

PAULO DANÚSIO LIMA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS E IRREGULARIDADES NUCLEARES EM
ERITROBLASTOS DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LINFOMAS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA

1993

PAULO DANÚSIO LIMA DA SILVA,
FARMACÊUTICO-BIOQUÍMICO, ALUNO DO CURSO DE
ESPECIALIZAÇÃO EM HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

**AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS E IRREGULARIDADES NUCLEARES EM
ERITROBLASTOS DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LINFOMAS**

Trabalho apresentado como requisito final do VII Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia. D.A.C.T. - D.M.C. - HEMOCE/CCS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

1 9 9 3

O farmacêutico faz misturas agra
dáveis, compõe unguentos úteis à
saúde e seu trabalho não termi-
nará.

Eclesiástico 38:7

AGRADECIMENTOS

A Deus a única verdade eterna; aquele ao qual tudo converge.

Aos meus pais, irmãos e avoengos com harmonia e louvor.

Ao Dr. José Murilo Martins, pelo estímulo científico e intelectual transmitido durante o curso.

A Dra. Fca. Vânia Barreto Aguiar Ferreira Gomes, por sua orientação científica, apoio e amizade.

Aos professores Dr. José Quixadá Cavalcante Filho e Dra. Alana Jocelina Montenegro de Castro pela colaboração e sensibilidade.

Aos amigos e colegas de curso que, de uma forma ou de outra, contribuíram solidariamente para concretização desta jornada.

Aos funcionários do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - HEMOCE, pelo carinho e aceitação que tiveram comigo.

A Dra. Verônica de Lima Guedes e Dra. Virgínia Inácio Rosa pela convivência fraterna e, em especial, a Dra. Regiane Muratori Moura com respeito e afago.

A Conceição de Maria Figueiredo Moura pelo constante sentimento.

ÍNDICE

RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Micronúcleos - Aspectos Gerais	1
1.2 - Micronúcleo e mutagenicidade	2
1.3 - Micronúcleo e idade	3
1.4 - Micronúcleo e sexo	3
1.5 - Micronúcleo e tabagismo	4
1.6 - Micronúcleo e drogas	4
1.7 - Linfomas	5
1.7.1 - Definição	5
1.7.2 - Classificação	5
1.8 - Objetivos da Pesquisa	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	30
6. SUMMARY	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS E IRREGULARIDADES NUCLEARES EM ERITROBLASTOS DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LINFOMAS

RESUMO

Realizamos um estudo sistemático de 30 pacientes com linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin procedentes do Hospital Universitário Walter Cantídio, compreendendo o período entre abril de 1984 a fevereiro de 1993. Em cada indivíduo avaliamos a frequência de micronúcleos e irregularidades nucleares na medula óssea, utilizando microscopia óptica com lente objetiva de imersão.

Para analisarmos as amostras adotamos o critério de contar 1.000 eritroblastos por lâmina registrando as modificações nucleares, com o objetivo de estudar a existência de alteração diseritropoiéticas e/ou mutagênicas nestas patologias. Constatamos que dos 30 pacientes, 22 (73,3%) apresentaram micronúcleo, sendo 12 casos (40%) de linfoma não Hodgkin e 10 (33,3%) com linfoma de Hodgkin.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a relação entre a presença de micronúcleos e irregularidades nucleares em eritroblastos de indivíduos com linfoma, por serem estas modificações citadas na literatura como alterações diseritropoiéticas e/ou de mutagenicidade.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Micronúcleo - Aspectos Gerais

O micronúcleo é um aglomerado de cromatina citoplasmática com aparência de um pequeno núcleo que surge de um cromossomo ou fragmento cromossômico deixado para trás em anáfase. O defeito de orientação e migração deve-se geralmente ao fato de não estar vinculado ao fuso mitótico. E os motivos básicos são: não possuir centrômero ou alguma falha no sistema de fuso. (8, 10, 11, 12)

O micronúcleo provém de um dano citogenético em qualquer célula que se encontre em proliferação e/ou divisão celular. Quando células são tratadas por algumas drogas ou irradiações que induzem a modificações cromossômicas, este desarranjo genético se intensifica ocorrendo com frequência alterações nucleares. (11)

A capacidade de gerar um novo e pequeno núcleo é um aspecto muito interessante do cromossomo ou fragmento cromossômico perdido.

A membrana nuclear é formada por duas membranas: a externa e a interna. A primeira, está em contato com o retículo endoplasmático rugoso; a segunda — a membrana interna, também chamada lâmina nuclear, é constituída por três proteínas principais que formam uma rede fibrosa. Estas proteínas ligam-se aos cromossomos fixando-os à membrana nuclear durante a interfase. No momento da prófase, ocorre a formação de pequenas vesículas por fragmentação da membrana externa que são indistinguíveis do retículo endoplasmático rugoso, e a rede protéica da membrana interna sofre despolimerização formando polipeptídeos monoméricos. Na telófase, ao fim da sepa

ração dos cromossomos, ocorre o processo inverso. As proteínas da lâmina nuclear repolimerizam-se em torno da cromatina, enquanto as pequenas vesículas unem-se reconstituindo a membrana nuclear externa; aparentemente a cromatina é responsável pelo estímulo a repolimerização e provavelmente da mesma forma, um fragmento cromossômico isolado é capaz de determinar a formação de sua própria membrana nuclear constituindo um pequeno núcleo comumente denominado de micronúcleo(MN).(4)

Toda célula em divisão, caso venha sofrer lesão do fuso ou qualquer quebra cromossômica, pode apresentar micronúcleo. Na hematologia o MN é reconhecido desde longa data em eritrócitos sob a denominação de corpúsculo de Howel-Jolly.(32)

Em condições normais o MN é encontrado em frequência muito baixa. Agentes físicos, químicos ou biológicos que induzam quebras cromossômicas ou interfiram no fuso mitótico aumentam a frequência de MN existindo geralmente uma correlação direta com a intensidade ou concentração do agente.(11)

1.2 - Micronúcleo e Mutagenicidade

A avaliação de micronúcleos em reticulócitos ou eritrócitos policromatófilos tornou-se um teste padrão para avaliação de genotóxicos. Além destas, outras células da medula óssea podem apresentar micronúcleos, tais como: mieloblastos, mielócitos, eritroblastos e eritrócitos.(32) O MN também tem sido estudado em cultura de linfócitos e células escamosas da boca e da urina.(3, 14)

Comparando o diâmetro do MN de células submetidas a diferentes substâncias citotóxicas pode-se ter uma informação sobre a possível ação do genotóxico, se clastogênica ou se afeta o fuso. Na segunda situação os MN encontrados tendem a ter um diâmetro maior, em geral acima de 1/4 do diâmetro do reticulócito.(40)

Análises realizadas em pessoas submetidas a radioterapia mostrou existir uma clara correlação entre a frequência de micronúcleo e a dose recebida.(10, 17)

Trabalhadores expostos profissionalmente a mutagênicos (Ex: Benzeno) apresentaram um aumento na incidência de aberrações cromossômicas ou micronúcleo, mostrando ter uma maior tendência a desenvolver câncer.(39)

Pessoas que ingerem grandes quantidades de café (5 ou mais xícaras por dia) apresentam um aumento de micronúcleos em policromatófilos.(2, 33)

1.3 - Micronúcleo e Idade

Indivíduos idosos têm tendências a aumentar a repetição de micronúcleos e este aumento tem sido atribuído a um ou mais dos seguintes fatores: algumas evidências que os efeitos dos agentes que danificam o DNA elevam-se com a idade, devido ao acúmulo de DNA danificado e/ou a diminuição da habilidade de separar o DNA modificado (6), defeito no fuso e o eixo-centrômero preso, e o aumento da taxa de quebras cromossômicas espontâneas. A extensão de quebras cromossômicas espontâneas que tem sido reportado em relação a idade em humanos não é provável para explicar, por si só, o observado aumento de micronúcleo com a idade.(5)

1.4 - Micronúcleo e Sexo

De acordo com o estudo colaborativo de vários laboratórios nórdicos sobre genotoxicidade, as mulheres tendem a ter um número maior de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos do que os homens.(18)

1.5 - Micronúcleo e Tabagismo

Em 1983, Högstedt e colaboradores, estudando medula óssea e sangue, concluíram que os fumantes apresentam um número significativamente maior de MN do que os não fumantes (13). Todavia o Nordic Study Group (1990) estudando linfócitos observou que o tabagismo aumenta aberrações cromossômicas mas não MN. (19, 24, 34)

1.6 - Micronúcleos e Drogas

Pesquisas citogenéticas realizadas em medula óssea "in vivo" revelou ^{aná} que várias drogas podem ser responsáveis pela capacidade de quebra do cromossomo cuja análise consiste em medir a frequência de eritrócitos com MN derivados de fragmentos cromossômicos. (41) Observou-se que tanto os agentes alcoilantes como os antimetobólitos são capazes de induzir a formação de MN. (16, 41)

Estudos sobre micronúcleos em linfócitos de sangue periférico foram empregados para monitoramento citogenético de crianças com processo linfoproliferativo, os quais foram submetidos a quimioterapia e radioterapia. Estas foram tratadas com uma variedade de drogas, as quais incluíam: vincristina, metotrexate, daunomicina e prednisona, e verificou-se um marcado aumento de MN em linfócitos. (22, 23)

A frequência máxima de MN em reticulócitos ocorre entre 24 a 50 horas após a dose máxima de um mutagênico. Doses repetidas, especialmente de antimetabólitos como 5-fluoracil e metotrexate, induzem um maior número de MN. (41)

1.7 - Linfomas

1.7.1 - Definição

Os linfomas são um grupo heterogêneo^o de desordens neoplásicas^a originados^a do sistema imune. Visto que as células que constituem o sistema imune são largamente distribuídas e possuem ampla heterogeneidade funcional, linfomas podem originar-se virtualmente em qualquer órgão e mostrar disparidade de fatores histológicos, comportamento clínico e prognóstico. O maior determinante do padrão clínico da doença e do prognóstico são o tipo celular de origem (Estágio de Diferenciação) e o padrão de crescimento interno envolvendo o linfonodo (folicular ou difuso). Progressos em imunologia, citogenética e biologia molecular tem permitido gradualmente melhorar as correlações clínica/patologia^o e definir os subtipos específicos de linfomas. Dependendo do subtipo de linfoma, o prognóstico pode variar de excelente (sobrevivida de 10 a 20 anos) a extremamente desfavorável (menos de 1 ano). (19)

Terminologia diagnóstica tem sido esclarecido em um maior estudo patológico comparativo. De acordo com a "Working Formulation", três grupos podem ser definidos: 1. um grupo favorável, o qual possui um tipo celular de baixa agressividade, também chamado folicular ou nodular; 2. um grupo de grau intermediário, o qual é mais agressivo e possui os tipos folicular e difuso; 3. alto grau de malignidade ou grupo não favorável que possui um modelo de crescimento difuso. (19)

LNH
DH → nod

1.7.2 - Classificação

Os linfomas podem ser de tipo não-Hodgkin (LNH ou linfomas malignos) e tipo Hodgkin (LH). Há diferenças entre

esses dois grupos de linfomas no que se refere ao quadro clínico, quadro anatômico, resposta a terapêutica e evolução.(20)

Hoje é adotada uma classificação internacional — a Working Formulation — para os LNH. Na tabela 1 estão colocadas a classificação de Rappaport e a formulação internacional, com a finalidade de comparação.(19, 20)

TABELA 1 - Classificação dos linfomas não-Hodgkin.

FORMULAÇÃO INTERNACIONAL	CLASSIFICAÇÃO DE REPPAPORT
<u>1. BAIXO GRAU DE MALIGNIDADE</u>	
A - Linfoma maligno de pequeno linfócitos:- tipo LLC - Plasmocitóide	- Linfoma linfocítico bem diferenciado difuso (LLBDD)
B - Linfoma maligno folicular, de células, pequenas clivadas (predominantes)	- Linfoma nodular pouco diferenciado (LNPD)
C - Linfomas maligno folicular Misto de células pequenas clivadas e células grandes.	- Linfomas nodular misto, linfocítico-histiocítico (LNM)
<u>2. GRAU INTERMEDIÁRIO DE MALIGNIDADE</u>	
D - Linfoma folicular de células grandes predominantes	- Linfoma nodular histiocítico (LNH)
E - Linfoma difuso de células pequenas clivadas	- Linfoma difuso pouco diferenciado
F - Linfoma difuso misto, de células pequenas e grandes	- Linfoma difuso misto linfocítico-histiocítico (LDM)
G - Linfoma difuso de células grandes (clivadas e não-clivadas)	- Linfoma difuso histiocítico (LDH)
<u>3. ALTO GRAU DE MALIGNIDADE</u>	
H - Linfoma de células grandes, imunooblástico	- Linfoma difuso histiocítico (LDH)
I - Linfoma linfoblástico (células convolutas e não-convolutas)	- Linfoma linfoblástico (LLB)
J - Linfoma de células pequenas não-clivadas (tipo Burkitt, áreas foliculares)	- Linfoma difuso indiferenciado: - tipo Burkitt - tipo não-Burkitt
K - Miscelânea: linfomas compostas, micose fungóide, linfoma histiocítico verdadeiro, linfomas não-classificáveis.	

O LH apresenta variedade de aspecto histopatológico, sendo classificado em quatro tipos:(19, 20)

- 1) Predominância linfocitária (PL)
- 2) Esclerose nodular (EN)
- 3) Celularidade mista (CM)
- 4) Depleção linfocitária (DL)

TABELA 1.2 - Tipos histopatológicos do LH, segundo a classificação de Rye (dados principais).

TIPOS HISTOPATOLÓGICOS
1. Predominância linfocitária (PL): presença de células linfocitárias em quantidade apreciável; folículos linfóides presentes ou esboçados; histiócitos presentes em quantidade variável.
2. Esclerose nodular (EN): agrupamentos de células linfocitárias de permeio a traves fibrosas; células de Reed-Sternberg (R-S) presentes. Com aumento da fibrose, os nódulos de linfócitos ficam isolados e podem surgir áreas de necroses.
3. Celularidade mista - (CM): aspecto menos celular que na PL; células de R-S, linfócitos, histiócitos, eosinófilos, neutrófilos, plasmócitos e tecido fibroso.
4. Depleção linfocitária (DL): diminuição dos linfócitos e presença de células de tipo reticular (às vezes com aspecto sarcomatoso). Às vezes há só fibrose acentuada com raríssimas células (tipo fibroso).

1.8 - Objetivos da Pesquisa

Sendo os micronúcleos e as irregularidades nucleares observadas e mencionadas como características de alterações diseritropoiéticas, deliberou-se realizar esta análise em pacientes com diagnóstico de linfoma.

Por isso estabeleceu-se fazer:

- a) Estudo sistemático de micronúcleos e irregularidades nucleares em esfregaços de medula óssea disponíveis, coletadas com o propósito de avaliar pacientes hematológicos com linfomas de Hodgkin (LH) e não-Hodgkin (LNH);
- b) Correlacionar estas variáveis com a doença (tipo de linfoma), idade (≤ 35 a > 35 anos), sexo (masculino e feminino), tratamento (tratados e não tratados) e tabagismo (fumantes não fumantes).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Nosso estudo foi realizado em lâminas de medula óssea de pacientes com LH e LNH do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

Analizamos 35 amostras, sendo 30 de indivíduos com linfomas e 5 utilizadas como controles normais, representadas por lâminas de medula óssea avaliadas e que se encontravam dentro dos padrões específicos de normalidade.

A população estudada foi de pacientes ao diagnóstico e durante o tratamento, incluindo-se fumantes e não-fumantes, ambos os sexos e com idades variadas.

As amostras empregadas para esta pesquisa não foram obtidas com o objetivo único desse trabalho, tendo sido utilizadas lâminas recentes e arquivadas, disponíveis no Laboratório Central do HUWC, compreendendo o período de abril de 1984 a fevereiro de 1993.

Todas as lâminas examinadas receberam coloração pelo método de May-Grunwald-Giemsa.

A leitura das amostras ^{foram} realizadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão (400x), adotando-se o critério de observar 1.000 eritroblastos por paciente, sendo algumas vezes necessário percorrer todo o esfregaço ou contar mais de uma lâmina do mesmo paciente.

Análise Microscópica

Os eritroblastos foram identificados de acordo com critérios morfológicos(21). Os micronúcleos quando presentes,

apresentam coloração azul escura em forma de corpúsculos ovalados ou arredondados com tamanho variando entre 1/20 a 1/4 do diâmetro da célula, sendo diferenciados de corante precipitado por não apresentarem birrefringência.

Foram avaliados 1.000 eritroblastos medulares por indivíduo, examinando a existência ou não de MN, o número de MN por célula e outras alterações nucleares mostrados na figura abaixo.

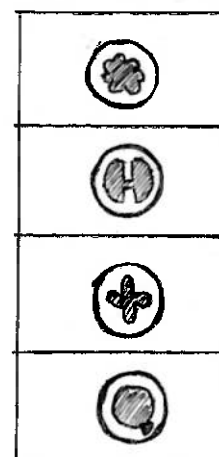
FIGURA 1 - Tipos de irregularidades nucleares encontradas nos eritroblastos.

CONTORNO IRREGULAR (CI)

BINUCLEAÇÃO COM PONTE (BN)

NÚCLEO EM FOLHA DE TREVO (FT)

NÚCLEO COM APÊNDICE (AP)



Análise Estatística

As amostras foram descritas através de distribuições de frequências das variáveis: idade, sexo, tratados e não tratados, fumantes e não fumantes, tipo de linfoma, quantidade de micronúcleos e irregularidades nucleares.

As variáveis idade, sexo, tratados e não tratados, fumantes e não fumantes são cruzados com os tipos de linfoma, presença de micronúcleo e de irregularidades nucleares. Estes cruzamentos estão representados em tabelas de contingência 2x2 e analisadas estatisticamente através do Teste

do Qui-quadrado (χ^2). Quando as condições de aplicação do χ^2 não foram satisfatórias utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Optou-se pela aceitação da existência de correlação entre as variáveis quando $p < 0,05$.

3 - RESULTADOS

Avaliamos 30 indivíduos com linfomas procedentes do Hospital Universitário Walter Cantídio e de acordo com os dados de seus prontuários, analisamos algumas variáveis neste trabalho.

Os pacientes distribuíam-se em:

- a) tipo de linfoma - 13 (43,3%) casos de Hodgkin e 17 (56,7%) de não-Hodgkin (tabela 12);
- b) idade - variou de 8 a 68 com uma idade média de 35,6 anos. (tabela 8);
- c) sexo - 20 (66,7%) pacientes masculinos e 10 (33,3%) femininos (tabela 9);
- d) tratamento - 16 (53,3%) tratados e 14 (46,7%) não tratados (tabela 10);
- e) tabagismo - 12 (40%) fumantes e 18 (60%) não fumantes.

Para o estudo das amostras contamos 1.000 eritroblastos por lâmina, observando a morfologia, a frequência de micronúcleos (tabela 2) e outras irregularidades nucleares (tabelas 3, 4, 5, 6) nestas células, as quais relacionamos com as variáveis idade, sexo, tratamento e tabagismo, onde obtivemos os seguintes resultados.

Em relação ao número de micronúcleos, a frequência ocorreu em 22 (73,3%) dos pacientes, sendo em número variados para cada caso, chegando um só indivíduo a apresentar 34 MN (tabela 2).

Quanto as irregularidades nucleares evidenciou-se que 27 (90%) dos casos apresentavam contorno irregular (tabela

1a 3), 17 (56,7%) binucleação com ponte (tabela 4), 17 (56,7%) folha de trevo (tabela 5) e 18 (60%) apêndice (tabela 6). Apesar da frequência da BN e a FT coincidirem em percentual nos 30 casos, o número de BN por lâmina foi bem maior.

Nas tabelas de associações em que empregamos o Teste Qui-quadrado, e quando este não foi possível, o Teste Exato de Fischer, optou-se pela existência de correlação quando $p < 0,05$. Nas comparações: linfoma/idade, linfoma/tratamento, linfoma/hábito de fumar, MN/tipo de linfoma, micronúcleo/idade, micronúcleo/sexo, micronúcleo/tratamento, MN/hábito de fumar, irregularidades nucleares/idade, irregularidades nucleares/sexo, irregularidades nucleares/tratamento, irregularidades nucleares/hábito de fumar (tabelas 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) encontramos $p > 0,05$ não representando significância pela análise estatística. Na tabela 14, onde relacionamos linfoma/sexo, obtivemos $p < 0,05$.

TABELA 2 - Distribuição de frequência do número de micronúcleos em 30 lâminas de pacientes com linfomas.

Micronúcleos	Frequência	%
0	8	26,7
1 — 5	13	43,3
6 — 10	4	13,3
11 — 15	4	13,3
16 — 20	0	0,0
21 — 25	0	0,0
26 — 30	0	0,0
31 — 34	1	3,4
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 3 - Distribuição de frequência do número de contornos irregulares em 30 lâminas de pacientes com linfomas.

Contorno Irregular	Frequência	%
0	3	10,0
1 — 10	16	53,4
11 — 20	7	23,3
21 — 30	2	6,7
31 — 40	1	3,3
41 — 50	1	3,3
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 4 - Distribuição de frequência do número de binucleação com ponte em 30 lâminas de pacientes com linfomas.

Binucleação com Ponte	Frequência	%
0	13	43,3
1 — 4	10	33,3
5 — 8	3	10,0
9 — 12	2	6,7
13 — 16	2	6,7
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 5 - Distribuição de freqüência do número de folhas de trevo em 30 lâminas de pacientes com linfomas.

Folha de Trevo	Freqüência	%
0	13	43,4
1 — 3	12	40,0
4 — 6	1	3,3
7 — 9	1	3,3
10 — 12	2	6,7
13 — 15	1	3,3
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 6 - Distribuição de freqüência do número de apêndice em 30 lâminas de pacientes com linfomas.

Apêndice	Freqüência	%
0	12	40,0
1 — 3	11	36,7
4 — 6	4	13,4
7 — 9	1	3,3
10 — 12	1	3,3
13 — 15	1	3,3
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 7 - Distribuição de freqüência das lâminas de medula óssea usadas como controle.

Controle	Irregularidades Nucleares				
	MN	CI	BN	FT	AP
1	1	0	0	0	0
2	0	2	0	0	1
3	0	0	0	0	0
4	1	1	0	0	1
5	0	0	1	0	0
TOTAL	2	3	1	0	2

MN: micronúcleo, CI: contorno irregular, BN: binucleação com ponte, FT: folha de trevo, AP: apêndice.

TABELA 8 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfomas de acordo com a idade (anos).

Idade	Freqüência	%
< 10	1	3,3
10 ┤ 20	6	20,0
20 ┤ 30	6	20,0
30 ┤ 40	3	10,0
40 ┤ 50	7	23,3
50 ┤ 60	3	10,0
60 ┤ 70	4	13,4
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 9 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfomas de acordo com o sexo.

Sexo	Freqüência	%
Masculino	20	66,7
Feminino	10	33,3
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 10 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfomas de acordo com os tratados e não tratados.

Pacientes	Freqüência	%
Tratados	16	53,3
Não tratados	14	46,7
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

nesta período (10 anos) só encontramos 30 no de linfomas?

TABELA 11 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfomas de acordo com fumantes e não fumantes.

Pacientes	Freqüência	%
Fumantes	12	40,0
Não fumantes	18	60,0
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

Deu-se res dos 100 tabuletes

TABELA 12 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes de acordo com o tipo de linfoma.

Tipo	Freqüência	%
LH	13	43,3
LNH	17	56,7
TOTAL	30	100,0

FONTE: HUWC.

Abril de 1984 a Fevereiro de 1993.

TABELA 13 - Distribuição de frequência de 30 pacientes de acordo com o tipo de linfoma e a faixa etária.

Idade	Linfoma	LH	LNH	Total
≤ 35		7	9	16
> 35		6	8	14
TOTAL		13	17	30

$$\chi^2 = 0,00242 \text{ (Teste do Qui-quadrado)} \quad p > 0,05$$

TABELA 14 - Distribuição de frequência de 30 pacientes de acordo com o tipo de linfoma e o sexo.

Sexo	Linfoma	LH	LNH	Total
Masculino		6	14	20
Feminino		7	3	10
TOTAL		13	17	30

$$\chi^2 = 4,344 \text{ (Teste do Qui-quadrado)} \quad p < 0,05$$

TABELA 15 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes de acordo com o tipo de linfoma tratados e não tratados.

Tratamento \ Linfoma			
	LH	LNH	Total
Tratados	7	9	16
Não tratados	6	8	14
TOTAL	13	17	30

$\chi^2 = 0,00242$ (Teste do Qui-quadrado)

$p > 0,05$

TABELA 16 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes de acordo com o tipo de linfoma de fumantes e não-fumantes.

Hábito de fumar \ Linfoma			
	LH	LNH	Total
Fumantes	5	7	12
Não fumantes	8	10	18
TOTAL	13	17	30

$\chi^2 = 0,0226$ (Teste do Qui-quadrado)

$p > 0,08$

TABELA 17 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfomas de acordo com o tipo de linfoma e apresentarem micronúcleos ou não.

Tipo de Linfoma	Micronúcleo	Sim	Não	Total
LH		10	3	13
LNH		12	5	17
TOTAL		22	8	30

$p > 0,05$ (Teste Exato de Fischer)

TABELA 18 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfoma de acordo com a faixa etária e apresentarem micronúcleo ou não.

Idade	Micronúcleo	Sim	Não	Total
≤ 35		13	3	16
> 35		9	5	14
TOTAL		22	8	30

$p > 0,08$ (Teste Exato de Fischer)

TABELA 19 - Distribuição de frequência de 30 pacientes com linfoma de acordo com o sexo e apresentarem micronúcleo ou não.

Sexo	Micronúcleo	Sim	Não	Total
Masculino		15	5	20
Feminino		7	3	10
TOTAL		22	8	30

$\chi^2 = 0,085$ (Teste do Qui-quadrado)

$p > 0,05$

TABELA 20 - Distribuição de frequência de 30 pacientes com linfoma de acordo e apresentarem micronúcleos e serem ou não tratados.

Tratamento	Micronúcleo	Sim	Não	Total
Tratados		12	4	16
Não tratados		10	4	14
TOTAL		22	8	30

$p > 0,05$ (Teste Exato de Fischer)

TABELA 21 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfoma de acordo com apresentarem micronúcleos e serem ou não fumantes.

Hábito de fumar	Micronúcleo	Sim	Não	Total
Fumante		8	4	12
Não fumante		14	4	18
TOTAL		22	8	30

$p > 0,05$ (Teste Exato de Fischer)

TABELA 22 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfoma de acordo com a presença de pelo menos uma irregularidade nuclear e a faixa etária.

Idade	Irregularidades nucleares	Sim	Não	Total
≤ 35		15	1	16
> 35		12	2	14
TOTAL		27	3	30

$p > 0,05$ (Teste Exato de Fischer)

TABELA 23 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfoma de acordo com a presença de pelo menos uma irregularidade nuclear e o sexo.

Sexo	Irregularidades nucleares	Sim	Não	Total
Masculino		18	2	20
Feminino		9	1	10
TOTAL		27	3	30

$p > 0,05$ (Teste Exato de Fischer)

TABELA 24 - Distribuição de freqüência de 30 pacientes com linfoma de acordo com a presença de pelo menos uma irregularidade nuclear e serem ou não tratados.

Tratamento	Irregularidades nucleares	Sim	Não	Total
Tratado		13	3	16
Não tratado		14	0	14
TOTAL		27	3	30

$p > 0,05$ (Teste Exato de Fischer)

TABELA 25 - Distribuição de frequência de 30 pacientes com linfoma de acordo com a presença de pelo menos uma irregularidade nuclear e serem ou não fumantes.

Hábito de fumar	Irregularidades nucleares	Sim	Não	Total
Fumante		9	3	12
Não fumante		18	0	18
TOTAL		27	3	30

$p > 0,05$ (Teste Exato de Fischer)

4 - DISCUSSÃO

Realizamos a avaliação das alterações morfológicas do material nuclear em eritroblastos de medula óssea de pacientes com linfomas, por estes poderem apresentar estados dieritropoiéticos, as vezes com hiper celularidade da série eritróide.

As características morfológicas pesquisadas, micronúcleo e irregularidades nucleares, são conhecidas de longa data. O micronúcleo observado nos eritrócitos policromatófilos é também chamado de corpúsculo de Howel-Jolly, a origem do mesmo tem sido explicada de forma até fantasiosa.(35)

Em nossa análise foi observado que o micronúcleo(MN) é muito parecido, isto é, apresenta a mesma forma e coloração do núcleo normal, diferindo apenas pelo tamanho, e que o MN é distinguido das outras estruturas por não apresentarem birrefringência.

As amostras estudadas neste trabalho não foram obtidas especificamente para este fim e sim de pacientes com diagnóstico de linfoma da HUWC. Escolheu-se esta patologia por não termos encontrados na literatura nenhuma análise quantitativa desse assunto, sendo os linfomas uma importante doença hematológica.

Micronúcleos (MN)

Estes variaram em frequência de 0 (zero) a 34MN por indivíduo (tabela 2) ocorrendo em 22 (73,3%) dos 30 pacientes analisados, mostrando ser depois do contorno irregular (CI) a alteração nuclear mais presente, sendo o LH a apresentar maior número, 84MN em 13 casos contra 71MN em 17 dos LNH.

Apesar das tabelas associativas: MN/idade, MN/sexo, MN/tratamento, MN/hábito de fumar não apresentarem resulta

dos estatísticos significativos. Observou-se que os fumantes e os tratados possuem maior número de MN por lâmina.

As irregularidades nucleares: contorno irregular (CI), binucleação com ponte (BN), folha de trevo (FT) e apêndice (AP), em geral foram mais frequentes nos linfomas não Hodgkin do que nos de Hodgkin, nos não fumantes do que nos fumantes e não tratados do que tratados, ao contrário do que ocorreu com os micronúcleos.

Tipos de irregularidades nucleares.

Não fizemos uma tabela de associação entre irregularidades nucleares e o tipo de linfoma, devido ao fato de todos os pacientes apresentarem pelo menos uma irregularidade nuclear. Mas constatamos que o contorno irregular (CI) é a alteração mais frequente e que os linfomas não Hodgkin apresentam maior repetição nas irregularidades do que os de Hodgkin:

CI - 27 (90%) dos casos -	LH - 36,7%
	LNH - 53,3%
BN - 17 (56,7%) dos casos -	LH - 26,7%
	LNH - 30,0%
FT - 17 (56,7%) dos casos -	LH - 23,3%
	LNH - 33,4%
AP - 18 (60%) dos casos -	LH - 23,3%
	LNH - 36,7%

As modificações nucleares do tipo folha de trevo aparecem em pequeno número indicando uma diferença qualitativa importante, pois não a encontramos no grupo controle; possibilitando até mesmo associar a presença dessa anomalia em eritroblastos como indicativa de diseritropoiese. Esta alteração coincidiu em percentual de frequência com a binucleação com ponte (BN), só que o número de BN foi bem maior por paciente.

A presença de irregularidade tipo apêndice ocorreu em 18 (60%) dos 30 casos e nos dois tipos de linfomas, incluindo o grupo controle.

Correlações.

Analisando estatisticamente as associações entre os tipos de linfoma, micronúcleo e irregularidades nucleares com as variáveis: idade, sexo, tratados, e não tratados, fumantes e não fumantes, (tabelas: 8, 9, 10, 11) percebe-se pelos testes empregados haver pouca correlação, exceto na associação linfoma/sexo, em que, pelo teste do qui-quadrado foi de $p < 0,05$, o que correlaciona de forma significativa. Deve-se ter a avaliação dessas associações como meramente experimental, sendo útil para revelar possíveis aspectos interessantes que merecem uma análise mais aprimorada em futuros trabalhos prospectivos.

5 - CONCLUSÃO

Observamos na nossa avaliação a presença de micro-núcleos e irregularidades nucleares em eritroblastos de medula óssea de pacientes com diagnóstico de linfoma.

Evidenciamos o aparecimento de micronúcleos em 22 (73,3%) e em relação as irregularidades nucleares todos os indivíduos apresentaram pelo menos um tipo de alteração, 30 (100%) dos casos, sendo o contorno irregular (CI) a mais freqüente.

Pelas análises estatísticas encontramos associação $p < 0,05$ apenas na correlação linfoma/sexo.

Em uma avaliação conjunta das amostras concluímos que os dois tipos de linfomas apresentaram aumentos de micro-núcleos e irregularidades nucleares em eritroblastos de medula óssea, ainda que, nem sempre significativas. Porém não é este ocorrido inesperado e sim de acordo com a previsto em abençoar que podem apresentar estados deseritropoiéticos.

6 - SUMMARY

We realized a systematic study of thirty (30) patients with Hodgkin's linfoma and Non-Hodgkin's linfoma, proceedings of Walter Cantídio Universitarian Hospital, including the period between April-1984 and February-1993. In each person we evaluated the frequency of micronuclei and nuclear irregularities in the bone marrow, using optic microscopy with immersion 's objctive lens.

To appreciate the samples we used the following criteria; we've counted one thousand erythroblasts per slide, taking note of the nuclear changes, with the objective of study the existence of dyserythropoietics and/or mutagenics modifications in those diseases. We found out that 22 (73,3% of the thirty patientes) presented micronuclei, being twelve (12) cases (40%) of non-Hodgkin's linfoma and 10 (33,3%) of Hodgkin's linfoma.

The present work had as the main objective to verity the relation between the presence of micronuclei and nuclear irregularitics in erythroblasts of carriers' linfoma, though these modifications are related in the literature as dyserythropoietics and/or mutagenics changes.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMÁSSY, Z.; KANYAR, B.; KÖTELES, G.J. Frequency of micro nuclei in X- irradiated human lymphocytes. **Inter J Rad Biol.** v. 49, n. 4, p. 718-719, Apr., 1986.
- ✓ 2. BISHUN, N.; WILLIAMS, O.; MILLS, J.; The cytogenetic effects of caffeine on two tremour cell lines. **Mut Research.** v. 26, n. 2, p. 151-155, apr., 1974.
- ✓ 3. CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenic techniques. **Mut Research.** v. 204, n. 6, p. 379-406, Jun., 1988.
- ✓ 4. DARNEL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. (Eds). Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc. New York 1986, p. 1187.
- ✓ 5. FENECH, M.; MORLEY, A.A. cytokinesis - block micronucleus method in human lymphocytes: effects of in vivo ageing and low dose X-irradiation. **Mut Research.** v. 161, n. 2, p. 193-198, July, 1986.
- ✓ 6. FENECH, M.; MORLEY, A.A. The effect of donar age on spontaneous and induced micronuclei. **Mut Research.** v. 148, n. 1 e 2, p. 99-105, Jan/Feb., 1985.
7. FOON, K.A.; TODD, R.F. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. **Blood.** v. 68, n. 1, p. 1-31, July, 1986.
- ✓ 8. GUDI, R.; SANDHY, S.S.; ATHWAL, R.S. Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes: an assay for the detection of aneuploidy-inducing agents. **Mut Research.** v. 234, n. 5, p. 263-268, Oct., 1990. ?

9. GUIMARÃES R. GUERRA C.C.C. O laboratório em Hematologia. IN - clínica e laboratório. 3^a ed. São Paulo, Sarvier, 1983. Sec. 2, p. 31-35.
- ✓ 10. HEDDLE, J.A.; CARRANO, A.V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by v-irradiation. Evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. **Mut Research**. v. 44, n. 1. p. 63-69, July, 1977.
- ✓ 11. HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MAC GREGOR; J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE; M.F. The induced of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the V.S. environmental: protection agency gene-tox program. **Mut Research**. v. 123, n. 1, p. 61-117, Sept. 1983.
- ✓ 12. HERNANDEZ-VERDUN, D.; BOUTEILLE, M.; EGE, T.; RINGERTZ, N.R. fine structure of nucleoli in micronucleated cells. **Exp Cell Research**. v. 124, n. 2, p. 223-235, Dec., 1979.
- ✓ 13. HÖGSTEDT, B.; GULLBERG, B.; HEDNERK, K.; KOLNIG, A. M.; MITELMAN, F.; SKERFVING, S.; WIDEGREN, B. Chromosome aberrations and micronuclei in the bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes in human exposed to ethylene oxide. **Hereditas**. v. 98, n. 3, p. 106-113, 1983.
- ✓ 14. HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mut Research**. v. 111, n. 2, p. 185-193, Oct., 1983.
15. JAMRA, M.; LORENZI, T.F. Leucócitos, Leucemias e Linfomas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1983. p. 170-223.
- ✓ 16. JENSEN, M.K.; NYFORS~ A. Cytogenetic effect of methotrexate on human cells in vivo. **Mut Research**. v. 64, n. 5, p. 293-362, Oct., 1979.

- ✓ 17. KARMOS, C.; KOTELES, G.J. Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. Mut Research. v. 199, n. 1, p. 31-35. May, 1988.
- ✓ 18. LABIDI, B.; BRODERS, F.; MEYER, J.L.; HERNANDEZ-VERDUN. Distribution of DNA and 28S, 18S and 5S r RNA in micronuclei containing a single chromosome. **Biochem Cell Biol**, v. 68, n. 6, p. 957-964. June., 1990.
- ✓ 19. LESTER, E.P.; JOHN, E.V. Lymphoma. in: WILLIAM, J.W. et al. **Hematology**. 4. ed. U.S.A.: international edition, 1991. cap. 118, p. 1067-1089.
- ✓ 20. LORENZI, T.F. Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica. São Paulo: Medsi, 1992, p. 348-375.
- ✓ 21. MIALE, J.B. Laboratory Medicine Hematology Saint Louis: Mosby Co. 1982, p. 1084.
22. MIGLIORE, L.; BARALE, R.; BELLOVOMINI, D.; COGNETTI, A. G.; LOPRIENO, N. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by adriamycin and vincristine: comparison between micronucleus and chromosomal aberrations assays **Toxic in Vitro**. v. 1, p. 247-254. May., 1987.
- ✓ 23. MIGLIORE, L.; CUIDOTT, P.; FAVRE, C.; NARDI, M.; SESSA, M.R.; BRUNORI, E. Micronuclei in lymphocytes of young patients under anti leukemic therapy. **Mut Research**. v. 263, n. 4, p. 243-248. Aug., 1991.
- ✓ 24. NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE. A nordic data base on somatic chromosome damage in humans. **Mut Research**. v. 241, p. 325-337, 1990. *some*
25. OLIVEIRA, H.P. Hematologia Clínica. 8ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 1990. p. 377-401.
26. PERRY, P.; WOLFF, S. New gremsa method for differential staining of sister chromatids. **Nature** (London). v. 252, p. 156-158. 1974.

27. PINCU, M.; BASS, D.; NORMAN, A. An improved micronuclear assay in lymphocytes. **Mut Research**. v. 139, n. 2, p. 61-65, Feb., 1984.
28. PROSSER, J.S.; MOQUET, J.E.; LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. **Mut Research**. v. 199, n. 1, p. 37-45, may., 1988.
29. RONALD, H.; BENZ, E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIC, B.; COHEN, H.J. Hematology basic principles and practice. States Uniteds of American. Churchill Livingstone, 1991, p. 911-989.
30. ROWLEY, J.D. Biological implicatons of consistent chromosome rearrangements in leukemia e lymphoma. **Cancer Research**. v. 44, p. 3159-3168., 1984.
31. SARTO, F.; TOMANIN, R.; GIACOMELLI, L.; CANOVA, A.; RAIMOND, F.; CHIOTTO, C.; FIORENTINO, M.V. Evaliation of chronrosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antitlastic therapy. **Mut Research**. v. 50, n. 16, p. 5049-5054, Aug. 1990.
- ✓ 32. SCHMID, W. The micronucleres test for cytogenetic analyses in: Hollander A (ed). Chemical mutagens. v. 8. plenum, New York. 1976, p. 31-53.
- ✓ 33. SMITH, D.F.; MACGREGOR, J.T.; HIATT, R.A. Micronucleated erythrocytes as an index of cytogenetic damage in humans: demographic and dietary factores associated with micronucleated erythrocytes in splenectomized subjects. **Cancer Research**. v. 50, n. 16, p. 5049-505. Aug. 1990.
- ✓ 34. STENSTRAND, K. Effects of ionising radiations on chromosome aberrations systes chromatid exchanges and micro nuclei in lymphocytes of smokers and non-smokers. **Hereditas**. v. 102. p. 71-76. 1985.

- ✓ 35. TEERENHOVI, L.; LINTULA, R.; RUUTU, T. KNUUTILA, S. Correlation between bone marrow karyotype and the occurrence of erythroblast micronuclei and nuclear budding in patients with myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol.** v. 39, p. 237-240, 1987.
36. TRAINOR, K.J.; WIGMORE, D.; CHRYSOSTOMOU, A.; DEMPSEY, J.; SESHADRI, R.; MORLEY, A.A. Mutation frequency in human lymphocytes increases with age. **mech. age. Develop.** v. 19, p. 325-33, 1984.
37. TROMANIN, R.; HÖGSTEDT, B.; GULLBERG, B. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. **Mutagenesis.** v. 6, n. 2, p. 123-126, Mar., 1991.
38. TUCKER, M.A.; COLEMAN, C.N.; COX, R.S.; VAGHESE, A.; ROSENBERG, S.A. Risk of second cancers after treatment for hodgkin's disease. **New Eng J Med.** v. 318, n. 2, p. 76-81. Jan. 1988.
- ✓ 39. YAGER, J.W.; EASTMOND, D.A.; ROBERTSON, M.L.; PARADISIN, W.M.; SMITH, M.T. Chracterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. **Cancer Research.** v. 50, n. 2, p. 393-399. Jan., 1990.
- ✓ 40. YAMAMOTO, K.I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mut Research.** v. 71, p. 127-131., 1980.
- ✓ 41. YAMAMOTO, K.I.; YASUMOTO, K. Studies on micronuclei time reponse and the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei. **Mut Research.** v. 90, p. 163-173, 1981.

- Apresentação - boa
- Português - bom
- Conteúdo científico - terminou de confundindo num tema que temia tudo pra ser ótimo, até o ineditismo.

1) LNH e DH são 2 entidades distintas que não podem ser analisadas juntas;

2) pequeno n° de casos para um período de 10 anos de análise;

3) por que não citou o trabalho do Thor? A Yânia tem esta tese.

4) discussões fracas!

- Conclusão - como está não dá pra publicar!

Nota - 8,5 (oitó e meio)

Miskid

11. APRESENTAÇÃO BIBLICA - Boa

12. REDAÇÃO E APRESENTAÇÃO DO
TEMA - Boa -

13. PORTE CIENTÍFICA -

com muitas falhas sendo a
principal a mistura de ΔH
com LNH - que são coisas
de comportamento bem diferentes
Algumas tabelas fora do local
Deveria ter uma lista de
de abreviações

14. REFERÊNCIAS - Vários erros
bibliográficos, muitos faltando
no texto -

conclusão 9 (more)
glad