

Neuza Filipa da Silva Ribeiro

Avaliação do conteúdo de ADN nos Linfomas Não-Hodgkin de
células B

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2008

Neuza Filipa da Silva Ribeiro

Avaliação do conteúdo de ADN nos Linfomas Não-Hodgkin de
células B

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2008

Neuza Filipa da Silva Ribeiro

Avaliação do conteúdo de ADN nos Linfomas Não-Hodgkin de
células B

“Monografia apresentada à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do
grau de licenciada em Análises Clínicas e Saúde
Pública.”

RESUMO

O presente estudo incluiu 142 casos de Linfoma Não-Hodgkin B enviados para o Serviço de Imunologia do IPO do Porto para ser realizada avaliação do conteúdo de ADN, por citometria de fluxo. As amostras foram processadas a fresco utilizando uma técnica de dupla marcação, seguindo as recomendações da reunião de consenso de 1993, sobre a utilidade clínica do conteúdo de ADN em neoplasias hematológicas. No presente estudo verificou-se a presença de 52,8% de diplóides e 47,2% de aneuplóides, o índice de ADN variou entre 0,98 e 2,49, tendo um valor médio de 1,13 e um valor mediano de 1,02, e a fracção de células em fase S variou entre 0,01 e 46,70, tendo revelado um valor médio de 4,50 e um valor mediano de 1,30.

Dos 142 casos iniciais apenas foi possível consultar os processos clínicos em 34 dos casos, cuja consulta se iniciou pelo caso com maior seguimento clínico. Verificou-se que 61,8% eram Linfomas Não-Hodgkin B de baixo grau e 38,2% eram de alto grau, tendo-se observado que os parâmetros citométricos separavam claramente estes dois grupos, em particular a fracção de células em fase S: os casos de baixo grau eram maioritariamente diplóides, enquanto que os casos de alto grau eram na grande maioria aneuplóides; a fracção de fase S nos casos de baixo grau tinha uma média de 2,68 e nos de alto grau uma média de 15,68. Quanto à sobrevivência, no grupo de baixo grau o período de seguimento não foi suficiente para se poder tirar conclusões; no grupo de alto grau apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas na ploidia de ADN, observou-se uma crescente sobrevivência desde os casos mais aneuplóides até aos diplóides de ADN. Relativamente ao índice proliferativo, verificou-se uma associação com a sobrevivência: os casos com fracção de células em fase S alta revelaram uma sobrevivência significativamente menor que os casos com fracção de células em fase S baixa.

Para se confirmar estes resultados, nomeadamente a associação entre o índice proliferativo e a sobrevivência, são necessários novos estudos com maior seguimento clínico e com maior número de doentes de forma a permitir avaliar mais correctamente o valor de prognóstico do conteúdo de ADN nos LNH-B.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais e irmã, por todo o apoio, amor e pelo incentivo incondicionais em todos os momentos da minha licenciatura e da minha vida.

Ao Mestre Carlos Palmeira, orientador desta Monografia, por todo o apoio, disponibilidade, dedicação e orientação que me forneceu.

Ao Serviço de Imunologia do IPO do Porto por todo o apoio prestado durante a realização deste trabalho.

Ao Serviço de Hemato-Oncologia do IPO do Porto por todo o apoio prestado, nomeadamente na recolha dos dados clínicos que foram fundamentais para a realização deste estudo.

ÍNDICE

1. Introdução	2
1.1. Linfoma Não-Hodgkin	2
1.1.1 Prognóstico	5
1.2. Citometria de fluxo	6
1.3. Avaliação do conteúdo de ADN celular	6
1.3.1. Importância ou utilidade clínica da avaliação do conteúdo de ADN nos Linfomas Não-Hodgkin B	7
1.3.1.1. Ploidia de ADN	8
1.3.1.2. Índice de ADN	9
1.3.1.3. Fracção de células em fase S	10
2. Objectivos	14
3. Material e Métodos	16
4. Resultados	22
5. Discussão	45
6. Bibliografia	50
7. Estudos futuros	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento dos linfomas de acordo com o Sistema de Estadiamento Ann Arbor	4
Tabela 2. Classificação da ploidia de ADN em classes com base no Índice de ADN ...	20
Tabela 3. Classificação histológica dos casos de LNH-B estudados	26
Tabela 4. Estadiamento de acordo com a classificação de Ann Arbor nos LNH-B de baixo grau	27
Tabela 5. Estadiamento de acordo com a classificação de Ann Arbor nos LNH-B de alto grau	28
Tabela 6. Associação entre a ploidia de ADN e as variáveis clínico-patológicas nos LNH-B de baixo grau	33
Tabela 7. Associação entre a ploidia de ADN e as variáveis clínico-patológicas nos LNH-B de alto grau	35
Tabela 8. Associação entre a FFS e as restantes variáveis estudadas nos LNH-B de baixo grau	36
Tabela 9. Associação entre a FFS e as restantes variáveis estudadas nos LNH-B de alto grau	37
Tabela 10. Associação entre o grau histológico e a sobrevivência nos LNH-B	38

Tabela 11. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a sobrevivência nos LNH-B de baixo grau39

Tabela 12. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a sobrevivência nos LNH-B de alto grau40

Tabela 13. Associação entre a Fracção de células em fase S (FFS) e a sobrevivência nos casos de LNH-B de baixo e alto grau histológico43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de amostras utilizadas	22
Figura 2. Representação de um caso de LNH-B com um conteúdo de ADN tetraplóide	23
Figura 3. Distribuição dos valores do Índice de ADN (IA) nos casos estudados	24
Figura 4. Frequência das diferentes classes de ploidia de ADN observadas nos casos estudados	25
Figura 5. Distribuição da fracção de células em fase S (FFS) nos casos estudados.....	25
Figura 6. Grau histológico dos casos de LNH-B estudados	27
Figura 7. Ploidia de ADN nos casos de LNH-B de baixo grau	28
Figura 8. Ploidia de ADN nos casos de LNH-B de alto grau	29
Figura 9. Distribuição dos valores do Índice de ADN (IA) nos casos de LNH-B de baixo grau	30
Figura 10. Distribuição dos valores do Índice de ADN (IA) nos casos de LNH-B de alto grau	31
Figura 11. Distribuição da fracção de células em fase S (FFS) nos grupos de baixo e alto grau histológico	32

Figura 12. Histograma de ADN de dois casos de LNH-B	32
Figura 13. Distribuição das classes de ploidia de ADN nos diferentes estádios segundo a classificação de Ann Arbor, nos casos de LNH-B de baixo grau estudados	34
Figura 14. ..Demonstração da sobrevivência global nos casos de LNH-B de baixo e alto grau estudados	38
Figura 15. Demonstração da sobrevivência no IPI nos casos de LNH-B de alto grau estudados	40
Figura 16. Demonstração da sobrevivência na ploidia de ADN nos casos de LNH-B de baixo grau estudados	41
Figura 17. Demonstração da sobrevivência na ploidia de ADN nos casos de LNH-B de alto grau estudados	42
Figura 18. Demonstração da sobrevivência global da fracção de células em fase S (FFS) nos casos de LNH-B de alto grau estudados	43

ABREVIATURAS

LNH-B – Linfoma Não-Hodgkin de células B

MALT – Mucosa-associated lymphoid tissue

IPI – International Prognostic Index

LDH – Desidrogenase láctica

CF – Citometria de fluxo

FFS – Fração de células em fase S

IA – Índice de ADN

CV – Coeficiente de variação

FISH – Fluorescent in situ hybridization

LLC – Leucemia Linfocítica Crónica

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em 1992 realizou-se uma reunião de consenso denominada “Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Neoplastic Hematopathology”, na qual foi feita uma revisão da literatura relativamente ao valor do conteúdo de ADN em neoplasias hematológicas, entre as quais os Linfomas Não-Hodgkin. Nesta reunião foram definidas diversas recomendações para a realização de novos estudos que permitissem definir de forma mais rigorosa o valor de prognóstico do conteúdo de ADN neste grupo de linfomas. O presente estudo teve como propósito avaliar os diferentes parâmetros de conteúdo de ADN, seguindo as recomendações sugeridas pela referida reunião, e estudar a sua associação com variáveis clínico-patológicas e de prognóstico numa série de casos de Linfomas Não-Hodgkin de célula B.

1.1. LINFOMA NÃO-HODGKIN

O Linfoma é um tumor do sistema linfático, particularmente de linfócitos, no qual ocorre uma alteração num linfócito que pode originar um crescimento e proliferação da célula. Tal como todas as células tumorais, o linfócito alterado não obedece aos sinais que controlam o comportamento normal das células. Isto pode levar a que mais células alteradas cresçam, eventualmente desenvolvendo-se e tornando-se um grande aglomerado de linfócitos, que quando suficientemente grande é denominado de massa tumoral. Normalmente, o crescimento anormal dos linfócitos ocorre nos gânglios linfáticos, que depois se desenvolvem. Os linfócitos alterados podem ainda acumular-se na medula óssea, no sangue, no baço, ou noutros locais como no intestino, nos pulmões, ou no cérebro (Holman et al., 2004).

Os linfomas dividem-se em dois tipos principais: Doença de Hodgkin e Linfomas Não-Hodgkin. O tipo específico de linfoma depende da natureza dos linfócitos que deram origem à doença e o aspecto que apresentam para o patologista no momento que os analisa ao microscópio (Holman et al., 2004). Os Linfomas Não-Hodgkin podem ser linfomas de células B (LNH-B) ou de células T, conforme a respectiva célula afectada. Os LNH-B, tema de estudo da presente monografia, apresentam diferentes características celulares e manifestações clínicas, tendo em comum uma expansão clonal das células B malignas (Braylan, 1993, Harris, 2001). Para a sua distinção e caracterização, contribuem dados

clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e, em alguns casos, os achados moleculares e citogenéticos (Harris, 2001).

Os LNH-B, em termos de prognóstico, podem ser classificados em tumores “indolentes” (baixo grau) e tumores “agressivos” (alto grau). Os tumores “indolentes” geralmente crescem mais lentamente e o seu diagnóstico é feito com base na observação ao microscópio. Os linfócitos que caracterizam o tumor são normalmente pequenos e tendem a crescer em grupos circulares de células, denominados nódulos ou folículos. Alguns exemplos de LNH-B “indolentes” são o linfoma MALT, linfoma folicular de grau 1 e grau 2, linfoma linfoplasmocítico, entre outros. Embora existam vários tratamentos que podem auxiliar no controlo do linfoma, nenhum deles é capaz de o curar (Holman et al., 2004, Witzig et al., 1995). A sobrevivência esperada para esta doença é longa (Witzig et al., 1995).

Os tumores “agressivos” são os linfomas de crescimento mais rápido e, por isso o tratamento é mais urgente. Podem envolver apenas um ou dois locais aquando o diagnóstico, mas estão associados muitas vezes com sintomas eminentes (Holman et al., 2004). Apesar da gravidade é uma doença com potencial cura (Witzig et al., 1995). Um dos tipos de linfomas pertencentes a este grupo é o linfoma difuso de grandes células B, o linfoma mais comum a nível mundial (Harris, 2001).

Em Portugal, segundo dados de 2002 do Globocan, o número de novos casos de linfomas no sexo masculino foi de 622 casos e no sexo feminino foi de 533, correspondendo a uma taxa bruta de incidência de 12,9 e 10,2 por 100.000 indivíduos, respectivamente (GLOBOCAN, 2007).

Na região Norte de Portugal, e segundos dados do mesmo ano do Registo Oncológico RORENO, o número total de novos casos de Linfomas Não-Hodgkin foi de 335, dos quais 173 casos no sexo masculino e 162 casos no sexo feminino. A taxa bruta de incidência foi 11,1 e 9,7 por 100.000 indivíduos no sexo masculino e no sexo feminino, respectivamente (RORENO, 2002).

Os linfomas podem ser avaliados quanto ao estágio pelo Sistema de Estadiamento de Ann Arbor (Holman et al., 2004), que é utilizado para descrever as áreas do corpo afectadas pelo linfoma (Tabela 1). O estágio pode ser I, II, III ou IV e é dividido em A ou B dependendo se estão presentes sintomas B, como febre, suores nocturnos e perda de peso. O estágio I refere o envolvimento de um gânglio linfático; o estágio II refere dois ou mais gânglios no mesmo lado do diafragma; o estágio III há um envolvimento dos gânglios linfáticos de ambos os lados do diafragma e o estágio IV inclui o envolvimento da doença nos gânglios linfáticos e também locais como a medula óssea, o fígado, os pulmões, o intestino ou a pele. Como atrás referido, cada um dos estádios é ainda subdividido em A, se os sintomas B estiverem ausentes, ou em B se, pelo contrário, estes sintomas estiverem presentes. Em geral, o estágio B indica que o linfoma é mais agressivo (Holman et al., 2004).

Tabela 1. Estadiamento dos linfomas de acordo com o Sistema de Estadiamento Ann Arbor (adaptado de Holman et al., 2004).

Estádio	
Estádio I	Um gânglio linfático envolvido
Estádio II	Dois ou mais gânglios linfáticos no mesmo lado do diafragma
Estádio III	Gânglios linfáticos de ambos os lados do diafragma envolvidos
Estádio IV	Envolvimento dos gânglios linfáticos de ambos os lados do diafragma e a medula óssea, o fígado, os pulmões, o intestino ou a pele
Sintomas B*	Febre, suores nocturnos ou perda de peso significativa

* Após a designação do estágio em função dos locais de envolvimento, os doentes são classificados com A (na ausência de sintomas B) ou com B (se presentes os sintomas B).

O estadiamento constitui uma informação vital, quer para a definição do tratamento mais adequado, quer para a avaliação do prognóstico (Holman et al., 2004).

1.1.1. PROGNÓSTICO

O International Prognostic Index (IPI) é um método utilizado para avaliar a probabilidade estatística da reacção do doente face ao tratamento. Inicialmente foi introduzido nos linfomas de grau intermédio, mas demonstrou utilidade para outros tipos de Linfomas Não-Hodgkin. Iniciado em 1993, este método adquiriu uma vasta aceitação como um sistema útil para planear o tratamento do linfoma. Em estudos realizados nos Estados Unidos da América, no Canadá e na Europa, foram documentadas algumas características do linfoma de certos doentes e posteriormente correlacionados com os resultados do tratamento. Alguns destes factores quando combinados permitem a separação dos doentes em grupos com distinto prognóstico (Holman et al., 2004).

Diversas características importantes para a determinação do prognóstico são combinadas neste IPI: idade, estágio, desidrogenase láctica (LDH), envolvimento extra-ganglionar e “performance status”. Quanto à idade, os doentes mais velhos têm geralmente um comportamento pior do que os mais novos, portanto uma idade superior a 60 anos contribui com um ponto no índice. Os doentes com um estágio I ou II geralmente superam a doença mais facilmente do que os doentes com um estágio III ou IV, portanto estes dois últimos estádios recebem mais um ponto no índice. A LDH está presente nos eritrócitos, fígado, osso e noutros tecidos. A sua concentração está aumentada nos doentes com linfoma, e reflecte o tamanho e a velocidade a que esta patologia está a crescer. A concentração acima do normal é um factor de risco adicional e recebe mais um ponto. É atribuído outro ponto se o linfoma atingir locais além dos gânglios linfáticos, incluindo a medula óssea, o intestino, o fígado, os pulmões e o sistema nervoso central. A última característica do IPI é a “performance status” que representa o nível de capacidade dos doentes em desempenhar as actividades diárias, sendo atribuído outro ponto no caso de maior incapacidade. Desta forma, determinado doente pode ter um IPI entre 0 e 5, tendo a maioria valores entre 0 e 3 (Holman et al., 2004).

1.2. CITOMETRIA DE FLUXO

A utilização da Citometria de Fluxo (CF) em laboratórios clínicos aumentou consideravelmente nas últimas duas décadas. O citómetro de fluxo permite uma rápida análise de várias características de células individuais. Este equipamento é utilizado para imunofenotipagem de vários tipos amostras, incluindo sangue total, aspirado medular, líquido cefalo-raquidiano, urina e tecidos sólidos. As características que podem ser analisadas são o tamanho celular, a complexidade citoplasmática, o conteúdo de ADN ou ARN, a expressão de antígenos celulares, entre outros. No momento em que estas células marcadas atravessam a fonte luminosa “laser”, as moléculas fluorescentes dos corantes ou dos anticorpos conjugados são excitadas e passam a um estado de energia superior. Quando regressam ao seu estado de repouso, os fluorocromos emitem energia luminosa a comprimentos de onda superiores. Esta fluorescência emitida é detectada pelo sistema óptico do citómetro através de filtros e detectores, permitindo a análise dos diferentes níveis de fluorescência (Brown et al., 2000).

1.3. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ADN CELULAR

A avaliação do conteúdo de ADN celular é uma das principais aplicações da citometria de fluxo (Nunez, 2001, Orfao et al., 1995, Rabinovitch, 1993). A utilização de corantes fluorescentes, como o iodeto de propídeo, permite marcar o ADN celular de uma forma estequiométrica, isto é, a quantidade de corante é directamente proporcional à quantidade de ADN no interior da célula. Esta relação é representada graficamente através do denominado Histograma de ADN (Rabinovitch, 1993). A análise deste gráfico permite a obtenção de dois tipos de informação biológica: por um lado, a indicação sobre a existência, ou não, de alterações clonais no conteúdo de ADN celular – conteúdo de ADN aneuplóide – e, por outro, a distribuição das populações celulares presentes na amostra ao longo das diferentes fases do ciclo celular, tendo especial interesse a fracção de células em fase S (FFS), como indicador de proliferação celular (Rabinovitch, 1993).

O interesse do seu estudo consiste no facto de uma alteração no conteúdo de ADN, ou aneuploidia de ADN, ser o sinónimo de acumulação de alterações genéticas nas células, que são acompanhadas ou resultam do aumento da instabilidade genética devido a diversos

mecanismos, como as mutações e as alterações na metilação de genes que regulam o ciclo celular. A acumulação destes eventos genéticos pode ser detectada por alterações no conteúdo de ADN das células tumorais (Lee et al., 1994).

A avaliação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo permite detectar a existência de aneuploidias de ADN e estudar o ciclo celular quer de populações celulares normais, quer tumorais. Este estudo simultâneo é possível combinando a avaliação do ADN com a análise da expressão de antígenos presentes nas células neoplásicas, utilizando para tal uma mistura de anticorpos monoclonais. Usando esta dupla marcação é possível determinar o conteúdo de ADN das células neoplásicas presentes na amostra separadamente das células normais (Palmeira et al., 2007).

Têm sido realizados estudos quantitativos do conteúdo de ADN de tumores com a utilização de citómetros de fluxo e de imagem há já duas décadas, tendo sido demonstrado que alterações no conteúdo de ADN celular são muito comuns em vários cancros humanos, nomeadamente nas neoplasias hematológicas (Duque et al., 1993).

As variáveis relacionadas com o conteúdo de ADN e apontadas como tendo utilidade clínica são a Ploidia de ADN, o Índice de ADN (IA) e a FFS, que serão descritas a seguir.

1.3.1. IMPORTÂNCIA OU UTILIDADE CLÍNICA DA AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ADN NOS LNH-B

Foi realizada em Prout's Neck, Maine, em 1992, uma reunião de consenso entre especialistas, denominada "Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Neoplastic Hematopathology" (Duque et al., 1993), na qual o objectivo era avaliar a utilidade clínica da determinação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo em neoplasias hematológicas. Neste encontro foi revista a maioria dos dados publicados até à data, relativos à análise de ADN por citometria neste grupo de neoplasias. Em relação aos LNH-B foi avaliado o valor clínico da ploidia de ADN e da FFS.

Com o intuito de clarificar e comprovar as associações acima referidas entre o conteúdo de ADN e a classificação e prognóstico dos LNH-B, os investigadores presentes nesta reunião de Consenso definiram algumas recomendações que deveriam ser seguidas na realização de novos estudos, relativamente à preparação da amostra e aos procedimentos de análise:

- A análise deve ser realizada com amostras de tecidos frescos não fixados, pois, deste modo, é reduzida a quantidade de resíduos celulares permitindo alcançar o melhor CV possível do pico G0/G1, além de serem preservadas as características imunofenotípicas das células em suspensão.
- É importante a obtenção de um CV baixo do pico G0/G1, pois grande parte dos LNH-B apresenta apenas pequenas variações no conteúdo de ADN, com Índices de ADN entre 1,01 e 1,15. Deve ser referido o facto da detecção destes conteúdos aneuplóides poderem ser importantes no diagnóstico de certos tipos de LNH-B, nomeadamente nos de alto grau (Harris, 2001).
- Previamente à análise de ADN deve ser confirmada a presença de células tumorais na amostra e a respectiva percentagem. Esta determinação pode ser realizada através de métodos de análise do ADN por dupla marcação. Este método consiste na combinação da avaliação do conteúdo de ADN e a análise da expressão antigénica das células tumorais. Deste modo, é possível a análise do conteúdo de ADN das células patológicas separadamente das células normais presentes na amostra (Braylan et al., 1984, Duque et al., 1993, Stokke et al., 1998a).

1.3.1.1. PLOIDIA DE ADN

O conceito de “ploidia de ADN” descreve o conteúdo de ADN nuclear medido por técnicas de citometria. Este conceito distingue-se do termo “ploidia” utilizado pela citogenética, visto que a citometria de fluxo não avalia ou não examina os cromossomas, mas o conteúdo de ADN total da célula (Orfao et al., 1993, Orfao et al., 1995, Rabinovitch et al., 1993).

Na reunião de Consenso atrás referida (Duque et al., 1993) a ploidia de ADN, apesar de se relacionar com o grau histopatológico, foi apontada como um factor de prognóstico não independente. No entanto, os autores alertam para o facto de alguns estudos referirem CV

elevados, o que poderá ter diminuído a capacidade de detecção de pequenos desvios no conteúdo de ADN (os chamados “near diploid DNA”).

A incidência da aneuploidia de ADN em doenças hematológicas é mais baixa quando avaliada por citometria, comparativamente ao valor encontrado por métodos citogenéticos (citogenética clássica e FISH). Isto é devido ao facto de que mesmo com as melhores condições técnicas a CF não permite a detecção de anomalias compensadas do cariótipo e revela grande dificuldade em detectar casos de monossomias ou trissomias simples. No entanto, a CF tem a vantagem de permitir o estudo da interfase nuclear sem ser necessário induzir a divisão da célula (Orfao et al., 1995). Estes autores descrevem, por conseguinte, que a frequência de aneuploidia de ADN é baixa nos LNH, estando associada a um prognóstico menos favorável, embora não pareça ser um factor de prognóstico independente (Orfao et al., 1995). Também Belessi e colaboradores (2003), num estudo retrospectivo em 29 doentes com linfoma gástrico primário, concluíram que a aneuploidia de ADN determinada por CF não revelou significado prognóstico nestes doentes.

Lackowska e colaboradores (1999), estudando prospectivamente 117 casos de Linfomas Não-Hodgkin, avaliaram o prognóstico da ploidia de ADN e encontraram resultados discordantes dos encontrados pelos autores Orfao et al. (1995) e Belessi et al. (2003). Concluíram que esta variável é um factor de prognóstico independente em Linfomas Não-Hodgkin de alto grau. Os doentes com linfomas “near”-tetraplóide foram caracterizados com um comportamento clínico desfavorável, enquanto a hiperploidia era um indicador de prognóstico favorável.

1.3.1.2. ÍNDICE DE ADN

O IA é normalmente utilizado para comparar o conteúdo de ADN entre a população tumoral e a população de células normais ou de referência e é calculado através da divisão entre o valor modal do pico G0/G1 da população tumoral pelo valor do pico G0/G1 da população diplóide de ADN (população controlo ou de referência) (Lee et al., 1994). Relativamente aos LNH-B, a utilidade clínica (valor prognóstico) não é referenciada no Consenso (Duque et al., 1993) nem na bibliografia posterior, sendo apenas utilizado para categorizar a ploidia de ADN,

nomeadamente o intervalo de diploidia. Por regra, as populações celulares com IA igual a 1 são classificadas como diplóides. O valor de IA a partir do qual se classifica como hiperdiplóide não é descrito em todos os artigos referidos neste estudo. Apenas Pinto e colaboradores (Pinto et al, 2003) referem o intervalo 1,07-1,19 para definir a hiperdiploidia de ADN.

1.3.1.3. FRACÇÃO DE CÉLULAS EM FASE S

A importância da fase S reside no facto de esta ser uma etapa onde decorre a replicação de ADN (Bergers, 1997). Para cada um dos ciclos celulares presentes num histograma de ADN é possível calcular a percentagem de células em fase S, denominada FFS.

A análise da cinética do ciclo celular em doenças hematológicas malignas demonstrou a existência de uma heterogeneidade proliferativa importante. Enquanto, por exemplo, os doentes com Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) apresentam uma baixa percentagem de células em fase S no sangue periférico, os doentes com Linfoma Não-Hodgkin demonstram um índice proliferativo intermédio. Por outro lado, este valor de proliferação não é igual entre os Linfoma Não-Hodgkin de baixo e alto grau, sendo significativamente inferior nos de baixo grau (Orfao et al., 1995). Esta actividade proliferativa tem sido determinada por CF, através da percentagem de células em fase S, ou pela marcação imunohistoquímica do anticorpo monoclonal Ki-67.

Na reunião de consenso (Duque et al., 1993) a FFS é apontada como um forte e consistente indicador de prognóstico nos LNH-B. De acordo com os autores, esta associação é válida quer considerando a globalidade dos LNH-B, quer estratificando para subtipos uniformes como os LNH-B foliculares ou os difusos de grandes células. Esta avaliação da actividade proliferativa é apontada como um meio mais objectivo e reprodutível para a definição do grau nos LNH-B.

Em 1990, Joensuu et al. realizaram um estudo de amostras parafinadas de uma série de 37 casos de LNH. Os autores referem que uma FFS elevada ($> 6\%$) era fortemente associada com pior prognóstico e que um grande aumento deste parâmetro ($\geq 6\%$) era normalmente

associado com a morte por linfoma após um ano de recidiva. Referem ainda que no estudo houve aumento da FFS e/ou mudança histológica em 14 (38%) dos 37 casos de linfoma. Concluíram que a progressão histológica não sucede apenas nos linfomas de graus baixo e intermédio, mas também nos de alto grau, os quais podem evoluir para formas mais agressivas com FFS superior durante o decurso da doença. Aliás, segundo os autores a probabilidade de um linfoma progredir para uma forma mais maligna com FFS superior pode ser ainda maior nos linfomas de alto grau do que nos graus baixo e intermédio.

Stokke et al (1998b) estudaram biópsias ganglionares de uma série de 92 casos de LNH-B. Estes autores demonstraram na análise multivariada dos diferentes parâmetros relacionados com o prognóstico, que a FFS era o factor de prognóstico independente mais forte.

Em 1999, Lackowska e colaboradores (Lackowska e tal., 1999), estudando prospectivamente 117 casos de Linfomas não-Hodgkin, avaliaram o prognóstico da FFS e concluíram que esta variável é um factor de prognóstico independente em Linfomas não-Hodgkin de baixo grau.

Mais recentemente, Pinto et al. (2003), avaliaram amostras obtidas por biópsia aspirativa por agulha fina de uma série de 76 casos de LNH-B e de 30 casos de gânglios linfáticos reactivos usados como controlo. Neste estudo, baseados num intervalo de sobrevida de 5 anos, os autores encontraram uma forte associação entre a FFS e o grau, em que quase todos os tumores agressivos revelaram valores de FFS >15% (valor médio de 20,4%), enquanto que a grande maioria dos LNH-B classificados como indolentes apresentaram valores de FFS <10% (valor médio de 6,5%). Estes autores concluem que a determinação da FFS constitui uma alternativa credível ao estabelecimento do grau dos LNH-B por critérios morfológicos. Em relação ao prognóstico, e utilizando o valor médio da FFS como valor “cut-off”, não conseguiram porém discriminar os casos com diferente prognóstico, em cada subgrupo de doentes com o mesmo grau. Acrescentam ainda, que a FFS não permitiu igualmente discriminar entre os LNH-B indolentes e as amostras controlo.

No estudo desenvolvido por Belessi et al. (2003), utilizando 29 doentes com linfoma gástrico primário, na análise do conteúdo de ADN univariada por citometria de fluxo os autores referem que a FFS é um factor de prognóstico adverso importante para a sobrevivência.

As recomendações definidas pelo Consenso (Duque et al., 1993) atrás referido, não têm sido seguidas na íntegra pelos estudos publicados posteriormente, nomeadamente no que se refere à utilização de amostras frescas e a métodos de dupla marcação. Como atrás referido, estes aspectos metodológicos são fundamentais para garantir, por um lado, maior capacidade de detectar pequenas alterações do conteúdo de ADN e, por outro, a avaliação do ciclo celular das células tumorais, independentemente da maior ou menor representatividade destas células na amostra. No presente estudo pretende-se utilizar estas recomendações definidas pelo Consenso, de forma a avaliar a importância do conteúdo de ADN nos LNH-B.

OBJECTIVOS

2. OBJECTIVOS

Este estudo tem como principais objectivos:

1. Avaliar por Citometria de Fluxo o conteúdo de ADN de uma série de casos de LNH-B, através do estudo dos seguintes parâmetros citométricos:
 - a. Ploidia de ADN;
 - b. Índice de ADN;
 - c. Fracção de células em Fase S

2. Estudar e avaliar a associação do conteúdo de ADN com parâmetros clínico-patológicos em LNH-B.

3. Estudar e avaliar a associação do conteúdo de ADN com variáveis de prognóstico em LNH-B.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População em estudo e tipo de amostras

Foram seleccionados para este estudo 142 doentes de LNH-B diagnosticados e tratados de forma consecutiva no Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil-EPE (IPOPFG-EPE), entre Outubro de 2002 e Janeiro de 2007. As amostras destes casos foram colhidas no momento do diagnóstico e enviadas para o Laboratório de Imunologia Celular do Serviço de Imunologia para caracterização imunofenotípica e avaliação do conteúdo de ADN.

Neste trabalho foi realizado um estudo misto, isto é, composto por uma componente observacional e outra experimental. A primeira componente refere-se às amostras que deram entrada no laboratório entre Outubro de 2002 e Outubro de 2006, tendo os resultados sido consultados na base de dados do Serviço. A segunda componente refere-se às amostras que deram entrada desde Outubro de 2006 até Janeiro de 2007. Estas amostras foram processadas no decorrer da realização desta monografia.

Antes da avaliação do conteúdo de ADN, foi confirmado para cada amostra, o diagnóstico de LNH-B através da caracterização imunofenotípica por CF e conhecida a percentagem de células patológicas presentes na amostra.

As amostras utilizadas foram amostras de sangue periférico, aspirado medular, biópsias aspirativas e gânglios linfáticos.

3.2. Avaliação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo

a. Procedimentos

O conteúdo de ADN dos 142 casos foi avaliado por CF, através de uma dupla marcação utilizando o “kit” “Cycloscope B-NHL™” (Cytognos), que é indicado para a análise de

conteúdo de ADN por citometria de fluxo em LNH-B e para Leucemias Linfocíticas Crónicas (LLC) de células B.

Após a recepção e registo da amostra foi contado o número de leucócitos, seguindo-se de imediato a sua caracterização imunofenotípica.

Após a confirmação do diagnóstico de LNH-B seguiu-se de imediato o processamento com o “kit”, de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, utilizou-se 40µl de uma mistura de anticorpos monoclonais primários, ao qual foi adicionado 1×10^6 células da amostra, num volume de 50-100 µl e incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente.

De seguida, realizou-se a lavagem das células, que consistiu em adicionar solução isotónica (“Isoton”, Coulter), centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 minutos, eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento.

A esse sedimento foram adicionados 20 µl do anticorpo secundário, colocando-se a incubar 15 minutos à temperatura ambiente e na obscuridade.

Posteriormente adicionaram-se 2 ml da solução de lise de eritrócitos, incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente e na obscuridade. Foi efectuada uma nova lavagem das células, em que na ressuspensão do sedimento foi usado 1 ml da solução de marcação de ADN, colocando-se depois a incubar 10 minutos à temperatura ambiente e na obscuridade.

Por fim a aquisição das amostras foi realizada nas primeiras 3 horas após a sua preparação. Quando isto não foi possível os tubos foram mantidos a 4°C e na obscuridade até à sua aquisição.

b. Equipamento

As amostras depois de processadas foram adquiridas no Citómetro de fluxo FACSCalibur™® (Becton&Dickinson, Enzifarma Portugal), equipado com um sistema de duplo “laser”

permitindo a detecção e análise de quatro fluorescências. O seu alinhamento e calibração foi realizado através do “kit” “DNA QC Particles[®]” (Becton&Dickinson, Enzifarma Portugal, Cat. Nº 349523).

Na aquisição das amostras, realizada com o programa o “Cell Quest Pro Versão 3.0.2[®]”, foi definido no dot-plot FL1-FITC/SSC um “gate” para as células patológicas (FL1+) e um “gate” para as células normais ou controlo (FL1-). Esta população controlo serviu como referência interna diplóide, ajustando-se o pico G₀/G₁ desta população para o canal 200. Para cada amostra foram adquiridas um mínimo de 10000 células no “gate” FL1+ (células patológicas).

A análise foi feita primeiro no programa “Paint-a-Gate 3.0.2[®]” e “ModFit LT Versão 2.0[®]”. No programa “Paint-a-Gate 3.0.2[®]”, começou-se por retirar os agregados celulares através do dot-plot FL2-A/FL2-W, seleccionando os eventos (células) que passaram isoladamente em frente ao “laser”. No dot-plot FL1-FITC/SSC, foi seleccionada a população patológica (FL1+) e a população normal ou de referência (FL1-). Cada uma das populações foi gravada em separado, para posterior análise do ciclo celular. Também foi registado o valor da população patológica de forma a comparar com os valores registados no estudo imunofenotípico.

No programa “ModFit LT Versão 2.0[®]” foi feita a análise do ciclo celular para cada uma das populações atrás referidas. Para além da ploidia de ADN, IA e FFS foi ainda registado o CV do pico G₀/G₁, tendo sido considerado válidos apenas os casos com CV menor que 5%, de forma a garantir a qualidade da análise.

3.3. Variáveis em estudo

3.3.1 Parâmetros clínicos

Os parâmetros clínicos foram recolhidos pelo Serviço de Hemato-Oncologia do IPOPGF-EPE, a partir dos processos clínicos dos doentes. Do total de casos incluídos neste trabalho

apenas foi possível a consulta do processo clínico em 34 casos. Estes casos consultados correspondem aos primeiros 34 casos com maior período de seguimento clínico.

Neste estudo foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Diagnóstico histológico
- Grau histológico
- Valor de LDH (para esta variável foi considerado um valor “cut-off” (190 U/L) para a categorizar em normal ou aumentada)
- Estádio segundo o sistema de Ann Arbor
- IPI (International Prognostic Index)

3.3.2 Parâmetros citométricos

Foram estudados os seguintes parâmetros relacionados com o conteúdo de ADN:

a. Índice de ADN

O IA foi calculado no total de casos através da divisão entre o valor modal do pico G_0/G_1 da população patológica e o valor modal do pico G_0/G_1 da população normal diplóide de ADN (população controlo ou de referência) (Lee et al., 1994).

b. Ploidia de ADN

A ploidia de ADN foi determinada na totalidade dos casos, tendo sido definidas 5 classes de ploidia de ADN em função do IA. Na Tabela 2 encontram-se descritas as classes de ploidia de ADN e os respectivos intervalos de IA. Estes intervalos encontram-se validados para o Serviço de Imunologia.

Tabela 2. Classificação da ploidia de ADN em classes com base no Índice de ADN (IA).

Ploidia de ADN	IA
Diplóide	0,98 – 1,02
“Near”-diplóide	1,03 – 1,09
Hiperdiplóide	1,10 – 1,90
Tetraplóide	1,91 – 2,10
Hipertetraplóide	> 2,10

c. Fracção de células em fase S (FFS)

Foi possível obter resultado de FFS em 135 casos. Não foi possível determinar a FFS em 7 casos devido ao insuficiente número de células patológicas presentes nestas amostras. Para efeitos de tratamento estatístico, utilizou-se o valor médio como valor “cut-off” para categorizar a FFS em baixa ou alta.

3.4. Tratamento de dados

Toda a informação laboratorial e clínica foi reunida numa base de dados em Excel® (Microsoft Office 2003) e o tratamento de dados foi realizado no programa estatístico SPSS® versão 15.0, recorrendo a estatística descritiva e a testes estatísticos adequados a cada uma das variáveis. Para o estudo da associação entre os parâmetros citométricos e os clínicos utilizou-se o teste de Qui-Quadrado, para a comparação de médias (de FFS dos LNH-B de baixo e alto grau) utilizou-se o teste de t-student. Na análise univariada entre as diferentes variáveis e a sobrevivência foi usado o teste de Kaplan-Meier e de Breslow. Foi considerada uma associação estatisticamente significativa quando o $p < 0,05$.

3.5. Ética

Sobre o ponto de vista ético cumpriram-se os pressupostos da declaração de Helsínquia. O trabalho realizado foi executado no âmbito da rotina laboratorial, não foram utilizados os nomes nem os números de processos dos utentes, salvaguardando-se a confidencialidade de todos os dados.

DISCUSSÃO

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do conteúdo de ADN no total de casos estudados

Foram incluídos no presente estudo 142 casos de LNH-B para os quais foi solicitada a avaliação do conteúdo de ADN, ou seja, ploidia de ADN, IA e FFS. Estas determinações foram realizadas em diferentes tipos de amostras, de acordo com a Figura 1, sendo as mais frequentes as amostras de gânglios linfáticos (n=60).

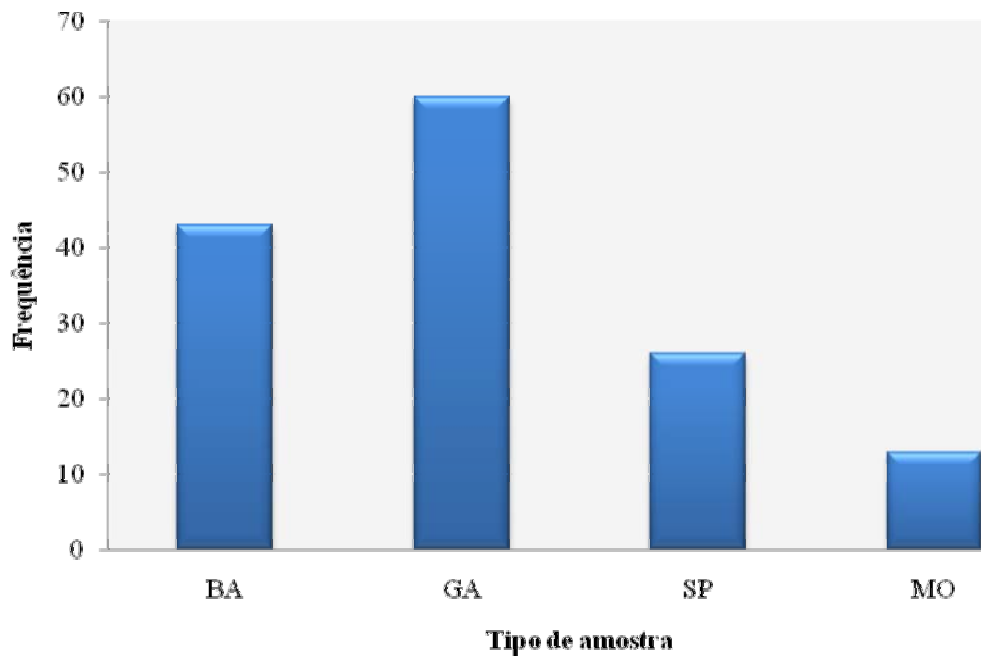
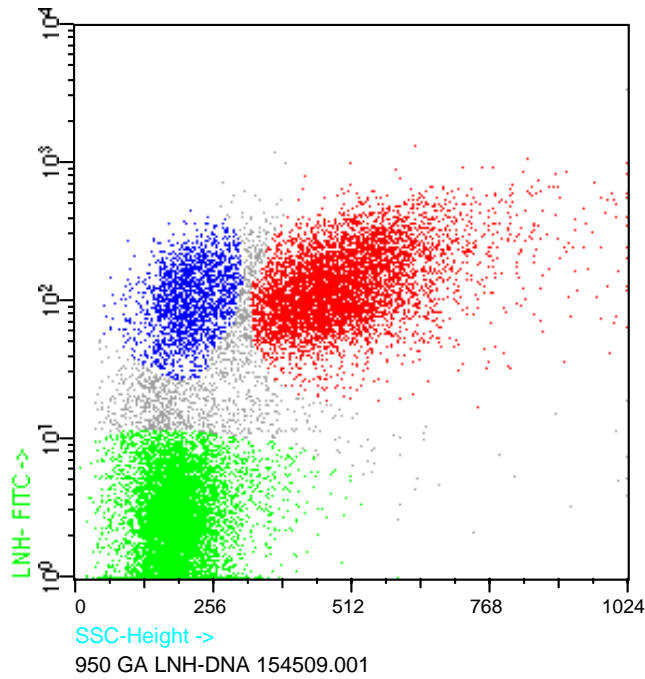
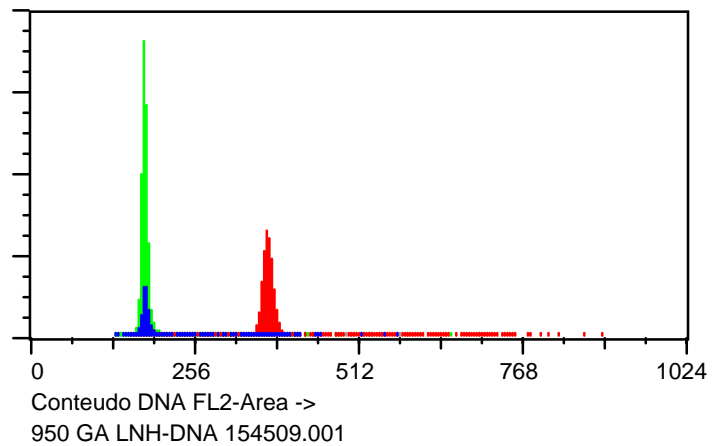


Figura 1. Tipos de amostras utilizadas: BA – biópsia aspirativa; GA – gânglio linfático; SP – sangue periférico; MO – medula óssea.

Na figura 2 apresenta-se a expressão imunofenotípica e respectivo histograma de ADN da população de linfócitos B patológicos e da população normal ou de referência presentes num dos casos de LNH-B estudados. Esta separação foi conseguida, como já foi referido no Material e Métodos, a partir de uma técnica de dupla marcação recorrendo a anticorpos monoclonais específicos para células B e um corante fluorescente para ácidos nucleicos.



A.



B.

Figura 2. Representação de um caso de LNH-B com um conteúdo de ADN tetraplóide: A- Gráfico de pontos LNH- FITC/SSC: vermelho - células B patológicas; azul - células B normais; verde - população de referência; B- Histograma de ADN.

Em relação ao conteúdo de ADN, o IA revelou um valor médio de 1,13 e uma mediana de 1,02 (entre 0,98 e 2,49) encontrando-se representado na Figura 3 a sua distribuição nos casos estudados.

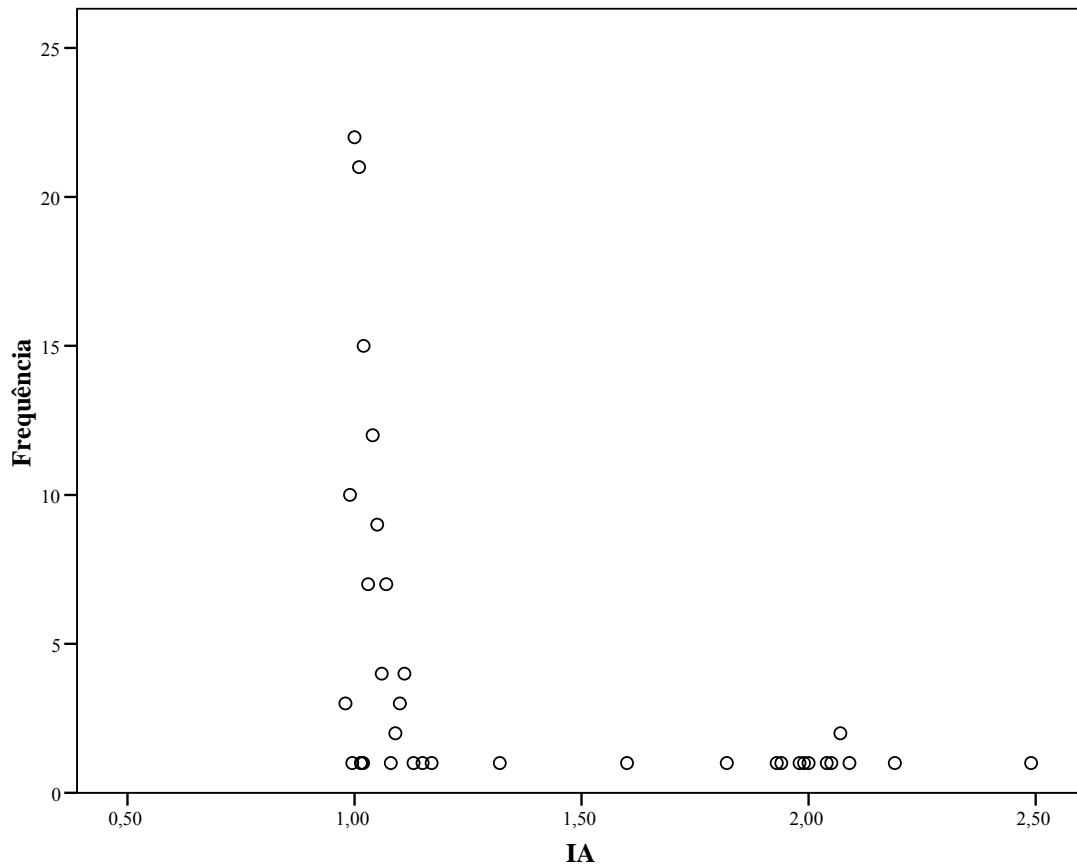


Figura 3. Distribuição dos valores do Índice de ADN (IA) nos casos estudados.

Observou-se uma distribuição bimodal, com valores de IA igual a 1 ou próximo, na região diplóide e ligeiramente hiperdiplóide (IA entre 0,98 e 1,10), e valores próximos de 2, na fracção tetraplóide do histograma de ADN (IA entre 1,93 e 2,09).

No que diz respeito à ploidia de ADN observaram-se 75 diplóides (52,8%) e 67 aneuplóides (47,2%), dos quais 42 são “near”-diplóides (29,6%), 13 hiperdiplóides (9,2%), 10 tetraplóides (7,0%) e 2 hipertetraplóides (1,4%) (Figura 4).

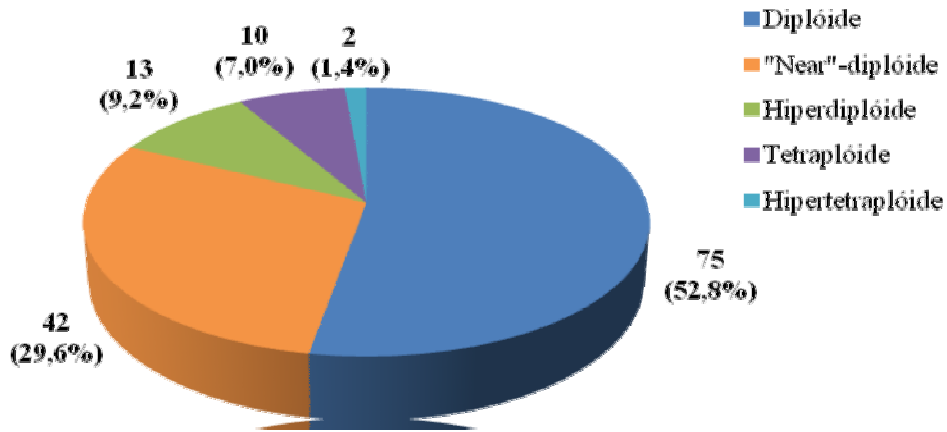


Figura 4. Frequência das diferentes classes de ploidia de ADN observadas nos casos estudados.

Relativamente à FFS, foi avaliada em 135 casos e revelou uma média igual a 4,50% e uma mediana de 1,30 (entre 0,01 e 46,70). A Figura 5 ilustra a distribuição deste parâmetro nos doentes estudados.

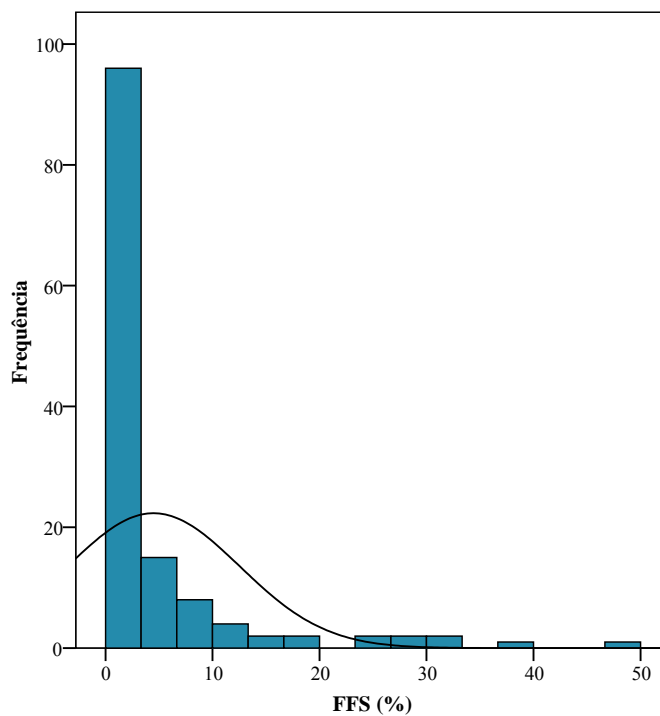


Figura 5. Distribuição da fracção de células em fase S (FFS) nos casos estudados.

4.2. Estudo da associação entre o conteúdo de ADN e as variáveis clínicas

Como atrás referido, apenas foi possível consultar o processo clínico em 34 dos casos de LNH-B. Por este motivo apenas se fez neste grupo o estudo da associação entre as variáveis do conteúdo de ADN e os parâmetros clínico-patológicos e de prognóstico.

4.2.1. Parâmetros clínicos

Foram estudados 34 casos de LNH-B, dos quais 18 homens (52,9%) e 16 mulheres (47,1%). Os tipos histológicos estão representados na Tabela 3, sendo os mais frequentes os LNH folicular (n=13) e difuso de grandes células B (n=12).

Tabela 3. Classificação histológica dos casos de LNH-B estudados.

Tipos histológicos	n	%
LNH Folicular	13	38,2
LNH difuso de grandes células B	12	35,3
LNH células do Manto	3	8,8
LNH Burkitt “like”	1	2,9
Linfoma Linfocítico de células B	2	5,9
Linfoma Esplénico de células B da zona marginal	1	2,9
LNH Linfoplasmocítico	1	2,9
Leucemia Pro-Linfocítica de células B	1	2,9

Atendendo às características clínicas e biológicas muito distintas, nomeadamente em termos proliferativos, entre os LNH-B de baixo grau e alto grau todo o estudo será a partir deste ponto, realizado separadamente para cada um dos graus.

Para tal, considerou-se os casos diagnosticados como difusos de grandes células B (DGCB) e o Linfoma de Burkitt “like” como alto grau; e os restantes foram categorizados como baixo

grau. Assim, dos 34 casos de LNH-B, 21 eram de baixo grau (61,8%) e 13 de alto grau (38,2%), conforme pode ser observado na Figura 6.

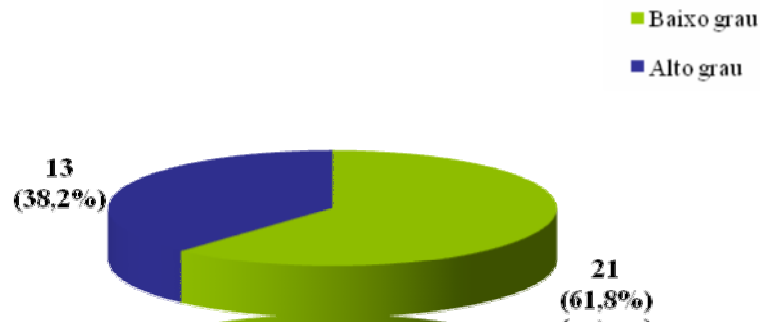


Figura 6. Grau histológico dos casos de LNH-B estudados.

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentadas as frequências dos LNH-B de baixo e alto grau, respectivamente, quanto ao sistema de estadiamento de Ann Arbor.

Tabela 4. Estadiamento de acordo com a classificação de Ann Arbor nos LNH-B de baixo grau.

Estádio Ann Arbor	n	%
I	4	19,0
II	0	0,0
III	5	23,8
IV	11	52,4

A maioria dos doentes com LNH-B de baixo grau tinha um estágio avançado de acordo com a classificação Ann Arbor: 11 casos (52,4%) no estágio IV e 5 (23,8%) no estágio III.

Tabela 5. Estadiamento de acordo com a classificação de Ann Arbor nos LNH-B de alto grau.

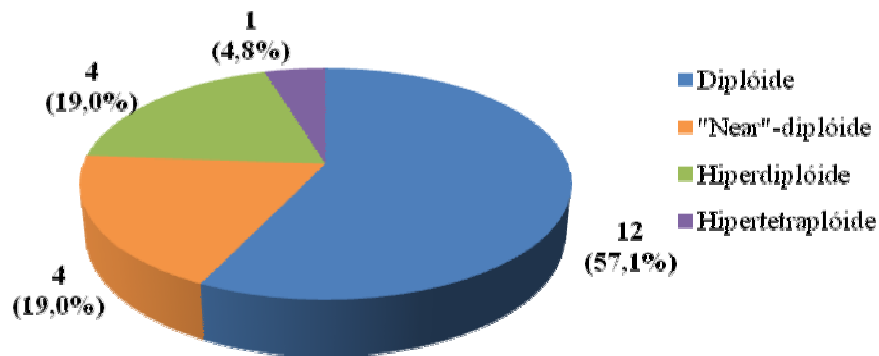
Estádio Ann Arbor	n	%
I	1	7,7
II	6	46,2
III	1	7,7
IV	5	38,5

Em relação aos de alto grau, a maioria dos doentes encontrava-se nos estádios II (46,2%) e IV (38,5%).

Analisando o IPI, apenas para os LNH-B de alto grau, as diferentes classes de IPI apresentaram um número próximo de casos, sendo a mais frequente a classe de risco mais elevado: 3 doentes (23,1%) tinham um risco baixo, 3 doentes (23,1%) tinham um risco intermédio-baixo, 3 doentes (23,1%) tinham um risco intermédio-alto e 4 doentes (30,8%) tinham um risco alto.

4.2.2. Parâmetros citométricos

Relativamente à ploidia de ADN, nos 21 casos de LNH-B de baixo grau, observou-se que mais de metade (57,1%) eram diplóides de ADN (n=12), sendo os restantes 9 casos aneuplóides (42,9%). Destes aneuplóides, 4 eram “near”-diplóides (19%), 4 hiperdiplóides (19%) e 1 hipertetraplóide (4,8%) (Figura 7).

**Figura 7.** Ploidia de ADN nos casos de LNH-B de baixo grau.

Nos LNH-B de alto grau a grande maioria revelou um conteúdo de ADN aneuplóide: 3 diplóides (23,1%) e 10 aneuplóides (76,9%). Destes 10 aneuplóides, 5 eram “near”-diplóides (38,5%), 4 hiperdiplóides (30,8%) e 1 hipertetraplóides (7,7%) (Figura 8).

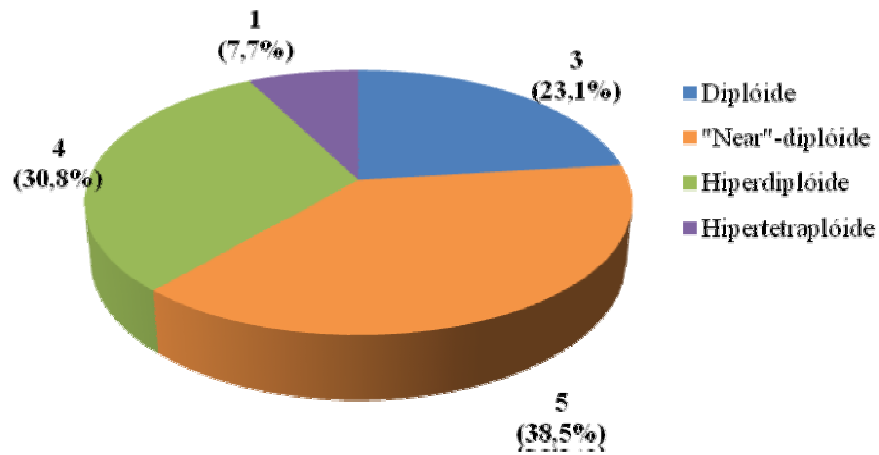


Figura 8. Ploidia de ADN nos casos de LNH-B de alto grau.

Relativamente ao IA, nos LNH-B de baixo grau, observou-se um valor médio de 1,15 e uma mediana de 1,02 (variou entre 0,99 e 2,09), encontrando-se representado na Figura 9.

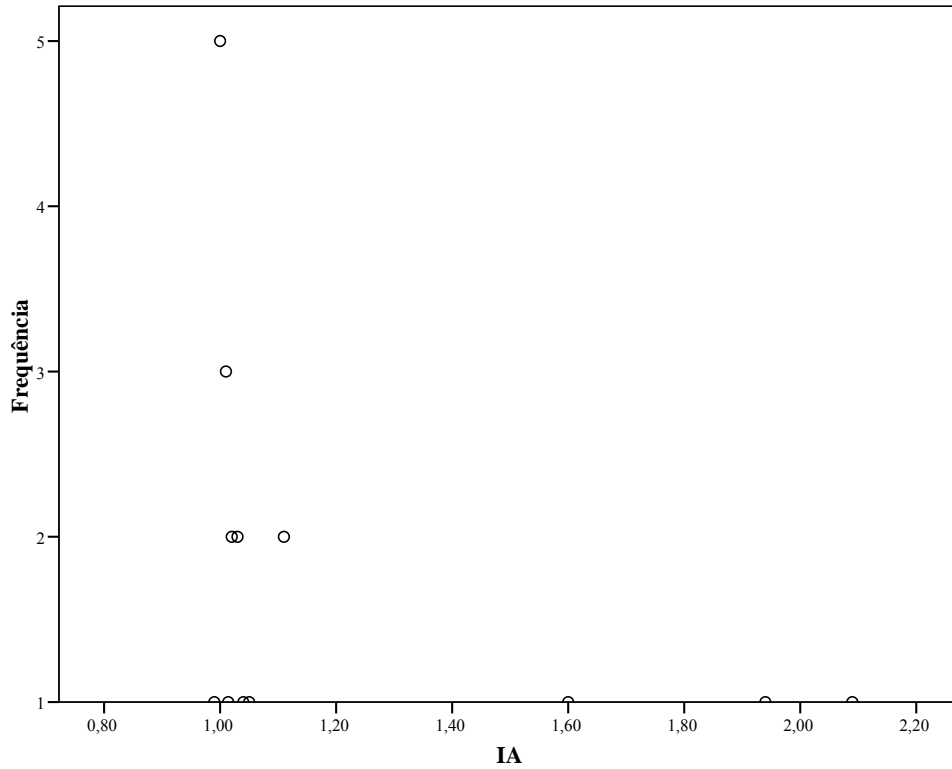


Figura 9. Distribuição dos valores do Índice de ADN (IA) nos casos de LNH-B de baixo grau.

Nos LNH-B de alto grau, verificou-se um valor IA médio de 1,22 e uma mediana de 1,06 (entre 1,00 e 2,05), encontrando-se representado na Figura 10.

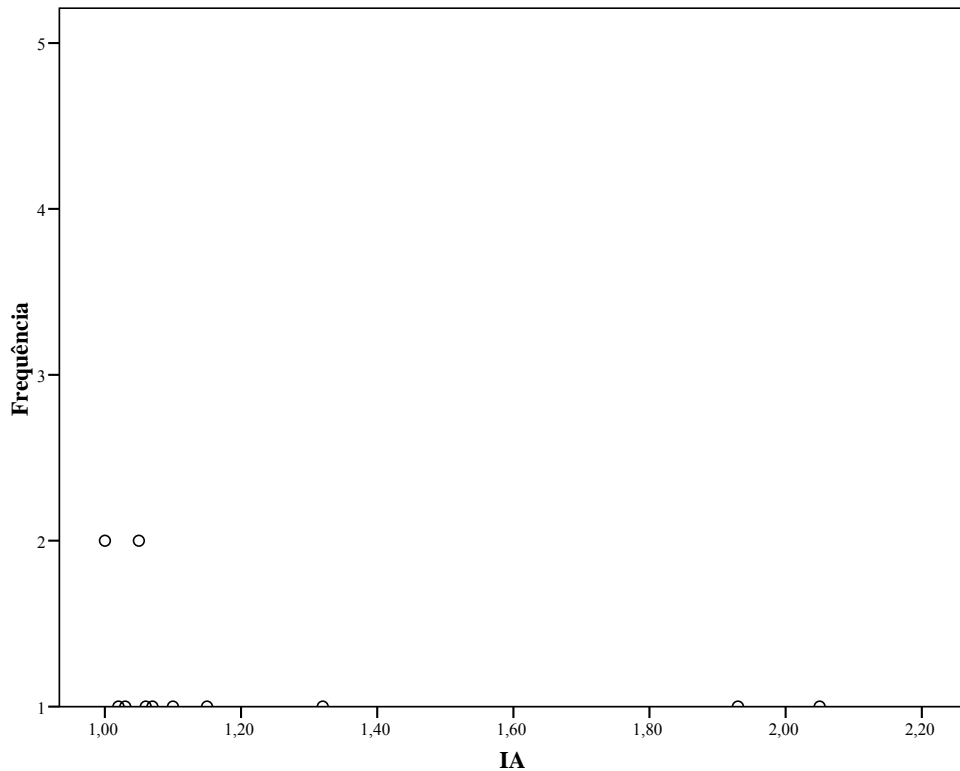


Figura 10. Distribuição dos valores do Índice de ADN (IA) nos casos de LNH-B de alto grau.

Em relação à FFS, verificou-se que a sua distribuição era significativamente diferente entre o grupo de LNH-B de baixo grau e os de alto grau ($p=0,001$): no grupo de baixo grau a média foi de 2,68 e a mediana foi de 1,35 (variou entre 0,01 e 15,50), e nos de alto grau a média foi de 15,68 e a mediana foi de 11,63 (variou entre 1,27 e 46,70). A Figura 11 representa a distribuição da FFS nestes dois grupos de LNH-B.

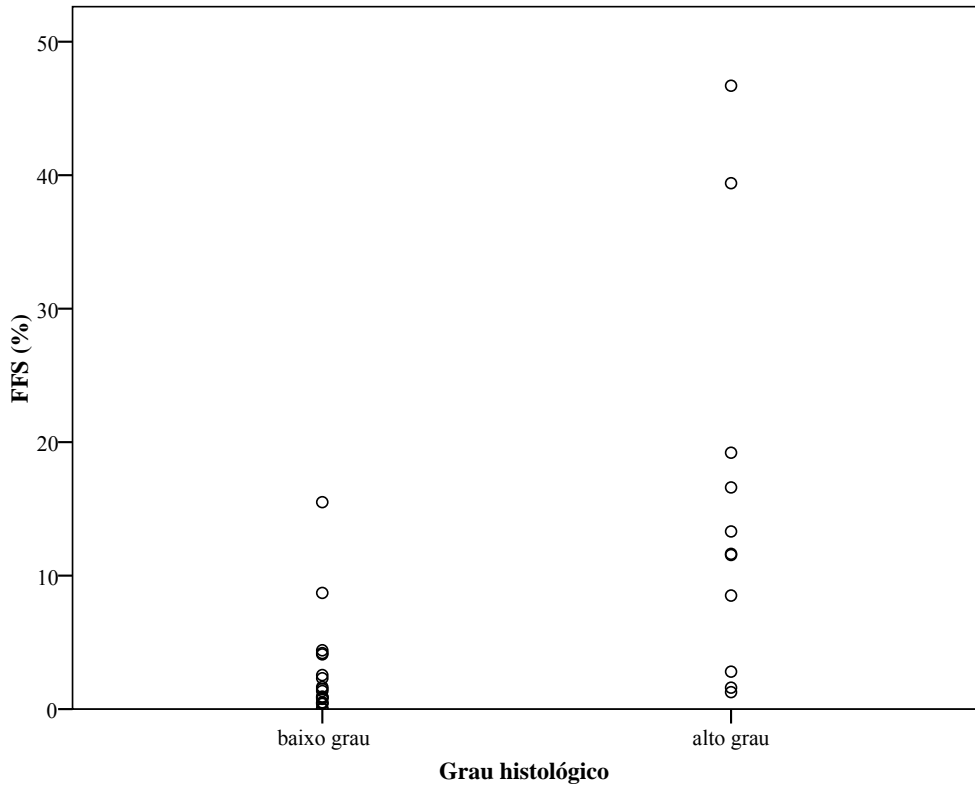
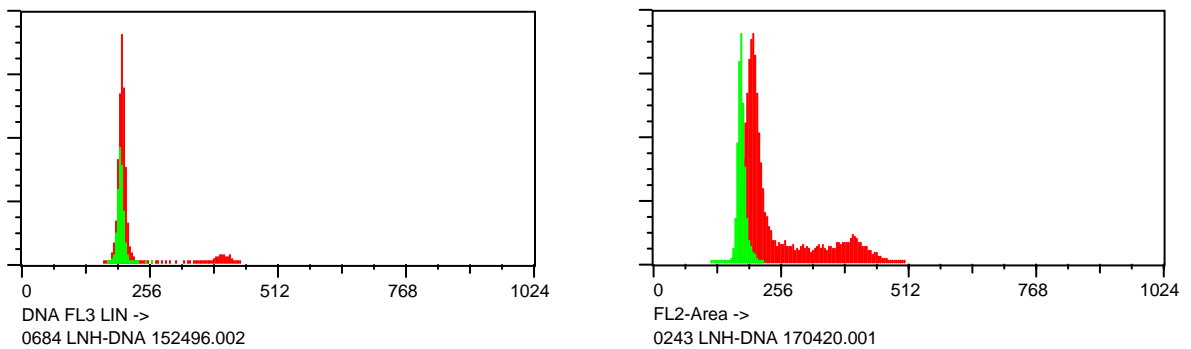


Figura 11. Distribuição da fracção de células em fase S (FFS) nos grupos de baixo e alto grau histológico.

Na Figura 12 estão representados dois histogramas de dois casos de LNH-B de baixo e alto grau histológico.



1. **2.**
Figura 12. Histograma de ADN de dois casos de LNH-B: 1. LNH-B de baixo grau com IA= 1,01 e FFS=0,59; 2. LNH-B de alto grau histológico com IA=1,13 e FFS=24,81.

4.2.3. Conteúdo de ADN e variáveis clínico-patológicas

Nas Tabelas 6 e 7 encontram-se descritos os resultados obtidos relativamente à associação entre a ploidia de ADN e as variáveis clínico-patológicas estudadas neste trabalho, nos LNH-B de baixo grau e alto grau, respectivamente. Dado o número pequeno de casos apenas se considerou duas classes de ploidia de ADN: diplóides e aneuplóides de ADN.

Tabela 6. Associação entre a ploidia de ADN e as variáveis clínico-patológicas nos LNH-B de baixo grau.

Parâmetros	Conteúdo de ADN		p
	Diplóides n (%)	Aneuplóides n (%)	
Estádio Ann Arbor			
I	0 (0,0)	4 (50,0)	0,004
II	-----	-----	
III	2 (16,7)	3 (37,5)	
IV	10 (83,3)	1 (12,5)	
LDH			
Normal	7 (58,3)	5 (62,5)	0,852
Aumentada	5 (41,7)	3 (37,5)	

Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa com o sistema de estadiamento de Ann Arbor: verificou-se que 83,3% os diplóides encontravam-se no estágio IV (Figura 13). Em relação ao valor de LDH não se observou diferenças estatisticamente significativas entre diplóides e aneuplóides de ADN.

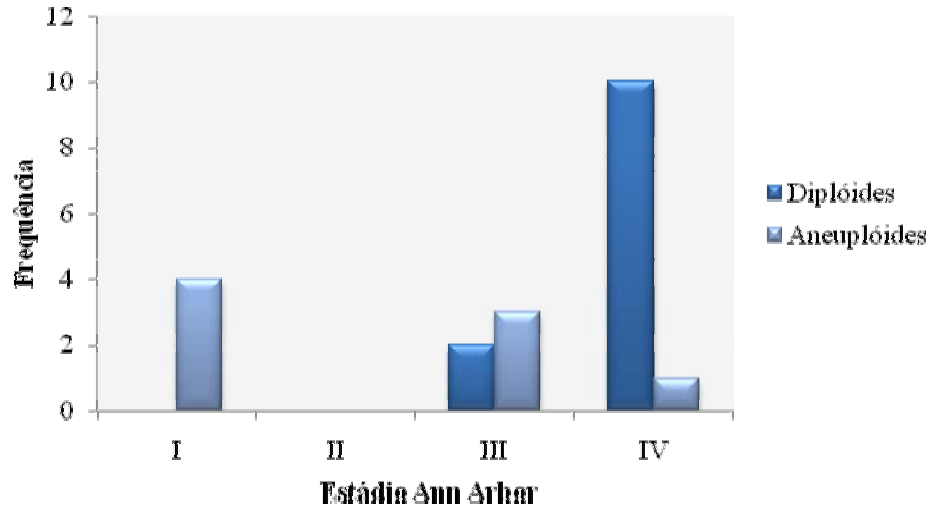


Figura 13. Distribuição das classes de ploidia de ADN nos diferentes estádios segundo a classificação de Ann Arbor, nos casos de LNH-B de baixo grau estudados.

De acordo com a Tabela 7, não foram encontradas associações estatisticamente significativas relativamente à ploidia de ADN e às variáveis clínico-patológicas, nos LNH-B de alto grau.

Tabela 7. Associação entre a ploidia de ADN e as variáveis clínico-patológicas nos LNH-B de alto grau.

Parâmetros	Conteúdo de ADN		p
	Diplóides n (%)	Aneuplóides n (%)	
Estadio Ann Arbor			
I	0 (0,0)	1 (10,0)	0,672
II	1 (33,3)	5 (50,0)	
III	0 (0,0)	1 (10,0)	
IV	2 (66,7)	3 (30,0)	
LDH			
Normal	1 (33,3)	4 (40,0)	0,835
Aumentada	2 (66,7)	6 (60,0)	
IPI			
Baixo risco	1 (33,3)	2 (20,0)	0,738
Risco intermédio-baixo	0 (0,0)	3 (30,0)	
Risco intermédio-alto	1 (33,3)	2 (20,0)	
Alto risco	1 (33,3)	3 (30,0)	

Nas Tabelas 8 e 9 apresentam-se os resultados encontrados entre a FFS e as restantes variáveis clínico-patológicas, para os LNH-B de baixo grau e para os LNH-B de alto grau, respectivamente.

Tabela 8. Associação entre a FFS e as restantes variáveis estudadas nos LNH-B de baixo grau.

Variáveis	Conteúdo de ADN		p
	FFS		
	$\leq 2,7$ n (%)	$> 2,7$ n (%)	
Estádio Ann Arbor			
I	1 (50,0)	1 (50,0)	0,289
II	0 (0,0)	0 (0,0)	
III	5 (100,0)	0 (0,0)	
IV	8 (72,7)	3 (27,3)	
LDH			
Normal	8 (72,7)	3 (27,3)	0,518
Aumentada	6 (85,7)	1 (14,3)	

Não se observaram associações estatisticamente significativas com as variáveis clínicas estudadas. Refira-se, no entanto, que 72,7% dos LNH-B de baixo grau com FFS baixa encontravam-se no estágio IV.

Tabela 9. Associação entre a FFS e as restantes variáveis estudadas nos LNH-B de alto grau.

Variáveis	Conteúdo de ADN		p
	FFS		
	≤ 15,7 n (%)	> 15,7 n (%)	
Estádio Ann Arbor			
I	1 (100,0)	0 (0,0)	0,359
II	4 (80,0)	1 (20,0)	
III	0 (0,0)	1 (100,0)	
IV	2 (50,0)	2 (50,0)	
LDH			
Normal	3 (75,0)	1 (25,0)	0,554
Aumentada	4 (57,1)	3 (42,9)	
IPI			
Baixo risco	1 (50,0)	1 (50,0)	0,380
Risco intermédio-baixo	2 (66,7)	1 (33,3)	
Risco intermédio-alto	3 (100,0)	0 (0,0)	
Alto risco	1 (33,3)	2 (66,7)	

Nenhuma das associações revelou diferenças estatisticamente significativas. No entanto, observa-se uma maior frequência de casos com FFS alta nos estádios e IPI mais altos e com valor aumentado de LDH.

4.3. Análise da sobrevivência

A série de casos em estudo apresentou uma sobrevivência mediana de 37 meses (entre 1 e 56 meses).

A análise estatística das variáveis clínico-patológicas e citométricas com a sobrevivência foi avaliada nos 34 casos referidos no ponto anterior.

Na Tabela 10 está representada a associação entre o grau histológico e a sobrevivência.

Tabela 10. Associação entre o grau histológico e a sobrevivência nos LNH-B.

Variáveis	Casos n	Mortes N	Sobrevivência aos 36 meses (%)	p
Grau histológico				
Baixo grau	21	3	85,7	0,037
Alto grau	13	6	53,8	

De acordo com a Tabela 10, a associação entre o grau histológico e a sobrevivência é estatisticamente significativa ($p=0,037$). Na Figura 14 apresenta-se essa associação.

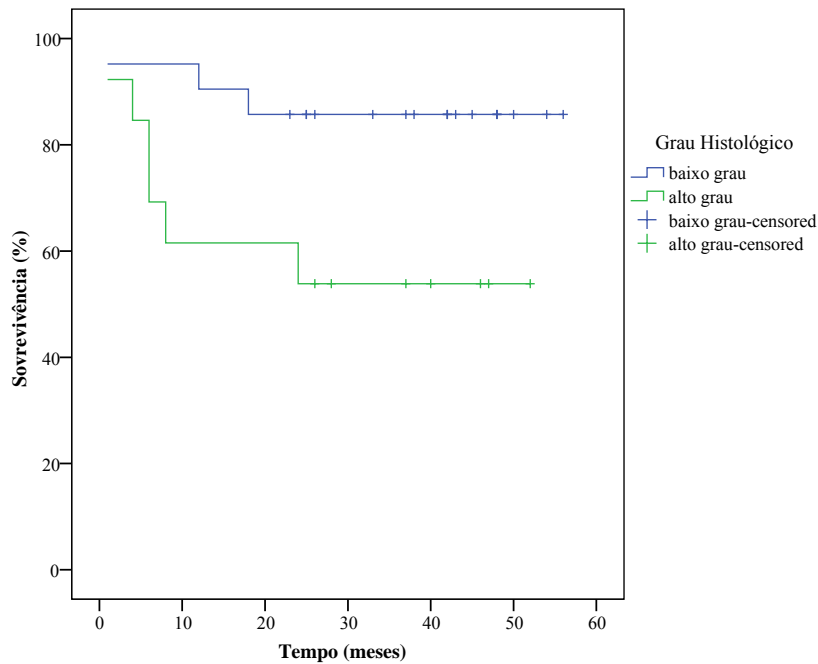


Figura 14. Demonstração da sobrevivência global nos casos LNH-B de baixo e alto grau estudados.

Nas Tabelas 11 e 12 apresentam-se os resultados obtidos relativamente à associação entre as variáveis clínico-patológicas abordadas neste trabalho e a sobrevivência separadamente para os dois grupos de LNH-B

Tabela 11. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a sobrevivência nos LNH-B de baixo grau.

Variáveis	Casos n	Mortes n	Sobrevivência aos 36 meses (%)	p
Estádio Ann Arbor				
I	4	0	100,0	0,589
II	----	----	----	
III	5	1	80,0	
IV	11	1	91,0	
LDH				
Normal	12	0	100,0	0,073
Aumentada	8	2	75,0	

Apesar de nenhuma das associações ter sido estatisticamente significativa, observou-se uma tendência para os casos com LDH aumentada apresentarem uma sobrevivência menor aos 36 meses ($p=0,073$).

Como demonstra a Tabela 12 foi encontrada associação estatisticamente significativa com o IPI ($p=0,003$).

Tabela 12. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a sobrevivência nos LNH-B de alto grau.

Variáveis	Casos n	Mortes n	Sobrevivência aos 36 meses (%)	p
Estádio Ann Arbor				
I	1	0	100,0	0,056
II	6	1	83,3	
III	1	1	0,0	
IV	5	4	20,0	
LDH				
Normal	5	1	80,0	0,111
Aumentada	8	5	37,5	
IPI				
Baixo risco	3	1	66,7	0,003
Risco intermédio-baixo	3	1	66,7	
Risco intermédio-alto	3	0	100,0	
Alto risco	4	4	0,0	

Na figura seguinte será apresentada essa associação (Figura 15).

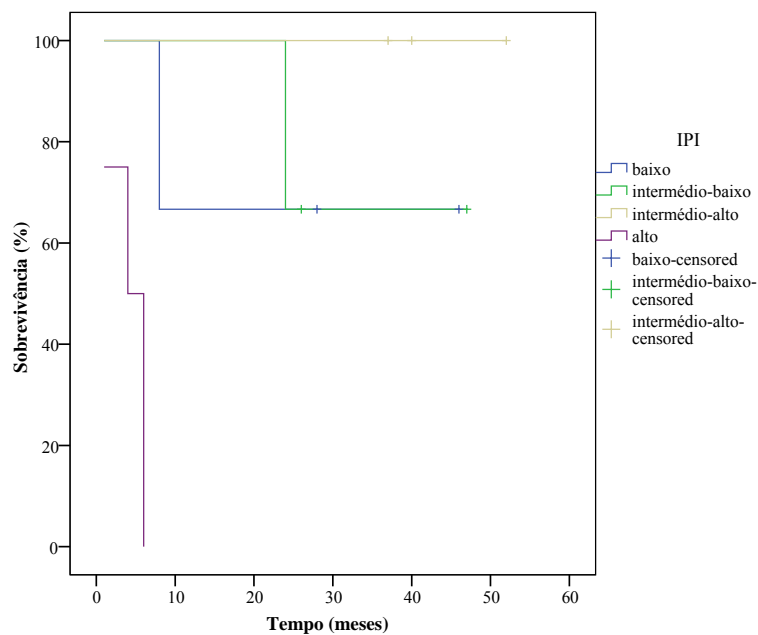


Figura 15. Demonstração da sobrevivência no IPI nos casos de LNH-B de alto grau estudados.

Seguidamente apresenta-se os resultados obtidos na análise univariada entre os parâmetros de conteúdo de ADN e a sobrevivência.

Em relação à ploidia de ADN, nos LNH-B de baixo grau, não se registaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,343$), no entanto, verificou-se que a sobrevivência aos 36 meses era menor nos casos aneuplóides de ADN (77,8%) relativamente aos diplóides (91,7%) (Figura 16).

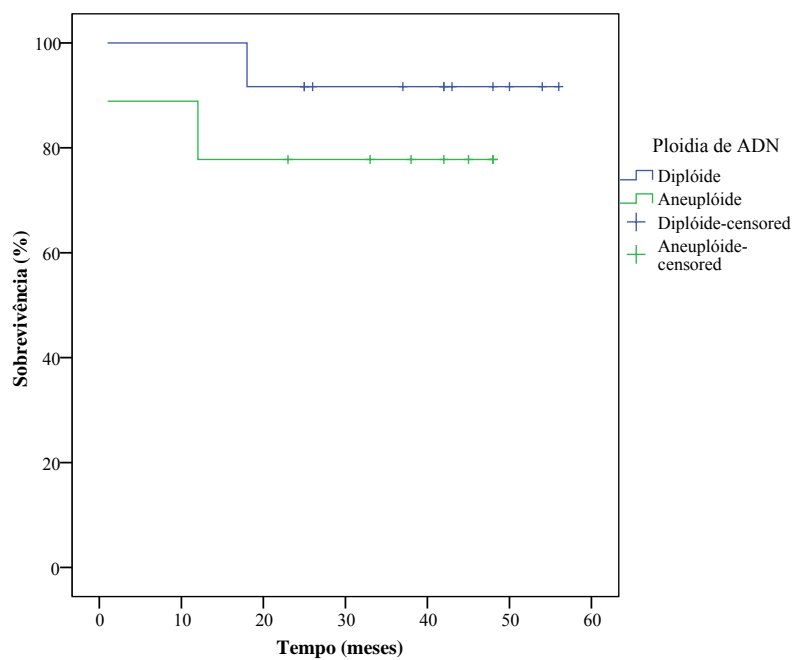


Figura 16. Demonstração da sobrevivência na ploidia de ADN nos casos de LNH-B de baixo grau estudados.

Nos LNH-B de alto grau não se observou associação estatisticamente significativa ($p=0,852$), no entanto, verificou-se que a sobrevivência aos 36 meses era menor nos casos aneuplóides de ADN (50%) do que nos diplóides (66,7%) (Figura 17).

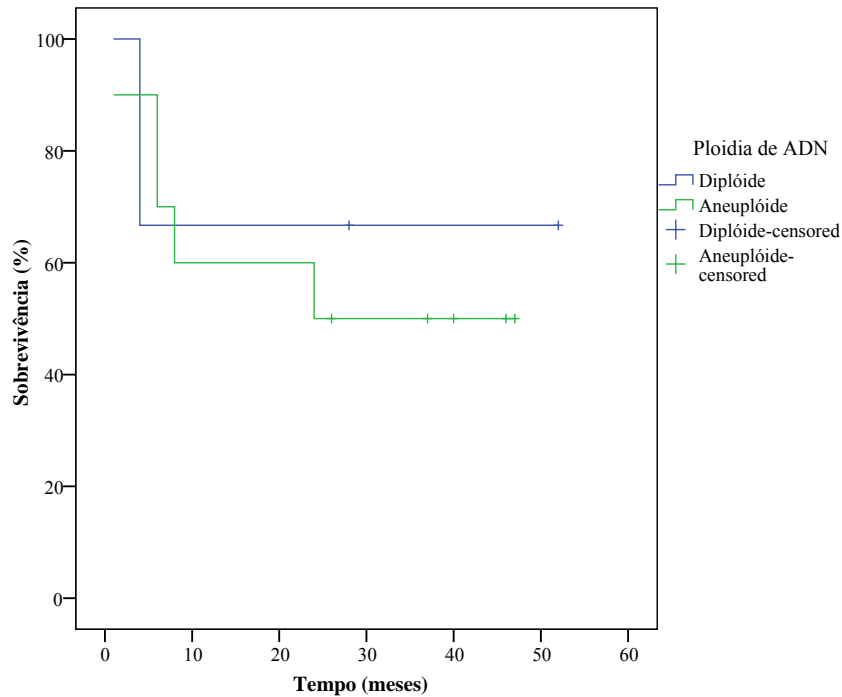


Figura 17. Demonstração da sobrevivência na ploidia de ADN nos casos de LNH-B de alto grau estudados.

Nos casos de LNH-B de alto grau, apesar de não haver diferenças significativas ($p=0,834$), observando a sobrevivência global aos 36 meses nas quatro classes da ploidia de ADN, verifica-se que há uma crescente na sobrevivência desde os casos mais aneuplóides até aos diplóides de ADN: hipertetraplóides (0%) < hiperdiplóides (50%) < “near”-diplóides (60%) < diplóides (66,7%).

Em relação à FFS, a análise da sobrevivência foi realizada separadamente para cada um dos graus histológicos utilizando o valor médio da FFS, como atrás referido.

Na Tabela 13 apresenta-se a sobrevivência global aos 36 meses nos LNH-B de baixo grau para os casos com $FFS \leq 2,7$ e $FFS > 2,7$, e LNH-B de alto grau para os casos com $FFS \leq 15,7$ e com $FFS > 15,7$.

Tabela 13. Associação entre a Fração de células em fase S (FFS) e a sobrevivência nos LNH-B de baixo e alto grau histológico.

Variáveis	Casos n	Mortes n	Sobrevivência aos 36 meses (%)	p
Baixo grau				
FFS $\leq 2,7$	14	2	85,7	0,706
FFS $> 2,7$	5	1	80,0	
Alto grau				
FFS $\leq 15,7$	7	1	85,7	0,034
FFS $> 15,7$	4	4	0,0	

No grupo de LNH-B de baixo grau a sobrevivência global aos 36 meses foi de 85,7% e 80% para os casos com FFS baixa ($\leq 2,7$) e FFS alta ($> 2,7$), respectivamente, não sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,706$). Em relação aos LNH-B de alto grau, a Figura 18 representa a associação da sobrevivência com a FFS nestes casos, associação essa que foi estatisticamente significativa ($p=0,034$): verificou-se que os casos com FFS alta ($> 15,7$) têm uma sobrevivência global menor que os casos com FFS baixa ($\leq 15,7$) (sobrevivência global aos 36 meses de 0% e 85,7%, respectivamente).

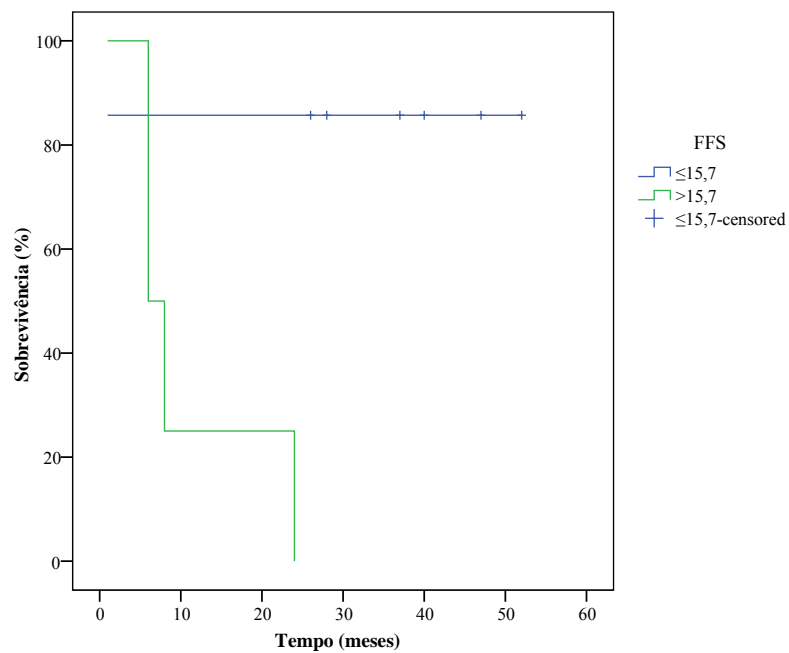


Figura 18. Associação da sobrevivência global da fracção de células em fase S (FFS) nos LNH-B de alto grau estudados.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram seguidas as recomendações estabelecidas na reunião de Consenso sobre a utilidade da avaliação do conteúdo de ADN nas neoplasias hematológicas (Duque et al., 1993), nomeadamente quanto à utilização de técnicas de dupla marcação. Este método combina a quantificação dos ácidos nucleicos e a análise da expressão antigénica das células tumorais, permitindo a avaliação do conteúdo de ADN separadamente para as populações patológica e de referência. Segundo a referida reunião de consenso, a não utilização deste tipo de metodologia era uma das principais fontes de erros neste tipo de determinação (Duque et al., 1993), devido ao efeito de diluição das células normais presentes na amostra (Pinto et al., 2003).

Neste trabalho verificou-se uma percentagem de casos com conteúdo de ADN diplóide ligeiramente superior aos aneuplóides. Outros autores encontraram proporções semelhantes de ploidia de ADN (Juneja et al., 1986; Pinto et al., 2003). Esta distribuição do padrão de ADN está de acordo com a proporção de casos de LNH-B indolentes (baixo grau) e LNH-B agressivos (alto grau) presentes na amostra. Com efeito, quando se estudou a associação entre a ploidia de ADN e o grau histológico observou-se maior frequência de diplóides nos LNH-B de baixo grau, enquanto nos LNH-B de alto grau havia maior número de aneuplóides.

Estes resultados estão de acordo com os dados revelados na reunião de consenso (Duque et al., 1993), onde é referida uma relação entre a ploidia de ADN e o grau histológico: uma grande incidência de aneuploidia nos linfomas agressivos quando comparados com os linfomas de baixo grau. Outros autores verificaram os mesmos resultados, tais como Pinto e colaboradores (Pinto et al., 2003) que afirmam que a incidência de aneuploidia é normalmente elevada nos tumores agressivos, à excepção dos linfomas de Burkitt que nesse estudo foram todos classificados como diplóides. Igualmente Joensuu e colaboradores (Joensuu et al., 1991) verificaram que a não-diploidia de ADN era mais comum nos linfomas de alto grau, de acordo com a classificação de Kiel, do que nos de baixo grau. Macartney e colaboradores (Macartney et al., 1986) obtiveram um resultado semelhante a estes em que a incidência da aneuploidia aumentou dos LNH de baixo grau para os de alto grau.

Em relação ao IA, observou-se uma distribuição bimodal, com valores na região diplóide e ligeiramente hiperdiplóide (IA entre 0,98 e 1,10) e valores na fracção tetraplóide (IA entre 1,93 e 2,09). Esta distribuição está igualmente relacionada com o grau histológico, aparecendo os LNH-B de baixo grau maioritariamente na região diplóide ou hiperdiplóide. Pinto e colaboradores (Pinto et al., 2003) verificaram também uma distribuição bimodal do IA no seu trabalho, em regiões do histograma de ADN sobreponíveis: uma ligeira hiperdiploidia (1,07 a 1,19) e uma “near”-tetraploidia (1,82 a 1,95).

As diferenças entre os dois grupos histológicos de LNH-B são igualmente confirmadas através dos seus índices proliferativos, avaliados pela FFS. De facto, verificou-se que este parâmetro é significativamente mais elevado nos casos de LNH-B de alto grau comparativamente aos de baixo grau histológico. Macartney e colaboradores (Macartney et al., 1986), no seu estudo, verificaram que os LNH de baixo grau obtiveram uma FFS baixa e os LNH de alto grau obtiveram uma FFS alta. Também Juneja e colaboradores (Juneja et al., 1986) observaram que a percentagem de células em fase S aumentou significativamente com o grau histológico: os LNH de baixo grau tiveram uma percentagem de células em fase S mais baixa do que os LNH de grau intermédio e alto. Os mesmos resultados foram obtidos por Pinto e colaboradores (Pinto et al., 2003). Estes autores concluem que a FFS é um parâmetro complementar valioso para o estadiamento dos LNH, juntamente com os aspectos morfológicos.

Neste estudo, 61,8% dos casos eram LNH-B de baixo grau e 38,2% de alto grau. Os Linfomas foliculares foram o tipo histológico mais representativo no grupo de baixo grau, enquanto os Linfomas difusos de grandes células B foram os mais representativos na classe de alto grau.

Os LNH-B de baixo grau, apesar de mais diplóides de ADN, apresentaram uma maior percentagem de casos nos estádios III e IV. Este facto está de acordo com o crescimento mais indolente deste tipo de linfomas (confirmado pelo valor mais baixo de FFS), fazendo com que a maioria dos casos seja diagnosticado já com envolvimento de vários gânglios linfáticos, do baço e, em geral, com envolvimento da medula óssea, correspondendo a um maior estágio clínico (Holman et al., 2004).

Pelo contrário, os casos de LNH-B de alto grau com estádios e classes de IPI mais elevados correspondem aos casos com maior índice proliferativo.

Em relação à sobrevivência, os LNH-B de alto grau têm claramente uma sobrevivência menor que os LNH-B de baixo grau. Na análise de sobrevivência separada para os dois graus verifica-se que nos LNH-B de baixo grau houve um número muito baixo de mortes com evidência de doença, no período de tempo de seguimento considerado no presente estudo. Este dado sugere a necessidade de um período de seguimento maior, de forma a permitir avaliar mais correctamente o valor de prognóstico das variáveis em estudo. No entanto, refira-se que os aneuplóides e os casos com LDH aumentada parecem ter sobrevivência menor. Relativamente à FFS não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os casos com FFS baixa e os com FFS alta, neste grupo histológico.

Nos LNH-B de alto grau, não se observaram diferenças na sobrevivência entre os diplóides e os aneuplóides de ADN. No entanto verificou-se que a sobrevivência ia aumentando desde o padrão mais aneuplóide até aos casos diplóides. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos publicados. Joensuu e colaboradores (Joensuu et al., 1990) verificaram que os casos de LNH-B com padrão diplóide na biópsia inicial tiveram uma tendência para uma sobrevivência mais favorável do que os casos com “near”-diploidia, aneuploidia, tetraploidia ou multiploidia, embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas. Estes autores verificaram também que se os casos “near”-diplóides fossem combinados com os casos diplóides essa tendência desaparecia. Também Pinto e colaboradores (Pinto et al., 2003) referem que a associação entre a ploidia de ADN e a sobrevivência não foi estatisticamente significativa, apesar de se ter observado uma tendência de pior prognóstico para os casos aneuplóides. Belessi e colaboradores (Belessi et al., 2003) afirmam no seu trabalho que a aneuploidia não tinha qualquer influência na sobrevivência nem na análise univariada nem na multivariada.

Em relação à FFS neste grupo de LNH-B de alto grau, o presente estudo permitiu encontrar uma associação estatisticamente significativa com a sobrevivência, ou seja, os LNH-B de alto grau classificados com FFS alta revelaram uma sobrevivência menor comparativamente com os de FFS baixa. Para além da FFS, apenas o IPI revelou valor de prognóstico: os casos classificados como de alto risco revelaram menor sobrevivência.

Esta associação entre a FFS e a sobrevivência é também referida nos estudos de Joensuu e colaboradores (Joensuu et al., 1990) e de Belessi e colaboradores (Belessi et al., 2003). Os primeiros autores verificaram que a FFS medida na biópsia inicial relacionou-se fortemente com a sobrevivência e os segundos afirmam que os casos de linfoma gástrico primário com FFS alta tiveram uma sobrevivência menor do que os doentes com FFS baixa. Apenas no trabalho desenvolvido por Pinto e colaboradores (Pinto et al., 2003) esta associação não é confirmada. Estes autores utilizaram os valores médios da FFS como pontos “cut-off” para dividir os Linfomas Não-Hodgkin em indolentes e em agressivos, e concluíram que não houve diferenças relativamente à sobrevivência.

Os resultados encontrados no presente estudo, nomeadamente a associação entre a FFS e a sobrevivência nos LNH-B de alto grau, está de acordo com o sugerido pela reunião de consenso e generalidade dos estudos realizados posteriormente. No entanto é necessário confirmar estes resultados numa análise estatística multivariada. Para tal é necessário novo estudo com maior número de casos de LNH-B, bem como um maior período de seguimento dos doentes, especialmente nos LNH-B de baixo grau. Belessi e colaboradores (Belessi et al., 2003) concluem, igualmente, no seu trabalho, que se deveriam realizar estudos futuros com maiores grupos de doentes e com um “follow-up” mais longo para ajudar a clarificar o papel da ploidia de ADN e da FFS na sobrevivência de doentes com linfomas gástricos.

Para além do número de casos e tempo de seguimento dos doentes, os estudos futuros deverão continuar a recorrer à técnica de dupla marcação utilizada no presente estudo, de forma a permitir uma análise selectiva das diferentes populações celulares presentes na amostra, e assim fornecer dados seguros para investigar na íntegra o valor da FFS como factor de prognóstico independente nos LNH-B.

ESTUDOS FUTUROS

7. ESTUDOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a realização de diversos estudos, nomeadamente:

- Prosseguir a avaliação do conteúdo de ADN em novos casos de LNH-B de baixo e alto grau, de forma a aumentar a série em estudo.

- Aumentar o tempo de seguimento desses casos, de forma a ter uma maior percepção do comportamento clínico da doença.

- Realizar uma análise estatística multivariada dos casos para se estudar o valor de prognóstico independente das variáveis em estudo.

- Estudar de forma complementar aos parâmetros analisados por citometria, marcadores imunofenotípicos e genéticos para tentar identificar os casos com um pior prognóstico.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Belessi, C. J., Parasi, A. S., Manioudaki, H. S., Laoutaris, N. P., Legakis, N. C., Peros, G. T., Androulakis, G. A. (2003). Prognostic Impact of DNA Ploidy Pattern, S-Phase Fraction (SPF), and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Patients With Primary Gastric Lymphoma, *Journal of Surgical Oncology*, 82, pp. 247-255.

Bergers, E. (1997). Flow cytometry in breast cancer; methodological and clinical aspects (dissertation). Amsterdam: Vrije Universiteit, pp. 1-213.

Braylan, R. C. (1993). Lymphomas. In: Bauer K. D., Duque R. E., Shankey T. V. (Ed.). *Clinical Flow Cytometry: Principles and Application*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins; pp. 203-234.

Braylan, R. C., Benson, N. A., Nourse, V. A. (1984). Cellular DNA of human neoplastic B-cells measured by flow cytometry, *Cancer Res*, 44, pp. 5010-5016.

Brown, M., Wittwer, C. (2000). Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology, *Clinical Chemistry*, 46 (8B), pp. 1221-1229.

Duque, R. E., Andreeff, M., Braylan, R. C., Diamond L. W., Peiper, S. C. (1993). Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Neoplastic Hematopathology, *Cytometry*, 14, pp. 492-496.

Harris, N. L. (2001). Mature B-cell neoplasm. In: Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., Vardiman, J. W. (Ed.). *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, IARC Press, pp. 121-187.

Holman, P., Garrett, J.; Jansen, W. (2004). *100 Questions & Answers About Lymphoma*. USA, Jones and Bartlett.

Joensuu, H., Klemi, P., Jalkanen, S. (1990). Biologic Progression in non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer*, 65, pp. 2564-2571.

Joensuu, H., Klemi, P., Söderström, K., Jalkanen, S. (1991). Comparison of S-Phase Fraction, Working Formulation and Keil Classification in non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer*. 68, pp. 1564-1571.

Lackowska, B., Gruchala, A., Niezabitowski, A., Radkowski, A., Skolyszewski, J., Rys, J., Szklarski, W., Sokolowski, A. (1999). Prognostic and predictive evaluation of DNA content, S-phase fraction and immunophenotyping in non-Hodgkin's lymphomas in adults: A prospective study. *Pol J Pathol*, 50 (1), pp. 9-23.

Lee, S., Tolmachoff, T., Marchevsky, A. M. (1994). DNA content analysis ("ploidy") by image analysis: clinical applications and comparison with flow cytometry. *In: Marchevsky AM, Bartels PH. (Ed.). Image analysis: a primer for pathologists*. New York, Raven Press, Lta, pp. 261-307.

Nunez, R. (2001). DNA measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 3 (3), pp. 67-70.

Orfao, A., González, M., Ciudad, J., et al. (1993). Cell Cycle and DNA aneuploidy: biological bases and terminology. *In: Sampedro A., Orfao A. (Ed.). DNA cytometric analysis*. Oviedo: Servicio de Publicaciones, Universidad de Oviedo, pp. 13-24.

Orfao, A., Ruiz-Arguelles, A., Lacombe, F., Ault, K., Basso, G., Danova, M. (1995). Flow Cytometry: its applications in Hematology, *Haematologica*, 80, pp. 69-81.

Palmeira, C., Ribeiro, N., Ribeiro, E., Godinho, I., Sousa, M., Caetano, C., Lima, E., Martins, G. (2007). Avaliação do Conteúdo de DNA por citometria de fluxo em Linfomas não-Hodgkin de células B: situação actual e perspectivas futuras, *Faculdade Ciências da Saúde*, In Press.

Pinto, A. E., Cabeçadas, J., Nóbrega, S. D., Mendonça, E. (2003). Flow Cytometric S-Phase Fraction as a Complementary Biological Parameter for the Cytological Grading of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Diagnostic Cytopathology*, 29 (4), pp. 194-199.

Rabinovitch, PS. (1993). Practical Considerations for DNA content and cell cycle analysis. In: Bauer KD., Duque RE., Shankey TV. (Ed.). *Clinical Flow Cytometry: Principles and Application*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, pp. 117-143.

Registo Oncológico da Região Norte (RORENO). Instituto Português de Oncologia 2002; In Press.

Stokke, T., Holte, H., Smedshammer, L., Smeland, E. B., Kaalhus, O., Steen, H. B. (1998a). Proliferation and apoptosis in malignant and normal cells in B-cell non-Hodgkin's lymphomas, *British Journal of Cancer*, 77 (11), pp. 1832-1838.

Stokke, T., Smeland, E. B., Kvaløy, S., Holte, H. (1998b). Tumour cell proliferation but not apoptosis, predicts survival in B-cell non-Hodgkin's lymphomas, *Br J Cancer*, 77, pp. 1839-1841.

Witzig, T., Habermann, T., Kurtin, P., Schroeder, G., Stenson, M., Greipp, P. (1995). S-Phase Fraction by the Labeling Index as a Predictive Factor for Progression and Survival in Low Grade Non-Hodgkin's Lymphoma, *Cancer*, 76 (6), pp. 1059-1064.

The International Agency for Research on Cancer-France GLOBOCAN. [Em linha]. Disponível em <<http://www-dep.iarc.fr/>> [Consultado em 21/06/2007].