

AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO EM LINFOMAS NÃO HODGKIN DE CÉLULAS B: SITUAÇÃO ACTUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Carlos Palmeira

Assistente Principal • Serviço de Imunologia – IPOPFG-EPE;
Mestre Assistente • Grupo de Patologia, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
carlosp@ufp.pt

Neuza Ribeiro · Elisabete Ribeiro

Alunas de ACSP – UFP
13181@ufp.pt • 12093@ufp.pt

Inês Godinho · M. Emília Sousa · Clarisse Caetano

Técnicas Superiores • Serviço de Imunologia – IPOPFG-EPE
imunolog@ipopoporto.min-saude.pt

Eduardo Lima

Licenciado em ACSP • Serviço de Imunologia – IPOPFG-EPE
edlima1982@hotmail.com

Gabriela Martins

Assistente Hospitalar Graduada • Serviço de Imunologia – IPOPFG-EPE
gmartins@ipopoporto.min-saude.pt

Resumo

Os Linfomas não Hodgkin de células B (LNH-B) constituem um grupo biologicamente heterogêneo de neoplasias hematológicas. Para a sua classificação e definição do prognóstico têm sido referidas, como importantes, diversas variáveis, entre elas a avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.

No presente trabalho procurou-se realizar uma análise crítica dos resultados publicados em 1993 aquando da reunião de consenso destinada a avaliar o valor clínico do estudo do conteúdo de DNA nas neoplasias hematológicas ("Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Neoplastic Hematopathology", Maine, 1992), e nos estudos publicados posteriormente.

Palavras-chave

Linfoma não Hodgkin de células B; conteúdo de DNA; citometria de fluxo; ploidia de DNA; fracção de células em fase S

Abstract

B-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas comprise a biological heterogeneous group of haematological neoplasms with variable clinical behaviour. For clinical and prognostic purposes their classification has been based on several important parameters such as DNA content measured by flow cytometry.

The present work tries to analyse the results and the recommendations published in the "Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Neoplastic Hematopathology" (Maine, 1992), and the studies published thereafter.

Key-words

B-cell non-Hodgkin's lymphoma; DNA content; flow cytometry; DNA ploidy; S-phase fraction

Os Linfomas não Hodgkin de células B (LNH-B) constituem um grupo biologicamente heterogêneo de tumores do sistema linfático, que apresentam diferentes características celulares e manifestações clínicas, tendo em comum uma expansão clonal das células B malignas (Braylan, 1993 e Harris, 2001). Para a sua distinção e caracterização, contribuem dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e, em alguns casos, os achados moleculares e citogenéticos (Harris, 2001). Em termos de prognóstico, os LNH-B podem ser classificados em tumores “indolentes” (baixo grau) e tumores “agressivos” (alto grau) (Stansfeld, 1988 e Harris, 2001). Têm sido referidas na literatura diversas variáveis como sendo importantes para esta classificação, entre elas a avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (Duque, 1993, Stokes, 1998b e Pinto, 2003).

Durante o processo de transformação maligna e progressão tumoral, ocorrem 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 (Lee, 1994). A acumulação destes eventos genéticos, pode ser detectada por alterações no conteúdo de DNA das células tumorais (Lee, 1994).

A avaliação do conteúdo de DNA celular é uma das principais aplicações da citometria de fluxo. A utilização de corantes fluorescentes permite marcar o DNA celular de uma forma estequiométrica, ou seja, a quantidade de corante é directamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula. Esta relação é representada graficamente através do denominado Histograma de DNA (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 DNA celular – conteúdo de DNA 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).

Nos últimos 20 anos, este tipo de estudo passou da investigação básica para a prática laboratorial, com aplicação na clínica, nomeadamente ao nível da hemato-oncologia e em particular, nos LNH-B.

Com a finalidade de avaliar a utilidade clínica da avaliação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo nas neoplasias hematológicas, realizou-se em 1992, Prout's Neck, Maine, uma reunião de consenso, denominada “Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Neoplastic Hematopathology” (Duque, 1993). Neste encontro de especialistas, foi revista a maioria dos dados publicados até à data, relativos à análise de DNA por citometria neste grupo de neoplasias.

Em relação aos LNH-B, foi avaliado o valor clínico da ploidia de DNA e da FFS. A ploidia de DNA, 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 coeficientes de variação (CV) elevados, o que poderá ter diminuído a capacidade de detecção de pequenos desvios no conteúdo de DNA (os chamados “near diploid DNA”).

Relativamente à FFS, este parâmetro citométrico é apontado nesta revisão de consenso 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.

De forma a clarificar e comprovar as associações acima referidas entre o conteúdo de DNA e a classificação e prognóstico dos LNH-B, os peritos presentes nesta reunião definiram diversas recomendações que deveriam ser seguidas na realização de novos estudos, nomeadamente no que se refere à preparação da amostra e nos procedimentos de análise, que se expõem a seguir:

- A utilização de amostras de tecidos frescos, não fixados, de forma a permitir, por um lado, reduzir a quantidade de resíduos celulares e assim alcançar o melhor CV possível do pico G0/G1, e por outro, preservar as características imunofenotípicas das células em suspensão.
- A obtenção de um CV baixo do pico G0/G1 é importante, visto grande parte dos LNH-B apresentarem apenas pequenas variações no conteúdo de DNA, com índices de DNA entre 1,01 e 1,15. De referir, que a detecção destes conteúdos aneuploides podem ter importância no diagnóstico de alguns tipos de LNH-B, nomeadamente nos de alto grau (Harris, 2001).
- Antes de ser efectuada a análise de DNA, deverá ser confirmada a presença de células patológicas na amostra e respectiva percentagem. Esta determinação poderá ser realizada através de métodos de análise do DNA por dupla marcação. Este tipo de método consiste na combinação da avaliação do conteúdo de DNA e a análise da expressão antigénica das células tumorais. Desta forma, é possível analisar o conteúdo de DNA das células neoplásicas separadamente das células normais presentes na amostra. Esta questão é particularmente importante no cálculo da FFS da subpopulação neoplásica, devido ao efeito de diluição causado pela mistura com células normais diplóides (Braylan, 1984, Duque, 1993 e Stokke, 1998a).

Seguindo algumas das orientações do consenso atrás referido, Stokke T. e colaboradores (Stokke, 1998b), estudaram biópsias ganglionares de uma série de 92 casos de LNH-B. As suspensões celulares foram criopreservadas e posteriormente processadas de forma a permitir a avaliação das fracções de células em apoptose e das células em fase S, simultaneamente com a expressão das cadeias leves das células tumorais (Stokke, 1998a). Estes autores demonstraram na análise multivariada dos diferentes parâmetros relacionados com o prognóstico, que a FFS era o factor de prognóstico independente mais forte. Neste trabalho não foi avaliado o valor de prognóstico da ploidia de DNA.

Mais recentemente, Pinto A.E. e colaboradores (Pinto, 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 (sobrevida global aos 5 anos),

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. Esta incapacidade, deverá estar relacionada com o facto de neste estudo não ter sido utilizado uma técnica de dupla marcação como recomendado pelo consenso (foi utilizado o método de Deitch, 1982), não tendo sido possível calcular a FFS exclusivamente das células neoplásicas. Em relação à ploidia de DNA, e apesar da maior incidência do padrão aneuplóide nos tumores agressivos relativamente aos indolentes (22,7% e 12,5%, respectivamente), não observaram associações estatisticamente significativas com a classificação do grau e com o prognóstico.

Também em 2003, Belessi C.J. e colaboradores (Belessi, 2003), realizaram um estudo retrospectivo em 29 doentes com linfoma gástrico primário. Da análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, os autores referem que a ploidia de ADN não revelou qualquer impacto na sobrevida dos doentes com este tipo de linfoma, e que a FFS apresentou valor de prognóstico mas unicamente na análise univariada. O facto de terem sido estudadas neste trabalho amostras incluídas em parafina e realizada a marcação monoparamétrica do DNA (segundo a técnica de Hedley, 1983), poderá ter contribuído para a falta de associações estatisticamente significativas.

As recomendações definidas pelo consenso 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 DNA e, por outro, a avaliação do ciclo celular das células tumorais, independentemente da maior ou menor representatividade destas células na amostra.

O grupo de trabalho responsável pelo presente artigo tem vindo a realizar, nos últimos 4 anos, de forma sistemática, a avaliação do conteúdo de DNA em amostras de doentes com LNH-B. Têm sido utilizadas amostras frescas de gânglio linfático, sangue periférico ou aspirado medular, sujeitas a dupla marcação, usando simultaneamente anticorpos monoclonais específicos para as células patológicas e um corante específico para o DNA tal como foi definido pelo consenso. Seguindo as orientações do consenso este grupo de trabalho pretende, com um número de casos suficiente e tempo de "follow-up" adequado, tentar demonstrar a utilidade clínica dos diferentes parâmetros citométricos relacionados com a avaliação do conteúdo de DNA em LNH-B, nomeadamente a ploidia de DNA e a FFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELESSI, C.J., Parasi, AS., Manioudaki, HS., Laoutaris, NP., Legakis, NC., Peros, GT., Androulakis, GA. (2003). Prognostic Impact of DNA Ploidy Pattern, S-Phase Fraction (SPF), and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Patients With Primary Gastric Lymphoma. *In: Journal of Surgical Oncology*, 82, pp. 247-255.
- BRAYLAN, RC. (1993) Lymphomas. *In: Bauer KD., Duque RE., Shankey TV. (Ed.). Clinical Flow Cytometry: Principles and Application*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins; pp. 203-234.
- BRAYLAN, RC., Benson, NA., Nourse, VA. (1984). Cellular DNA of human neoplastic B-cells measured by flow cytometry. *In: Cancer Res*, 44, pp. 5010-5016.

- DEITCH, AD., Law, H., White, RD. (1982). A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *In: J Histochem Cytochem*, 30, pp. 967-972.
- DUQUE, RE., Andreeff, M., Braylan, RC., Diamond LW., Peiper, SC. (1993). Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Neoplastic Hematopathology. *In: Cytometry*, 14, pp. 492-496.
- HARRIS, NL. (2001). Mature B-cell neoplasm. *In: Jaffe, ES., Harris, NL, Stein, H., Vardiman, JW. (Ed.). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon, IARC Press, pp. 121-187.
- HEDLEY, DM., Friendlander, ML., Taylor IW., et al. (1983). Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *In: J Histochem Cytochem*, 31, pp. 1333-1335.
- LEE, S., Tolmachoff, T., Marchevsky, AM. (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.
- PINTO, AE., Cabeçadas, J., Nóbrega, SD., Mendonça, E. (2003). Flow Cytometric S-Phase Fraction as a Complementary Biological Parameter for the Cytological Grading of Non-Hodgkin's Lymphoma. *In: Diagnostic Cytopathology*. 29, Nº 4/ Março, 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.
- STANSFELD, A., Diebold, J., Noel, H., Kapanci, Y., Rilke, F., Kelenyi, G., Sundstrom, C., Lennert, K., van Unnik, JA., Mioduszewska, O., Wright, DH. (1988). Updated Kiel classification for lymphomas. *In: Lancet*, 1, pp. 292-293.
- STOKKE, T., Holte, H., Smedshammer, L., Smeland, EB., Kaalhus, O., Steen, HB. (1998a). Proliferation and apoptosis in malignant and normal cells in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *In: British Journal of Cancer*, 77, Nº 11/ Novembro, pp. 1832-1838.
- STOKKE, T., Smeland, EB., Kvaløy, S., Holte, H. (1998b). Tumour cell proliferation but not apoptosis, predicts survival in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *In: Br J Cancer*, 77, pp. 1839-1841.