossomo 8 (13% dos casos), monossomia do cromossomo 7 (9%), e monossomia do cromossomo 5 (6%). Rearranjos cromossômicos estruturais recorrentes, tem sido identificados em diferentes subtipos de LMA, que representam diferentes linhagens na diferenciação de células mielóides (HEIM & MITELMAN, 1995).

A TabelaIV apresenta os principais rearranjos cromossômicos estruturais relatados em LMA.

Tabela IV: Rearranjos estruturais recorrentes em LMA

TIPOS DE REARRANJOS			
Subtipo de LMA	Deleções	Translocações	Outros Rearranjos Estruturais
M0		t(15;17)(q22;q12-21)	
M1	del(5)(q22;q23) del(7)(q33;q36)	t(6;9)(p23;q34) t(15;17)(q22;q12-21) t(9;22)(q34;q11)	
M2	del(5)(q22;q23) del(7)(q33;q36)	t(8;21)(q22;q22) t(15;17)(q22;q12-21) t(6;9)(p23;q34)	
M3		t(15;17)(q22;q12-21)	i(17q)
M4	del(16)(q22) del(11q) del(5)(q22;q23) del(7)(q33;q36)	t(8;21)(q22;q22) t(15;17)(q22;q12-21) t(6;9)(p23;q34) t(10;11)(p14;q13-14) t(16;16)(q13;q22.1) t(1;7)(p11;p11) t(3;5)(q21;q31)	inv(16)(p13;q22)
M5	del(5)(q22;q23) del(7)(q33;q36) del(11)(q13-q14)	t(6;11)(q27;q23) t(9;11)(p21;22;q23) t(8;16)(p11;p13) t(10;11)(p14;q13-14)	
M6	del(5)(q22;q23) del(7)(q33;q36) del(20q)		
M7		t(1;3)(p36;q21)	ins(3;3)(q26;q21q26) inv(3)(p21q26)

Fontes: Adaptado de HEIM (1990), SHEER (1990), SANDBERG (1991) e WILLIAMS (1991).

1.3. Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica é uma doença clonal, causada pela transformação neoplásica de uma célula tronco do sistema hematopoiético, caracterizada por uma alta produção de granulócitos. Os eventos da leucemogênese da LMC ocorrem a partir de uma célula-tronco pluripotente (*stem cell*). No início da doença, estabelece-se uma fase crônica, relativamente benigna, que pode durar cerca de 3 anos. Essa fase é substituída por uma fase acelerada maligna, que eventualmente resulta na crise blástica terminal. Essa última se caracteriza por aumento no número de células imaturas na medula óssea e no sangue periférico, pela anemia progressiva e trombocitopenia, e muitas vezes pelo acúmulo extramedular de células blásticas, e por uma resposta reduzida à terapia citostática (MARINHO, 1983, KANTARJIAN *et al*, 1993, HEIM & MITELMAN; 1995).

No mundo ocidental, a LMC compreende aproximadamente 1/4 de todos os casos de leucemias, isto é, uma incidência de 1 caso por 100.000 pessoas por ano. A contagem de leucócitos é alta, tipicamente cerca de 200×10^9 /litro. A morfologia da medula óssea é caracterizada por hiperplasia granulocítica e megacariocítica. Eosinofilia e, especialmente, basofilia são comuns, e em 1/3 de todos os casos uma certa quantia de mielofibroblastos estão presentes (MARINHO, 1983)

Segundo MARINHO (1993), apesar de ter sido a primeira forma de leucemia a ser reconhecida por Bennett & Virchow em 1845, ainda possui uma evolução inexoravelmente fatal. A LMC compromete os dois sexos, com ligeira predominância do masculino. Incide em todas as raças, sendo

mais rara nos negros e pode ser observada em todos os grupos etários, com maior frequência na 2ª e 3ª décadas de vida.

Em 1960, Nowell & Hungerford descreveram a primeira neoplasia associada a anormalidades cromossômicas em humanos, quando relataram a presença de um pequeno cromossomo do grupo G em células leucêmicas de pacientes com LMC. Este novo marcador detectado foi denominado de cromossomo Philadelphia (Ph), em homenagem a cidade em que ele foi descoberto (SHEER, 1990). De acordo com BEIGUELMAN (1982), no Brasil, os primeiros pesquisadores a se dedicarem ao estudo do cromossomo Philadelphia foram Bottura e Coutinho, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP .

Primeiramente acreditava-se que o cromossomo Ph fosse derivado de um cromossomo do par 21, em decorrência de uma simples deleção. Após a descoberta das técnicas de bandamento, em 1970, permitindo a identificação de cada par de cromossomos homólogos pelo padrão específico de bandas, foi possível identificar que o cromossomo Ph origina-se, na verdade, de um cromossomo 22. Em 1973, Rowley demonstrou que não ocorre uma deleção, mas sim uma translocação recíproca envolvendo as regiões terminais dos braços longos (q) dos cromossomos 9 e 22, isto é, $t(9;22)(q34;q11)$.

Segundo revisão feita por THOMPSON *et al.* (1993), o ponto de quebra na banda q34 do cromossomo 9, é um dos sítios frágeis já identificados no genoma humano que exibe herança mendeliana. No caso da translocação que dá origem ao cromossomo Philadelphia, o oncogene *abl* (de "Abelson leukemia"), localizado em 9q34, passa a situar-se no

cromossomo Ph na região 22q11, ficando próximo ao gene da cadeia leve *lambda* da imunoglobulina (deKLEIN *et al.*, 1982), em um *locus* denominado *bcr* (de “break cluster region”). A consequência patogênica crucial da translocação é a criação de um novo gene quimérico *bcr/abl*, na região do ponto de quebra do cromossomo 22 derivado. A proteína-produto do gene *bcr/abl* é uma quinase tirosina-específica. Como esse novo polipeptídeo é leucemogênico ainda não se sabe, mas supõe-se que o gene quimérico altere a expressão e função da proteína *abl* nas células hematopoiéticas malignas, pois quando se introduziu uma composição retroviral contendo o gene quimérico em medula óssea de camundongos saudáveis, os camundongos infectados apresentaram neoplasias hematológicas, incluindo a LMC, o que sugere que o próprio cromossomo Ph causa o câncer.

Embora seja um cromossomo marcador para a LMC, em cerca de 5 a 10% dos casos de LMC o cromossomo Philadelphia não é encontrado (Ph⁻), mas esses casos são hematologicamente indistinguíveis da LMC clássica (Ph⁺) (HEIM & MITELMAN, 1995). A presença ou ausência do cromossomo Ph em LMC se mostrou clinicamente relevante, já que pacientes com LMC Ph-positivo têm uma sobrevida maior (42 meses) quando comparados a pacientes com LMC Ph-negativo (15 meses) (SHEER, 1990).

Pacientes com LMC podem, ocasionalmente, apresentar outras alterações no início da doença, sendo a t(9;22)(q34;q11) exclusiva da fase crônica. Quando a doença progride, aberrações cromossômicas adicionais são observadas em 75 a 80% dos casos. Estas alterações secundárias geralmente precedem as manifestações hematológicas e clínicas da fase aguda da doença por muitos meses e podem servir como valiosos indicadores prognósticos.

Nas últimas duas décadas, o estudo citogenético do câncer tem confirmado a hipótese de Boveri de uma íntima relação entre mutações cromossômicas e progressão tumoral. Hoje, três classes de alterações cromossômicas adquiridas em câncer são reconhecidas: (a) *alterações cromossômicas primárias*, que manifestam-se inicialmente na tumorigênese. (b) *alterações cromossômicas secundárias*, que manifestam-se no curso da progressão tumoral e a presença dessas alterações em tumores, são freqüentemente um indicador de maior avanço da doença, e (c) *alterações cromossômicas terciárias*, que são mutações que provavelmente manifestam-se por disrupções ao acaso no processo mitótico e são, por definição de efeito genético, neutras. Um aumento no número de alterações cromossômicas primárias em malignidades humanas tem sido identificada. Elas são consideradas como sendo marcadores tumorais sensitivos e específicos (HEIM & MITELMAN, 1987, BATTAGLIA *et al.*, 1989).

1.4. Exposição a defensivos agrícolas e achados citogenéticos

GOLOMB *et al.* (1982), após um estudo envolvendo pacientes portadores de leucemia mielóide aguda expostos e não-expostos à pesticidas, concluíram que as perdas totais ou parciais dos cromossomos 5 ou 7 são alterações específicas resultantes de mutagênese/leucemogênese associada com vários químicos, incluindo inseticidas, produtos de petróleo e agentes alquilantes. Esta interpretação é compatível com evidências em experimentos com animais, onde alterações cariotípicas consistentes são estritamente correlacionadas com agentes etiológicos específicos como o dimetilbenzeno(a) antraceno ou vírus do Sarcoma de Rous.

FAGIOLI *et al.*(1992), por meio de estudos citogenéticos em pacientes com LMA que foram expostos a pesticidas e a solventes orgânicos, observaram que esses pacientes apresentavam três ou mais eventos de translocação ou não-disjunção no mesmo clone, que foram definidas por estes autores como *aberrações cariotípicas principais*. As aberrações cromossômicas recorrentes em pacientes expostos foram monossomia total ou parcial do 5, deleção ou translocação de 17p, deleção ou translocação de 16q22, monossomia total ou parcial do 7, trissomia de 21q, e trissomia de 11q. Quebras nas bandas 6p23, 7q14, 11p14-15 e 11q13 foram encontradas em pacientes com leucemias agudas. A associação de anormalidades cromossômicas, especialmente as consideradas *principais*, com a exposição ocupacional pode ter influência clínica, de acordo com as diferenças observadas entre cariótipos de pacientes expostos e de pacientes não-expostos.

RICHARDSON *et al.*(1992) também relataram que a incidência de leucemias agudas é maior em pacientes expostos a pesticidas do que aos não-expostos. Segundo CICCONE *et al.*(1993), existe uma incidência mais elevada de leucemias entre fazendeiros do que em outros grupos de risco (95%), sugerindo-se que alguns pesticidas, tais como o Dichlorvos e Crotoxyphos, possam aumentar esse risco.

VIEL & RICHARDSON (1993) consideram que, embora os fazendeiros estejam expostos a muitos agentes potencialmente prejudiciais a saúde, uma atenção especial deve ser dada à exposição aos pesticidas (i.e. inseticidas, herbicidas e fungicidas), concluindo que seus achados são consistentes com a hipótese do aumento do risco de leucemia em pacientes expostos a estas substâncias.

LEVIGNE & BLOOMFIELD (1992) afirmam que em pacientes portadores de SMD primária com exposição ocupacional a solventes químicos, inseticidas ou derivados de petróleo apresentam anormalidades cromossômicas envolvendo os cromossomos 5 e 7 (cerca de 70%), enquanto pacientes com SMD primária, mas não expostos tem uma frequência bem menor dessas alterações (cerca de 20 a 30%). Segundo esses autores, as ocorrências não-casuais de anormalidades similares dos cromossomos 5 e 7 em pacientes com síndromes mielodisplásicas secundárias ou leucemias agudas e pacientes com síndromes mielodisplásicas primárias ou LMA de novo ocupacionalmente expostos à solventes químicos, inseticidas ou produtos derivados de petróleo, são evidências de que esses agentes são mais leucemogênicos do que se tem pensado. Esses achados levam a crer na hipótese de que pesticidas são agentes leucemogênicos, influenciando na terapia e na avaliação prognóstica.

1.5. Telômeros

Os telômeros são elementos da porção terminal dos cromossomos eucarióticos, compostos por DNA e proteínas. Na espécie humana, o DNA dessas estruturas é constituído por seqüências de hexanucleotídeos TTAGGG que se repetem *in tandem*, com tamanho de até 15 kb, altamente conservadas através da evolução, sendo essenciais para a manutenção da estrutura e função dos cromossomos (MOYSIS *et al.*, 1988, OHYASHIKI *et al.*, 1994a, KIM *et al.*, 1994, HIYAMA *et al.*, 1995, GREIDER & BLACKBURN, 1996, BOULTWOOD *et al.*, 1997).

Os telômeros atuam como estruturas de proteção das terminações cromossômicas contra degradação, fusão e recombinação; também são importantes, juntamente com os centrômeros, para a replicação dos cromossomos e estão provavelmente envolvidos na manutenção da arquitetura do núcleo (ADAMSON *et al.*, 1992, ENGELHARDT *et al.*, 1997).

Recentes observações, demonstraram que as repetições teloméricas das células somáticas humanas, agem como um “relógio celular”, pois diminuem com o envelhecimento, podendo causar ou contribuir para o desenvolvimento de doenças relacionadas com este processo (HARLEY, 1991, KIM *et al.*, 1994, SHAY *et al.*, 1997). Recentes pesquisas demonstraram que ocorre uma perda maior de pares de base (pb) nas regiões teloméricas, tanto em fibroblastos como em sangue periférico, em experimentos *in vitro* do que *in vivo* (IWAMA *et al.*, 1997).

Este encurtamento ocorre devido à perda do DNA telomérico durante cada divisão celular pela incapacidade da DNA polimerase de replicar totalmente a fita de DNA na nova porção 5´da extremidade do cromossomo linear (SEOL *et al.*, 1998).

Esse encurtamento progressivo provoca erosão no telômero que como consequência exerce pressão seletiva para a ativação de uma ribonucleoproteína chamada Telomerase, que adiciona novas repetições teloméricas nas extremidades cromossômicas. Tal processo é normalmente ativado, em vertebrados, somente em linhagens germinativas e em embriões, nos estágios iniciais do desenvolvimento. Quando esse procedimento se desenvolve em células somáticas *in vitro* ou *in vivo*, as

células tornam-se imortais (COUNTER *et al.*, 1992, HEALY, 1995, OHYASHIKI *et al.*, 1997).

A redução do comprimento do telômero também ocorre em várias células tumorais humanas, embora o significado biológico desta redução ainda não seja totalmente conhecido. Porém, como a atividade da telomerase foi detectada em 85% das doenças malignas humanas primárias estudadas, existem evidências que, embora a telomerase não seja essencial para a formação inicial do tumor, a progressão e o crescimento celular, a longo prazo, são associados com a atividade da telomerase (OHYASHIKI *et al.*, 1999).

1.6. Telomerase e câncer

A enzima Telomerase é uma DNA polimerase, que pode ser classificada como uma transcriptase inversa, uma vez que seu mecanismo de ação envolve a cópia de uma fita molde de RNA em DNA. A telomerase caracteriza-se por possuir uma fita molde de RNA fazendo parte integral da enzima, sendo assim uma ribonucleoproteína (BLACKBURN, 1992).

Essa enzima tem como função a síntese de repetições teloméricas (fita rica em Guanina) na porção final 3' da fita do DNA de cada espécie, estabilizando e alongando as extremidades teloméricas nos cromossomos (HOHAUS *et al.*, 1997).

Recentes estudos confirmaram que a ação da telomerase é reprimida em células somáticas normais, sugerindo que a progressão maligna de

neoplasias pode depender da ativação da telomerase.(KIM *et al.*, 1994, IWAMA *et al.*, 1997).

Muitos autores relatam a presença da atividade de telomerase em células de neoplasias hematológicas, inclusive fazendo distinção da expressão dessa atividade, relacionando-a com as fases do desenvolvimento e progressão da doença (NILSSON *et al.*, 1994, ZHANG *et al.*, 1996, OHYASHIKI & OHYASHIKI, 1997, HOHAUS *et al.*, 1997, XU *et al.*, 1998, OHYASHIKI *et al.*, 1999, DALLA TORRE, 1999).

A atividade de telomerase em tecidos tumorais humanos, foi primeiramente demonstrada em carcinoma ovariano metastático, com telômeros encurtados estabilizados. Uma grande variedade de tumores, tem mostrado encurtamento de telômeros, apesar de se detectadar a atividade de telomerase (SEOL *et al.*, 1998).

Os telômeros das células tumorais são pequenos, já que as células só sintetizam a telomerase após a perda do controle da divisão celular. Antes da perda do controle, o comprimento dos telômeros vai diminuindo a cada ciclo celular. Quando a telomerase é, então, finalmente ativada, ocorre a estabilização telomérica permitindo a proliferação celular, e assim, tornando as células imortalizadas. Essa hipótese de ativação da telomerase, infere que a enzima é produzida rotineiramente pelas células da linhagem germinativa e em desenvolvimento embrionário. Após a formação do organismo, a telomerase é reprimida na maioria das células somáticas e os telômeros iniciam o processo de encurtamento a cada divisão celular (GREIDER & BLACKBURN, 1996).

Tem-se demonstrado que células de sangue periférico e muitas células tronco do tecido hematopoiético possuem atividade de telomerase, para prevenir o encurtamento progressivo dos telômeros que resultariam em morte celular (HIYAMA *et al.*, 1995, BROCCOLI *et al.*, 1995, OHYASHIKI & OHYASHIKI, 1997). Apesar disso, ENGELHARDT *et al.* (1997) sugerem que a atividade de telomerase em células hematopoiéticas reduz, mas não impede completamente, o encurtamento telomérico na proliferação celular.

Assim, estas observações sugerem que o encurtamento dos telômeros e o aumento da atividade da telomerase, podem ser necessários para que as células neoplásicas sofram evolução clonal para fenótipos mais malignizados em estágios avançados da doença (TATEMATSU *et al.*, 1996). Uma vez que a perda telomérica e a ativação da telomerase estão envolvidas nos processos de envelhecimento e imortalização celular e que estes eventos contribuem para o desenvolvimento de processos neoplásicos, as investigações sobre a inibição da telomerase poderão tornar-se um novo alvo para o tratamento dessas doenças (KIM *et al.*, 1994, COUNTER *et al.*, 1995, HARLEY & VILLEPONTEAU, 1995).

1.7. Associações Teloméricas (*tas*)

Segundo OHYASHIKI *et al.* (1994b) e OHYASHIKI & OHYASHIKI, (1997) a redução do comprimento do telômero, também pode induzir a formação de associações teloméricas, refletindo-se em instabilidade cromossômica.

Associações teloméricas (*tas*), segundo THERMAN & SUSMAN (1996), são associações reversíveis ou mais ou menos estáveis entre as partes terminais dos cromossomos (telômeros).

Normalmente, as regiões terminais intactas dos cromossomos não possuem a tendência de associação com outras regiões ou com as extremidades de outros cromossomos, porque essas são “protegidas” por estruturas denominadas de telômeros. Em casos raros, os cromossomos humanos, são encontrados ligando-se pela associação das extremidades normais de dois cromossomos, para formarem um cromossomo composto parecido com um dicêntrico (MORGAN *et al*, 1986).

De acordo com THERMAN & SUSMAN, (1996) foi Dutrillaux e colaboradores, em 1977, que descreveram um interessante fenômeno de associações teloméricas múltiplas na Síndrome de Thiberge-Weissenbach. Nos portadores desta síndrome, eles demonstraram que as extremidades cromossômicas tem a tendência de unirem-se entre si, originando a formação de correntes e anéis, que muitas vezes afetam todos os cromossomos. Não se achou nenhum fragmento acêntrico que indicasse que este fenômeno poderia ser devido a translocações não-recíprocas. Estas associações foram descritas em baixíssima porcentagem. Tem-se descrito uniões terminais similares, mais ou menos estáveis, em linhagens celulares de mamíferos e em várias enfermidades malignas (FITZGERALD & MORRIS, 1984; MANDHAL *et al.*, 1988; HASTIE & ALLSHIRE, 1989; ABRUZZO *et al*, 1991).

Associações teloméricas já foram descritas em cromossomos de células de mieloma de camundongos e também foram observadas entre

cromossomos normais com organizadores nucleolares localizados terminalmente (PATHAK *et al.*, 1982; PATHAK *et al.*, 1988). Embora sejam considerados fenômenos raros, as associações teloméricas ou terminais de cromossomos humanos foram observadas em linfócitos anormais de pacientes com ataxia talangiectasia, em culturas de fibroblastos e de células renais de origem normal, mas subsequente infectadas pelo vírus SV40, em fibroblastos heteroplóides ou senescentes, em mixomas cardíacos, em tumores de células renais, em casos isolados de leucemia prolinfocítica de células B e de histiocitoma maligno, em gliomas, carcinomas de ovário e neoplasias mesenquimais (FITZGERALD & MORRIS, 1984, RAIMONDI *et al.*, 1987, MANDHAL *et al.*, 1985; DEWALD *et al.*, 1987; KOVACS *et al.*, 1987, PATHAK *et al.*, 1988; HOWELL *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1996).

As *tas* são consideradas como uma origem potencial de novas combinações citogenéticas, que podem ter um papel na etiologia dos tumores ou podem conferir uma vantagem de crescimento seletivo nas células tumorais; um papel similar às translocações cromossômicas, muitas das quais estão fortemente implicadas na transposição de oncogenes (ROWLEY, 1983; YUNIS, 1983, FITZGERALD & MORRIS, 1984).

A ocorrência de associação telomérica ou de configuração em anel com mínima ou nenhuma perda de DNA, pode ser explicada pela estrutura singular dos telômeros. Os telômeros dos cromossomos eucarióticos contém seqüências de bases repetidas, onde bases homólogas podem ser responsáveis pelas associações teloméricas. HOLMQUIST & DANCIS (1979) sugeriram que, durante a divisão normal dos cromossomos, a fusão telomérica ocorreria antes da replicação e uma subsequente dissociação

seria requerida pelas terminações teloméricas livres para manter a estrutura dos cromossomos.

As *fas* observadas em cromossomos metafásicos possivelmente refletem a persistência destas replicações intermediárias, por causa das falhas nos processos de fissão, embora novas fusões não possam ser excluídas. Tais falhas podem ocorrer em células neoplásicas ou infectadas por vírus e também em células leucêmicas (PATHAK *et al.*, 1988).

1.8. Justificativa do trabalho

Por ser essencialmente um polo agrícola com extensas plantações de trigo e soja, na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, é freqüente o uso de defensivos agrícolas no controle de pragas que atacam as lavouras, o que resulta na exposição dos agricultores a esses produtos, uma vez que a grande maioria dos mesmos não utiliza os meios de proteção adequados.

Dentre os pacientes com neoplasias hematológicas, atendidos no hospital regional, observa-se que grande parte destes são provenientes da zona rural (agricultores ou ex-agricultores), que trabalham direta ou indiretamente com agroquímicos. PASQUALETTI *et al.*(1991), comentam que a hipótese mais plausível para a observação de que fazendeiros ou agricultores possuam um alto risco para desenvolverem doenças hematológicas é a que eles estariam expostos a diversos carcinógenos ocupacionais, como fertilizantes ou pesticidas, assim como carcinógenos usados no combate a zoonoses.

Na literatura especializada, vários autores salientam a existência de uma associação entre leucemias agudas e exposição à pesticidas, conduzindo a hipótese de que pesticidas são agentes leucemogênicos, influenciando na terapia e na avaliação prognóstica (ROWLEY, 1980, 1982, 1985; MITELMAN *et al.*, 1981; GOLOMB *et al.*, 1982; FAGIOLI *et al.*, 1992 e RICHARDSON *et al.*, 1992). Em relação às síndromes mielodisplásicas (SMD), associações semelhantes foram relatadas por GOLDBERG *et al.* (1990) e VINEIS *et al.* (1990) que constataram que pacientes expostos a pesticidas e outros agentes genotóxicos enquadravam-se mais freqüentemente nos grupos de pior prognóstico quando comparados àqueles sem história de exposição, e freqüentemente evoluíam para leucemias.

Assim sendo, as associações entre alterações cromossômicas específicas e tipos diferentes de doenças hematológicas já são conhecidas e estão bem estabelecidas, independente de os pacientes serem ou não expostos a defensivos agrícolas.

Com relação às associações teloméricas dos cromossomos, trata-se de um fenômeno ainda pouco compreendido que vêm recebendo maior atenção nos últimos anos. Tais associações aparentemente casuais de extremidades cromossômicas, vêm sendo relatadas, de maneira ainda esporádica, em doenças hematológicas humanas (TEMPERANI *et al.*, 1995), desconhecendo-se o seu potencial como indicador biológico de exposição a agentes genotóxicos do meio ambiente.

II. OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivos :

- (a) verificar se o fenômeno de associações teloméricas (*tas*) ocorre também em leucemias mielóides e SMD,
- (b) verificar se o fenômeno de *tas* constitui um padrão não específico de alteração citogenética,
- (c) verificar se existe relação com a ocorrência de *tas* e a exposição à defensivos agrícolas e
- (d) comparar os dados obtidos com a literatura especializada para verificar se as *tas* refletem uma indicação de instabilidade cromossômica em portadores de leucemias mielóides e síndromes mielodisplásicas.

III. CASUÍSTICA

Os pacientes foram selecionados dentre aqueles atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário São Vicente de Paulo(HSVP) e as amostras de medula óssea foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Genética da mesma instituição, bem como ao Laboratório de Citogenética Humana da Universidade de Passo Fundo. O estudo cromossômico foi realizado nas amostras de medula óssea de pacientes com leucemia mielóide crônica, leucemia mielóide aguda ou de síndrome mielodisplásica, antes do início do tratamento quimioterápico. Os diagnósticos clínicos-hematológicos desses pacientes foram estabelecidos pelos médicos hematologistas do HSVP, que, no entanto não informaram a classificação FAB dos subtipos de LMA e de SMD.

Foram estudados amostras de 30 pacientes. Destas amostras, 13 foram provenientes do Laboratório de Patologia e Genética do HSVP e 17 do Laboratório de Citogenética Humana do ICB-UPF. As preparações cromossômicas dos casos 2, 3, 4, 5,6, 7, 8, 9, 12, 15, 16, 22 e 27 foram realizadas pela Bióloga Anita Moro, no Laboratório de Patologia e Genética do HSVP, enquanto as preparações cromossômicas dos casos 1, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29 e 30 foram realizadas no Laboratório de Citogenética Humana da UPF pelo autor.

A Tabela V apresenta a discriminação dos pacientes de acordo com o sexo, idade, origem, profissão e diagnóstico hematológico.

Tabela V: Distribuição dos pacientes quanto ao sexo, idade, origem, profissão e diagnóstico hematológico.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Origem	Profissão	Doença hematológica
1	M	68	Rural	Agricultor	SMD
2	M	07	Rural	Estudante	SMD
3	M	28	Rural	Frentista	SMD
4	F	60	Urbana	Do Lar	SMD
5	F	57	Rural	Agricultor	SMD
6	F	44	Urbana	Médico	SMD
7	F	43	Rural	Agricultor	SMD
8	M	74	Rural	Ex-agricultor	SMD
9	F	38	Rural	Agricultor	SMD
10	F	29	Rural	Agricultor	SMD
11	M	10	Urbana	Estudante	LMA
12	M	86	Rural	Ex-agricultor	LMA
13	F	37	Rural	Agricultor	LMA
14	M	62	Rural	Agricultor	LMA
15	M	54	Urbana	Do Lar	LMA
16	M	54	Rural	Ex-agricultor	LMA
17	M	79	Rural	Ex-agricultor	LMA
18	F	51	Urbana	Do Lar	LMA
19	F	60	Rural	Agricultor	LMA
20	M	51	Rural	Ex-agricultor	LMA
21	M	72	Rural	Ex-agricultor	LMC
22	M	51	Rural	Agricultor	LMC
23	M	47	Rural	Agricultor	LMC
24	F	62	Rural	Agricultor	LMC
25	M	60	Rural	Agricultor	LMC
26	M	44	Urbana	Torneiro Mecânico	LMC
27	M	51	Rural	Agricultor	LMC
28	F	55	Rural	Agricultor	LMC
29	M	17	Urbana	Auxiliar de Indústria	LMC
30	F	49	Urbana	Do Lar	LMC

M: masculino **F:** feminino
LMA: Leucemia Mielóide Aguda **SMD:** Síndrome Mielodisplásica;
LMC: Leucemia Mielóide Crônica

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Metodologia

O material utilizado para a análise cromossômica foi aspirado de medula óssea (3 a 5 mL). Para a obtenção de metáfases utilizou-se a técnica de obtenção de células mitóticas, segundo VERMA & BABU (1995).

4.1.1. Técnica de Obtenção de Células em Metáfase a partir de Aspirado de Medula Óssea em cultura de 24 horas

- 1) foram colocados 10 mL de cloreto de amônia no frasco contendo 5 mL de aspirado medular (coletado pelo médico e colocado em um frasco contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 sem soro fetal bovino e transportado até o laboratório) e este ficou por 2 a 3 horas em temperatura ambiente.
- 2) centrifugou-se por 10 minutos a 1200 r.p.m., e retirou-se o sobrenadante.
- 3) o precipitado foi colhido e distribuído em 2 ou 3 tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640, mais 0.8 mL de L-glutamina.
- 4) centrifugou-se por 10 minutos a 1200 r.p.m. e retirou-se o sobrenadante. Esse processo foi repetido por 2 a 3 vezes.
- 5) após centrifugar e retirar o sobrenadante, o precipitado foi distribuído em garrafas de cultura contendo 8 mL de meio de cultura RPMI 1640 e 2 mL de soro fetal bovino.
- 6) o material foi incubado em estufa a 37°C por 24 horas.
- 7) 30 minutos antes de completar o período de incubação foi acrescentado ao meio 0,05 mL de Colquicina para inibir a continuidade do ciclo celular.

8) ao fim do tempo de incubação, centrifugou-se por 10 minutos a 1200 r.p.m. e retirou-se o sobrenadante.

9) foi acrescentado ao meio, 5 mL de cloreto de potássio (KCl) 0,075M e aquecido em banho histológico a 37°C por 30 minutos para realizar a hipotonia das células.

10) de 5 em 5 minutos agitou-se para homogeneizar o meio.

11) ao fim dos 30 minutos foi acrescentado 0,5 mL de fixador 3:1 (metanol : ácido acético) para interromper a hipotonia. Agitou-se o material e o mesmo ficou descansando por 5 minutos.

12) após, centrifugou-se por 10 minutos a 1200 r.p.m. e retirou-se o sobrenadante.

13) acrescentou-se 5 mL de fixador 3:1 (metanol : ácido acético), agitou-se e centrifugou-se por 10 minutos a 1200 r.p.m. e depois foi retirado o sobrenadante. Esse processo foi repetido por 3 a 4 vezes até o material ficar bem "limpo".

4.2. Análise Cromossômica

A análise cromossômica foi realizada por intermédio da técnica de obtenção de bandas G (segundo SANCHEZ *et al.*, 1973).

4.2.1. Técnica de Obtenção de Bandas G

1) foram utilizadas lâminas, previamente lavadas (imersas em sabão por 45 minutos, esfregadas uma a uma; lavadas em água corrente; imersas em solução de ácido nítrico a 10% por 1 hora, lavadas em água deionizada por 10 vezes e imersas em álcool 95%).

- 2) lavou-se em álcool/éter (1:1), secou-se e as mesmas foram levadas ao congelador.
- 3) gotejou-se 3 a 4 gotas do material na lâmina, assoprando cuidadosamente para espalhar mais o material sobre a superfície da lâmina e fixou-se o material com calor.
- 4) as lâminas foram deixadas envelhecendo por 24 horas.
- 5) após as o período de envelhecimento, colocou-se as lâminas em tampão PBS por 1 hora e então as mesmas foram coradas com corante Giemsa segundo Wright (3% de tampão PBS e 1% de corante) por 3 a 5 minutos.
- 6) lavou-se as lâminas e deixou-se secar ao ar ou em estufa a 37° C.

4.2.2. Critérios Utilizados para a Classificação e Análise dos Resultados

As alterações cromossômicas encontradas nas amostras foram descritas segundo as normas estabelecidas pelo Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN, 1995).

As alterações cromossômicas foram analisadas de acordo com os critérios adotados pelo “ First International Workshop on Chromosomes in Leukemia “ (JOTTERAND & PARLIER, 1996), que considera que uma anomalia cromossômica é de natureza clonal sempre que a mesma trissomia ou rearranjo estrutural estiver presente em pelo menos duas metáfases e quando a mesma monossomia for observada em pelo menos 3 células.

Foram consideradas *fas* todas as associações envolvendo as extremidades teloméricas de uma ou ambas as cromátides de um ou mais cromossomos (Fig. 1). Foram excluídas dessa categoria as associações observadas entre os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos dos grupos D e G, por serem estas últimas decorrentes de associações de regiões organizadoras do nucléolo (NOR).

Para a determinação do laudo citogenético, foram analisadas entre 30 e 50 células, enquanto que para a determinação da frequência de metáfases diplóides com *fas* foram revistas e/ou analisadas de 20 a 80 metáfases. Embora fosse ideal analisar no mínimo 50 metáfases para cada caso, isso não foi possível para todos os pacientes, tendo em vista a dificuldade de se obter um grande número de células em divisão e com boa qualidade, devido as características do material.

A documentação das metáfases foi realizada em fotovideomicroscópio Olympus BX 50, empregando-se filme Kodak TMAX (100 ISO). As ampliações foram feitas em papel fotográfico Kodabromide Print RCF3, da Kodak.

Para a análise estatística da frequência de *fas* nos diferentes grupos de neoplasias hematológicas foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, adotado o nível de significância de 5%.

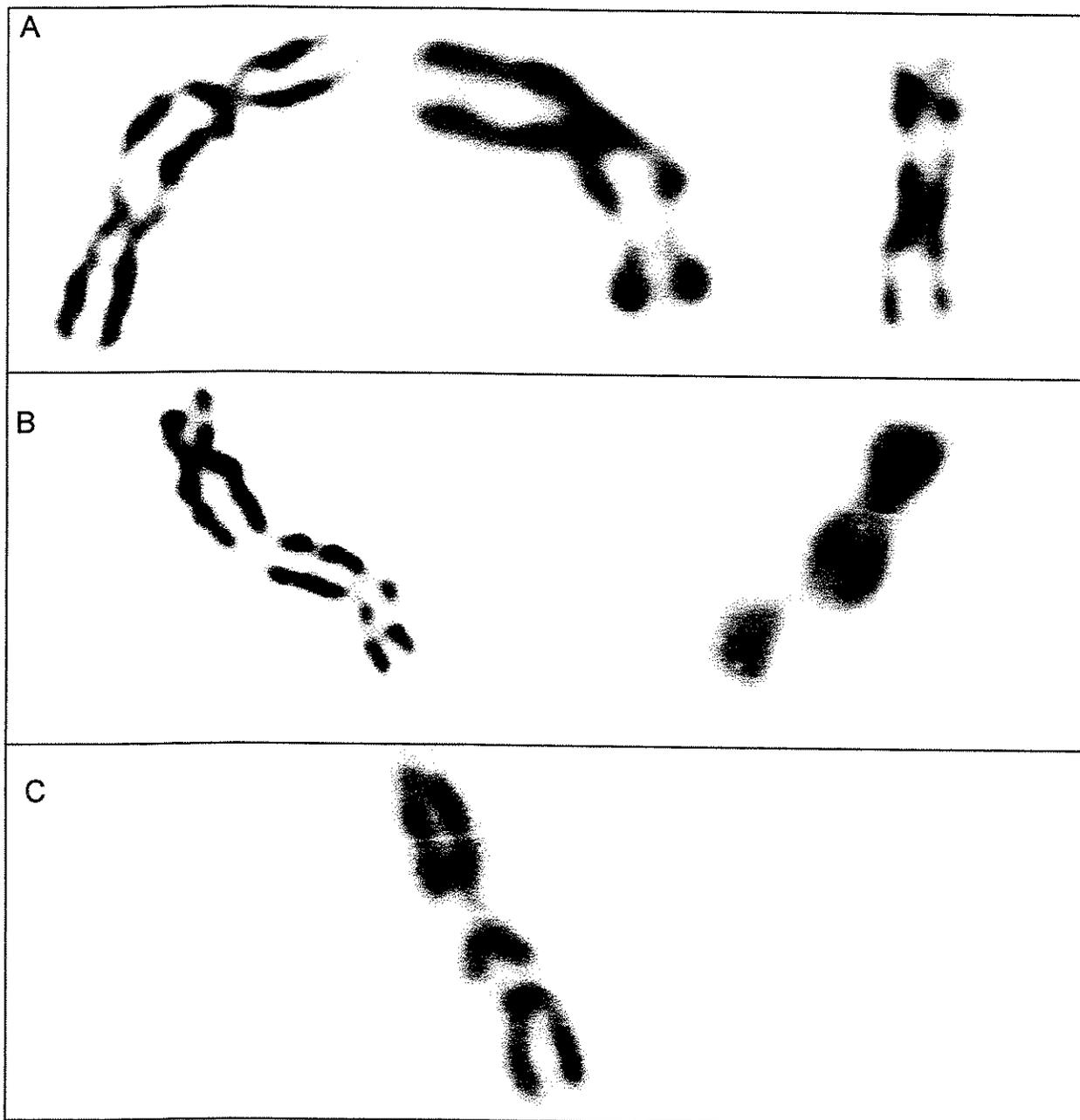


Figura 1. Critérios de classificação das associações teloméricas. **A** – Associações teloméricas envolvendo as duas cromátides dos cromossomos. **B** – Associações teloméricas envolvendo apenas uma cromátide de cada cromossomo. **C** – Associações teloméricas envolvendo mais de um cromossomo.

V. RESULTADOS

A análise dos cariótipos se deu em dois momentos. O primeiro, quando as amostras foram encaminhadas aos laboratórios, para o exame citogenético de rotina e o segundo, quando buscou-se avaliar a presença de *fas* no mesmo material.

Os resultados do exame de cariótipo (laudo citogenético inicial) foram estabelecidos em colaboração com o Laboratório de Patologia e Genética do Hospital Universitário São Vicente de Paulo de Passo Fundo - RS, e as anomalias encontradas na segunda análise encontram-se apresentados na Tabela VI. Nesta tabela, pode-se visualizar as alterações cromossômicas encontradas, cujos resultados mostram um predomínio de alterações numéricas, tais como poliploidias, hipo e hiperdiploidias, monossomias e trissomias, além de , em muitos casos, de uma linhagem normal. As alterações estruturais estáveis, como deleções (“del”), translocações (“t”) , adições (“add”) e cromossomos marcadores (“mar”), foram observadas em 13 pacientes, associadas ou não à aberrações numéricas acima mencionadas. Outras alterações, tais como quebras cromatídicas (“chtb”) e separação precoce de centrômeros (“pcd”), foram esporadicamente observadas.

Tabela VI: Cariótipos dos pacientes com SMD, LMA e LMC

Paciente	Laudo citogenético inicial	Alterações adicionais observadas na segunda análise	N Total
1**	46, XY[26]/ hipodiplóides[3], / hiperdiplóides[3]	44, XY, -2,-3, chtb(10q), chtb(16q)[1]	33
2*	43, XY,-7,-13,-20[4] / 44, XY, -7, -20[3] / 45, XY,- 20[4] / 46, XY[48] / hiperdiplóides[1]	46, XY, chtb(5q), chtb(8p), chtb(18q)[1]	61
3*	45, XY, -20[1] / 46, XY[21] / Hipodiplóides [5]	Ausentes	27
4*	46, XX[15] / 46, XX, del(7)(p?)[1] / 47, XX, +21[4] / 48, XX, +22, +22[2]	46, XX, pcd(17)[1]	39
5*	46,XX[31] / 47, XX, +5[1] / 47, XX, +15[2] / 47, XX, +19[3] / 48, XXX, +19[1]	46, XX, add(2)(q37), add(4)(q35), t(9;12)(p11;p13)[1] / 46, XX, add(2)(q37), add(4)(q35)[1]	42
6*	46, XX[30]	Triplóides[5]	35
7*	46, XX [25] / 47, XX, -9, +21, +mar[3] / hipodiplóides[2]	Ausentes	30
8*	46, XY, -16, +11 [1] / 46, XX, del(7)(p?)[2] / 46, XX, t(7;12)(p22;q24)[2] / 46, XX[13]	Ausentes	18
9**	46, XX[30]	Ausentes	30

Tabela VI: Continuação

Paciente	Laudo citogenético inicial	Alterações adicionais observadas na segunda análise	N Total
10**	46, XX [29]	Ausentes	29
11**	46, XY [32]	Ausentes	32
12*	46, XY[34]	Ausentes	34
13**	44, XX, -1, -22[5] / 46, XX[28] / 46, XX, +14, -22[1] / 47, XX, +14[3]	Hipertetraploidia(>100 cromossomos) [12]	49
14**	44, XY, -7, -18, -21, +19[8] / 46, XY[34]	Ausentes	42
15*	46, XX, del(7)(q?),del(11)(q?)[4] / 46, X, del(X)(q?), del(7)(q?)[2] / 46, XX[10]	Ausentes	16
16*	45, XY, -7 [3]/ 46, XY[30]	Hipotriploidia[2]	32
17*	46, XX[10]	Hipodiploidia (38-45 cromossomos)[14] / Hipertriploides (>76 cromossomos)[7]	31
18**	46, XX[62]	Ausentes	62
19**	46, XX[18] / 46, XX, der(22)t(9;22)[2]	Hipodiploidia[20] / Hiperdiploidia[1]	41
20**	46, XY[28]	Hipodiploidia(39 – 44 cromossomos)[16] / Hiperdiploidia [1] / Poliploidia[1]	46
21**	46, XY[13] / Hipodiploides[12] / Hiperdiploides[5]	Ausentes	30

Tabela VI: Continuação

Paciente	Laudo citogenético inicial	Alterações adicionais observadas na segunda análise	N Total
22*	46, XY[14] / 46, XY, der(22)t(9;22)[12]	45, XY, +7, -8, -12, add(3p)[1]	27
23**	46, XY[30]	Ausentes	30
24**	46, XX[27] / 46, XX, der(22)t(9;22)[5]	Ausentes	32
25**	46, XY[21] / 46, XY, der(22)t(9;22)[16]	Ausentes	37
26**	46, XY[38] / 46, XY, der(22)t(9;22)[6]	Ausentes	44
27*	45, X, -Y[5] / 46, XY[9] / 46, XY, der(22)t(9;22)[9] / 47, XY, der(22)(9;22), + der(22)t(9;22)[2]	Hiperdiploidias[5]	30
28**	46, XX[26] / 46, XX, der(22)(9;22)[6]	Ausentes	32
29**	46, XY[16] / 46, XY, der(22)(9;22)[15] / 46, XY, -21, +17[1] / 47, XY, +21[1] / 47, XY, +21, der(22)(9;22)[1]	Ausentes	34
30**	46, XX[15] / 46, XX, der(22)(9;22)[4] / 47, XX, der(22)t(9;22), +der(22)(9;22)[3]	Hipodiploidia (42- 45 cromossomos)[15] / Hiperdiploidias (48- 66 cromossomos)[17] / Poliploidia[11]	65

* Resultado do exame de cariótipo fornecido pelo Laboratório de Patologia e Genética do HSVP / Passo Fundo - RS.

** Resultado do exame de cariótipo obtido no Laboratório de Citogenética Humana da Universidade de Passo Fundo (UPF) / Passo Fundo – RS.

5.1. Análise cromossômica e freqüência de *tas* nas amostras provenientes de pacientes com Síndromes Mielodisplásicas

Na definição do laudo citogenético dos casos de SMD (Tabela VI), verificou-se que 8 pacientes (casos 1 a 8) mostraram alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais e apenas 2 pacientes mostraram cariótipo normal (casos 9 e 10).

Na segunda análise, quando aumentou-se o número de metáfases examinadas, em todos os casos de SMD observou-se a presença de um número significativo de metáfases com *tas*. A Tabela VII demonstra o número de células diplóides analisadas para *tas*, e a freqüência de metáfases diplóides onde esse fenômeno foi observado. Na Tabela VIII, pode-se visualizar a descrição detalhada dessas metáfases.

Em relação aos fenômenos das associações teloméricas, todos os cromossomos acharam-se representados nas metáfases dos pacientes com SMD, mas alguns estiveram mais freqüentemente envolvidos tais como o cromossomo 20 (17,1%), o cromossomo 17 (15,9%) e o cromossomo 21 (12,5%). Já os cromossomos 10, 13 e Y tiveram um menor envolvimento nestes fenômenos, exibindo freqüências de 3,5% ; 3,5 % e de 1,2 % respectivamente.

Na análise citogenética global desses pacientes, as alterações cromossômicas consideradas como marcadoras (específicas e/ou características de uma determinada doença) foram encontradas em apenas 1 paciente (caso 2), que exibia monossomia do cromossomo 7 em 11,6% das metáfases examinadas, associada à monossomia dos cromossomos

13 e 20. Outras alterações numéricas de natureza clonal foram detectadas em 3 pacientes , consistindo em : trissomia do cromossomo 21 e tetrassomia do cromossomo 22 (caso 4), trissomia dos cromossomos 15 e 19 (caso 5), monossomia do cromossomo 9, trissomia do 21 e cromossomo marcador (caso 7). Também foram observados novos rearranjos estruturais envolvendo as regiões 2q37, 4q35, 9p11 e 12p13 (caso 5 – Fig. 2) e as regiões 7p22 e 12q24 (caso 8).

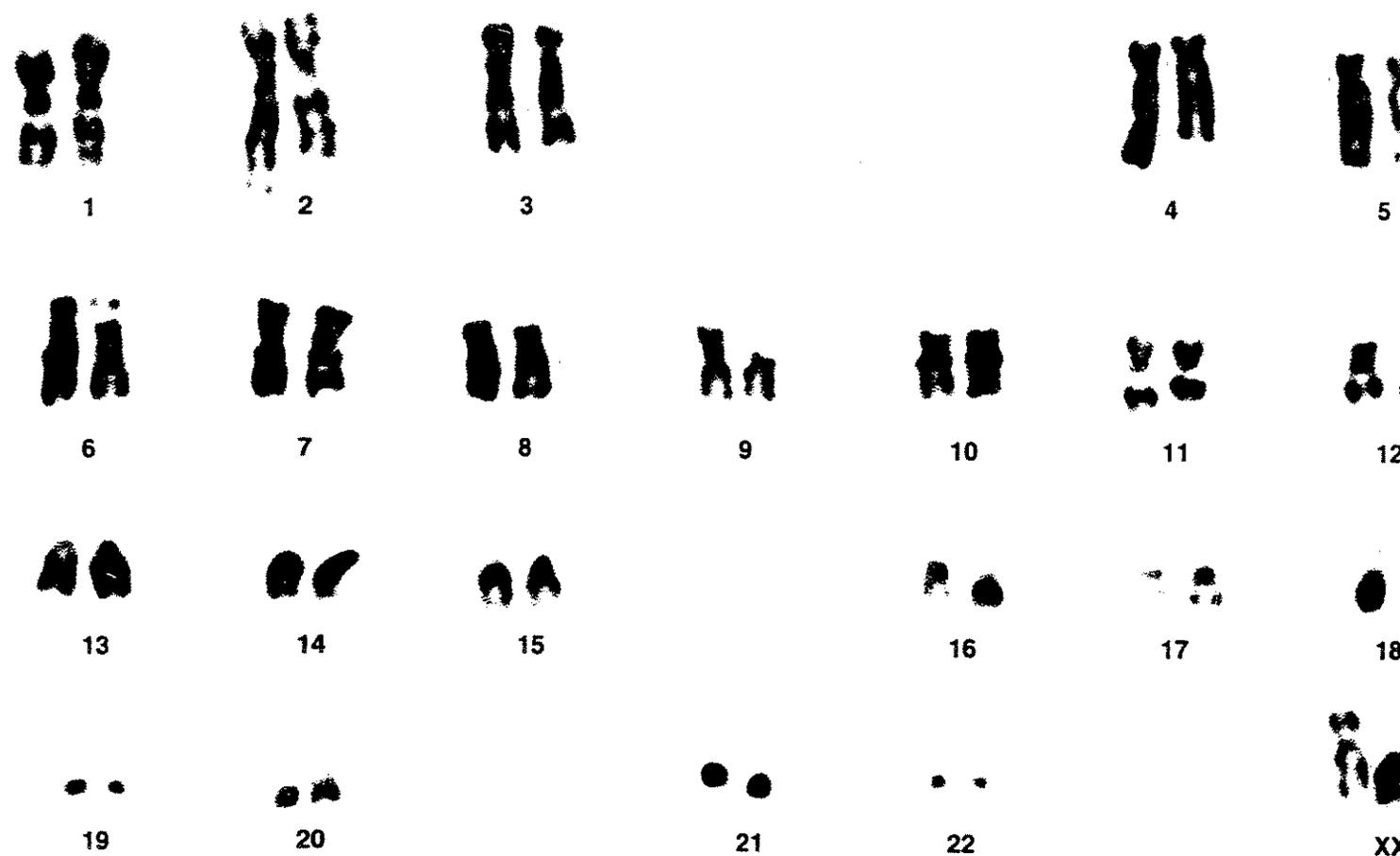


Fig 2 – Metáfase 46,XX, add(2)(q37), add(4)(q35), t(9;12)(p11;p13) do paciente 5 (SMD)

Tabela VII: Número de células analisadas e frequência de *tas* em pacientes com SMD

Paciente	Idade (anos)	Nº de Células diplóides analisadas	Nº de Células com <i>tas</i>	Frequência das <i>tas</i> (%)
1	68	38	3	7,89
2	07	63	14	22,22
3	28	35	9	25,71
4	60	31	4	12,9
5	57	43	5	11,63
6	44	38	9	23,68
7	43	40	6	15
8	74	27	4	14,8
9	38	37	5	13,51
10	29	35	3	8,57

Tabela VIII: Descrição das metáfases com *tas* em pacientes com SMD

Paciente	Cariótipo das Metáfases com <i>tas</i>
1	- 43, X, -16, -22, -Y, <i>tas</i> (7;7)(p22;p22), <i>tas</i> (8;19)(p23;p13), <i>tas</i> (8;13)(p23;q34) - 45, XY, -14, <i>tas</i> (4;5)(p16;p15), <i>tas</i> (17;19)(p13;p13), <i>chtb</i> (4q) - 46, XY, <i>tas</i> (16;19)(q24;p13)
2	- 46, XY, <i>tas</i> (3;7)(p26;q36), <i>tas</i> (11;8;6;20)(p15;q24p23;p25q27;q13) - 46, XY, <i>tas</i> (18;20;X)(p11;q13p13;p22), <i>tas</i> (9;21)(q34;q22), <i>chtb</i> (18q) - 46, XY, -11, -12, -13, -16, + (?;12), +mar1, +mar2, <i>tas</i> (10;17)(p14;p12) - 46, XY, <i>tas</i> (3;4)(p26;q35), <i>chtb</i> (9q), <i>chtb</i> (10q) - 46, XY, <i>tas</i> (5;9)(p15;q34), <i>tas</i> (14;17)(p13;p13) - 44, X, -21, -Y, , <i>tas</i> (15;17)(p13;q25) - 46, XY, <i>tas</i> (X;12)(q28;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (2;5)(p25;p15) - 45, X, -Y, <i>tas</i> (17;17)(p13;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (1;18)(q44;p11) - 46, XY, <i>tas</i> (20;Y)(p13;p11) - 46, XY, <i>tas</i> (4;9)(q35;q34) - 46, XY, <i>tas</i> (3;8)(p26;q24), <i>chtb</i> (14p) - 46, XY, <i>tas</i> (20;20)(q13;p13), <i>tas</i> (9;11)(q34;p15)
3	- 42, XY, -6, -8, -11, -16, <i>tas</i> (1;9)(p36;q34), <i>tas</i> (4;16)(p16;q24), <i>tas</i> (4, X, 17) (p16;p22;p13), <i>tas</i> (12;22)(p13;p13), <i>tas</i> (12;15)(q23;p13), <i>tas</i> (15;20)(q26;p13) - 45, X, -Y, <i>tas</i> (11;21)(p15;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (4;18)(p16;q23) - 46, XY, <i>tas</i> (5;19)(p15;q13) - 44, X, -Y, -15, <i>tas</i> (7;21)(q36;q22) - 46, XY, <i>tas</i> (7;22)(q36;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (4;17)(p16;p13), <i>tas</i> (16;20)(p13;q13), <i>tas</i> (9;10)(p24;p15) - 46, XY, <i>tas</i> (5;16)(p15;q13), <i>tas</i> (4;9)(p16;q34) - 46, XY, <i>tas</i> (11;22)(p15;p13)
4	- 46, XX, <i>tas</i> (Cp;Cp), <i>tas</i> (Cp;Ep) - 46, XX, <i>tas</i> (1;2)(q44;p25) - 46, XX, <i>tas</i> (11;20)(q25;p13) - 46, XX, -4, -15, +22, +22, <i>tas</i> (20;5;22)(q13;p15;q13)
5	- 43, X, -X, -7, -15, <i>tas</i> (2;3)(q37;q29), <i>tas</i> (13;14)(q34;q32) - 46, XX, <i>tas</i> (X;14)(p22;q32) - 44, X, -7, - X, <i>tas</i> (14;21)(q32;p13) - 46, XX, <i>tas</i> (X;17)(p22;p13) - 46, XX, <i>tas</i> (2;21)(q37;p13)

Tabela VIII: Continuação

Paciente	Cariótipo das Metáfases com tas
6	<ul style="list-style-type: none"> - 45, XX, -8, del(5)(p13), tas(6;X)(p25;p22), tas(9;15)(p24;q26), tas(11;19)(q25;p13), tas(12;18)(p13;q23), tas(14;17)(p13;p13), tas(17;21)(p13;q22) - 45, X, -X, del(5)(p13), del(10)(q24), tas(17;17)(p13;q13) - 46, XX, tas(16;20)(q24;q13), tas(21;22)(p13;q13) - 46, XX, tas(3;20)(q29;q13) - 46, XX, tas(2;15)(q37;p13) - 46, XX, tas(9;20)(q34;p13) - 46, XX, tas(18;20)(q23;q13) - 46, XX, tas(15;21)(q26;q22) - 46, XX, tas(6;20)(q27;p13)
7	<ul style="list-style-type: none"> - 46, XX, -16, +18, tas(15;7;9)(p13;q36p22; p24), tas(11;21)(q24;q22), min - 46, XX, i(17p), tas(14;16;22)(p13;q24p13;q13) - 45, XX, -3, tas(C?;1)(p?;p36), tas(C?;2)(q?;p25) - 46, XX, tas(14;16)(p13;p13) - 46, XX, tas(11;22)(p15;p13) - 46, XX, tas(5;18;12;16)(q35;p11;p13;p13)
8	<ul style="list-style-type: none"> - 46, XY, -12, +mar, tas(20;22)(p13;q13) - 46, XY, tas(6;21)(p25;p13), pcd em vários cromossomos - 46, XY, tas(7;C)(q36, ?), tas(10;X)(p15;p22) - 46, XY, tas(5;18)(q35;p11)
9	<ul style="list-style-type: none"> - 46, XX, del(4)(q?→qter), tas(13;18)(p13;p11) - 46, XX, tas(Cp;Dp) - 46, XX, tas(3;14)(p26;q32) - 46, XX, tas(9;15)(p24;p13) - 46, XX, tas(15;18)(p13;q23)
10	<ul style="list-style-type: none"> - 46, XX, tas(21;19)(p13;q13) - 46, XX, tas(8;13)(p23;p13), - 44, XX, -21, -22, tas(12;17)(q24;p13)

5.2. Análise cromossômica e frequência de *tas* nas amostras provenientes de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda

Na definição do laudo citogenético dos casos de LMA (Tabela VI) verificou-se que 7 pacientes (casos 13 a 17, 19 e 20) mostraram alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais e somente 3 pacientes apresentaram cariótipo normal (casos 11, 12 e 18)

Na segunda análise, somente os casos 12 e 18 não apresentaram alterações cromossômicas numéricas. Contudo, todos os casos de LMA apresentaram *tas* (ver Tabela IX) ainda que em frequência inferior às observadas em pacientes com SMD.

Na Tabela X estão descritas as metáfases que apresentaram *tas* nesse grupo de pacientes. Foram encontradas associações teloméricas envolvendo quase todos os cromossomos, com exceção dos cromossomos 15 e Y. Os cromossomos que estiveram envolvidos com maior frequência foram os cromossomos 12 e 21 (16,3% cada um).

Nos resultados globais das duas análises, as alterações cromossômicas de natureza clonal foram encontradas em 5 pacientes. Os achados relativos a esses pacientes foram : a trissomia do cromossomo 14 e as monossomias dos cromossomos 1 e 22 (caso 13), a monossomia do cromossomo 7 (casos 14 e 16), a deleção do braço longo do cromossomo 7 (caso 15) e a presença de cromossomo Philadelphia (caso 19).

Tabela IX: Número de células analisadas e frequência de *fas* em pacientes com LMA

Paciente	Idade (anos)	Nº de Células diplóides analisadas	Nº de Células com <i>fas</i>	Frequência das <i>fas</i> (%)
11	10	28	3	10,71
12	86	18	3	16,7
13	37	38	5	13,15
14	62	42	1	2,38
15	54	45	8	17,8
16	54	29	1	3,4
17	79	43	3	6,98
18	51	48	1	2,08
19	60	38	3	7,89
20	51	32	2	6,25

Tabela X: Descrição das metáfases com *tas* em pacientes com LMA

Paciente	Cariótipo das Metáfases com <i>tas</i>
11	- 45, XY, -7, -9, +16, <i>tas</i> (3;13)(p26;p13), <i>tas</i> (6;12)(p25;p13) - 44, XY, -C, -C, -C, -19, +16, <i>tas</i> (3;18)(q29;q23) - 45, XY, -4, <i>tas</i> (9;10)(q34;q26)
12	- 46, XY, <i>tas</i> (4;18;5)(p16;p11;p15) - 46, XY, <i>tas</i> (16;17;19;16)(q24;p13q25;p13;q24) - 46, XY, <i>tas</i> (2;3)(q23;p26)
13	- 45, XX, -1, del(7)(q21), <i>tas</i> (2;13)(q37;p13) - 46, XX, <i>tas</i> (Cp;Cq) - 46, XX, <i>tas</i> (Bp;Ep) - 46, xx, <i>tas</i> (2;11)(q37;p15) - 46, XX, <i>tas</i> (11;14)(p15;p13)
14	- 46, XY, <i>tas</i> (3;7)(q29;p22), <i>tas</i> (12;21;18)(q24;q22;p11)
15	- 46, XX, <i>tas</i> (1;12)(q44;p13) - 46, XX, <i>tas</i> (11;12)(p15;q24) - 46, XX, <i>tas</i> (1;8)(p36;q24) - 46, XX, <i>tas</i> (11;21)(p15;q22), <i>tas</i> (12;18)(q24;p11) - 46, XX, <i>tas</i> (Cq;Cq) - 46, XX, <i>tas</i> (8;20)(p23;q13) - 46, XX, <i>tas</i> (10;21)(q26;p13) - 46, XX, <i>tas</i> (14;21)(p13;q22)
16	- 44, XY, -C, -21, <i>tas</i> (4;4;17)(p16;p16;p13)
17	- 46, XY, <i>tas</i> (13;21)(q34;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (6;22)(p25;p13), <i>tas</i> (17;18)(p13;p11) - 46, XY, <i>tas</i> (X;2;11)(p22;p25; q37;p15)
18	- 46, XX, <i>tas</i> (3;D)(q29;p?)
19	- 46, XX, <i>tas</i> (5;14)(p15;q32) - 46, XX, <i>tas</i> (7;12)(p22;q24) - 46, XX, <i>tas</i> (8;9)(q24;p24)
20	- 46, XY, <i>tas</i> (X;19)(q28;p13), <i>tas</i> (12;17)(p13;p13), <i>tas</i> (13;18)(p13;p11) - 46, XY, <i>tas</i> (4;20)(p16;q13), <i>tas</i> (16;21)(q24;p13)

5.3. Análise cromossômica e frequência de *tas* nas amostras provenientes de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

Na primeira análise para a definição do laudo citogenético dos casos de LMC (Tabela VI) verificou-se que nove pacientes (casos 21 e 22, 24 a 30) mostraram alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais e somente um paciente apresentou cariótipo normal (caso 23). Esses achados se confirmaram quando foi efetuada a segunda análise.

A presença de *tas* (Tabela XI) foi observada em 8 pacientes (casos 21,22, 24 a 28, 30), não se verificando esse fenômeno em 2 pacientes (casos 23 e 29). Na Tabela XII estão discriminadas essas metáfases. As frequências de metáfases com *tas* em pacientes com LMC foram inferiores àquelas observadas nos outros grupos.

As *tas* envolveram quase todos os cromossomos com exceção dos cromossomos 6, 10, 15 e 22 que não apareceram associados pelas regiões teloméricas a outros cromossomos em nenhum momento. Os cromossomos que mais apareceram envolvidos no fenômeno de *tas* foram os cromossomos 19 (24,2%), 4, 9 e 18 (17,2% cada um).

Os resultados globais dos estudos citogenéticos revelaram a presença do cromossomo Philadelphia, como principal alteração de natureza clonal, em 8 pacientes. Dentre esses pacientes, observou-se um segundo cromossomo Ph em dois casos (pacientes 27 e 30).

Tabela XI: Número de células analisadas e frequência de *tas* em pacientes com LMC

Paciente	Idade (anos)	Nº de Células diplóides analisadas	Nº de Células com <i>tas</i>	Frequência das <i>tas</i> (%)
21	72	60	4	6,67
22	51	35	2	5,71
23	47	34	0	0
24	62	43	1	2,32
25	60	45	1	2,22
26	44	45	2	4,44
27	51	42	4	9,52
28	55	37	1	2,7
29	17	38	0	0
30	39	39	1	2,56

Tabela XII: Descrição das metáfases com *tas* em pacientes com LMC

Paciente	Cariótipo das Metáfases com <i>tas</i>
21	- 43,XY, -16, -16, -18, <i>tas</i> (2;9)(q37;p24), <i>tas</i> (5;18)(p15;p11) - 46, XY, <i>tas</i> (1;4;9)(q44;q35;p24), <i>tas</i> (11;20)(q25;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (1;16)(p36;p13), <i>tas</i> (13;19)(q34;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (7;16)(p22;q24)
22	- 46, XY, <i>tas</i> (9;19)(p24;013), <i>tas</i> (14;17)(p11;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (5;19)(p15;q13)
23	- Não foi observada a presença de metáfases com <i>tas</i>
24	- 46, XX, <i>tas</i> (5;11)(q35;q25), <i>tas</i> (X;21)(p22;?)
25	- 46, XY, der(22)t(9;22), <i>tas</i> (4;4)(p16;q35)
26	- 46, XY, der(22)t(9;22), <i>tas</i> (2;19;9)(p25;p13q13;p24), <i>tas</i> (8;17)(p23;p13), <i>tas</i> (14;21;14)(q32;p13q22;p13) - 46, XY, <i>tas</i> (8;16)(p23;q24)
27	- 46, XY, der(22)t(9;22), <i>tas</i> (3;8;18)(p26;q24p23;q23), <i>tas</i> (13;19)(q34;p13), <i>tas</i> (20;21)(q13;p13), <i>tas</i> (21;Y)(q22;p11) - 45, XY, -3, <i>tas</i> (4;16)(p16;q24), <i>tas</i> (8;9)(p23;p24), <i>tas</i> (17;19)(p13;q13) - 46, XY, <i>tas</i> (18;18)(p11;q23) - 46, XY, <i>tas</i> (4;19)(p16;p13)
28	- 45, XX, -C, der(22)t(9;22), <i>tas</i> (D;C;12)(p?;p?q?;p13), <i>tas</i> (C;18)(q?;p11)
29	- Não foi observada a presença de metáfases com <i>tas</i>
30	46, XX, -6, + der(22)t(9;22), <i>tas</i> (3;X)(p26;p22)

5.4. Análise Estatística

A freqüência de metáfases com *fas* entre os pacientes com SMD variou de 7,89% a 25,71%. No grupo de pacientes com LMA, foram observadas freqüências que variaram de 2,08% a 16,7%, e no grupo de pacientes com LMC as freqüências variaram de 0% a 9,52%.

A comparação das freqüências de associações teloméricas entre os três grupos de neoplasias hematológicas, pelo teste de Kruskal Wallis, apresentou diferença significativa entre SMD e LMC ($p < 0.01$), enquanto que os pacientes com LMA não demonstraram diferença significativa em relação às SMD ($p > 0.05$) e às LMC ($p > 0.05$).

VI. DISCUSSÃO

É consenso geral que a ocorrência de alterações cromossômicas adquiridas, indica a existência de uma condição maligna ou pré-maligna. Conseqüentemente, a investigação de associação entre alterações cromossômicas e neoplasias hematológicas é relevante, e deve propiciar elementos para que a análise do cariótipo de células da medula óssea possa ser utilizada para monitorar e avaliar essas doenças (OLIVEIRA, 1988; HEIM & MITELMAN, 1995)

A freqüência de alterações cromossômicas em pacientes portadores de doenças hematológicas é variável, mas segundo HEIM (1990) e ZAGO & SIMÕES (1993), cerca de 80% de todos os pacientes com leucemias agudas adquirem alterações cromossômicas adicionais e pacientes com leucemia mielóide crônica apresentam em mais de 90% dos casos a presença do cromossomo Ph. Neste aspecto, nossos dados são compatíveis com os relatados na literatura, na medida em que as células com alterações cromossômicas de natureza clonal foram identificadas em 8 dentre 10 pacientes (80%) com LMC.

A incidência de anormalidades cromossômicas em SMD tem sido relatada como sendo de 32% à 72% (JOTTERAND & PARLIER, 1996). No presente trabalho, foram detectadas alterações cromossômicas de natureza clonal em 50 % dos pacientes, achado este que se situa dentro dos valores observados na literatura.

Já em relação à LMA, a incidência de aberrações cromossômicas de natureza clonal observada no presente estudo, foi de 50%, inferior à

relatada na literatura, que segundo ZAGO & SIMÕES (1993) situa-se em torno de 80-85%. Tendo em vista a grande dificuldade na obtenção de metáfases de boa qualidade, e o fato de não ter sido possível a análise deste material pela técnica de bandamento em alta resolução, é possível que rearranjos estruturais menores não tenham sido detectados nos pacientes cujo laudo citogenético foi considerado normal.

6.1. Alterações cromossômicas numéricas

6.1.1. Hipodiploidias e Hiperdiploidias de natureza clonal

Dentre as alterações numéricas de natureza clonal reconhecidamente recorrentes em SMD, destacam-se nos nossos achados a monossomia do 7 e as trissomias dos cromossomos 19 e 21. As demais alterações numéricas não acham-se tipicamente associadas a esse grupo de neoplasias hematológicas.

A monossomia do cromossomo 7 também foi o achado mais típico dentre os pacientes com LMA analisados no presente trabalho. Outras alterações numéricas de natureza clonal foram observadas nesse grupo de pacientes, entretanto, o significado dessas alterações ainda é desconhecido.

Em LMC, a nulissomia do cromossomo Y e a presença de um cromossomo Ph extra foram as únicas alterações numéricas de natureza clonal encontradas no presente estudo. Segundo uma revisão feita por CONNOR & FERGUSON-SMITH (1991), essas são consideradas alterações cromossômicas secundárias e o aparecimento destas (especialmente isocromossomo de 17q, trissomia do cromossomo 8, trissomia do cromossomo 19, nulissomia do cromossomo Y ou um

cromossomo Philadelphia extra), em LMC Ph⁺, geralmente indicam a existência de uma fase blástica aguda, podendo surgir semanas a meses antes de evidências clínicas. Assim, esses mesmos autores sugerem que estas alterações podem expressar a evidência clínica de aceleração da recaída/doença.

6.1.2. Hipodiploidias e Hiperdiploidias não-específicas

De acordo com KNUUTILA *et al.* (1976), a freqüência de células hipodiplóides em células da medula óssea de indivíduos hematologicamente normais varia de 0 a 16%. Na presente amostra, apenas dois pacientes com SMD exibiram células hipodiplóides de natureza não clonal em freqüências correspondentes a 9,1 % (caso 1) e a 6,7% (caso 7), que se situam dentro dos valores normais esperados.

Nos casos de SMD estudados no presente trabalho, as hiperdiploidias ($2n > 50$ cromossomos) foram observadas em freqüências de 9,1% (caso 1) e de 1,6% (caso 2) e em apenas um paciente (caso 6) foram detectadas metáfases triplóides em 14,3% das células analisadas. Em relação às hiperdiploidias com mais de 50 cromossomos, não há dados sobre a freqüência desse tipo de alteração em SMD, o que sugere que se tratem de achados isolados. Quanto à poliploidia, sabe-se que o percentual de células poliplóides observado em medula óssea de indivíduos normais é da ordem de 2% (KNUUTILA *et al.* 1976). Por outro lado, índices de poliploidia superiores a 10% são esporadicamente observados em pacientes leucêmicos (BORGSTROEM *et al.*, 1976). Em uma amostra de pacientes com SMD, OLIVEIRA (1988) observou a ocorrência de poliploidia em freqüências superiores a 10% em 4 casos, dos quais três desenvolveram

LMA e o quarto foi a óbito seis meses após o exame citogenético. Esses dados sugerem que a presença de células poliplóides na medula óssea em pacientes com SMD indicam um prognóstico reservado.

No presente estudo, metáfases hipodiplóides foram detectadas em 3 pacientes com LMA (casos 17, 19 e 20) em frequências bastante elevadas (45,2%, 48,8% e 34,8%), indicando uma grande instabilidade cromossômica. Já as hiperdiploidias e pseudodiploidias foram raras nessa amostra, estando presentes em frequências muito baixas nos casos 13, 19 e 20. O percentual de células poliplóides foi bastante variável nesse grupo, pois observaram-se desde valores normais (2,2% no caso 20) até valores superiores a 10% (22,5% no caso 17 e 25% no caso 13).

Dentre os pacientes com LMC no presente estudo, alterações numéricas inespecíficas foram detectadas em 3 casos. Curiosamente, frequências relativamente elevadas de hipodiploida, hiperdiploidia e/ou poliploidias foram observadas nos dois pacientes que exibiam um segundo cromossomo Ph como alteração estrutural adicional (casos 27 e 30). No terceiro caso, constataram-se frequências de 40% de células hipodiplóides e de 16,6% de hiperdiploides, sem associação com anormalidades cromossômicas estruturais.

Apesar de tais fenômenos individuais não serem conclusivos, permitem-nos supor que variações acentuadas em torno do número modal de cromossomos podem, eventualmente, conduzir à formação de clones celulares neoplásicos, e desse modo, influir desfavoravelmente no prognóstico de pacientes portadores dessas alterações.

6.2. Alterações cromossômicas estruturais

6.2.1. Aletrações Estruturais de natureza clonal

Nas SMD, as alterações estruturais de natureza clonal detectadas no presente trabalho envolveram o braço curto do cromossomo 7 , quer como deleção quer como translocação e a observação de segmentos cromossômicos adicionais em 2q37 e 4q35.

Quanto ao cromossomo 7, a base de dados do *The Cancer Genome Anatomy Project* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP/mitelsum.cgi>) relaciona, dentre 2712 casos de SMD listados, duas translocações balanceadas, setenta e oito translocações não balanceadas e dez deleções envolvendo diferentes regiões do braço curto desse cromossomo.

Em contraposição, nessa mesma base de dados, são raras as descrições de alterações estruturais envolvendo o braço longo do cromossomo 2 (dois casos com deleção e duas translocações balanceadas) ou o braço longo do cromossomo 4 (sete casos com deleção). No presente trabalho, foram encontradas adições terminais nesses dois cromossomos, em um mesmo indivíduo. A origem do material adicional poderia ser esclarecida por meio de técnicas de hibridização *in situ* que possibilitassem a “pintura” de todos os cromossomos , tal como descrito por VELDMAN *et al.* (1997). Entretanto, tal metodologia é extremamente dispendiosa e não disponível em nosso meio.

Nas LMA, as alterações estruturais de natureza clonal acharam-se representadas, no presente trabalho , pela presença do cromossomo der(22)t(9;22) em um paciente e por monossomias parciais dos braços longos dos cromossomos 7, 11 e X em outro. Nessa última situação,

infelizmente, os pontos de quebra não puderam ser determinados com precisão.

De acordo com a base de dados do *The Cancer Genome Anatomy*, dentre os 7825 casos listados de LMA, o braço longo do cromossomo 7 acha-se envolvido em apenas dezenove translocações (dezessete balanceadas e duas não balanceadas) enquanto que as deleções foram averiguadas em 365 (4,7%) dos casos. Já o braço longo do cromossomo 11 acha-se envolvido em rearranjos estruturais balanceados em 519 casos (6,6%), com um predomínio das translocações recíprocas com o cromossomo 9 ($205/519 = 39,4\%$). As translocações não balanceadas são representadas por 41 casos (0,5%) e as deleções em 11q, por 194 casos (2,5%), sendo relatados ainda $i(11q)$, $r(11)$, e $dup(11q)$ em menor número. O braço longo do cromossomo X é o menos representado : acham-se referidas onze translocações balanceadas, doze deleções e treze isocromossomos. Tais dados indicam que as deleções envolvendo os cromossomos 7, 11 e X estão efetivamente relacionadas ao desenvolvimento do processo leucemogênico, fato este encontrado em nosso trabalho.

Nas LMC, a única alteração estrutural de natureza clonal encontrada no presente estudo foi a presença do cromossomo Ph ($der(22)t(9;22)(q34;q11)$) em 80% dos pacientes, dados esses compatíveis com os descritos na literatura (HEIM & MITELMAN, 1995).

6.2.2. Alterações Estruturais de natureza não clonal

Dentre as alterações estruturais que não foram consideradas de natureza clonal por terem sido detectadas em uma metáfase somente, mencionamos a presença da translocação 9;12 em um paciente com SMD (Fig. 2), que poderia eventualmente tratar-se de um novo rearranjo nesse grupo de doenças.

Outros achados foram quebras de tipo cromatídica em alguns pacientes e de separação precoce de centrômero, esta última em apenas uma metáfase analisada. Uma vez que tais fenômenos ocorreram em frequências extremamente baixas, tais achados foram apenas registrados dentro da análise citogenética complementar.

Pelo fato de serem não-clonais, a influência dessas alterações no prognóstico do paciente é ainda desconhecida.

6.3. Associações teloméricas

Até meados da década de 80, eram praticamente inexistentes os relatos de associações teloméricas em células de pacientes com tumores sólidos ou leucemias. Segundo FITZGERALD & MORRIS (1984), a raridade de descrições sobre *tas* em células humanas é, mais provavelmente, decorrente do não reconhecimento desse fenômeno, do que de sua ausência.

As primeiras observações relatando a existência de *tas* em neoplasias hematológicas foram descritas em células leucêmicas de origem linfóide (FITZGERALD & MORRIS, 1984; MORGAN *et al.*, 1986; RAIMONDI *et al.*, 1987; TEMPERANI *et al.*, 1995). De acordo com TEMPERANI *et al.* (1995), tais associações foram consideradas de natureza não-clonal, embora freqüentemente envolvessem a região telomérica do cromossomo 19p. Esses mesmos autores relatam a ausência de rearranjos teloméricos em LMA, SMD e na LMC ao diagnóstico ou na fase crônica da doença. Nos casos de LMA, apenas um caso de associação telomérica foi relatado por MORO *et al.* 1998, em um paciente com LMA-M6 que exibia *tas* (17;22)(q25;p13).

Em contraposição aos resultados encontrados por TEMPERANI *et al.* (1995), no presente trabalho foram observadas *tas* nesses três grupos de neoplasias hematológicas. As *tas* foram observadas em todos os pacientes com SMD e LMA, em freqüências que variaram de 7,89 a 25,71% e de 2,08% a 17,8%, respectivamente (Tabelas VII e IX). Nos pacientes com LMC, as *tas* foram encontradas em freqüências variando de 2,22 a 9,52% em 8 dos 10 casos examinados (Tabela XI). Embora se tratem de entidades hematológicas distintas, foram constatadas diferenças significativas entre os

grupos de SMD e LMC ($p < 0.01$), estando o grupo das LMA numa posição intermediária, não demonstrando diferença significativa em relação às SMD ($p > 0.05$) e as LMC ($p > 0.05$). Porém, deve-se ressaltar que as *fas* encontradas neste estudo são de natureza não-clonal.

Existem evidências sugerindo que as associações de extremidades cromossômicas, podem ocorrer devido à perda de repetições teloméricas, em linhagens de células tumorais cultivadas *in vitro* (COUNTER *et al.*, 1992; SALTMAN *et al.*, 1993). Em tumores sólidos, a presença de *fas* também tem sido relacionada à redução do tamanho dos telômeros (HEALY, 1995)

O encurtamento dos telômeros e a presença de apenas atividade basal da telomerase nas células tronco, podem levar a rearranjos cromossômicos complexos como uma tentativa para a estabilização dos cromossomos (OHYASHIKI & OHYASHIKI, 1997; ENGELHARDT *et al.*, 1997; SEOL *et al.*, 1998; OHYASHIKI *et al.*, 1999).

Segundo PAZ-Y-MIÑO *et al.* (1997), quando os telômeros são afetados por instabilidade, eles perdem a funcionalidade, que é expressa pelas associações teloméricas em estudos citogenéticos. Esta perda de funcionalidade produziria um aumento na instabilidade do material genético que, para completar o ciclo, aceleraria o processo de malignização celular.

OHYASHIKI & OHYASHIKI (1997) e OHYASHIKI *et al.* (1999) observaram o encurtamento de telômeros em células de pacientes com SMD que exibiam atividade normal ou moderada de telomerase e que tais características estavam mais freqüentemente associadas a rearranjos citogenéticos complexos. Além disso, os pacientes com número reduzido de

repetições teloméricas apresentavam um risco significativamente mais elevado de transformação leucêmica e pior prognóstico.

As SMD se caracterizam por uma deficiência na hematopoiese, resultante de rápida proliferação celular, não se constatando atividade elevada de telomerase na maioria dos casos. Segundo OHYASHIKI *et al.*(1999) a instabilidade telomérica sem aumento de atividade de telomerase, pode ser uma característica biológica dessas células. Em consequência, a erosão telomérica, decorrente da rápida multiplicação celular, não seria reparada porque a atividade da telomerase seria insuficiente para manter o comprimento dos telômeros nas células desses pacientes. Desse modo, pode se sugerir que as tas observadas em pacientes com SMD no presente estudo, sejam derivadas da ocorrência desses fenômenos.

Nas LMA, os resultados da análise de atividade de telomerase são bastante heterogêneos (NILSSON *et al*, 1994; COUNTER *et al.* 1995, ZHANG *et al* 1996; SEOL *et al*, 1998). ZHANG *et al* (1996) afirmam que pacientes com LMA portadores de anormalidades em 11q e monossomia dos cromossomos 5 e 7 (prognóstico desfavorável) tendem a apresentar atividades elevadas de telomerase, quando comparados com a atividade desta enzima, em células obtidas de pacientes com LMA com outros tipos de aberrações citogenéticas.

O aumento da atividade enzimática pode induzir a uma malignização com redução na complexidade do cariótipo : uma vez que não mais existe a instabilidade telomérica, não há a necessidade de rearranjos complexos para a manutenção da integridade do telômero (OHYASHIKI & OHYASHIKI,

1997; ENGELHARDT *et al.*, 1997; SEOL *et al.*, 1998; OHYASHIKI *et al.*, 1999)

Embora não tenha sido possível averiguar a atividade de telomerase no presente trabalho, é curioso constatar-se que, dentre os pacientes com LMA aqui estudados, os dois casos com monossomia do 7 são os que exibem as menores freqüências de metáfases com *fas* nesse grupo. Além disso, o fato de terem sido encontradas freqüências intermediárias de células com *fas*, em relação aos outros dois grupos por aqui estudados (SMD e LMC), pode ser um reflexo da heterogeneidade de atividade da telomerase acima mencionada.

Na maioria dos casos de LMC analisados, OHYASHIKI e OHYASHIKI (1997) e OHYASHIKI *et al.* (1997) detectaram níveis basais de atividade de telomerase em pacientes em fase crônica, e um aumento dessa atividade em períodos de crise blástica. Segundo esses autores, a redução do número de repetições teloméricas parece ser menos notável em células de LMC em fase crônica do que em crise blástica.

OHYASHIKI *et al.* (1999) relataram uma relação entre a redução do tamanho do telômero e a reativação da telomerase durante o processo de estabelecimento das linhagens celulares leucêmicas. Dessa forma, pode-se inferir que as células em crise blástica com telômeros muito reduzidos atingem um ponto crítico, onde somente a reativação da telomerase pode impedir a morte celular (OHYASHIKI e OHYASHIKI, 1997).

Tendo em vista os achados mais recentes, é possível que inibidores de atividade de telomerase possam atuar como indutores de *fas*, como

evidenciado por experimentos *in vitro* (FUSTER *et al.*, 1990; KUWANO *et al.*, 1992 ; PAZ-Y-MIÑO *et al.*, 1997)

Admitindo-se que a presença do cromossomo Ph confere uma alta capacidade de multiplicação às células leucêmicas em fase crônica, é razoável supor-se que esse potencial proliferativo supere a atividade de reparo das extremidades cromossômicas pela telomerase, resultando em erosão progressiva dos telômeros. Uma maior instabilidade dos telômeros, dentro de um processo de evolução leucêmica, poderia resultar em associações teloméricas citogeneticamente visualizáveis, muito embora em frequências inferiores às observadas em SMD. Entretanto, há que se considerar que, na casuística aqui estudada, faltam informações sobre a fase da doença nestes pacientes. É possível que as populações celulares detectadas na análise citogenética, estivessem em diferentes fases de evolução leucêmica, expressando diferentes níveis de atividade de telomerase e de encurtamento telomérico, conforme consideram OHYASHIKI e OHYASHIKI (1997).

Não há, na literatura mais recente, nenhuma descrição de uma eventual influência de pesticidas ou agrotóxicos de uma maneira geral, sobre a atividade de telomerase. Entretanto, considerando-se que :

a) inibidores de telomerase tais como a afidilcolina são indutores de *fas* em células cultivadas *in vitro* de pacientes portadores de neoplasias (PAZ-Y-MIÑO *et al.*, 1997),

b) o tecido hematopoiético é o alvo preferencial dos processos de malignização associado ao uso de pesticidas (ROWLEY, 1980, 1982, 1985;

MITELMAN *et al.*, 1981; GOLOMB *et al.*, 1982; FAGIOLI *et al.*, 1992; RICHARDSON *et al.*, 1992.),

c) nas células somáticas humanas normais, apenas as células hematopoiéticas exibem atividade basal de telomerase (HIYAMA *et al.*, 1995, BROCCOLI *et al.*, 1995, OHYASHIKI & OHYASHIKI, 1997; ENGELHARDT *et al.*, 1997) e que

d) há uma forte correlação entre exposição à pesticidas e alterações cromossômicas observadas em neoplasias hematológicas (FAGIOLI *et al.*, 1992; LEVIGNE & BLOOMFIELD, 1992; RICHARDSON *et al.* 1992; VIEL & RICHARDSON; 1993; CICCONE *et al.*, 1993);

é possível que os pesticidas atuem como inibidores da atividade de telomerase, atingindo preferencialmente as células tronco da medula óssea, desencadeando assim uma perda de repetições teloméricas, cuja expressão citogenética inicial seria representada pelas *tas*. Desse modo, as *tas* poderiam ser consideradas indicadores de instabilidade cromossômica relacionada à exposição aos genotóxicos do meio ambiente. No entanto, nossos dados são apenas indicativos, pois na casuística por nós examinada houve um predomínio de indivíduos do meio rural, não sendo possível comparar os dados com indivíduos não-expostos ocupacionalmente a esses produtos. Porém, até o presente momento, não existe qualquer referência, na literatura especializada, sobre a ocorrência de *tas* em células de pacientes com leucemias do compartimento mielóide ou com síndromes mielodisplásicas, sendo este trabalho o primeiro relato sobre a presença de associações teloméricas em leucemias mielóides e SMD.

Levando-se em consideração essas questões, sugerimos que sejam realizadas novos estudos citogenéticos e moleculares para investigar a

relação entre o encurtamento dos telômeros, a atividade da telomerase e a ocorrência das *tas*, em modelos *in vitro* ou por meio de estudos comparativos de paciente com história de exposição ocupacional a defensivos agrícolas com pacientes que não tenham tido exposição ocupacional a esses produtos, com uma casuística maior.

VII - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e comparados com a literatura permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

- a) As alterações cromossômicas de natureza clonal encontradas no presente estudo foram compatíveis com os achados de literatura, embora tenha-se observado novos achados citogenéticos de natureza não clonal em pacientes portadores de SMD;
- b) Os fenômenos das associações teloméricas foram encontrados em leucemias mielóides aguda e crônica, bem como em síndromes mielodisplásicas ainda não descritos na literatura;
- c) Esses fenômenos são de natureza não-clonal, não existindo prevalência de *tas* entre dois cromossomos ou grupos específicos de cromossomos;
- d) As *tas* são indicadores de instabilidade cromossômica em portadores de neoplasias hematológicas do compartimento mielóide, pois provavelmente são decorrentes do processo de encurtamento dos telômeros, o que propiciaria a formação de novas combinações citogenéticas, que podem ter um papel importante na etiologia das neoplasias.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUZZO, M.A. Telomeric associations involving Yq12 in a lymphoblastic cell line. **Cytogenet Cell Genet.**, 56:149-151, 1991.
- ADAMSON, D.J.A. ; KING, D.J. ; HAITES, N.E. Significant telomere shortening in childhood leukemia. **Cancer Genet Cytogenet.**, 61: 204-206, 1992.
- BATTAGLIA, D.; DUBÉ, I.; PINKERTON, P.; SENN, J.. Acquisition of additional primary chromosome abnormalities in the course of karyotype evolution in a case of FAB-M2 acute leukemia. **Cancer Genet Cytogenet.**, 40:105-110, 1989.
- BEIGUELMAN, B.. **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.
- BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T. ; FLANDRIN, G. ; GALTON, D.A.G. ; GRALNICK, H.R. ; SULTAN, C. The French-American-British (FAB) Co-operative group. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Hematol.**, 51: 189-199, 1982.
- BLACKBURN, E.H. Telomerase. **Ann Rev Biochem.**, 61: 113-129, 1992.
- BORGES-OSÓRIO, M.R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. Porto Alegre : Artes Médicas/Editora da UFRGS, 1993.

- BORGSTROEM , G.M. ; VUOPIO, P. ; DE LA CHAPELE, A. Polyploidy of the bone marrow. **Scan J Hematol.**, 17: 123-131, 1976.
- BOULTWOOD, J. ; FIDLER, C. ; KUSEC, R. ; RACK, K. ; ELLIOT, P.J.W. ; ATOYEBI, O. ; CHAPMAN, R. ; OSCIER, D.G. ; WAINSCOAT, J.S. Telomere length in myelodysplastic syndromes. **Am J Hematol.**, 56: 266-271, 1997.
- BROCCOLI, D. ; YOUNG, J.W. ; de LANGE, T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 92: 9082-9086, 1995.
- CICCONE, G. ; MIRABELLI, D.; LEVIS, A.; GAVAROTTI, P.; REGECAMBRIM, G.; DAVICO, L.; VINEIS, P.. Myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes : chemicals exposure, histologic subtype and cytogenetics in a case-control study. **Cancer Genet Cytogenet.**, 68: 135-139, 1993.
- CONNOR, J.M.; FERGUSON-SMITH, M.A. **Fundamentos de Genética Médica**. 3^a edição, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1991.
- COUNTER, C.M. ; AVILLON, A. A.; LeFEUVRE, C. ; STEWART, N.G. ; GREIDER, C.W. ; HARLEY, C.B. ; BACCHETTI, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. **EMBO J.**, 11: 1921-1929, 1992.

COUNTER, C.M. ; GUPTA, J. ; HARLEY, C.B. ; LEBER, B. ; BACCHETTI, S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. **Blood**, **85**: 2315-2320, 1995.

DALLA TORRE, C.A. **Leucemias infantis: citogenética e atividade da enzima telomerase**, São Paulo, 1999, Tese (Mestrado em Morfologia), Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

DEWALD, G.W. DAHL, R.J. ; SPURBECK, J.L. CARNEY, J.A. ; GORDON, H. Chromosomally abnormal clones and nonrandom telomeric translocations in cardiac myxomas. **Mayo Clin Proc.**, **62**: 558-567, 1987.

ENGELHARDT, M. ; KUMAR, R.; ALBANELL, J. ; PETTENGELL, R. ; HAN, W. ; MOORE, M.A.S. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. **Blood**, **90**: 182-193, 1997.

FAGIOLI, F.; CUNEO, A.; PIVA, N.; CARLI, M.G.; PREVIATI, R.; BALBONI, M.; TOMASI, P.; CARIANI, D.; SCAPOLI, G.; CASTOLDI, G.. Distinct cytogenetic and clinicopathologic features in acute myeloid leukemia after occupational exposure to pesticides and organic solvents. **Cancer**, **70**: 77- 85, 1992.

FAILACE, R.. **Hemograma : manual de interpretação**. 3ª edição, Porto Alegre : Artes Médicas, 1995.

FITZGERALD, P. ; MORRIS, C.M. Telomeric association of chromosomes in B-cell lymphoid leukemia. **Hum Genet.**, **67**:385-390, 1984.

- FUSTER, C. ; MIRÓ, L. ; BARRIOS, L. ; EGOZCUE, J. Telomere association on chromosomes induced by aphidicolin in a normal individual. **Hum Genet.**, **84**: 424-426, 1990.
- GOLDBERG, H.; LUSK, E.; MOORE, J.; NOWELL, P. C.; BESA, E. C. Survey of exposure to genotoxic agents in primary myelodysplastic syndrome: correlation with chromosomes patterns and data on patients without hematological disease. **Cancer Res.**, **50**:6876-6881, 1990.
- GOLOMB, H. M.; ROWLEY, J. D. Significance of cytogenetic abnormalities in acute leukemias. **Human Pathology**, **12**:515-521,1981.
- GOLOMB, H. M.; ALIMENA, G.; ROWLEY, J. D.; VARDIMAN, J. W.; TESTA, J. R. ; SOVIK, C.. Correlation of occupation and karyotype in adults with acute nonlymphocytic leukemia. **Blood**, **60**: .404-411, 1982.
- GREIDER, C.W. ; BLACKBURN, E.H. Telomeres, telomerase and cancer. **Sci Am.**, **274**: 92-97, 1996.
- GRIFFIN, J.D. ; LOWENGERG, B. Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. **Blood**, **68**: 1185-1195, 1986.
- HARLEY, C.B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? **Mutat Res.**, **256**: 271-282, 1991.
- HARLEY, C.B.; VILLEPONTEAU, B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. **Curr Opin Genet Dev.**, **5**: 249-255, 1995.

- HASTIE, N.D. ; ALLSHIRE, R.C. Human telomeres: fusion and interstitial sites. **TIG**, 5: 326-336, 1989.
- HEALY, K.C Telomere dynamics and telomerase activation in tumor progression: prospects for prognosis and therapy. **Oncol Res.**, 7: 121-130, 1995.
- HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer cytogenetics**. Alan R. Liss, New York, 1987.
- HEIM, S. Cytogenetics in the investigation of haematological disorders. **Baillière's Clinical Haematology**, 3, 1990.
- HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer cytogenetics : Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells**. 2nd edition, New York : Wiley-Liss, 1995.
- HIYAMA, K. ; HIRAI, Y. ; KYOIZUMI, S. ; AKIYAMA, M. ; HIYAMA, E. ; PIATYSZEK, M.A. ; SHAY, J.W. ; ISHIOKA, S. ; YAMAKIDO, M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. **J Immunol.**, 155: 3711-3715, 1995.
- HOHAUS, S. ; VOSO, M.T. ; BARBERA, E.O-L. ; CAVALLO, S. ; BELLACOSA, A. ; RUTELLA, S. ; RUMI, C. ; GENUARDI, M. ; NERI, G. Telomerase activity in human hematopoietic progenitor cells. **Haematologica**, 82: 262-268, 1997.

HOLMQUIEST, G.P. ; DANCIS, B. Telomere replication, kinetochore organizers and satellite DNA evolution. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 76: 4566-4570, 1979.

HOWELL, R.T. ; KITCHEN, C. ; STANDEN, G.R. Telomeric associations in a patient with B-cell polymphocytic leukaemia. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 7: 116-118, 1993.

ISCN (1995) : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman, F.(ed); S. Karger, Basel, 1995.

IWAMA, H. ; OHYASHIKI, K. ; OHYASHIKI, J.H. ; HAYASHI, S. ; KAWAKUBO, K. ; SHAY, J.W. ; TOYAMA, K. The relationship between telomere length and therapy-associated cytogenetic response in patients with chronic myeloid leukemia. **Cancer**, 79: 1552-1560, 1997.

JOTTERAND, M.; PARLIER, V. Diagnostic and prognostic significance of cytogenetics in adult primary myelodysplastic syndromes. **Leuk Lymphoma.**, 23: 253-266, 1996.

deKLEIN, A.; van KESSEL, A. G.; GROSWELD, G. BARTRAM, C.R.; HAGEMEIJER, A.; BOOTSMA, D.; SPURR, N.K.; HEITSTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; STEPHENSON, J.R. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, 300: 765-767, 1982.

- KANTARJIAN, H.M. ; DEISSEROTH, A. ; KUZROCK, R. ; ESTROV, Z.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. **Blood**, **82**: 691-701, 1993.
- KIM, N.W. ; PIATYSZEK, M.A. ; PROWSE, K.R. ; HARLEY, C.B. ; WEST, M.D. ; HO, P.L.C. ; COVIELLO, G.M. ; WRIGHT, W.E. ; WEINRICH, S.L.; SHAY, J.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, **266**: 2011-2015, 1994.
- KNAPP, R.H. ; DEWALD, G.W. ; PIERRE, R.V. Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndromes. **Mayo Clin Proc.**, **60**: 507-516, 1985.
- KNUUTILA, S. Polyploid mitoses in human bone marrow cell. **Hereditas**, **82**: 263-265, 1976.
- KOVACS, G. ; MULLER-BRECHLIN, R. ; SZUCS, S. Telomeric association in two renal tumors. **Cancer Genet Cytogenet.**, **28**: 363-366, 1987.
- KUWANO, A.; MATSUURA, S. ; KAIJI, T. Telomere association of human chromosomes induced by aphidicolin. **Mut Res.**, **269**: 107-111, 1992.
- LEVINE, E.G. ; BLOOMFIELD, C.D. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. **Seminars in Oncology**, **19**: 47-84, 1992.

- MANDHAL, N.; HEIM, S. ; KRISTOFFERSSON, U. ; MITELMAN, F. ; ROOSER, B. ; RYDHOLM, A.; WILLEN, H. Telomeric association in a malignant fibrous histiocytoma. **Hum Genet.**, 71: 321-324, 1985.
- MANDHAL, N. ; HEIM, S.; ARHEDEN, K. ; RYDHOLM, A.; WILLEN, H. ; MITELMAN, F. Rings, dicentrics, and telomeric association in histiocytomas. **Cancer Genet Cytogenet.**, 30: 23-33, 1988.
- MANSOOR, A.M.; BHARADWAJ, T.P.R.; SETHURAMAN, S.; CHANDY, M.; PUSHPA, V.; KAMADA, N.; MURTHY, B.K.. Analysis of karyotype, SCE, and point mutation of RAS oncogene in Indian MDS patients. **Cancer Genet Cytogenet.**, 65: 12-20, 1993.
- MARINHO, H. M.. **Hematologia**. São Paulo, Sarvier, 1983.
- MARTINEZ-CLIMENT, J.A. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. **Leukemia**, 11: 1999-2021, 1997.
- MITELMAN,F.; NILSSON, P.G.; BRANDT,L. *et al.* Chromosome pattern, occupation, and clinical features in patients with acute nonlymphocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 4: 197-214, 1981.
- MORGAN, R. ; JARZABEK, V. ; JAFFE, J.P. ; HECHT, K. ; HECHT, F. ; SANDBERG, A.A. Telomeric fusion in pre-T-cell lymphoblastic leukemia. **Hum Genet.**, 73: 260-263, 1986.

MORO, A. ; PACHECO, A. P .; SCHILLING, M.A.R. ; GUERRA, L.A.
Anormalidades cromossômicas em neoplasias hematológicas e
exposição ocupacional a agrocitoquímicos. **Revista Médica do HSVP,**
10: 22-28, 1998.

MOYSIS, R.K. ; BUCKINGHAN, J.M ; CRAM, L.S. ; DANI, M. ; DEAVEN,
L.L.; JONES, M.D. ; MEYENE, J. ; RATLIFF, R.L. ; WU, J-R. A highly
conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the
telomeres of human chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA., 85: 6622-**
6626, 1988.

NILSSON, P. ; MEHLE, C. ; REMES, K. ; ROOS, G. Telomerase activity in
vivo human malignant hematopoietic cells. **Oncogene, 9: 3043-3048,**
1994.

OHYASHIKI, J.H. ; OHYASHIKI, K. ; FUJIMURA, T. ; KAWAKUBO, K. ;
SHIMAMOTO, T. ; IWABUCHI, A. ; TOYAMA, K. Telomere shortening
associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes.
Cancer Res., 54: 3557-3560, 1994a.

OHYASHIKI, K. ; OHYASHIKI, J.H. ; FUJIMURA, T. ; KAWAKUBO, K. ;
SHIMAMOTO, T. ; SAITO, M. ; NAKAZAWA, S. ; TOYAMA, K. Telomere
shortening in leukemic cells is related to their genetic alterations but not
replicated capability. **Cancer Genet Cytogenet., 78: 64-67, 1994b.**

OHYASHIKI, K. ; OHYASHIKI, J.H.; IWAMA, H. ; SHAY, J.W. ; TOYAMA, K.
Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia
with disease progression. **Leukemia**, 11: 190-194, 1997.

OHYASHIKI, K. ; OHYASHIKI, J.H. Telomere dynamics and cytogenetics
changes in human hematologic neoplasias: a working hypothesis.
Cancer Genet Cytogenet., 94: 67-72, 1997.

OHYASHIKI, J.H. ; IWAMA, H. ; YAHATA, N. ; ANDO, K. ; HAYASHI, S. ;
SHAY, J.W. ; OHYASHIKI, K. Telomere stability is frequently impaired in
high-risk groups of patients with myelodysplastic syndromes. **Clin Cancer
Res.**, 5: 1155-1160, 1999.

OLIVEIRA, E.M.C. de. **Estudo Cromossômico em Síndromes
Mielodisplásicas**, Campinas, 1988, Tese (Mestrado em Genética
Médica), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de
Campinas.

PARK, J.P. ; DOSSU, J.R. ; RHODES, C.H. Telomere associations in
desmoplastic infantile ganglioglioma. **Cancer Genet Cytogenet.**, 92: 4-
7, 1996.

PASQUALETTI, P.; CASALE, R.; COLANTONIO, D.; COLLSCCIANI, A..
Occupational risk for hematological malignancies . **Am J Hematol.**, 38:
147-149, 1991.

- PATHAK, S. ; VAN TUINEM, P. ; MERRY, D.E. Heterochromatin, synaptonemal complex and NOR activity in the somatic and germ cells a male domestic dog, *Cannis familiares* (Mammalia, Canidae). **Cytogenet Cell Genet.**, **34**: 112-118, 1982.
- PATHAK, S. ; WANG, Z. ; DHALIWAL, M. K. ; SACKS, P.C. Telomeric association: another characteristic of cancer chromosomes? **Cytogenet Cell Genet.**, **47**: .227-229, 1988.
- PAZ-Y-MINÓ, C.; SANCHÉZ, M.A.; DEL POZO, M.; BALDEÓN, M.A.; CÓRDOVA, A. ; GUTIÉRREZ, S. ; PEÑAHERRERA, S.; NEIRA, M.; OCAMPO, L.; LEONE, P. Telomeric association in women with breast and uterine cervix cancer. **Cancer Genet Cytogenet.**, **98**: 115-118, 1997.
- PELLIER, I., Le MOINE, P. J. ; RIALLAND, X. ; FRANCOIS, S.; BARANGER, L ; BLANCHET, O. ; LARGET-PIET, L.; IFRAH, N. Myelodysplastic syndrome with t(5;12)(q31;p12-p13) and eosinophilia: a pediatric case with review of literature. **J Pediatr Hematol Oncol.**, **18**: 285-288, 1996.
- RAIMONDI, S.C. ; RAGSDALE, S.T. ; BEHM, F. ; RIVERA, G. ; WILLIAMS, D.L. Multiple telomeric associations of a trisomic whole q arm of chromosome 1 in a child with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet.**, **24**: 87-93, 1986.
- RAIMONDI, S.C. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, **81**:.2237-2251, 1993.

RICHARDSON, S.; ZITTOUN, R.; BASTUJI-GARIN, S.; LASSERRE, V.; GUIHENNEUC, C.; CADIOU, M.; VIGUIE, F.; LAFFONT-FAUST, I. Occupational risk factors for acute leukaemia : a case-control study. *Int J Epidemiol.*, **21**: 1063-1073 ,1992.

ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. **Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional**. 5ª edição, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996.

ROWLEY, J.D. Chromosome abnormalities in human leukemia. *Ann Rev Genet.*, **14**: .17- 39,1980.

ROWLEY, J.D. Chromosome abnormalities in human acute nonlymphocytic leukemia : relationship to age, sex, and exposure to mutagens. *Natl Can Inst Monog.*,**60**: 17-23, 1982.

ROWLEY, J.D. Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature*, **301**: 290-291, 1983.

ROWLEY, J.D. Chromosome abnormalities in human leukemia as indicators of mutagenic exposure. *Carcinog Compr Surv.*,**10**: 409-418,1985.

SALTMAN, D. ; MORGAN, R. ; CLEARY, M.L.. ; DE LANGE, T. Telomeric structure in cells with chromosome end associations. *Chromosoma*, **102**: 121-128, 1993.

SANCHEZ, O.; ESCOBAR, J.J.; YUNIS, J.J. A simple G-banding technique. **Lancet II**, 269, 1973.

SEOL, J.G. ; KIM, E.S. ; PARK, W.H. ; JUNG, C.W. ; KIM, B.K. ; LEE, Y.Y. Telomerase activity in acute myelogenous leukaemia: clinical and biological implications. **Br J Haematol.**, **100**: 156-165, 1998.

SHAY, J.W. ; WERBIN, H. ; WRIGHT, W.E. Telomeres and telomerase in human leukemias. **Leukemia**, **10**: 1255-1261, 1996.

SHEER, D. Cromossomos e câncer. In : FRANKS, L.M.; TEICH,N. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. São Paulo : ROCA, 1990.,p.221-240.

TATEMATSU, K. ; NAKAYAMA, J. ; DANBARA, M. ; SHIONOYA, S. ; SATO, H. ; OMINE, M. ; ISHIKAWA, F. A novel quantitative 'stretch PCR assay', that detects a dramatic increase in telomerase activity during the progression of myeloid leukemias. **Oncogene**, **13**: 2265-2274, 1996.

TEMPERANI, P. ; GIACOBBI, F. ; GANDINI, G. ; TORELLI, U. ; EMILIA, G. Chromosome rearrangements at telomeric level in hematologic disorders. **Cancer Genet Cytogenet.**, **83**: 121-126, 1995.

THE CANCER GENOME ANATOMY PROJECT
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP/mitelsum.cgi>)

THERMAN, E. ; SUSMAN, M. **Cromosomas Humanos**. Estructura, comportamiento y efectos. Traducción de Máximo E. Drets, 3ª edición, Ribeirão Preto, 404p., 1996.

THOMPSON, M. W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica**. 5ª edição, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1993.

VELDMAN, T. ; VIGNON, C. ; SCHRÖCK, E. ; ROWLEY, J.D. ; RIED, T. Hidden chromosomes abnormalities in haematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. **Nature Genetics**, **15**: 406-410, 1997.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human Chromosomes : principles and techniques**. 2^{ed} edition, McGraw-Hill, Inc., 1995.

VIEL, J.F.; RICHARDSON, S. T. Lymphoma, multiple myeloma and leukemia among French farmers in relation to pesticide exposure. **Sci Med.**, **37**: 771-777, 1993.

VINEIS, P. ; AVANZI, G. C.; GIOVINAZZO, B.; PONZIO, G.; CAMBRIM, G.R.; CICCONE, G.. Cytogenetics and occupational exposure to solvents: a pilot study on leukemias and myelodysplastic disorders. **Tumori**, **76**: 350-352, 1990.

WIERNIK, P.H. New agents in the treatment of acute myeloid leukemia. **Semin Hematol.**, **28**: 201-205, 1991.

- WILLIAMS, D.L. Cytogenetics of acute leukemia. In: CATOVSKY, D. **The leukemic cell**. 2nd ed., Churchill Livingstone, 1991.
- WOOD, M. E.; BUNN, P. A. **Segredos em Hematologia/Oncologia**. Porto Alegre, Artes Médicas, 1996.
- XU, D. ; GRUBER, A. ; PETERSON, C. ; PISA, P. Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. **Br J Haematol.**, **102**: 1367-1375, 1998.
- YUNIS, J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. **Science**, **221**: 227-236, 1983.
- ZAGO, M.A. ; SIMÕES, B.P. Alterações cromossômicas e gênicas nas leucemias. **Série de Monografias da Escola Brasileira de Hematologia**, **1**: 24-40, 1993.
- ZHANG, W. ; PIATYSZEK, A.M. ; KOBAYASHI, T. ; ESTEY, E. ; ANDREEFF, M. ; DEISSEROTH, A.B. ; WRIGHT, W.E. ; SHAY, J.W. Telomerase activity in human myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. **Clin Cancer Res.**, **2**: 799-803, 1996.
- ZIPURSKY, A.; THORNER, P.; De HARVEN, E.; CHRISTENSEN, H. ; DOYLE, J. Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome. **Leukemia.**, **18**: 163-171, 1994.