

Estudos citogenéticos e de resposta à fito-hemaglutinina em cultura de linfócitos do sangue periférico de paciente portadora de linfoma maligno não-Hodgkin e de sua irmã gêmea fraterna

LEONOR DENARO-MACHADO¹, ALFREDO ABRÃO²,
JESUS CARLOS MACHADO³, RAFAEL ABRÃO POSSIK⁴

Unitermos: Linfócitos. Linfoma — Não-Hodgkin. Citogenética

Key words: Lymphocytes. Lymphoma — Non-Hodgkin's. Cytogenetics

RESUMO — Culturas de linfócitos do sangue periférico de paciente portadora de linfoma não-Hodgkin e de sua gêmea fraterna clinicamente normal foram realizadas, para estudos citogenéticos e de resposta à PHA. Na cultura da paciente foram encontradas anomalias cromossômicas, numéricas e estruturais, sugerindo que importantes alterações estão em franco processamento. Embora a cultura tenha ainda mostrado comportamento bastante peculiar e sugestivo de alto metabolismo das células, o índice mitótico obtido foi baixo em relação à cultura controle, enquanto que o índice de blastos transformados pela PHA foi mais elevado. Fato a se notar, tanto na cultura da paciente quanto na de seu controle — gêmea fraterna —, foi a forte associação entre cromossomos satelitados.

INTRODUÇÃO

Citogeneticamente, os linfomas não-Hodgkin constituem um grupo bastante homogêneo, com variações cariotípicas numéricas ocorrendo ao redor do número diplóide normal, sendo freqüente a pseudodiploidia e a ocorrência de cromossomos marcadores. A poliploidia, quando ocorre, não ultrapassa a quadruplicação do número haplóide da espécie humana.

Com relação à resposta à fito-hemaglutinina (PHA) nesses casos de linfomas, há divergências de opiniões. Papac⁽¹⁾ relata, para os então chamados reticulossarcomas,

uma resposta deprimida dos linfócitos periféricos frente ao estímulo da PHA, enquanto Elves⁽⁶⁾ não havia encontrado tal resposta. Para os então chamados linfossarcomas, as opiniões também são divergentes^(1,7,11,15). Na realidade, essas divergências de achados talvez possam ser devidas, em parte, ao fato de que, no início do curso da doença, a imunidade celular do paciente portador desses linfomas malignos ainda esteja intacta.

Modelos biológicos ideais de estudo, tais como o são gêmeos univitelínicos, serviram muitas vezes para solucionar problemas em diversas áreas médicas. Citemos, por exemplo, a demonstração de que o cromossomo Ph1 da leucemia mielóide crônica era uma anomalia adquirida e não constitucional, através do estudo em gêmeos monozióticos, em que um era leucêmico e o outro não⁽³⁾.

O presente trabalho tem como propósito um modelo quase ideal de estudo; por se tratarem de 2 gêmeas frater-nas, uma delas tendo desenvolvido um linfoma maligno não-Hodgkin e a outra parecendo, até o momento, clinicamente normal. Relata, este estudo, o exame dos linfócitos do sangue periférico, dos pontos de vista citogenético e de transformação blástica pela PHA, tendo servido, a gêmea normal, como controle da paciente portadora do linfoma.

Trabalho realizado na Seção de Anatomia Patológica da Divisão de Patologia do Instituto Butantã, em colaboração com o Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente, com auxílio do CNPq e FEDIB. Recebido em 3.6.85. Aprovado para publicação em 4.10.85.

1. Chefe da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantã.
2. Diretor do Departamento de Cirurgia Abdominal do Hospital A.C. Camargo — Fundação Antônio Prudente, São Paulo; SP.
3. Diretor da Divisão de Patologia do Instituto Butantã e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo — Fundação Antônio Prudente.
4. Titular do Departamento de Cirurgia Abdominal do Hospital A.C. Camargo — Fundação Antônio Prudente.

MATERIAL E MÉTODOS

A paciente estudada, L.N.S., sexo feminino, 6 anos de idade, registro 76.8724, era procedente do Hospital A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente.

O diagnóstico anatomopatológico de linfoma difuso bem diferenciado (classificação de Rappaport) foi realizado no Departamento de Anatomia Patológica daquele Hospital, não tendo sido possível uma posterior reclassificação do caso dentro dos moldes de novas classificações dos linfomas não-Hodgkin, em vigência (classificação de Kiel).

Para as análises citogenética e de transformação blástica a que nos propusemos, sangue venoso foi colhido assepticamente, em seringa heparinizada, para o preparo das culturas temporárias de linfócitos, de acordo com a técnica de Moorhead *et al.* ⁽¹⁰⁾, com modificações.

A própria gêmea fraterna da paciente serviu como controle.

As melhores metáfases foram desenhadas ao microscópio e selecionadas para fotografia e montagem dos cariótipos, com base na "London Conference" ⁽⁹⁾. A nomenclatura adotada seguiu as recomendações da "Paris Conference" ⁽¹²⁾.

Para os estudos de transformação blástica por resposta à PHA, estimamos a percentagem relativa de núcleos inativos e dos ativados por aquela substância, após 72 horas de cultivo.

Essa estimativa foi feita pela contagem das células em 50 campos previamente delimitados ao acaso, sem auxílio do microscópio, e distribuídos entre duas lâminas.

Para cada campo analisado, foi determinado o número de mitoses (M), o número de células blásticas (CB) e o número de núcleos inativos (NI). O total geral (TG), em cada caso, corresponde à somatória de todos os estágios celulares nos 50 campos analisados, sendo os resultados expressos como percentagem desse total.

RESULTADOS

Ao cabo de aproximadamente 24 horas de cultivo, o meio de cultura dos frascos que continham linfócitos de L.N.S. apresentou violenta acidificação, evidenciada pela cor amarelo-limão, similarmente ao que ocorre durante os processos de contaminação bacteriana, o mesmo não tendo acontecido com os frascos-controle. No entanto, culturas em meios de tioglicolato e Saboureaud apresentaram-se negativas.

De fato, passadas as 72 horas de cultivo, verificou-se que essas culturas não estavam contaminadas, mas suas células deviam estar apresentando metabolismo elevado.

Surpreendentemente, o número de mitoses nos frascos de L.N.S. também não excedia ao de uma cultura rotineira.

A análise citogenética de L.N.S. revelou grande gama de alterações cromossômicas, perfazendo um total de 36 células anômalas, como mostra a tabela 1.

Hipodiploidia foi evidenciada em 12% das células analisadas, constituída por perdas não preferenciais, enquanto que, na cultura controle, a hipodiploidia foi bem menos freqüente (3%).

Uma classe de células representativa na cultura de linfócitos da paciente L.N.S. foi a pseudodiploidia, possivelmente decorrente da associação entre cromossomos acrocêntricos dos grupos D e G, resultando na formação de cromossomos meta e submetacêntricos. Essa importância não se deve ao seu valor quantitativo (3,33%), mas ao seu significado biológico, uma vez que foi um evento repetitivo na cultura controle, o que pode talvez evidenciar uma predisposição familiar à associação entre cromossomos acrocêntricos.

Uma das células analisadas na cultura da paciente L.N.S. apresentou uma figura quadrirradial de recombinação cromatídica, envolvendo dois cromossomos cujos grupos não nos foi possível determinar pela técnica rotineira (fig. 1). Tal fato mostra-nos a evidente ocorrência de rearranjos cromossômicos em processamento, nos linfócitos de sangue dessa paciente. Isso é reforçado pela ocorrência de pseudodiploidia, encontrada em uma célula onde havia ganho de um elemento dos pares 3, G e B, perda de dois elementos do grupo C, um do grupo D, além de terem sido

TABELA 1
Percentagens de células citogeneticamente normais e anômalas na cultura de sangue periférico da paciente L.N.S. e seu controle (gêmea fraterna)

Indivíduos	Tipo de células (%)	
	Normais	Anômalas
Paciente L.N.S.	(64,44)	(35,56)
Controle	(78,13)	(21,87)

TABELA 2
Percentagem de estágios morfofisiológicos dos linfócitos nas culturas da paciente e seu controle, como resposta ao estímulo da PHA

Indivíduos	Estágios celulares					
	M	CB	TrB1	NI	TG	X ²
L.N.S.	2,79	80,45	83,24	16,76	179	0,0932
Controle	13,77	70,66	84,43	15,57	167	

evidenciados dois centrômeros num dos elementos do par 2. Note-se, porém, que a indicação dos grupos cromossômicos envolvidos foi feita apenas com base em sua morfologia grosseira, observada ao microscópio comum e sem o emprego de técnicas especiais.

Anomalias estruturais, do tipo de falhas e quebras também ocorreram, afetando grupos cromossômicos ao acaso.

A presença de hiperdiploidia corroborou a ocorrência de não-disjunções ao acaso. Uma das células classificada como hiperdiploide apresentava, ao lado de um cariótipo normal, dois elementos aparentemente unifilamentosos extras, de tamanhos distintos, situados na parte mais central da placa metafásica (fig. 2). Noutra célula hiperdiploide, com 52 cromossomos, ao lado de elementos extras com morfologia comparável à dos elementos normais do cariótipo, apareceu um cromossomo acrocêntrico, não comparável aos dos grupos D ou G.

As diferenças entre o número de células normais e anômalas presentes nas culturas da paciente e seu respectivo controle não se mostraram estatisticamente significantes ($X_0^2 = 2,1260$; $X_c^2 = 3,841$; $gl = 1 \alpha 5\%$).

Urgia verificar, no entanto, se a gêmea clinicamente normal era também cromossomicamente normal. Para tanto, foi aplicado o teste estatístico da Razão de Verossimilhança entre os resultados citogenéticos desse controle e de vários outros controles, podendo-se afirmar, com 95% de segurança, que essa gêmea é também cromossomicamente normal.

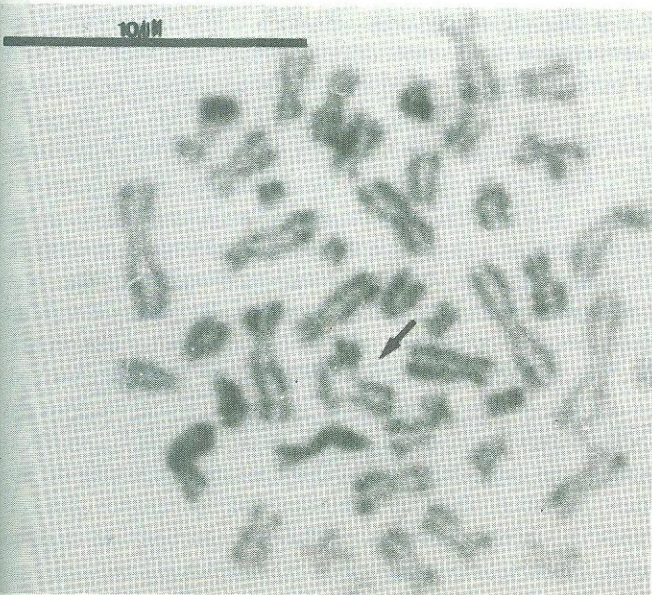


Fig. 1 — Cultura de linfócitos do sangue periférico da paciente L.N.S. Metáfase em que se evidencia figura quadrirradianal de recombinação cromatídica.

No que tange à análise e contagem dos estágios morfofisiológicos dos linfócitos nessas culturas, procuramos distinguir células em mitose (M), células em estágio de blastos (CB) e núcleos não ativados pela PHA (NI); a classe TrBl corresponde à somatória das classes M e CB. Os resultados são os que constam na tabela 2.

DISCUSSÃO

Citogeneticamente, a paciente L.N.S. apresentou bizarras anomalias cromossômicas, embora a frequência de células aberrantes não se revelasse estatisticamente significativa em relação ao seu controle. No entanto, o controle da paciente L.N.S. foi uma cultura de linfócitos periféricos de sua gêmea fraterna, até então sem qualquer alteração clínica. É bem verdade que os achados citogenéticos nessa gêmea clinicamente normal foram estatisticamente comparados aos de outros indivíduos normais, podendo-se afirmar, com 95% de segurança, que ela era também citogeneticamente normal.

Os tipos de anomalias na cultura referente à paciente L.N.S. sugerem que alterações cromossômicas estão em franco processamento em células linfóides do sangue periférico. Essas anomalias incluíram a ocorrência de alterações numéricas, acarretando perda e excesso de grupos cromossômicos, ao acaso. As perdas cromossômicas, presentes em 12% das células analisadas, poderiam ser atribuídas como decorrentes de erros divisionais, ou como resultado de uma maior fragilidade dessas células, durante



Fig. 2 — Cultura de linfócitos do sangue periférico da paciente L.N.S. Metáfase em que se evidenciam dois elementos unifilamentosos, extras ao cariótipo normal.

a preparação citológica. Embora excessos cromossômicos pudessem ser explicados de maneira lógica e normal pela simples ocorrência de erros divisionais, este não é o caso diante dos fatos ocorridos. Assim, numa das células, os elementos extras eram filamentos, assemelhando-se a cromossomos profásicos, de tamanhos diversos. Fato semelhante foi anteriormente descrito em pacientes cancerosos^(4,5). Tais elementos apareciam ao lado de um cariótipo absolutamente normal e, por se situarem entre os demais cromossomos da placa metafásica e não na periferia celular, não podemos admitir que sejam elementos pertencentes a uma célula vizinha, em fases mitóticas anteriores à metáfase que, devido à hipotonização e preparo das lâminas, tivessem adentrado na célula em estudo. Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade de estarem esses elementos opostos à membrana celular e, dessa forma, aparecerem como artefatos de técnica, embora esta última hipótese não ganhe corpo, desde que já observamos tal fenômeno em outros casos; sua repetição seria estranhamente coincidente.

A outra célula hiperdiploide, contendo 52 cromossomos, também não pode ser explicada somente pela ocorrência de simples erros divisionais, em vista de os elementos acrocêntricos extras mostrarem morfologia e tamanho não comparáveis aos dos elementos normais ao cariótipo. Teríamos, nesse caso, que admitir a ocorrência de eventos mais complexos, tais como translocação de fragmentos de um cromossomo D ou G, formando-se assim um cromossomo maior; ou inversão pericêntrica de um dos braços de um cromossomo B ou C; ou deleção de um braço de um cromossomo A, B ou C; ou mesmo incorporação de um cromossomo inteiramente novo, de origem discutível. Tais eventos poderiam suceder ou preceder fenômenos de não disjunção, que conduziram a essa hiperaneuploidia.

A observação desses novos elementos neste caso pode ser compreendida em vista das demais anomalias cromossômicas presentes no estudo citogenético dessa paciente; consistiram de quebras e rearranjos cromossômicos, aparecimento de figuras quadrirradiais que lembram a ocorrência de recombinações cromatídicas e pseudodiploidia. Ainda, fato que chamou atenção, não pelo seu significado quantitativo, mas sim qualitativo, foi a constante ocorrência de associações centroméricas entre cromossomos acrocêntricos, com a conseqüente formação de elementos de centrômero mediano ou submediano, propiciando o aparecimento de células pseudo-hipodiploides. Tal fato tomou força ainda maior ao ser observada em uma célula da cultura controle, o que nos fez pensar em uma predisposição familiar à associação entre cromossomos acrocêntricos, mais do que uma decorrência do processo mórbido, uma vez que a gêmea controle não apresentou qualquer

alteração clínica, indicativa de um desenvolvimento neoplásico. Wisniewski & Korsak⁽¹⁶⁾ também descreveram associações de cromossomos satelitados dos grupos D e G, num caso de linfossarcoma.

As anomalias cromossômicas presentes em linfócitos do sangue periférico neste caso de linfoma são concordantes com os achados de Wisniewski & Korsak⁽¹⁶⁾, que descrevem aneuploidias, pseudodiploidia e cromossomos marcadores em cultura de linfócitos de um paciente também portador de linfossarcoma.

Concordam também com achados em gânglios linfáticos, onde a variação cromossômica se dá ao redor da diploidia. Discordam, outrossim, com outros relatos^(2,13,14), que não constatarem anomalias cromossômicas em linfócitos do sangue periférico.

Analizadas do ponto de vista da transformação blástica por ação de PHA, a cultura de linfócitos da paciente L.N.S. apresentou um comportamento bastante peculiar, com alto metabolismo dessas células, a ponto de baixarem visivelmente o pH do meio de cultura, nas primeiras 24 horas.

Apesar dessa alta atividade metabólica das células, de comportamento diferente do da cultura controle, tal fato não implicou, no entanto, no achado de um índice mitótico mais elevado; pelo contrário, esse índice mitótico foi bem mais baixo que aquele da cultura controle (2,79% e 13,77%, respectivamente) e mesmo mais baixo do que o índice mitótico médio de outros controles (8,12%).

Entretanto, a percentagem de células blásticas superou a da cultura controle (80,45% e 70,66%, respectivamente) e em nível semelhante e inverso à indiferença entre as percentagens de mitoses. Decorrente disso, se analisarmos a classe TrB1 como um todo (CB + M), as percentagens se aproximam (83,24 e 84,43). Portanto, aplicando-se o teste estatístico entre os resultados obtidos para as classes TrB1 e NI, não há rejeição de igualdade, justamente porque a fusão das classes CB e M encobre esses valores discrepantes, normalizando-os. No entanto, se, apenas a título de comentário, a classe TrB1 fosse novamente desdobrada e os valores estatísticos analisados em separado, tais diferenças seriam reveladas. Se analisarmos agora o número total de núcleos contados nos 50 campos das lâminas referentes à cultura da paciente L.N.S., verificaremos que esse número (179) é bastante próximo do número médio de núcleos contados nos 50 campos das culturas de outros controles (163,66) e também do número total de núcleos contados nos 50 campos da cultura controle desse experimento. Tais fatos, aliados à observação da queda brusca do pH do meio de cultura nas primeiras 24 horas, poderiam ser explicados pela hipótese de uma

maior duração do período G1 dessas células, com consequente retardo para o início da divisão. Na fase de blastos, essas células poderiam apresentar uma razão de metabolismo mais intensa, o que viria a contribuir para a acidificação do meio de cultura, em virtude da taxa respiratória dessas células.

É atraente a idéia de compararmos os valores de transformação blástica encontrados na cultura de linfócitos da gêmea normal, com aqueles de outros controles. Nessa comparação podemos verificar que, enquanto a percentagem de TrB1 da gêmea controle é levemente maior que a percentagem média de TrB1 dos demais indivíduos-controle (84,43% e 82,76%, respectivamente), a percentagem de mitoses na gêmea normal (13,77%) é cerca de duas vezes maior que a percentagem média de mitoses nos demais controles, sem exceder, porém, o maior valor encontrado entre tais controles (15,87%). Preferimos, neste

caso, admitir que tais "resultados sejam decorrentes das condições em que foram realizados os experimentos".

SUMMARY

Cultures of peripheral blood lymphocytes of a patient carrier of non-Hodgkin's lymphoma and her clinically normal fraternal twin were done for studies of cytogenetics and PHA response. In the culture of the patient, numerical and structural chromosome abnormalities were found, suggesting that important alterations are occurring. Although the patient's culture has shown a peculiar behavior suggesting a high cell metabolism, the mitotic index obtained was low in relation to the control culture, while the number of blasts transformed by PHA was elevated. To note, in the patient's culture and her control — fraternal twin — was the strong association between satellite chromosomes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIRÓ, R; ASTALDI, G; MICU, D; MANDELLI, PG; RAILEUANU, I Lymphocytes of human lymph nodes in phytohaemagglutinin cell culture. *Pathol. Eur.* 2: 437-446, 1967.
2. BAKER, MC & ATKIN, NB Chromosomes in short-term cultures of lymphoid tissue from patients with reticulosis. *Br. J. Med.* (5437): 770-771, 1965.
3. BERGER, R Leucémie myéloïde chronique et chromosomes. *Rev. Eur. Clin. Biol.* 15: 1.000-1.007, 1970.
4. DENARO, L; ABRÃO, A; CAPPELLANO, RSL; MACHADO, JC; POSSIK, RA Carcinoma espinocelular de pênis e de colo de útero concomitantes em um casal: aspectos citogenéticos. In: Congresso Brasileiro de Citologia, VII. Guarujá (São Paulo), 1976, Anais, p. 177.
5. DENARO-MACHADO, L; ABRÃO, A; POSSIK, RA; CAPPELLANO, RSL; MACHADO, JC; OGATA, TRP Concomitância de carcinoma espinocelular de pênis e de colo de útero em um casal: aspectos citogenéticos. *Acta Oncol. Bras.* 3: 13-18, 1983.
6. ELVES, MW (1966) apud PAPAC, RJ Lymphocytes transformation in malignant lymphomas. *Cancer*, 26: 279-286, 1970.
7. HIRSCHHORN, K; SCHERIBMAN, RR; BACH, FH; SILTZBACK, LE "In vitro" studies of lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative disease. *Lancet*, II: 842-843, 1964.
8. KOWALEWSKI, J & ROZYNKOWA, D Behaviour of lymphocytes in culture after phytohemagglutinin stimulation in certain lymphoproliferative and reticuloproliferative diseases: II. cytological examinations of activities of succinic dehydrogenase, acid phosphatase, non-specific esterase activity and of glycogen content. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 44: 157-161, 1970.
9. LONDON CONFERENCE OF THE NORMAL HUMAN KARYOTYPE *Cytogenetics*, 2: 265-268, 1963.
10. MOORHEAD, PS; NOWELL, PC; MELLMAN, WJ; BATTIPS, DM; HUNGERFORD, DA Chromosome preparations of leukocyte cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20: 613-616, 1960.
11. PAPAC, RJ Lymphocyte transformation in malignant lymphomas. *Cancer*, 26: 279-286, 1970.
12. PARIS CONFERENCE (1971) Standardization in human cytogenetics *Birth Defects Orig. Art. Serv.* 8 N.Y., The National Foundation, 1972.
13. REEVES, BR Cytogenetics of malignant lymphomas: studies utilizing a giemsa-banding technique. *Humangenetik*, 20: 231-250, 1973.
14. TIJO, JH; MARSH, JC; WHANG, J; FREI, E Abnormal karyotype findings in bone marrow and lymph node aspirates of a patient with malignant lymphoma. *Blood*, 22: 178-190, 1963.
15. TRUBOWITZ, S; MASEK, B; DEL ROSARIO, A Lymphocyte responses to phytohemagglutinin in Hodgkin's disease, lymphatic leukemia and lymphosarcoma. *Cancer*, 19: 2.019-2.023, 1966.
16. WISNIEWSKI, L & KORSACK, E Cytogenetic analysis in two cases of lymphoma. *Cancer*, 25: 1.081-1.086, 1970.