

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/10676**  
**IB/81430**

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1989*

BC/10676  
IB/81430

51030  
FATIMA APARECIDA BOTTCHER LUIZ



Este exemplar corresponde à redação final da tese de mestrado pela candidata Fatima Aparecida Bottcher Luiz e aprovada pela Comissão Julgadora  
Regina Pisani

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE UM ESQUEMA POLIQUIMIOTERÁPICO:  
EFEITOS SOBRE LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO,  
PROVENIENTES DE PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA.**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de MESTRE em Biologia, na área de Genética Médica.

**ORIENTADORA: DR<sup>a</sup>. REGINA DE CASTRO BICUDO PISANI**

CAMPINAS

1989

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

CLASSIF. **T**  
AUTOR. **L968**  
V. .... EX. ....  
TOMBO **10676**  
**1B1889**  
**CM000353467**

1B/81430  
BY 10676

*10/10/1968*

Aos meus pais João e Nide,  
Ao Dema, à Maíra e ao  
Pedro Henrique.

## AGRADECIMENTOS

- A Dra. Regina de Castro Bicudo Pisani, pelos ensinamentos e orientação constantes e sobretudo pela amizade dedicada em todos os momentos deste trabalho e da minha vida profissional.
- Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho, meu orientador de programa durante todos os anos de aluna de pós-graduação.
- A Lúcia Maria Fagian de Carvalho, pela amizade, pela ajuda e disponibilidade nos momentos mais difíceis.
- Ao Sérgio Bastos, pela dedicação com que realizou o estudo estatístico.
- Ao Departamento de Tocoginecologia, pelo estímulo e apoio irrestritos à execução deste trabalho.
- A Sub-Comissão de Pós-Graduação em Genética, pela compreensão e apoio oferecidos à minha pessoa.
- A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais.

- Aos colegas do Departamentos de Farmacologia e de Patologia Clínica, pelo empréstimo de salas e aparelhos.
- Aos Doutores Luiz Carlos Teixeira e Luiz Petrilli, por terem possibilitado o contato com as pacientes.
- Aos colegas do Laboratório de Genética da Reprodução, especialmente à Nicéia Gonçalves Marrone e Flávia Franco Gellert.
- A Assessoria Científica do Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher, especialmente ao Ricardo Leite Hoffmann, Fátima Juliana C. Marsula e Lúcia Helena E. A. de Oliveira, pela assistência técnica na versão final desta tese.
- Ao Centro de Processamento de Dados, especialmente ao Moacir Procopio.
- As enfermeiras do Setor de Oncologia do Hospital das Clínicas e do Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher (UNICAMP), pelas coletas de sangue.

- Aos queridos amigos, companheiros de todos os momentos:  
Francisco Antonio Fazano, Joel Salles Giglio, Mara Liza M.  
B. Burmester, Mara Aparecida de Lúcio e Maria Helena Krae-  
mer.
  
- As pacientes do Setor de Oncologia que, embora anônimas,  
permitiram a realização deste estudo.

## SUMÁRIO GERAL

1 - INTRODUÇÃO.....	001 - 011
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	012 - 034
2.1 - O ESQUEMA CMF.....	013 - 017
2.2 - A AMOSTRA.....	017 - 019
2.3 - SORO, MEIOS NUTRITIVOS E SOLUÇÕES.....	019 - 026
2.4 - PROCEDIMENTOS.....	027 - 030
2.5 - CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO.....	030 - 033
2.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	033 - 034
3 - RESULTADOS.....	035 - 051
4 - DISCUSSÃO.....	052 - 071
5 - CONCLUSÕES.....	072 - 074
6 - RESUMO.....	075 - 078
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	079 - 102



## **INTRODUÇÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

O emprego dos agentes citostáticos no tratamento de doenças humanas representou um dos maiores avanços em medicina, na década de quarenta (Burchenal, 1977; Calabresi & Parks Jr, 1980). Em oncologia, a associação dos tratamentos cirúrgico e quimioterápico, e posteriormente a introdução da radioterapia e da hormonioterapia como tratamentos auxiliares propiciaram, se não a cura, pelo menos uma sensível melhora na extensão e qualidade de vida dos pacientes (Farber et alii, 1948; Progress Report, 1961; Kennedy, 1965; Calabresi & Parks Jr., 1980).

O êxito obtido nestes programas encorajou a pesquisa de novas drogas, bem como o emprego destas em novos esquemas, em combinações complexas de agentes, dosagens, vias de administração e períodos de tratamento (Martin & Gelhorn, 1951; Freireich, 1961; Hart et alii, 1976) resultando, na atualidade, em um aumento considerável na população de indivíduos sobreviventes de uma primeira malignidade e estendendo o período livre de doença entre 5 e 15 anos (Jasmin, 1988). Segundo Jasmin, 1988, as chances de cura, são variáveis em função dos diferentes tipos de tumores mas restringem-se, em média, a apenas 10% da população adulta. Por outro lado, a expectativa de vida na população infantil chega a atingir 50% dos casos, nos centros mais avançados de tratamento (Waskerwitz & Ruccione, 1985).

Devido às propriedades imunossupressoras dos agentes citostáticos, a utilização destes em situações que não envolviam malignidade tornou-se também uma opção satisfatória, especialmente no tratamento de condições patológicas de origem autoimune, em pacientes resistentes aos tratamentos convencionais com base na administração de esteróides. Assim, o emprego de drogas antineoplásicas tem sido frequente no tratamento da artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, pênfigos vulgar, psoríase, além de constituir uma terapia de suporte no controle de rejeição heteróloga em indivíduos submetidos a transplantes renais e de medula (Page et alii, 1971; Steimberg et alii, 1973; Christophides N, 1984). Mais recentemente, alguns desses agentes têm sido administrados, com sucesso, na indução de aborto terapêutico (Feichtinger & Kemeter, 1987; Higgins & Schwartz, 1986), bem como no tratamento das síndromes nefróticas (Lehnert et alii, 1982), e da anemia aplástica severa (Griner, P, 1980).

Paralelamente a esses avanços, a literatura tem acumulado publicações a respeito dos efeitos colaterais e das sequelas, muitas delas irreversíveis, sobre os sistemas renal, hepático, cardíaco, neurológico e sobretudo hematopoiético (Bender & Young, 1978; Benedetti et alii, 1984; Lanse et alii, 1985; Pastore et alii, 1987). No sistema reprodutor, esses agentes podem induzir a atrofia testicular e ovariana, com reversibilidade parcial ou total, dependendo das dosagens recebidas, bem como da idade em que a droga foi

administrada (Fairley et alii, 1972; Lentz et alii, 1977; Sussman & Leonard, 1980; Damewood & Grochow, 1986). Os efeitos teratogênicos, embora não conclusivos, têm sido relatados em alguns casos, como nos abortos espontâneos, em enfermeiras que manipulavam agentes antineoplásicos (Selevan et alii, 1985; Kalter, 1986), assim como em mulheres que fizeram uso da medicação durante a gravidez. Em alguns conceptos nascidos a termo, foram verificados casos de palato fendido, hidrocefalia e meningocele (Thiersch & Wash, 1952, Sokal & Lesmann, 1960).

Além desses inconvenientes, avolumaram-se as publicações relatando um aumento de incidência de um segundo câncer, não relacionado com o primeiro, anos após o tratamento de neoplasias primárias com citostáticos (Li et alii, 1975; Harris, 1976). O mesmo risco foi verificado nos pacientes com doenças benignas que também se utilizaram desses agentes (Callen, 1983; Clements & Davis, 1986; Baker et alii, 1987).

Passada a euforia inicial, surge a necessidade de avaliar os efeitos tóxicos gerados pelo emprego generalizado desses fármacos, e sobretudo de investigar o risco potencial sobre o genoma, bem como sobre o sistema imunológico do indivíduo. Neste sentido, vários sistemas biológicos têm sido propostos, cada qual com suas vantagens e limitações características.

Nos sistemas "in vitro", onde os citostáticos são acrescentados diretamente ao meio de cultura, vários ti-

pos de resposta têm sido obtidos. Em uma linhagem celular de tumor de Burkitt, Bishum (1971), encontrou um aumento de "gaps" e quebras, além de poliploidias e quadrirradiais, após exposição a concentrações variadas de ciclofosfamida (cy). Resultados semelhantes foram obtidos em linhagens de hepatomas humanos (Dearfield et alii, 1983), assim como em culturas primárias de células hepáticas advindas de murinos (Rossi et alii, 1987).

A utilização de linfócitos de sangue periférico estimulados pela fitohemaglutinina (PHA), em sistemas semelhantes, tem gerado resultados controversos. Assim, a CY parece induzir a um aumento de aberrações estruturais em geral (Sargent et alii, 1987), além de poliploidias e endoreduplicações (Nasjleti & Spencer, 1967) dose-dependentes, enquanto que a indução de troca entre cromátides irmãs (TCI) foi considerada por Raposa (1978) como não significativa estatisticamente. Por outro lado, alguns estudos indicam que alterações do tipo "gaps" e quebras (Hampel et alii, 1966; Hsu, 1981; Au et alii, 1980), assim como TCI (Hsu, 1980), ocorreriam apenas após a ativação metabólica da CY. Joenje & Oestra (1986), no entanto, referem um aumento significativo de TCI, mesmo sem ativação deliberada da droga. Análises feitas com o metotrexato (MTX) revelaram-se igualmente inconclusivas, pois Hampel et alii (1966), não encontraram qualquer dano cromossômico em linfócitos, enquanto que Voorhees et alii (1969), e posteriormente Mondello et alii (1984), afirmaram que as aberrações geradas seriam dependentes das concentrações da droga no meio de cultivo.

A resposta blastogênica frente ao estímulo da fitohemaglutinina (PHA) também se mostra variável, diminuindo sensivelmente em concentrações de CY entre 20 e 160 g/ml (Sharma, 1983), e apenas parcialmente em concentrações menores. O MTX teria um efeito equivalente somente em concentrações elevadas, superiores a 75 g/ml (Lopes Cardozo, 1970; Rozenszajn & Rudnay, 1974). A 5-fluoruracila (5-FU), por sua vez, agiria como um dos mais potentes inibidores de resposta, com níveis de depressão superiores à ciclofosfamida, colchicina, vinblastina e daunorubicina, tanto "in vitro", como "in vivo" (Astaldi et alii, 1969).

Embora essas informações constituam um parâmetro importante na avaliação desses agentes, os estudos ainda não são conclusivos. Segundo Sieber & Adamson (1975), os estudos "in vitro" incluem variações metodológicas significativas, relacionadas com as concentrações das drogas nos meios de cultivo, com os sistemas empregados na ativação da droga, no caso dos experimentos com a ciclofosfamida, com o período de cultivo das células a serem submetidas a análise, e ainda com a própria constituição do meio de cultivo que, segundo Rozenszajn (1974) poderia, nos casos de avaliação dos agentes antimetabólitos, suprir as deficiências geradas pelo fármaco.

Em pesquisas com animais de experimentação, alguns efeitos estão praticamente estabelecidos. Assim, existe uma correlação direta entre os abortos ou malformações congênitas e o período ao qual a fêmea prenhe foi ex-

posta a uma injeção única e maciça de CY (Ashby, et alii 1976; Singh et alii, 1984; Trasler et alii, 1986). A resposta blastogênica dos animais nascidos após experimentos dessa natureza se revela elevada quanto aos linfócitos B, e praticamente inalterada nos linfócitos T (Luebke et alii, 1986). Em murinos adultos receptores de tumor ascítico, aos quais foi administrada uma injeção de CY as células tumorais, bem como da medula óssea, apresentaram um aumento de aberrações, principalmente "gaps" de cromátides e isocromátides (Arrighi, et alii 1962). Análises citogenéticas feitas por Goetz et alii (1975) em várias espécies de roedores e na espécie humana, revelaram que os linfócitos advindos desses animais apresentavam sensibilidade variada à CY. Os níveis de toxicidade, quando comparados através dos percentuais de quebras, gaps e trocas mútuas, em material de medula óssea, indicavam o camundongo como o mais sensível, seguido pelo rato, hamster chinês e, por último, o homem. Dearfield et alii (1985) verificaram ainda que, em ratos, o tecido da medula óssea mostrava-se mais sensível à CY do que os linfócitos de sangue periférico estimulados pela PHA. O plasma advindo desses animais era capaz de induzir troca entre cromátides irmãs em linhagens celulares estabelecidas. Com relação à transformação blástica, o tratamento de murinos com MTX ou com 5-FU resultava em um aumento inicial da resposta proliferativa por estímulo da PHA, seguido por um período de declínio associado à linfopenia (Scheiffarth et alii, 1973).

Embora esses experimentos apresentem um grande número de variáveis sob controle, os resultados não têm sido equivalentes em humanos, não somente devido à diferença de sensibilidade mencionadas por Goetz et alii, (1975), mas também pelas variações quanto às dosagens e vias de administração. Nos animais, as doses são geralmente subletais e a via de administração intraperitoneal, o que constitui situação rara a ser empregada em pacientes, nas quais a administração é via de regra intravenosa.

Considerando os inconvenientes dos sistemas que acrescentam as drogas "in vitro" e dos que utilizam animais de experimentação, grande parte das análises a respeito do potencial genó e imunotóxico dessas drogas tem sido feita a partir de material biológico advindo dos próprios indivíduos expostos, acarretando outras dificuldades, principalmente em função da heterogeneidade das amostras, frequentemente compostas por pacientes portadores de condições patológicas de etiologias variadas as quais exigem diferentes esquemas de tratamento, ajustados para cada indivíduo em função da idade, sexo, gravidade da doença, sensibilidade ou resistência ao tratamento (Bridge & Melamed, 1972; Schinzel & Schmid, 1976; Kapadia et alii, 1980; Thomas, et alii, 1983; Pastore, B. et alii, 1987). É também por razões semelhantes que os trabalhos que visam a avaliação dos efeitos dos citostáticos sobre os cromossomos constituem, via de regra, estudos isolados, onde apenas algumas variáveis são mantidas sob controle. Neste contexto, a cultura de linfócitos



tos de sangue periférico tem sido o sistema mais frequentemente empregado, quer pela facilidade de obtenção do material, quer pelas suas implicações com o sistema imune, uma vez que a estimulação dos linfócitos pela fitohemaglutinina representa também, segundo Creaven & Mihlich (1977), uma medida indireta da capacidade imune. No entanto, a correlação entre o nível de resposta e os efeitos decorrentes da aplicação dos medicamentos permanece obscura, uma vez que a maioria dessas avaliações foram feitas apenas em uma ocasião, desconsiderando a situação prévia ao tratamento (Bridge & Melamed, 1972; Jensen & Nyfords, 1979; Schuller et alii, 1981; Robinson et alii, 1982). Além disso, as análises concentram, em um único grupo, pacientes com idades diferentes, com períodos de exposição às drogas extremamente variáveis, de poucos meses até anos de tratamento (Miller et alii, 1978; Aronson et alii, 1982; Garcia et alii, 1986), ou embasam suas conclusões a partir de uma casuística pequena, via de regra inferior a cinco indivíduos (Astaldi et alii, 1969; Bridge & Melamed, 1972; Tolchin et alii, 1974).

Apesar desses inconvenientes, os estudos citogenéticos realizados em material advindo de pacientes sob tratamento quimioterápico têm apontado os agentes alquilantes, e especialmente a ciclofosfamida, como indutora de aberrações estruturais do tipo "gaps" e quebras de uma ou duas cromáticas, constricções secundárias e fragmentos acêntricos, além de aumentar a frequência de alterações numéricas (Tolchin et alii, 1974; Kapadia et alii, 1980; Garcia et alii, 1986).

Com relação ao MTX, Hampel et alii (1966) não encontraram alterações cromossômicas em seus pacientes, enquanto Jensen & Nyfords (1979) e Ryan et alii (1970) consideraram que, embora o número de aberrações em geral estivesse aumentado, estas não seriam suficientes para acarretar efeitos tardios consideráveis. Os estudos de Melnyk et alii (1971) entretanto, revelaram uma suscetibilidade diferente nos vários tecidos uma vez que, a partir de biópsias variadas, verificaram ausência de aberrações cromossômicas ao nível das gônadas, sangue periférico e fibroblastos de pele, mas um aumento considerável de "gaps" de cromátides e de isocromátides nas células de medula óssea. Variações de sensibilidade tecidual, e também individual, foram comentadas ainda por Schinzel & Schmid (1976), Jensen & Nyfords (1979), e por Bochkov et alii (1986), em análises de pacientes submetidos a tratamento poliquimioterápico.

Por outro lado, a análise citogenética dos linfócitos provenientes de pessoas saudáveis, mas em contato com os citostáticos através de exposição ocupacional, têm revelado que alguns agentes, principalmente a CY, pode ser absorvida pela pele intacta, ou mesmo inalada através dos aerossóis que se formam no ambiente de aplicação das drogas (Hirst, 1984). Embora a urina e o plasma de enfermeiras e médicos que trabalham nos setores de oncologia tenham se revelado como mutagênicos nos ensaios realizados com procariontos, o potencial genotóxico com relação ao efeito no próprio indivíduo não está suficientemente esclarecido.

Do que foi exposto, parece claro que a avaliação dos efeitos cito e genotóxicos dessas drogas necessita de estudos mais padronizados, tendo em vista a crescente diversidade existente nas amostras dos grupos de risco. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o estudo das drogas que compõem o esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluoruracila) quanto a seus efeitos sobre linfócitos de sangue periférico, em pacientes portadoras de carcinoma de mama em estadio II ou III, mastectomizadas, e que se utilizaram dessas medicações como tratamento adjuvante. Para tanto, propôs-se a avaliar como parâmetros principais: a transformação blástica por estímulo da fitohemaglutinina, o índice mitótico e a frequência de alterações cromossômicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

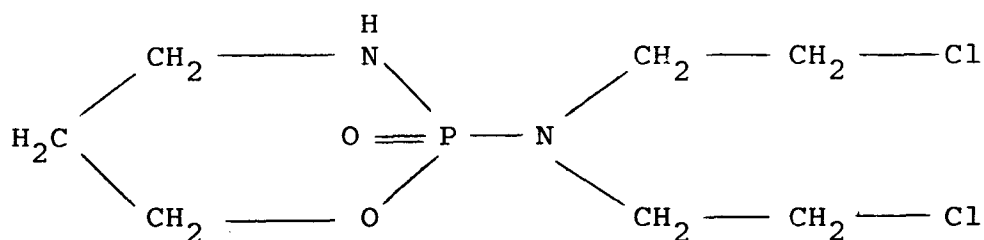
## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - O ESQUEMA CMF

Comumente empregado no tratamento do carcinoma de mama, o esquema CMF consiste na administração associada de três agentes antineoplásicos, sendo um alquilante (ciclofosfamida) e dois antimetabólitos (metotrexato e 5-fluoruracila). Essas drogas podem ser aplicadas simultaneamente, na forma de coquetel, por via endovenosa, ou compor esquemas variados quanto às dosagens, vias de administração e períodos de tratamento.

Em linhas gerais, os agentes alquilantes possuem a propriedade comum de desencadear reações químicas fortemente eletrofílicas, através da formação de íons carbônicos intermediários ou de complexos de transição com as moléculas alvo (Calabresi & Parks Jr, 1980). Essas reações resultam na formação de ligações covalentes (alquilação) com várias substâncias nucleofílicas, como os grupos amino-fosfato, carboxila, hidroxila, sulfidrila, entre outros. Alterações dessa ordem promovem a desestabilização de moléculas vitais, como o DNA. Os efeitos finais variam desde a excisão de bases específicas preferencialmente atingidas, ou mesmo um pareamento anômalo no momento da síntese de DNA, ou ainda um aumento da viscosidade dentro do núcleo celular, o que consequentemente deverá resultar em uma célula inviável.

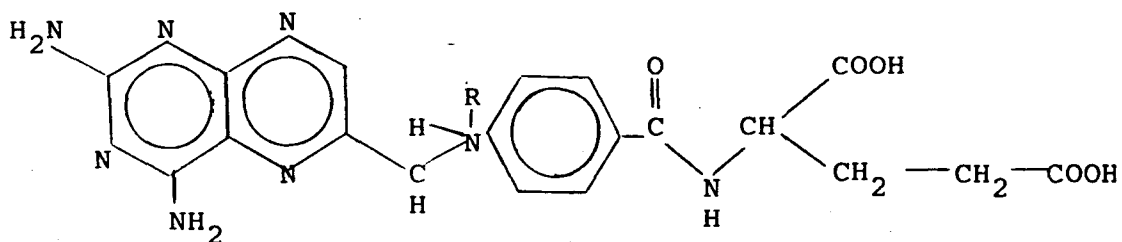
Na classe dos agentes alquilantes, a ciclofosfamida é o mais estudado, apresentando um dos maiores espectros de ação nas neoplasias de diferentes origens. Pode ser administrada por via oral, endovenosa, intramuscular, intraperitoneal e ainda intrapleurar. É ativada no fígado pelo sistema oxidase do retículo endoplasmático liso (P-450), o qual converte a ciclofosfamida em 4-hidroxila-ciclofosfamida e aldofosfamida, as quais são transportadas para a circulação. Ainda no fígado, são oxidadas pela aldeído oxidase e outras enzimas, produzindo a carboxifosfamida e 4-ceto-ciclofosfamida, ambas sem atividade biológica significativa, o que constitui característica importante para as células desse órgão, que ficam protegidas contra a ação dos componentes ativos. Nas células susceptíveis à citólise, a aldofosfamida é quebrada, gerando quantidades estequimétricas de fosfamida mustada e acroleína, ambas altamente tóxicas (Calabresi & Parks Jr, 1980). A fórmula estrutural da CY é a que se segue:



A meia vida da CY no plasma humano, após injeção intravenosa de 6 a 80 mg/kg é variável mas oscila, em média, em torno de seis horas e meia, encontrando-se 50% dos seus metabólitos ligados a proteínas plasmáticas (Calabresi & Parks Jr, 1980).

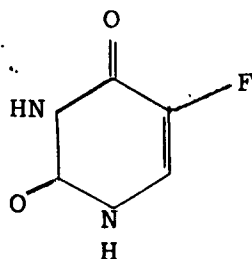
Quanto aos agentes antimetabólitos, como o metotrexato e a 5-fluoruracila, a desestabilização dos sistemas celulares se dá por via indireta, através do comprometimento de compostos intermediários, os quais serão utilizados na síntese de moléculas vitais, inviabilizando a célula atingida.

O metotrexato difere do ácido fólico pela substituição de um grupo hidroxila por um grupo amina, no núcleo pteridina, e pelo acréscimo de um grupo metila. A fórmula estrutural é apresentada em seguida:



A droga pode ser administrada por via oral, parenteral, intravenosa e ainda intrateca. Qualquer que seja a via de administração, mesmo em dosagens baixas, o composto é rápida e totalmente absorvido. Sua meia vida no plasma revela-se variável, mas oscila em torno de duas horas, estando cerca de 50% do mesmo ligado às proteínas plasmáticas (Calabresi & Parks Jr, 1980).

A 5-fluoruracila, por sua vez, constitui um antimetabólito análogo às bases pirimídias. Na atualidade, considera-se que sua atividade antimitótica seja decorrente da interferência no metabolismo dos ácidos nucleicos, uma vez que interfere na síntese ou no aproveitamento das pirimidinas, que serão utilizadas na síntese dos mesmos. A fórmula estrutural do composto é a seguinte:



A droga deve ser manipulada com muito cuidado, e administrada por via endovenosa, rapidamente. A meia-vida no plasma é referida como em torno de vinte minutos, sendo degradada no fígado. A uréia representa um importante produto do seu metabolismo, sendo por isso fundamental a avalia-



ção prévia das funções renais, antes da administração da droga (Calabresi & Parks JR, 1980).

## 2.2 - A AMOSTRA

O estudo foi realizado em amostras de sangue periférico, provenientes de mulheres que procuraram os serviços do ambulatório de Tocoginecologia da UNICAMP, com queixas clínicas sugestivas de câncer de mama. Confirmado o diagnóstico, foram submetidas à mastectomia parcial ou radical e, um mês depois, encaminhadas ao setor de Oncologia do hospital, para avaliação clínica e estabelecimento de conduta terapêutica, considerando principalmente o tipo histológico do tumor, seu grau potencial de invasividade, o comprometimento ganglionar e o estadiamento clínico da doença. As pacientes incluídas neste trabalho compreenderam aquelas em estadio clínico II ou III, e que receberam a quimioterapia adjuvante como tratamento pós cirúrgico, associado ou não à radioterapia, sem se considerar uma faixa etária preferencial. As drogas utilizadas para o tratamento das pacientes foram a ciclofosfamida, o metotrexato e a 5-fluoruracila, as quais compõem o esquema poliquimioterápico clássico, conhecido como CMF. Em alguns casos, a presença da Vincristina se fez clinicamente necessária, e a paciente permaneceu incluída na amostra. Não foram incluídos os casos tratados por radio, quimio e/ou hormonioterapia previamente à cirurgia.

Dessa forma, para atender às condições acima e compor uma amostra relativamente homogênea, trabalhou-se com um grupo reduzido de pacientes, constituído inicialmente por 13 pacientes, com idade entre 29 e 63 anos, cuja história clínica está sumarizada na tabela I. Uma delas, embora em fase de doença avançada e não submetida à cirurgia, permaneceu incluída no grupo, tendo em vista a ausência de tratamento prévio, a origem mamária do tumor primário e a identidade do esquema de tratamento.

O esquema protocolado para esses casos consistiu de seis ciclos sucessivos de Ciclofosfamida ( $300 \text{ mg/m}^2$ ), Metotrexato ( $30 \text{ mg/m}^2$ ) e 5-Fluoruracila ( $300 \text{ mg/m}^2$ ), administrados simultaneamente a cada 28 dias, por via endovenosa. Eventualmente, o período entre as aplicações estendeu-se por mais sete dias, em função de razões clínicas. Em quatro casos foi indicada radioterapia prévia ao 1º ciclo ou concomitantemente à quimioterapia (QT), conforme salienta a tabela I.

Paralelamente à avaliação do estado geral da paciente, feita através de exames clínicos e laboratoriais de rotina segundo os protocolos existentes no setor, foram feitas coletas de sangue periférico em quatro ocasiões pré-estabelecidas: a primeira imediatamente antes de iniciar a quimioterapia, e que será aqui chamada de Antes 1ª QT (ou subgrupo 2); a segunda após 30 minutos da injeção dos quimioterápicos, ainda no primeiro ciclo, e que será chamada de Depois 1ª QT (ou subgrupo 3); a terceira feita antes de se

iniciar a aplicação do quarto ciclo, chamada Antes 4º QT (ou subgrupo 4) e a última, feita 6 a 9 meses após o término do tratamento quimioterápico, e que será chamada de Revisão (ou subgrupo 5).

O grupo controle (subgrupo 1) foi representado por 29 indivíduos sadios, sem antecedentes oncológicos pessoais, pertencentes aos diversos setores de assistência, excetuando-se o de radiodiagnósticos, do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Essas pessoas, de ambos os sexos e idade entre 20 e 45 anos, não estavam sob tratamento médico e nem se utilizaram de qualquer medicamento, nos últimos três meses anteriores à coleta de sangue periférico.

### **2.3 - SORO, MEIOS NUTRITIVOS E SOLUÇÕES**

#### **SORO FETAL BOVINO (SFB)**

De acordo com as informações fornecidas pela Microbiológica Consultoria e Análise de Produtos Biológicos, o sangue fetal é colhido através de punção intracardíaca. Após centrifugação, o soro obtido é inativado a 56°C e esterilizado em membranas filtrantes do tipo Millipore com porosidade de 0,22/  $\mu$ m e acondicionado em embalagens estéreis de vidro com volume de 250 ml. No laboratório o soro foi descongelado, homogeneizado cuidadosamente, distribuído em alíquotas de 20 ml e novamente congelado, até o momento do uso.

## LEGENDA:

ca duc. inv. = carcinoma ductal invasivo.

ca lob. inv. = carcinoma lobular invasivo.

MD = mama direita.

ME = mama esquerda.

mamilo (+) = com protuberância do mamilo.

Grau: H = histológico.

N = nuclear.

Gânglios: x = nº de gânglios invadidos.

y = nº de gânglios retirados.

Tratamento: MRH = mastectomia radical à Holsted.

QT = quimioterapia - 1ª QT = 1º ciclo.

RT = radioterapia.

Esquema: C = ciclofosfamida.

M = metotrexato.

F = 5-fluoruracila.

V = vincristina.

\* com antecedentes oncológicos familiares.

TABELA 1: CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES

Nome/ Idade (ns)	Idade	Tipologia do Tumor	Gravidade H-n	Órgão (n/y)	Estadio Clínico	Tratamento	Esquema (mg)	Outros Medicamentos
MAT (01)	46	ca duc. inv. MD ca intrad.	III-2	3/17	Ec III a	MRH-1°QT-RT-QT	CHFV (800-50-500-1000)	Decadron
AM (02)	38	ca duc. inv. ME ca intrad.	III-2	0/13	Ec II	MRH-QT	CHF (800-50-750)	Decadron
DA (03)	54	ca duc. inv. MD ca intrad.	III-2	4/15	Ec III a	MRH-RT-QT	CHFV (800-50-500-1,0)	Decadron
RSV (04)	61	ca duc. inv. ME ca intrad. mamilo (+)	III-2	12/16	Ec II/IIIa	MRH-RT-QT	CHF (800-50-750)	Novaldex Decadron
MCS (05)	66	ca indiferencial do metástases gliconares	---	---	---	QT	CHF (1000-50-500)	Aldomet Decadron
DGRP (06)	44	ca duc. inv. ME ca intrad. mamilo (+)	III-2	3/12	Ec II	MRH-QT	CHF (800-50-500)	Decadron
*LODI (07)	27	ca duc. inv. MD	III-2	15/23	Ec II	MRH-1°QT-RT-QT	CHF (800-50-500)	Decadron
SRA (08)	63	ca duc. inv. ME	III-2	1/11	Ec III a	MRH-QT	CHF (800-50-750)	Decadron
ESN (09)	58	ca duc. inv. MD ca intraductal	III-2	11/11	Ec II/IIIa	MRH-QT	CHF (800-50-750)	Triamestrin Premarin Decadron
ES (10)	43	ca duc. inv. MD ca intrad. mamilo (+)	III-2	0/11	Ec II	MRH-QT	CHF (800-50-750)	Decadron
FBH (11)	59	ca lob. inv. ME	III-2	3/15	Ec II	MRH-QT	CHF (800-50-500)	Decadron
MACP (12)	49	ca lob. inv. MD papil. intrad.	III-2	0/12	Ec II	MRH-QT	CHF (800-50-750)	Decadron
*ZONI (13)	52	ca duc. inv. MD MD	III-2	3/17	Ec II	MRH-QT	CHF (800-50-750)	Decadron

## **SOLUÇÃO DE ANTIBIÓTICO**

Uma ampola de 1 ml de gentamicina (Schering S.A.) contendo 40 mg de gentamicina base (sulfato de gentamicina) foi diluída em 7 ml de Meio de Eagle, perfazendo 8 ml de uma solução com 5000  $\mu\text{g/ml}$  de antibiótico e mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso, sendo empregada numa concentração final de 50  $\mu\text{g/ml}$  de meio nutritivo.

## **SOLUÇÃO DE COLCHICINA**

Uma solução estoque foi preparada com 10 mg de colchicina (Sigma) diluída em 10 ml de água bidestilada, e estocada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dessa solução, 0,9 ml eram diluídos em 8,1 ml de meio de Eagle, totalizando 9 ml de uma solução-mãe com concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$ , filtrada em membranas Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  e congelada até o momento de uso, quando era empregada numa concentração final de 1  $\mu\text{g/ml}$  de meio nutritivo.

## **SOLUÇÃO DE FITOHEMAGLUTININA**

Para o preparo da fitohemaglutinina foram pesadas 40 gramas de feijão preto, o qual foi lavado em água corrente e as sementes deixadas em água destilada por uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$ , para embeber. Após ser moído em liquidificador com 200 ml de salina a 0,9%, o material foi mantido por mais

doze horas a 4°C, em agitação permanente, sendo a seguir centrifugado a 800 rpm por 30 minutos. A solução sobrenadante foi cuidadosamente recolhida, diluída em igual volume de solução fisiológica a 0,9% e novamente centrifugada a 13000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante recolhido foi filtrado em membranas Millipore clarificantes de 0,44 µm e esterilizantes de 0,22 µm, e a solução resultante diluída em 9 partes de meio de Eagle, acondicionado em alíquotas de 5 ml e mantidas a -20°C (solução mãe). A concentração final de fitohemaglutinina empregada nos cultivos correspondia a 0,05 ml da solução mãe para 5 ml de meio nutritivo.

#### **MEIO NUTRITIVO**

Distribuído em alíquotas de 5 ml, o meio empregado para a realização das culturas apresentava a seguinte composição:

Meio de Eagle/sem soro .....	80 ml
Soro Fetal Bovino.....	20 ml
Gentamicina.....	50 µg/ml (1 ml)
Fitohemaglutinina.....	01 ml
Volume total.....	101,5 ml

O meio de Eagle sem soro foi fornecido pelo Instituto Adolfo Lutz e constituído de: (em g/l)

## SAIS:

NaCl .....	68,0
KCl .....	400
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O .....	200
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O .....	200

## AMINOACIDOS

L - Arginina .....	0,105
L - Histidina .....	0,031
L - Isoleucina .....	0,052
L - Leucina .....	0,052
L - Lisina HCl .....	0,058
L - Metionina .....	0,015
L - Fenilalanina.....	0,032
L - Treonina.....	0,048
L - Triptofano .....	0,010
L - Valina .....	0,046
L - Cistina .....	0,024
L - Tirosina .....	0,036
L - Glutamina .....	0,330



## VITAMINAS

Biotina .....	0,001
Colina HCl .....	0,001
Ácido Fólico .....	0,001
Inositol .....	0,002
Nicotinamida .....	0,001
Pantetonato de Ca .....	0,001
Piridoxal HCl .....	0,001
Riboflavina .....	0,001
Tiamina .....	0,001
Glicose .....	27,0
NaHCO .....	17,0
TPB (caldo de fosfato de Triptose) .....	29,7
Vermelho de Fenol .....	0,20

## FIXADOR

Metanol P.A. Merck .....	3 partes
Ácido Acético Glacial P.A. Merck .....	1 parte

## TAMPÃO SORENSEN

Solução A: Fosfato de Sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

0,2 M - Qeal ..... 1 litro

Solução B: Fosfato de Potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

0,2 M - Qeal ..... 1 litro

A solução tampão era composta de 490 ml de solução A e 510 ml da solução B, acertando-se o pH final para 6,8 com uma das soluções, e completando-se para 2000 ml de água destilada. Os estoques foram mantidos a 4°C.

## GIEMSA; SOLUÇÃO ESTOQUE

Um grama de corante Giemsa (Gurr) foi diluído em 54 ml de glicerina P.A. (Merck) e mantida a 56°C, por duas horas. O acréscimo de 84 ml de metanol foi feito quando a solução atingia a temperatura ambiente, após o que o corante foi filtrado, acondicionado em frascos recobertos com papel alumínio, e envelhecido por um período mínimo de 15 dias.

## SOLUÇÃO DE CORANTE GIEMSA

Giemsa - solução estoque ..... 5 ml

Tampão Sorensen pH 6,8 ..... 95 ml

## **2.4 - PROCEDIMENTOS**

### **COLETA DE MATERIAL**

As coletas de sangue periférico foram feitas quando a paciente vinha até o ambulatório para receber a quimioterapia. Uma veia foi puncionada por um "scalp" conectado de início a uma seringa estéril, para colher 10 ml de sangue e, logo a seguir, a um frasco contendo 250 ml de Soro Fisiológico Glicosado, acrescido de 5% de Plasil. Após trinta minutos de corrida do soro, as drogas foram aplicadas sucessivamente com uma seringa conectada à bifurcação do scalp. A seguir, o restante do soro foi deixado a fluir lentamente, até se esgotar por completo, ocasião em que, durante a aplicação do 1º ciclo de quimioterápicos, foi efetuada nova coleta de sangue. Este procedimento durava, desde a punção da veia até a retirada do scalp e limpeza do local com álcool iodado, cerca de 90 minutos.

Nos 2 casos de tratamento radioterápico prévio à quimioterapia, fez-se também uma coleta de sangue anterior à irradiação da paciente.

### **CULTURA DE LEUCÓCITOS**

O sangue periférico, colhido na seringa descartável, foi imediatamente transferido para um frasco veda-

do e estéril, contendo 60 UI de heparina sódica (Liquemine Roche), sendo em seguida rotulado e levado para o laboratório.

No fluxo laminar, o material foi transferido para um tubo cônico de centrífuga e deixado em repouso. Após 30 a 40 minutos, o plasma sobrenadante foi recolhido, homogeneizado e parte deste distribuído em alíquotas de 0,5 ml para dois frascos de cultura contendo 5 ml de meio nutritivo, os quais foram mantidos à temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos. O plasma restante foi centrifugado a 800 rpm, durante 10 minutos, e o sedimento obtido ressuspensão em Meio de Eagle, num volume equivalente ao do sobrenadante retirado. Essa suspensão celular sem plasma autólogo foi distribuída em dois frascos contendo 5 ml de Meio Nutritivo, num volume de 0,5 ml por frasco. Finalmente, todos os frascos foram colocados em estufa a 37°C por 66 horas. Desse modo, cada amostra foi subdividida em quatro, sendo duas delas representantes da cultura de linfócitos com o plasma autólogo, e as duas restantes desprovidas do mesmo. Dessas duplicatas, o conteúdo de uma delas foi utilizado para o estudo cromossômico e outro para o estudo de Transformação Blástica. Conviém salientar que, nas amostras referentes ao subgrupo 3, os cultivos foram realizados apenas na presença do plasma autólogo, uma vez que o plasma das próprias pacientes constituiria a fonte única das drogas em estudo.

O mesmo procedimento foi empregado nas culturas do grupo controle, lançadas paralelamente às culturas das pacientes.

Para a avaliação da transformação blástica, a suspensão celular era centrifugada, após as 66 horas de cultivo, a 800 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O sedimento resultante foi homogeneizado e uma gota deste colocado sobre uma lâmina para a obtenção do esfregaço. A partir de cada sedimento, cerca de oito esfregaços de boa qualidade foram obtidos. Cada um deles foi rapidamente seco ao ar, fixado em metanol absoluto por 10 minutos e em seguida corado em uma solução de Corante Giemsa a 5% em tampão fosfato, pH 6,8 durante cinco a dez minutos, para posterior observação ao microscópio.

Nas culturas de leucócitos destinadas a estudo cromossômico, o acúmulo de metáfases foi obtido através do acréscimo de colchicina, numa concentração final de 1  $\mu$ g/ml de meio, por um período de três horas, a 37°C. Em seguida, a suspensão celular obtida foi centrifugada a 800 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. Um volume de 5 ml de uma solução hipotônica a 37°C, constituída por 4 partes de água e uma de meio nutritivo era acrescentado aos tubos e o sedimento homogeneizado e incubado em estufa a 37°C, durante vinte minutos. Após esse período, a suspensão celular foi novamente centrifugada a 800 rpm por dez minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento resultante fixado numa solução de metanol-ácido acético (3:1), durante uma hora. A troca de fixador foi feita através de três tratamentos sucessivos de homogeneização do material, centrifugação e retirada do sobrenadante. O sedimento resultante foi

novamente suspenso em 0,5 ml de fixador recém preparado, homogeneizado e distribuído em lâminas rigorosamente limpas, geladas e revestidas por uma fina camada de vapor de água condensado. Esse procedimento resultava, geralmente, em 6 a 8 lâminas por amostra, sendo que cada lâmina recebia três gotas da suspensão celular. As preparações foram secas ao ar e coradas em solução de corante Giemsa a 5% em tampão fosfato, pH 6,8, durante cinco a dez minutos.

## **2.5. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO**

### **2.5.1. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DE TRANSFORMAÇÃO BLÁSTICA:**

A observação das células dos esfregaços corados pelo Giemsa foi feita em microscópio Zeiss, em objetiva Planapo com aumento de 63 vezes, ocular com aumento de 8 vezes e optovar com 1,25 aumentos.

Na avaliação do esfregaço, foram considerados como linfócitos as células cujos núcleos apresentavam cromatina densa, intensamente corada e disposta em grumos grosseiros. O citoplasma era escasso e corado em azul.

A diferenciação morfológica dos linfócitos frente ao estímulo da fitohemaglutinina era evidenciada em células bem maiores do que suas precursoras. A cromatina mostrava-se mais homogênea, corando-se em púrpura enquanto os nucléolos, em número de dois ou três, evidenciavam coloração pálida em azul. O citoplasma, também corado em azul,

apresentava vários vacúolos de tamanho reduzido. A relação núcleo-citoplasma mostrava-se alterada, quando comparada com os linfócitos, além de citoplasma mais abundante. Essas características foram utilizadas para a classificação dos linfoblastos, sendo que as células com morfologia intermediária foram denominadas de Pró-Linfoblastos. Estas se apresentavam basicamente como linfócitos grandes, porém com a cromatina um pouco mais frouxa, na qual um nucléolo pequeno podia ser evidenciado. O citoplasma, mais evidente, apresentava dois ou três vacúolos pequenos.

Além desses tipos celulares, observavam-se algumas vezes eosinófilos, macrófagos com limites celulares pouco definidos, além de polimorfonucleares em degeneração. Foram incluídos na contagem apenas os linfócitos, linfoblastos e prólinfoblastos íntegros. A região da lâmina escolhida para a leitura correspondia ao terço terminal da mesma, iniciando-se a contagem a partir de uma extremidade até completar um total de 200 células, sendo examinadas 2 lâminas por indivíduo. Grumos celulares, desde que compostos por células íntegras e bem individualizadas, também foram avaliados. O estabelecimento do índice de transformação blástica, expresso em percentuais, foi feito através da relação linfoblastos/linfócitos e prólinfoblastos. Esses critérios foram utilizados em todas as amostras, incluindo-se as do grupo controle, bem como as duplicatas com e sem plasma autólogo, as quais serão mencionadas como TBc e TBs, respectivamente.

### **2.5.2. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO CROMOSSÔMICA**

Para o estudo cromossômico foram examinadas 30 células em metáfase, com cromossomos perfeitamente individualizados. As alterações avaliadas foram as aneuploidias e poliploidias, no caso de aberrações numéricas. Quebras, gaps de cromátides e de isocromátides, constricções secundárias, cromossomos em anel e fragmentos acêntricos foram as aberrações estruturais consideradas.

O termo "quebra" representou, neste estudo, uma interrupção na coloração, em uma ou em ambas cromátides, resultando na figura de um segmento cromossômico não alinhado à sua respectiva cromátide. Nos casos de permanência do alinhamento, a alteração foi considerada uma falha cromossômica (gap).

### **2.5.3. CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO**

O estabelecimento do índice mitótico foi feito com o emprego das mesmas lâminas investigadas nas análises cromossômicas. A leitura se iniciava a partir de uma extremidade, que era percorrida em movimentos ascendentes e descendentes, em relação ao campo visual e com pequenos deslocamentos laterais entre os mesmos, até completar o número de 400 células, atingindo uma extensão variável de um quarto até a lâmina inteira. A razão percentual entre o número de células em metáfase ou prometáfase e as células em repouso



representou o valor do índice mitótico obtido. Foram incluídos na contagem apenas núcleos íntegros, correspondentes aos linfócitos estimulados pela Fitohemaglutinina, identificados nas preparações como maiores, com cromatina menos densa, mais rósea que as dos linfócitos. Estes últimos, bem como os núcleos de polimorfonucleares, não foram incluídos na contagem.

Os valores de IM estimados serão identificados daqui em diante como IMc e IMs, de acordo com a presença ou não de plasma autólogo.

## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva foi feita para cada grupo em separado com base na estimativa da média e do desvio padrão. A comparação entre as amostras com e sem plasma autólogo foi feita para cada grupo e subgrupo através do teste de dados emparelhados (Beiguelman, 1977). Este teste foi empregado ainda nas comparações entre os pares de subgrupos, (G2 x G3; G2 x G4; G2 x G5, G4 x G5), utilizando-se como referência os valores obtidos na presença do plasma autólogo.

As comparações entre o grupo controle e o subgrupo 2, em relação às variáveis TBc, IMc, Aberrações Numéricas e Aberrações Estruturais, foram feitas pelo teste t de Student (Beiguelman, 1977).

A investigação de correlação entre os dados de Transformação Blástica e de índice Mitótico quanto às condi-

ções com e sem plasma autólogo foi feita através da análise de regressão linear, sendo a significância dos coeficientes de regressão calculada pelo valor de "t" (Beiguelman, 1977). O nível de significância admitido para todas as análises foi de 5%.

## **RESULTADOS**

### 3 - RESULTADOS

Os resultados obtidos através das análises da transformação blástica, índice mitótico, aberrações numéricas e estruturais referentes aos grupos controle e de pacientes apresentam-se transcritos nos anexos 1 e 2, respectivamente. Constam das mesmas a identificação de cada indivíduo através de numeração sequencial, composta pelos números 1 a 29, no grupo controle, e de 1 a 13, no grupo de pacientes. Este se apresenta dividido em quatro subgrupos, 2, 3, 4 e 5, correspondentes às amostras Antes da 1a. QT, Depois da 1a. QT, Antes da 4a. QT e por ocasião da Revisão final, nessa ordem de citação. O número de identificação pessoal pode se repetir, nesses subgrupos, à medida que a mesma paciente retorna para compor a amostra correspondente à situação de tratamento na qual se encontra.

Como pode ser observado no anexo 2, os subgrupos 2, 3, 4 e 5 apresentam-se constituídos por um número decrescente de indivíduos, refletindo uma interrupção no acompanhamento de alguns deles em decorrência de situações não contornáveis, tais como o óbito precoce (paciente nº 2), transfusão sanguínea e/ou mudança de tratamento originalmente proposto (pacientes nºs 4, 5, 9) e transferência para outro centro de atendimento oncológico (pacientes nº 1 e 13).

Os resultados de transformação blástica estão representados, segundo a média da contagem obtida em duas

lâminas, relacionando o número médio de blastos encontrados em um total de 100 ou 200 células analisadas em cada uma delas, encontrando-se na coluna seguinte, a expressão percentual dessa relação. De modo semelhante, os resultados de índice mitótico e de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais estão expressos em números absolutos e em percentuais, em função de um total de células analisadas.

### **3.1 - TRANSFORMAÇÃO BLÁSTICA E ÍNDICE MITÓTICO**

#### **GRUPO CONTROLE**

Os valores percentuais máximo e mínimo de transformação blástica (TB) e de índice mitótico (IM) obtidos nos cultivos com e sem plasma autólogo, bem como as estimativas de suas respectivas médias e desvios padrões, estão expressos na Tabela II. Os diagramas das dispersões de pontos referentes a estas variáveis estão representados nas figuras 1 e 2.

**TABELA II** - Análise descritiva obtida a partir dos resultados de TB e de IM referentes ao Grupo Controle.

Variáveis	N	Média (X)	D.P. (X)	Valores	
				Mínimo (X)	Máximo (X)
TBc	29	66,88	9,62	50	88
TBs	29	60,72	10,00	41	79
IMc	29	15,76	10,23	3	42
IMs	29	7,95	6,48	1	26

D.P. = Desvio Padrão

c = com plasma autólogo

s = sem plasma autólogo

A análise da TB e do IM em função da presença (TBc e IMc) ou ausência (TBs e IMs) do plasma autólogo, realizada pelo teste t com os dados emparelhados, mostrou diferenças significativas entre os dois tipos de cultivo, tanto para a TB ( $t = 4,18$ ;  $GL = 28$ ;  $p < 0,001$ ), como para o IM ( $t = 6,66$ ;  $GL = 28$ ;  $p < 0,001$ ).

As análises de regressão linear feitas para as variáveis expressas na tabela II, tomadas duas a duas, mostraram uma correlação significativa e positiva entre TBc e TBs, IMc e IMs, TBc e IMc, enquanto para TBs e IMs não foi possível constatar correlação linear entre as mesmas. (Tabela III).

**TABELA III - Resultados obtidos nas Análises de Regressão Linear entre a TB e o IM, no Grupo Controle.**

Variáveis	Coef.Regr.	Constante	t	p	R <sup>2</sup> (X)
TBc x TBs	0,6473	0,2757	4,72	<0,001	45,28
IMc x IMs	1,1929	0,0628	6,87	<0,001	63,61
TBc x IMc	0,4527	0,5975	2,85	<0,01	23,18
TBs x IMs	0,1015	0,0178	0,78	<0,50	2,20

Coef. Regr. = Coeficiente de Regressão

Graus de Liberdade (G.L.) = 27

p = probabilidade

R<sup>2</sup> = poder explicativo

#### GRUPO DE PACIENTES

A representação gráfica dos valores de TB e de IM obtidos no grupo de pacientes encontra-se nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Os percentuais obtidos através das análises de TB e de IM referentes às pacientes do Subgrupo 2 estão expressos na tabela IV.

**TABELA IV** - Análise descritiva obtida a partir dos dados de TB e de IM referentes ao subgrupo 2.

Variável	N	Média (X)	D.P. (X)	Valores	
				Mínimo (X)	Máximo (X)
TBc	13	71,12	13,19	49	92
TBs	11	70,91	9,10	58	84
IMc	13	8,15	6,47	0,5	22
IMs	11	6,68	2,28	3	10

Neste subgrupo, a aplicação do teste t com os dados emparelhados na comparação das situações com e sem plasma autólogo revelou que as diferenças intrapares obtidas não foram significativas, tanto nas análises de TB ( $t = 0,37$ ;  $GL = 10$ ;  $0,80 > p > 0,70$ ), como nas de IM ( $t = 0,82$ ;  $GL = 10$ ;  $0,50 > p > 0,40$ ).

Comparando o grupo controle e o subgrupo 2, verificou-se que os percentuais médios de TBc destes não diferiram estatisticamente embora, quanto ao IM, os valores médios diferissem significativamente. (Tabela XIII).

As análises de regressão linear aplicadas às duplas de variáveis da tabela IV evidenciaram uma correlação significativa e positiva entre TBc e IMc, e ainda entre IMc e IMs, de acordo com os dados transcritos na tabela V.



**TABELA V** - Resultados obtidos nas Análises de Regressão linear entre a TB e o IM, no Subgrupo 2. (G.L. = 9)

-----						
-----	Variáveis	Coef.Regr.	Constante	t	p	R <sup>2</sup> (X)
-----						
	TBc x TBs	0,3659	0,4360	0,810	<0,50	6,79
	IMc x IMs	1,7989	- 0,0377	2,209	<0,05	35,19
	TBc x IMc	1,2390	0,5932	2,711	<0,05	44,96
	TBs x IMs	0,9047	0,6486	0,698	<0,60	5,14
	-----					

As preparações celulares advindas das pacientes do subgrupo 2 apresentavam os mesmos padrões morfológicos característicos do grupo controle, independente da presença ou ausência do plasma autólogo. No entanto as preparações correspondentes às pacientes de número 1 e 3 apresentavam uma quantidade de material celular bastante reduzida, na presença do plasma autólogo. Nas preparações advindas das culturas sem o mesmo, esta alteração não foi constatada, possibilitando as leituras de modo idêntico às demais pacientes (anexo 2).

As estimativas de média, desvio padrão, bem como os valores máximo e mínimo verificados nas análises de TB e de IM do subgrupo 3 estão referidas na tabela VI. Conviria salientar que, nessas amostras, os percentuais de TBc apresentados pelas pacientes de números 3, 4, 7, 9, 11, 12 e

13, resultou da pesquisa de apenas 100 células por lâmina. Nesses casos, os esfregaços exibiam grande quantidade de material amorfo, constituindo grumos associados a células que, por não estarem suficientemente íntegras ou individualizadas, foram excluídas da contagem.

**TABELA VI** - Análise descritiva obtida a partir dos valores de TB e de IM referentes ao subgrupo 3.

Variável	n	Média (X)	D.P. (X)	Valores	
				Mínimo (X)	Máximo (X)
TBc	13	66,23	9,16	47	77
IMc	13	4,79	5,21	1	16

Quando comparados, os subgrupos 2 e 3 evidenciaram percentuais que diferiram significativamente quanto ao IMc, mediante a retirada das pacientes de números 1 e 3 da amostra, às quais era administrado a Vincristina em associação ao esquema CMF (tabela X). Os percentuais referentes ao IM encontrados nas preparações celulares dessas pacientes interferiram igualmente na expressão da correlação linear entre a TB e o IM, nesse subgrupo, estimada como significativa e negativa enquanto tais pacientes permaneciam inseridas nas amostras, e não significativa após a exclusão das mesmas (Tabela VII).

**TABELA VII** - Resultados obtidos nas análises de Regressão Linear entre a TB e o IM, no Subgrupo 3.

Variáveis	Coef.Regr.	Constante	t	p	R <sup>2</sup> (X)
TBc x IMc	- 1,0019	0,7103	- 2,30	<0,05	32,48
TBc x IMc(*)	- 0,0490	0,1390	- 0,355	<0,80	1,36

G.L. = 11

G.L. (\*) = 9

(\*) com a retirada das pacientes n<sup>os</sup> 1 e 3

Com referência aos subgrupos 4 e 5, as estimativas de média, desvio padrão, e os valores mínimo e máximo obtidos estão transcritos nas tabelas VIII e IX, respectivamente.

Nesses dois subgrupos, a remoção do plasma autólogo das culturas não implicou em alterações significativas de valores de TB ( $0,20 > p > 0,10$  para o subgrupo 4;  $p > 0,70$  para o subgrupo 5), embora os níveis de significância referentes ao subgrupo 4 estivessem muito próximos do valor crítico de t, ao nível de 5%.

**TABELA VIII** - Análise descritiva obtida a partir dos valores de TB e do IM, referentes ao subgrupo 4.

Variável	n	Média (X)	D.P. (X)	Valores	
				Mínimo (X)	Máximo (X)
TBc	8	66,00	12,04	45	86
TBs	8	70,63	9,66	57	85
IMc	8	6,69	3,42	3	11
IMs	8	5,47	2,62	1	8

**TABELA IX** - Análise descritiva obtida a partir dos dados de TB e de IM referentes ao subgrupo 5.

Variável	n	Média (X)	D.P. (X)	Valores	
				Mínimo (X)	Máximo (X)
TBc	7	58,71	9,21	44	73
TBs	7	59,64	4,69	52	67
IMc	7	6,21	7,27	1	22
IMs	7	4,61	1,76	3	8

As comparações feitas entre os subgrupos 4 e 5, e entre cada um deles e o subgrupo 2, revelaram que os valores de TB e de IM obtidos não diferenciaram estatística-

mente qualquer dessas situações, conforme expressam os dados da tabela X.

**TABELA X** - Análise de dados pareados aplicadas nas comparações entre os vários subgrupos, com relação às variáveis TB e IM.

Subgrupo	TB			IM		
	t	G.L.	p	t	G.L.	p
G2 x G3	1,39	12	0,20 > p > 0,10	1,39	12	0,20 > p > 0,10
(*)	0,24	10	0,50 > p > 0,40	2,50	10	0,05 > p > 0,02
G2 x G4	1,12	7	0,30 > p > 0,20	1,06	7	0,40 > p > 0,30
G2 x G5	1,76	6	0,10 > p > 0,05	0,21	6	0,90 > p > 0,80
G4 x G5	1,71	4	0,20 > p > 0,10	0,84	4	0,50 > p > 0,40

(\*) com a retirada das pacientes n<sup>os</sup> 1 e 3.

### 3.2 - ABERRAÇÕES CROMOSSOMICAS

A análise descritiva, bem como a representação gráfica dos percentuais de alterações numéricas e estruturais obtidos através das análises dos grupos controle e de pacientes estão representados na tabela XI e figuras 3 e 4, respectivamente.

**TABELA XI - Análise descritiva obtida a partir dos dados de Aberrações, numéricas (N) e estruturais (E), dos diferentes subgrupos.**

Subgrupo		n	Média (%)	D.P. (%)	Valores	
					Mínimo (%)	Máximo (%)
G1 (controle)	N	29	0,85	1,46	0	7
	E	29	4,06	4,93	0	17
G2	N	13	5,82	4,62	0	17
	E	13	3,57	3,31	0	10
G3	N	13	4,92	4,50	0	13
	*	11	3,99	3,99	0	10
	E	13	6,92	6,86	0	23
	*	11	6,06	7,11	0	23
G4	N	8	3,83	3,20	0	7
	E	8	6,71	4,65	0	13
G5	N	7	4,33	2,43	0	7
	E	7	2,52	2,36	0	7

\* com a retirada das pacientes de nºs 1 e 3

No que se refere ao grupo controle, as aberrações numéricas encontradas resumiram-se a poliploidias, frequentemente triploidias, e raras células aneuplóides, com 47 cromossomos, enquanto as aberrações estruturais verificadas consistiram principalmente de "gaps" de cromátides, ou isocromáticas, além de raras quebras cromatídicas.

No subgrupo 2, o percentual médio de aberrações numéricas, quando comparado ao do grupo controle evidenciou diferenças significativas entre as pacientes e os controles (tabela XII) sendo de 47% a frequência de poliploidias e de 53% as de aneuploidias, representadas na maioria por células com 47 cromossomos.

As aberrações estruturais estiveram presentes, no subgrupo 2, com uma frequência média de 3,5%, valor que não diferiu estatisticamente do controle (tabela XIII), o mesmo ocorrendo com os tipos de aberrações encontradas, basicamente gaps e quebras de cromátides e isocromáticas. Quando comparadas às do subgrupo 3, as aberrações encontradas revelaram-se significativamente aumentadas neste último, sendo representadas por quebras não preferenciais de cromátides, em sua maioria, seguidas de constricções secundárias em cromossomos do grupo A ou B e fragmentos acêntricos, além de poucos gaps, um caso de cromossomo em anel e um caso de isocromossomo do grupo A.

Nas amostras do subgrupo 4 a frequência média de aberrações estruturais ainda foi muito próxima daquela

estimada para o subgrupo 3. Entretanto, no subgrupo 5, esses valores não diferiam significativamente dos obtidos com o subgrupo 2 e se distanciaram bastante da média encontrada para o subgrupo 3 (tabelas XI e XII; fig. 4).

**TABELA XII** - Análise de dados pareados, aplicada nas comparações entre os vários subgrupos, com relação às aberrações numéricas e estruturais.

Subgrupo	Ab. Numéricas			Ab. Estruturais		
	t	G.L.	p	t	G.L.	p
G2xG3	0,56	12	0,60 > p > 0,50	2,15	12	0,10 > p > 0,05
(*)	0,99	10	0,40 > p > 0,30	1,58	10	0,20 > p > 0,10
G2xG4	0,33	7	0,50 > p > 0,40	1,48	7	0,20 > p > 0,10
G2xG5	0,75	6	0,50 > p > 0,40	0,067	6	0,90 > p > 0,80
G4xG5	0,46	4	0,70 > p > 0,60	2,03	4	0,20 > p > 0,10

(\*) com a retirada das pacientes de n<sup>os</sup> 1 e 3.



**TABELA XIII** - Comparações entre o grupo controle e o Subgrupo 2, através do teste t de Student.

<b>Variáveis</b>	<b>t</b>	<b>G.L.</b>	<b>Prob.</b>
<b>TB</b>	- 1,17	40	0,30 > p > 0,20
<b>IH</b>	2,45	40	< 0,02
<b>Ab. Num.</b>	- 5,30	40	< 0,001
<b>Ab. Estr.</b>	0,32	40	0,80 > p > 0,70

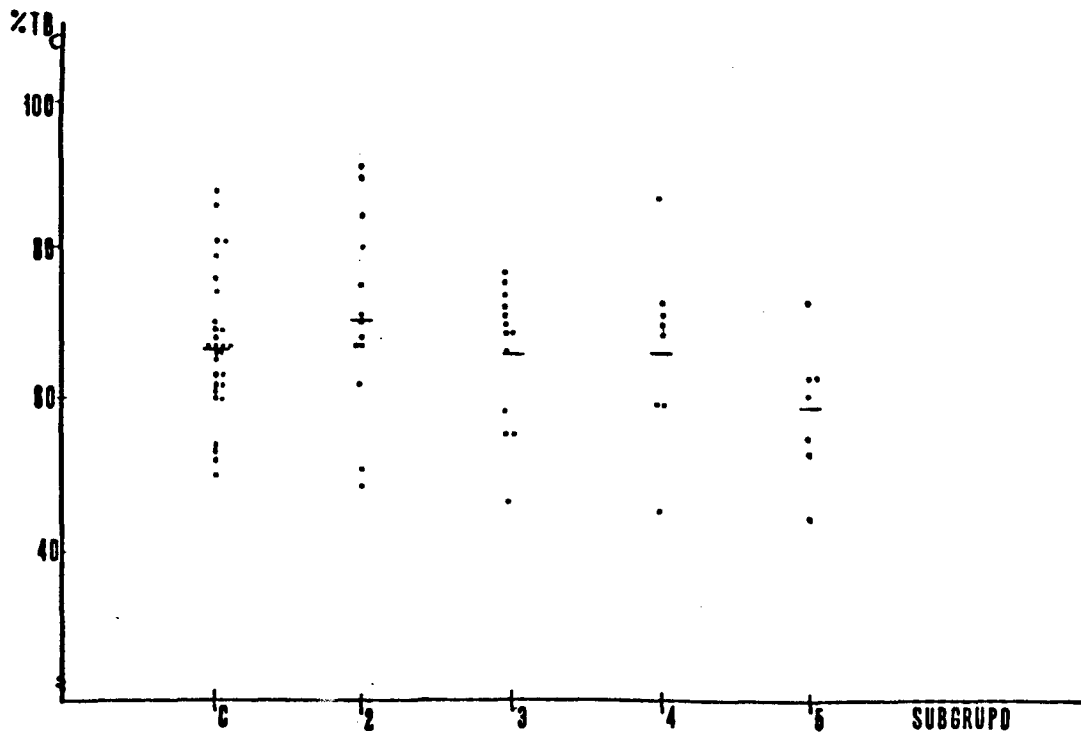


FIGURA 1: Percentuais de Transformação Blástica (%Tb) obtidos com os subgrupos 1 a 5.

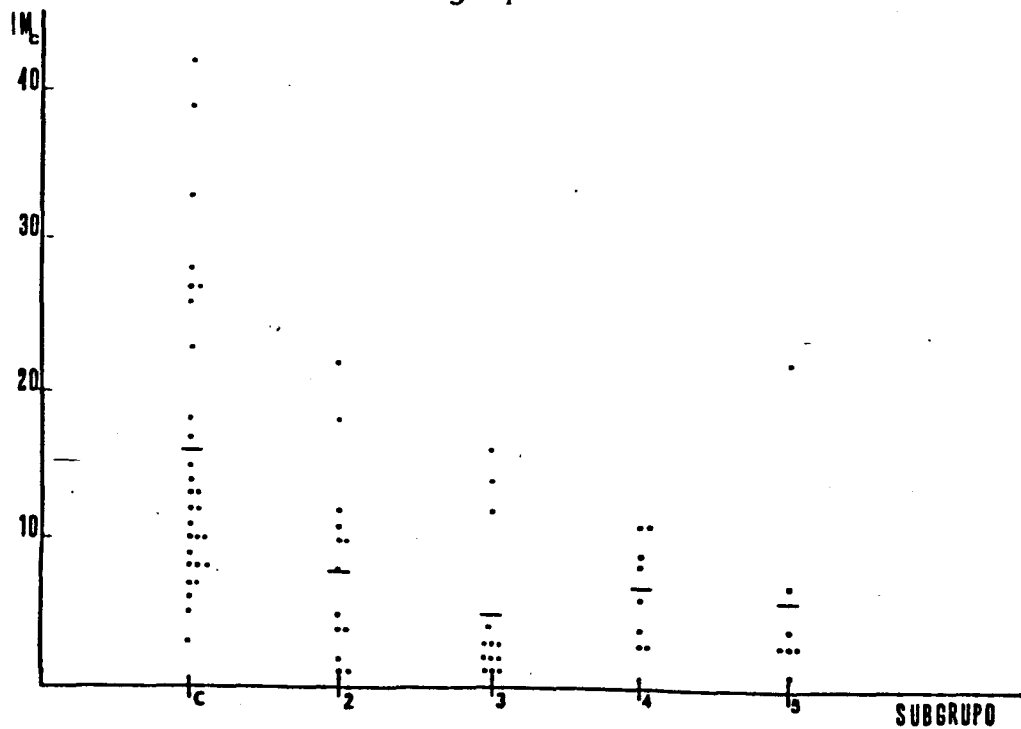
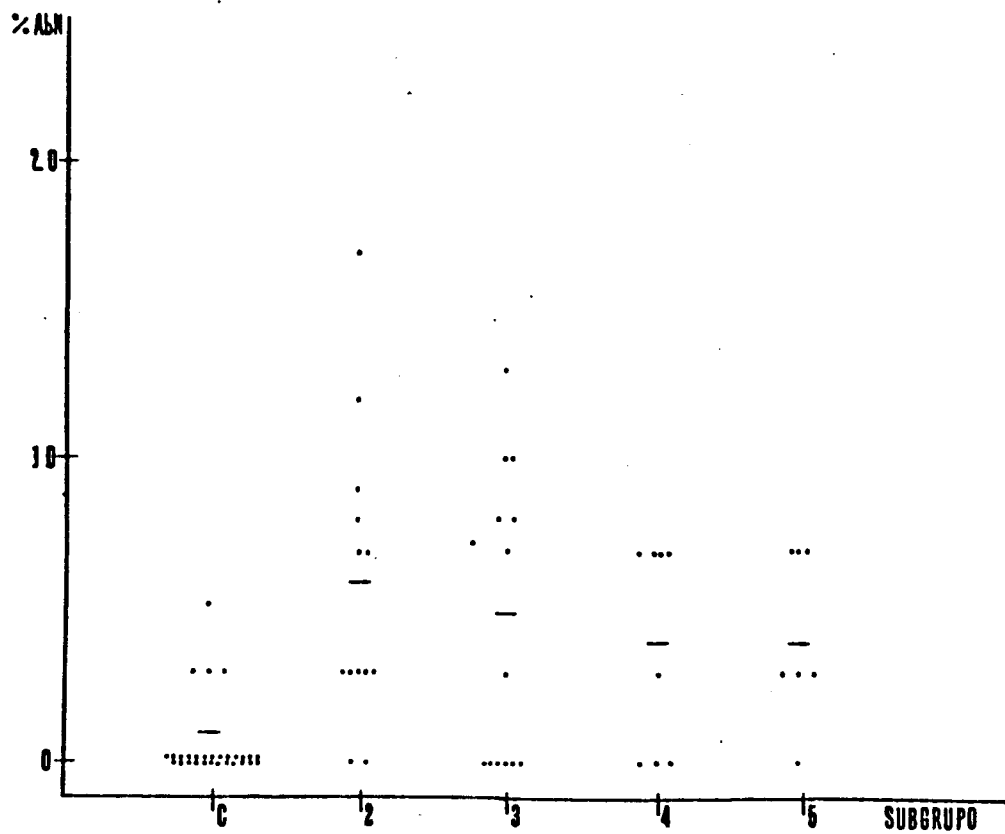
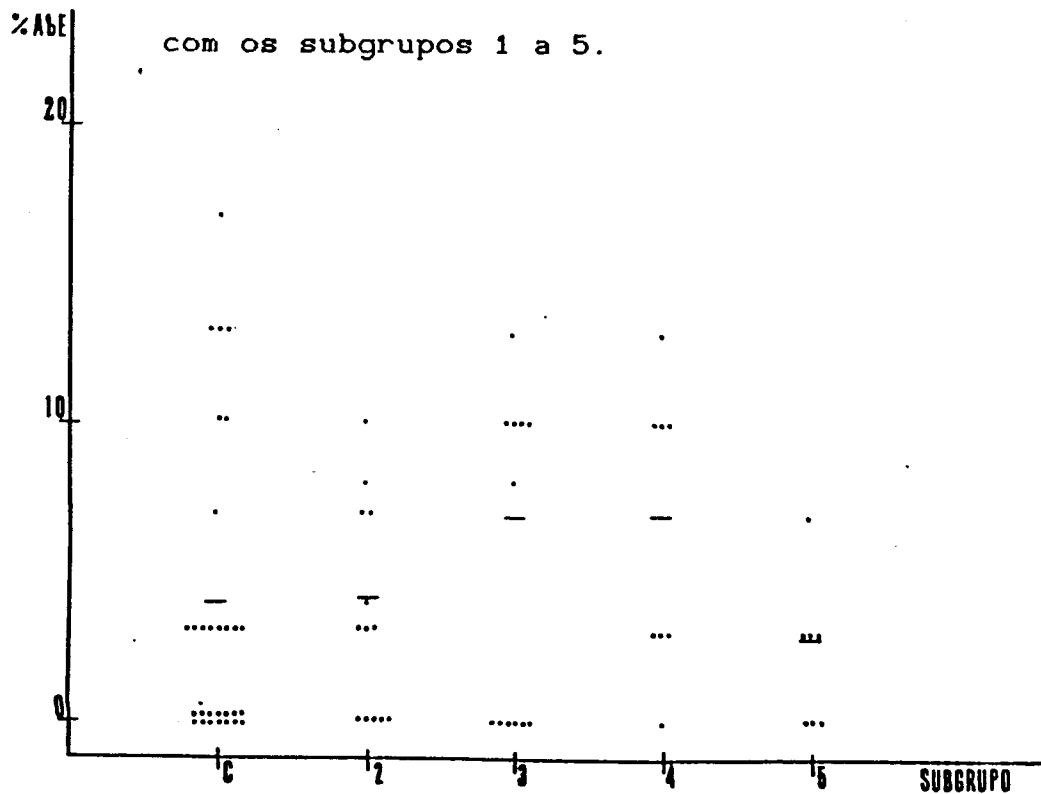


FIGURA 2: Percentuais de Índice Mitótico (%IMc) obtidos com os subgrupos 1 a 5.



**FIGURA 3:** Percentuais de Aberrações Numéricas (%AbN) obtidos com os subgrupos 1 a 5.



**FIGURA 4:** Percentuais de Aberrações Estruturais (%AbE) obtidos com os subgrupos 1 a 5.

**DISCUSSIO**

## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1. TRANSFORMAÇÃO BLÁSTICA E ÍNDICE MITÓTICO

Os critérios citológicos adotados neste estudo permitiram o estabelecimento dos percentuais de transformação blástica para um grupo controle, os quais oscilaram entre 50% e 88%, com uma média de 67% (tabela II). Esses valores revelaram-se muito próximos, com pequenas variações, aos percentuais encontrados nas análises feitas inicialmente por Yoffey et alii (1965), e confirmada por vários autores, entre eles Hurvitz & Hirschhorn (1965), Hersh & Oppenheim (1967), cujos trabalhos apresentam em comum uma TB oscilante entre os extremos de 40 e 90%, com um valor médio variável entre 60 e 80%.

Paralelamente, estudos que utilizaram a incorporação de timidina triciada como precursor radioativo, revelaram a existência de uma correlação entre os níveis de marcação obtidos com esse método e os percentuais de TB analisados citologicamente. (Leventhal et alii, 1967). Desse modo, embora os níveis de TB analisados através de marcação radioativa mostrem-se oscilantes entre 20 e 50%, essa taxa corresponderia à magnitude de variação, observada citologicamente, entre 40 e 80%.

Sendo assim, a obtenção de valores médios não inseridos dentro dos intervalos mencionados acima seria atribuída a um comportamento peculiar da amostra, distinto

do grupo controle, ou a variações decorrentes das condições de cada ensaio, capazes de interferir no nível de resposta linfocitária. De fato, experimentos elaborados para avaliar as condições de diferentes culturas comprovaram a interferência direta de algumas variáveis nos mecanismos de resposta, sendo as principais a concentração do inóculo e o período de cultivo (Moorhead et alii, 1967), seguidos pelos fatores ligados à origem e qualidade do soro empregado no meio de cultura (Johnson & Russel, 1965; Hui et alii, 1980), bem como à idade dos indivíduos componentes da amostra (Pisciotta et alii, 1967). A concentração da fitohemaglutinina, embora importante, interferiria de forma indireta, através da sua interação com as demais variáveis (Harrison et alii, 1981).

Considerando os tipos de cultivo realizados neste trabalho, onde linfócitos correspondentes a cada indivíduo foram incubados na presença e ausência de plasma autólogo, os resultados referidos na tabela II sugerem que, no grupo controle, a expressão da TB poderia se modificar em função da presença ou não do plasma autólogo. Desse modo, embora os dados referentes à TBs citados nesta tabela e no anexo 2 estejam aparentemente inseridos nos padrões de normalidade já mencionados, a ausência do plasma autólogo parece representar uma condição importante na expressão dessa variável, a julgar pelos valores de P obtidos para essa condição de cultivo (Tabela III). O papel do plasma autólogo parece ainda mais evidente nas análises de IM, onde o per-

centual médio estimado, na ausência deste, reduziu-se a 50% do valor médio correspondente ao IMc (Tabela II).

Esses resultados poderiam estar eventualmente associados a uma diminuição do inóculo inicial, decorrente dos procedimentos empregados na remoção do plasma autólogo. No entanto, essa não parece ser a explicação adequada, visto que, em experimentos realizados posteriormente em nosso laboratório para testar essa hipótese, não se observou uma perda apreciável de material celular, nem tampouco um decréscimo da viabilidade dos linfócitos, sendo o inóculo assim obtido semelhante ao da amostra com plasma autólogo. Por outro lado, como a execução desses passos levou a uma defasagem de trinta minutos no preparo desses dois tipos de cultura, resultando em igual diferença de tempo para o contato prévio da PHA com os linfócitos, caberia também perguntar se essa antecipação no contato com a PHA, à temperatura ambiente, por um período de trinta minutos, seria suficiente para explicar a diferença nos valores de transformação blástica entre TBc e TBs.

De acordo com Nazpitz & Richter (1968), a incubação de leucócitos com a PHA por apenas cinco minutos, seguidos de 72 horas de cultivo bastaria para desencadear o mecanismo de transformação blástica em alguns linfócitos. Entretanto, a resposta máxima só ocorreria após 6 horas de contato com a PHA. Esses dados, associados às observações de Kay (1967), que demonstrou a necessidade de um período mínimo de 3 horas para estimulação de 70 a 80% dos linfócitos na

presença da fitohemaglutinina, sugerem uma probabilidade mínima de atribuir ao fator tempo às diferenças obtidas. Considerando ainda que no subgrupo 2 a remoção do plasma autólogo resultou em um aumento da TB, em algumas pacientes (anexo 2), os resultados obtidos no grupo controle sugerem fortemente um papel facilitador de resposta blastogênica, existente no plasma autólogo, corroborando as afirmações de Johnson & Russel (1965) e de Beckman (1962).

Os dados obtidos através das análises de regressão, expressos na tabela III, permitem sugerir ainda que, mesmo com a retirada do plasma autólogo e a consequente diminuição dos percentuais de TB e de IM, as variáveis TBc e TBs, IMc e IMs, TBc e IMc, permaneceram correlacionadas positivamente, indicando que as oscilações de valores, dentro do mesmo par, ocorreram no mesmo sentido.

Se as análises de TB e de IM evidenciaram um comportamento homogêneo no grupo controle, o mesmo não ocorreu com o grupo de pacientes, mesmo antes de iniciarem o tratamento quimioterápico (tabela IV). Considerando-se os 11 indivíduos que participaram destas análises (anexo 2), observou-se que sete, (64%), apresentaram resposta blastogênica, assim como rendimento celular, semelhante aos controles, nos dois tipos de cultivo. Os quatro demais, (36%), revelaram ou um percentual de TB diminuído, ou um rendimento celular aparentemente reduzido (anexo 2) em decorrência da grande quantidade de grumos celulares que dificultaram a leitura das lâminas. Estas retomavam o aspecto e os valores seme-



lhantes aos controles, nas culturas onde o plasma autólogo era retirado. Por outro lado, a avaliação do IM revelou que, mesmo acompanhando o sentido das oscilações de TB, os percentuais foram sempre inferiores em relação aos controles (anexo 2 e tabela IV). Um IM diminuído, em relação aos controles, também pôde ser verificado na análise dos dados de Lopes Cardoso (1970), em duas amostras de pacientes com câncer, uma de 33 pacientes com carcinoma brônquico e outra de 26 com carcinomas de tipos histológicos variados.

As análises comparativas entre o grupo controle e de pacientes, utilizando precursores radioativos do DNA, têm revelado a existência de reduções significativas quanto ao nível de incorporação de timidina triciada, nos linfócitos de pacientes com câncer (Borella & Green, 1972; Suciú-Foca, 1973; Jerels et alii, 1978; Quan & Burtin, 1978), enquanto outros autores declaram que as diferenças em relação a grupos controle, se existentes, seriam pouco expressivas (Harrisson et alii, 1981; Sattam et alii, 1981). Em um experimento clássico, Whittaker et alii (1971), verificaram que, quando os linfócitos de indivíduos sadios eram incubados na presença do plasma de pacientes portadores de câncer, os níveis de incorporação de timidina triciada diminuíam sensivelmente. Porém, quando os linfócitos dos pacientes eram incubados na presença do plasma de pessoas da amostra controle, os níveis de marcação eram restabelecidos, mostrando o comprometimento da resposta dos linfócitos desses pacientes à fitohemaglutinina, em decorrência da presen-

ça de algum fator inibidor de resposta, no plasma desses indivíduos. Os resultados obtidos neste trabalho também salientam a importância do plasma autólogo como fator de interferência na resposta linfocitária.

Os trabalhos realizados mais recentemente evidenciam que a ação antimitogênica do plasma de pacientes estaria relacionada com as concentrações elevadas de algumas proteínas produzidas por células responsáveis pela resposta imunológica humoral ou produzidas por células presentes na população tumoral (Catania et alii, 1982), ou ainda com outras proteínas séricas circulantes (Macy et alii, 1983; Garcia-Palmieri, 1981).

Além dos fatores ligados ao soro, vários estudos tem demonstrado a relevância das células responsáveis pelos mecanismos de supressão da resposta imune, (Hersh & Harris, 1968; Paswell et alii, 1982) que podem estar elevadas em condições patológicas malignas, entre outras (Barret, 1970; Satam, 1981) ou podem aumentar por estímulo de situações traumáticas, como o ato cirúrgico e o emprego de anestésicos (Michaels, 1978; Grzelak, 1988).

Embora esse aspecto não tenha sido objeto de estudo neste trabalho, esta explicação poderia ser cogitada como hipótese para justificar a ausência de resposta à fito-hemaglutinina exibida por três pacientes, cujos valores de TB e IM respectivamente, inferiores a 20% e 0,5%, impossibilitaram a análise citogenética de suas lâminas, obrigando a retirada dessas pacientes da amostra. Nestes casos, a res-

posta permaneceu inalterada, mesmo nas culturas onde o plasma autólogo estava ausente. Como esses cultivos foram acompanhados por culturas controle que responderam normalmente ao estímulo da PHA, ficaria descartada a possibilidade de falhas ocorridas nos ensaios. Sendo assim, torna-se sedutor aventar a hipótese de uma possível alteração na relação entre linfócitos T helper/ T supressor, ao nível do sangue periférico dessas pacientes. De fato, essa relação alterada, associada a uma resposta deficiente à PHA, já foi observada em pacientes com carcinoma de pulmão e de mama (Jerrels et alii, 1978) e em outros tumores sólidos (Suciú-Foca, 1973; Quan & Burtin, 1978). Além disso, coincidentemente, essas mulheres evoluíram rapidamente para um estágio avançado da doença.

Do que foi exposto, parece claro que o grupo de pacientes com câncer mamário não apresentou, neste estudo, uma resposta homogênea ao estímulo inespecífico da fitohemaglutinina, mesmo antes de iniciarem o tratamento quimioterápico, havendo um grupo com um comportamento semelhante ao controle, e outro com resposta diminuída em relação a esse.

No subgrupo 3 (Depois da 1ª QT), alguns aspectos da resposta linfocitária se modificaram. Lembrando que os ensaios referentes a esse subgrupo deveriam simular uma situação "in vitro" e que o plasma das próprias pacientes constituiria a fonte única das drogas a serem analisadas, os cultivos foram então realizados apenas na presença do plasma

autólogo. A opção por uma coleta feita logo após 30 minutos da aplicação dos quimioterápicos baseou-se nos dados da literatura, que mencionam um período de meia vida de cerca de duas horas para o metotrexato (Calabresi & Parks Jr., 1980) e de 10 a 20 minutos para a 5-Fluoruracila (Calabresi & Parks Jr., 1980). Por outro lado, observações feitas com o macaco Rhesus sp e com roedores evidenciaram a presença de ciclofosfamida ativada no plasma desses animais, 10 a 30 minutos após uma injeção única e maciça da droga, correspondente a 100mg/kg, (Stevenson & Fauci, 1980), e 20mg/kg, respectivamente (Dearfield et alii, 1985). Assim, a coleta de sangue realizada após 30 minutos da aplicação dessas drogas resultaria na possibilidade teórica do plasma correspondente conter parte da ciclofosfamida já ativada, além das demais drogas em quantidades ainda apreciáveis. Além disso, a coleta nessa ocasião representaria uma comodidade para a paciente, uma vez que esse momento era coincidente com a retirada do scalp, ocasião ideal para se fazer nova coleta sem recorrer a outra punção venal.

O percentual médio de TB não se mostrou estatisticamente alterado, quando comparadas as amostras Antes e Depois do 1º QT. No entanto, o número absoluto de células íntegras presentes nos esfregaços apresentou-se severamente diminuído, em 50% dos casos (anexo 2). Nos demais, a redução parece não ter sido suficientemente intensa para ser detectada pela análise citológica empregada. Quanto ao IM, ocorreu uma diminuição significativa dos percentuais, em 85% dos

casos, e um aumento destes nos 15% restantes (anexo 2 e tabela X). A diminuição do IM parece evidenciar a presença de uma ou mais drogas no plasma, capazes de deprimir o mecanismo de proliferação celular. Em uma análise feita em 8 pacientes com carcinoma brônquico, Lopes Cardozo (1970) verificou que 5 deles apresentavam valores de TB e de IM nulos, nas amostras de sangue periférico colhidas 16 horas após injeção única e maçica de ciclofosfamida, enquanto os três demais pacientes não apresentavam quaisquer alterações em relação às amostras colhidas antes do tratamento. Entretanto, nas coletas feitas após 48 horas da administração da CY, todos os pacientes mostravam valores de TB e de IM equivalentes às amostras prévias. Analisando uma amostra de pacientes com diferentes tipos de tumor, e submetidos a esquemas quimioterápicos diferentes, Cheema & Hersh (1971) encontraram, também, diminuições significativas de incorporação de timidina nas amostras colhidas 24 horas após a injeção da medicação. Considerando essas observações e os resultados de análises farmacológicas realizadas em pacientes que se utilizaram do esquema CMF, onde se verificou uma variabilidade individual considerável quanto à metabolização das drogas, as variações no rendimento das culturas, bem como as diminuições do IM obtidos neste estudo, parecem sugerir a existência de uma ação inibidora sobre a proliferação dos linfócitos "in vitro", e que a intensidade desta poderia diferir segundo a capacidade individual de metabolização de uma ou mais drogas, apesar das concentrações destas estarem bastan-

te diminuídas em razão da diluição de 0,5 ml de plasma do indivíduo em a 5 ml de meio de cultura.

Por outro lado, a aparente incoerência entre os percentuais de TB, inalterados, e os de IM, severamente diminuídos, não constitui observação única na literatura. Winkelstein (1972) encontrou, nas preparações de uma amostra de pacientes com artrite reumatóide que faziam uso da ciclofosfamida, índices normais de marcação autoradiográfica, acompanhados de uma redução significativa nos níveis de incorporação de timidina. Estes resultados foram atribuídos a "uma esterilização funcional de parte dos linfócitos circulantes, a qual se tornaria letal quando a célula entrasse em mitose. Assim, uma parte das células injuriadas pela ciclofosfamida morreria durante a primeira ou segunda mitose. Os linfócitos restantes, com alterações mínimas ou ausentes, sobreviveriam e completariam várias divisões repetidas, incorporando normalmente a timidina marcada. No entanto, a marcação total estaria comprometida, em razão das células danificadas". Estabelecendo-se a mesma linha de raciocínio no presente estudo, parece possível supor uma situação análoga para explicar uma TB alterada e IM diminuído. É provável que neste trabalho a leitura citológica da TB e de IM tenha se efetivado nas células que permaneceram viáveis, embora em número reduzido (anexo 2).

Quanto aos 15% da amostra, representado pelas duas pacientes cujos valores de índice mitótico estavam aumentados em relação às amostras anteriores ao tratamento,

algumas particularidades devem ser mencionadas, uma vez que ambas receberam a Vincristina em adição ao esquema CMF. Sabendo-se que essa droga tem por função principal a sincronização dos ciclos celulares da população tumoral e, portanto, a facilitação da atuação de outros agentes ciclo-específicos (Calabresi & Parks Jr., 1980), os resultados obtidos nesses dois casos (anexo 2) sugerem que a Vincristina estava presente em concentrações suficientes para gerar, "in vitro", um efeito semelhante ou adicional, ao da colchicina acrescentada ao meio de cultura, resultando num aumento do índice mitótico entre as células que permaneceram viáveis.

A atuação da Vincristina parece ter sido importante não somente nas análises do IM, como refere a tabela X, mas também nas análises de regressão realizadas para o subgrupo 3 (tabela VII). Assim, a correlação significativa e negativa existente entre as variáveis Tbc e IMc., com a inclusão de todas as pacientes, deixou de existir após a retirada das pacientes 1 e 3, para efeito de cálculos (tabela VII).

Quanto à resposta dos linfócitos durante e após o tratamento das pacientes (subgrupos 4 e 5, respectivamente), a análise foi parcialmente comprometida em virtude do decréscimo no número de indivíduos da amostra. Embora a resposta dos linfócitos após a exposição a agentes citostáticos possa variar em função do mitógeno empregado, bem como das drogas administradas (Hersh & Oppenheim, 1967; Astaldi et alii, 1969; Strendler et alii, 1982), em geral ocorre uma queda gradativa na resposta linfocitária com posterior recu-

peração (Hersh & Oppenheim, 1967; Green & Borrella, 1973; Strendler et alii, 1982). Em esquema CMF administrado em doze ciclos, Strendler et alii (1981) também registraram um decréscimo gradual na estimulação blástica, com os menores valores de incorporação de timidina (75%) situados no 11º ciclo, após o qual estes retornaram gradativamente aos valores iniciais. As razões para o retorno à normalidade têm sido atribuídas, basicamente, ao reestabelecimento das proporções clonais entre linfócitos "Thelper/Tsupressor", decorrente da remoção cirúrgica do tumor, (Grzelak, 1988). No entanto, não se pode afastar a hipótese da emergência de uma população resistente às drogas aplicadas. Estudos que abordam esse aspecto têm revelado que o fenômeno da resistência celular pode se manifestar principalmente com o Metotrexato, Vincristina e 5-fluoruracila, entre outras drogas (Biedler et alii, 1972; Hill, 1986).

#### **4.2 - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS**

O estudo cromossômico realizado nas amostras do grupo controle resultou no estabelecimento de um percentual no valor de 1% para as aberrações numéricas (tabela XI), concordando com a literatura, que registra percentuais entre 1% e 3% para estas alterações (Beiguelman et alii, 1975; Beiguelman & Pisani, 1976; Bloom et alii, 1967)

O percentual médio no valor de 4% para as aberrações estruturais (tabela XI), mostrou-se igualmente



inserido nos padrões descritos nos trabalhos que utilizam indivíduos sadios como parte de suas análises, e que variam entre 2% a 5% (Beiguelman et alii, 1975; Beiguelman & Pisani, 1976; Schinzel & Schimidt, 1976; Jaju et al, 1986; Sargent et alii, 1987). Sendo assim, de acordo com os métodos empregados neste trabalho, estabeleceu-se como valores controle os percentuais médios acima citados.

O grupo de pacientes revelou, mesmo antes de iniciar o tratamento quimioterápico, uma frequência de aberrações numéricas (6%), significativamente diferente do controle (tabelas XI e XIII). Entretanto, o encontro de alterações numéricas em linfócitos de pacientes com câncer não parece ser considerado um achado importante pelos vários autores, uma vez que os trabalhos que relatam alterações cromossômicas deste tipo ou discutem-nas como artefatos de técnica (Patil, 1980), ou simplesmente não as mencionam em sua discussão (Bridge & Melamed, 1972; Dobos, 1974; Miller et alii, 1978; Schuler et alii, 1982). É verdade, porém, que mesmo os estudos que enfocam a ação dos citostáticos não investigam a constituição cromossômica dos pacientes antes do tratamento (Bridge & Melamed, 1972; Robison, et alii, 1981), o que os impossibilita de avaliar as alterações eventualmente presentes já naquele momento. Os que o fazem, tendem a priorizar unicamente as aberrações estruturais e as TCI em suas análises (Arrighi et alii, 1962; Aronson et alii, 1982; Bochkov et alii, 1986; Dearfield et alii, 1985; Garcia et alii, 1986; Gebhart et alii, 1980).

Os recentes aprimoramentos obtidos com as técnicas de citogenética aplicadas a tumores sólidos têm possibilitado uma retomada gradual dos estudos voltados para a avaliação da instabilidade cromossômica ao nível da área tumoral mas, ainda assim, persiste como principal interesse a análise minuciosa das aberrações estruturais. O mesmo se verifica na averiguação de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico, onde as alterações numéricas, assumem sempre caráter secundário diante das possibilidades de análise oferecidas pelas atuais técnicas de bandas cromossômicas (de la Chapelle & Berger, 1985). Entretanto, essas aberrações parecem constituir um achado importante.

Em pacientes portadores de doenças autoimunes, também tem sido registradas alterações numéricas (Tolchin, 1974; Winkelstein, 1971; Kappadia, 1980), embora esses autores refiram um aumento de hipodiploidias que, segundo Brown (1983), representam uma possibilidade matematicamente comprovada, de constituírem artefatos, enquanto as hiperdiploidias seriam indicadores reais de não disjunções ocorridas.

Considerando que no subgrupo 2 as hiperdiploidias foram o achado mais frequente, em oposição aos controles cujas aberrações, ainda que raras, consistiram de poliploidias, parece que a amostra de pacientes estudada neste trabalho já apresentava alterações numéricas antes de iniciar a quimioterapia.

Mattevi & Salzano (1975), demonstraram que as aberrações cromossômicas em geral, e especialmente as numé-

ricas, tendem a aumentar com o avanço da idade do indivíduo. De fato, as duas pacientes que apresentaram o maior percentual de alterações numéricas (anexo 2) corresponderam àquelas com idade mais avançada, acima de 60 anos. No entanto, os valores apresentados revelam que a maioria das pacientes apresentou, no estudo cromossômico realizado, pelos menos uma célula com alteração numérica enquanto que essa alteração, nos indivíduos do grupo controle, manifestou-se apenas raramente (anexos 1 e 2).

A presença de uma instabilidade cromossômica constitucional, relacionada com a manifestação da doença tem sido descrita a nível da área tumoral, onde o grau de ploídia, bem como o encontro de aneuploidias podem ser considerados como de valor prognóstico (Auer et alii, 1980; Wolman, 1984). Por outro lado, uma "condição aneuplóide", associada a aberrações estruturais, foi também constatada em pacientes que desenvolveram leucemia linfocítica aguda após serem submetidas a tratamento quimioterápico para câncer de mama (Partii, 1980), e linfoma de Hodgkin (Rowley, 1977). Além disso, sabe-se que indivíduos portadores de Síndrome de Down ou de cromossomos sexuais extranumerários apresentariam uma tendência aumentada para desenvolver neoplasias malignas (Kaneko et alii, 1981; Lazarus et alii, 1981; Geraedts et alii, 1980). Assim as alterações numéricas parecem ser um achado constitucional importante, e poderia estar associados a uma predisposição do indivíduo para o desenvolvimento de neoplasias.

Com relação a essas alterações, os percentuais encontrados no subgrupo 3 não se alteraram, estatisticamente, em relação ao subgrupo 2. Considerando que no subgrupo 3 as drogas contidas no plasma das pacientes foram diluídas pelo menos dez vezes no meio de cultivo, a ausência de variações nas frequências de aberrações numéricas poderia ser decorrente da redução "in vitro" nas concentrações dos quimioterápicos. No entanto, estas concentrações foram suficientes para gerar uma sensível diminuição do índice mitótico e do rendimento celular em algumas culturas e, mesmo assim, a frequência de aberrações numéricas permaneceu inalterada.

Além disso, de acordo com o raciocínio exposto anteriormente, se a concentração insuficiente das drogas fosse o fator responsável pela ausência de alterações na frequência de aberrações numéricas, essa variável poderia se modificar no subgrupo 4, após 3 ciclos de atuação das drogas "in vivo". Entretanto, nos subgrupos 4 e 5, as frequências obtidas não se modificaram significativamente (tabela XII), reforçando a hipótese de que essas alterações seriam constitucionais e que as drogas do esquema CMF não atuaram nesse sentido.

Quanto às aberrações estruturais, os percentuais médios obtidos na amostras anteriores ao tratamento não diferiram dos controles nem mesmo quanto ao tipo de aberrações, representadas nesse grupo por gaps e quebras não preferenciais de cromátides e isocromátides. Esses resulta-

das não se mostram destoantes daqueles obtidos por vários pesquisadores os quais, mesmo utilizando metodologia mais sofisticadas do que as empregadas neste trabalho, também não encontraram alterações estruturais em linfócito de pacientes com carcinoma de mama (Pathak, 1987), carcinoma de pulmão (Nordenson et alii, 1984), e com sarcomas de músculos esqueléticos (Mertens, 1988). Porém, a existência de aberrações estruturais anteriores ao tratamento é ainda um assunto controvertido, uma vez que tem sido relatado um aumento destas nos linfócitos de pacientes portadores de retinoblastomas (Czeizel et alii, 1974; Takabayashi et alii, 1983), carcinoma de tireóide (Hsu et alii, 1981; Pathak, 1982), carcinomas renais (Wang, 1982) e carcinoma de cérvix uterino (Murty et alii, 1985; Murty et alii, 1988).

Após a aplicação do primeiro ciclo, de quimioterápico as culturas correspondentes ao subgrupo 3 evidenciaram um número de aberrações estruturais elevado, apesar do reduzido número de metáfases analisadas e da diluição das drogas no meio de cultivo. Esses resultados confirmam os dados relatados em experimentos "in vitro" utilizando a ciclofosfamida acrescentada ao meio nutritivo, ainda que sem a ativação prévia (Hampell et alii, 1966; Au et alii, 1980; Mondello, 1984; Bochkov, 1986; Sargent et alii, 1987). Os trabalhos que avaliam o efeito dos citostáticos logo após a aplicação do primeiro ciclo indicam que o aumento de aberrações, principalmente gaps e quebras, é diretamente proporcional às concentrações das drogas no plasma, principalmente

com relação à ciclofosfamida, e que a intensidade desses efeitos seria variável de acordo com a capacidade individual de metabolização das mesmas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que, 30 minutos após a aplicação da 1ª QT as aberrações mais frequentes foram, além dos gaps e quebras, as contricções secundárias em cromossomos do grupo A ou B. Estas alterações, associadas aos fragmentos acêntricos, são consideradas por Fabry et alii (1985), e também por Coppola (1986), com indicadores de exposição à radiações ionizantes ou à agentes alquilantes, entre eles a ciclofosfamida. Estas aberrações, embora presentes nas pacientes que receberam radioterapia prévia à quimioterapia (pacientes nºs 3 e 4), não constituíram uma particularidade das mesmas, mas sim um achado comum dentre as pacientes que compunham os subgrupos 3 e 4. Porém, as pacientes de números 3 e 4 apresentaram os mais altos percentuais de aberrações em geral, o que parece confirmar, em parte, os estudos de Miller (1978), Gebhart (1980) e Garcia et alii (1985), que referem uma potencialização dos efeitos citogenéticos, causada pela associação dos tratamentos radio e quimioterápico.

Considerando os dados da tabela XII, onde a retirada das pacientes de números 1 e 3 ainda resultou em um valor limítrofe de P quanto à significância estatística, parece-nos que a Vincristina não seria responsável por um aumento de aberrações, mas sim por uma probabilidade aumentada de detecção das mesmas, já que nestas pacientes o IM estava aumentado.

Embora diferenças estatisticamente significativas, no que se refere à frequência de aberrações estruturais, só tenham sido observadas nas comparações entre as mostras Antes e Depois da 1ª QT, o retorno aos percentuais iniciais apenas no subgrupo 5, ou seja, 6 a 9 meses após o término do tratamento. Isso sugere que, pelo menos durante o tratamento, as alterações cromossômicas estruturais resultantes da quimioterapia ainda permaneçam aumentadas "in vivo" concordando com as observações de Robinson et alii (1982), Schuler et alii (1981), Aronson et alii (1982) e Dobos et alii (1974) que, entre outros, relataram um aumento considerável de aberrações estruturais durante o tratamento com citostáticos, e um decréscimo gradativo posterior, até os níveis iniciais prévios do tratamento, ressaltando a importância da variabilidade individual nesse fato. Em uma avaliação crítica deste aspecto, Schinzel & Schmidt (1976), e Jensen & Nyford (1979) mostraram que o nível de sensibilidade difere, ainda, entre os vários tecidos, sendo a medula óssea mais sensível que os linfócitos de sangue periférico, considerados por esses autores como inadequados para a averiguação do potencial genotóxico induzido por agentes químicos. No entanto, os resultados aqui relatados, bem como os estudos já mencionados, parecem indicar que a cultura de linfócitos de sangue periférico pode representar, um sistema de avaliação bastante útil, principalmente no sentido de identificar a estabilidade, de possíveis clones anômalos originados na medula, e lançados posteriormente na corrente sanguínea.

12/11/11

**CONCLUSIONS**



## 5 - CONCLUSÕES

As análises de TB, IM e os estudo cromossômico realizados neste trabalho forneceram os subsídios necessários para as seguintes conclusões:

1 - O esquema poliquimioterápico estudado neste trabalho (CMF), não induziu alterações numéricas em linfócitos de sangue periférico de pacientes sob tratamento, mas elevou significativamente a frequência de aberrações estruturais, nas amostras correspondentes à ação quimioterápica "in vitro" (Subgrupo 3), bem como durante o tratamento (Subgrupo 4), retornando aos percentuais de alterações iniciais, 6 a 9 meses após o mesmo (Subgrupo 5). As aberrações estruturais mais frequentemente induzidas pelo esquema CMF foram gaps e quebras não preferenciais de cromátides, constricções secundárias em cromossomos do grupo A ou B, além de fragmentos acêntricos, seguidos por outras aberrações raras, como cromossomo em anel e isocromossomo do grupo A.

2 - O plasma mostrou ter um papel importante na expressão da TB e do IM, tanto para os controles quanto para as pacientes. Nos controles, a sua presença favoreceu a expressão de valores de TB e IM em média mais elevadas. Nas pacientes antes do tratamento, a sua presença evidenciou dois grupos de respostas: um deles, à semelhança dos controles, mostrou uma TB e IM significativamente aumentada na

presença desse plasma, enquanto o outro se expressou de forma diferente, com valores semelhantes aos controles, apenas na ausência de plasma autólogo.

3 - Na presença de plasma autólogo, a TB e o IM oscilaram intrapares no mesmo sentido nos controles como nas pacientes antes do tratamento embora nestas o IM médio tenha sido significativamente inferior ao do controle.

4 - A amostra controle se comportou de acordo com os dados expressos na literatura pertinente quanto à TB e às aberrações numéricas e estruturais.

5 - As pacientes, mesmo antes de iniciarem o tratamento, mostraram uma frequência média de aberrações numéricas significativamente mais elevada do que os controles.

6 - A cultura de linfócitos de sangue periférico constituiu um importante instrumento de trabalho na avaliação dos efeitos blastogênicos e citogenéticos gerados pelos quimioterápicos que compõem o esquema CMF.

## **RESUMO**

## 6 - RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar o potencial tóxico das drogas que compõem o esquema CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluoruracila), sobre os linfócitos de sangue periférico, provenientes de pacientes com carcinoma de mama em estadio clínico II ou III, mastectomizadas, e que se utilizaram desse esquema como tratamento adjuvante pós cirúrgico.

Para tanto, foram realizadas coletas de sangue periférico de 13 pacientes, em quatro ocasiões pré-estabelecidas: antes do 1º ciclo de quimioterápicos, 30 minutos após a aplicação do mesmo, antes da aplicação do 4º ciclo, e uma coleta final, feita 6 a 9 meses após o término do tratamento protocolado. O grupo controle foi constituído de 29 indivíduos sadios, com idade entre 20 e 45 anos, e que não se utilizaram de qualquer medicação nos últimos três meses anteriores à coleta do sangue periférico.

Após a cultura dos leucócitos por 72 horas, o material foi preparado segundo as técnicas convencionais de citogenética, para a avaliação do índice mitótico (IM) e estudo cromossômico. Paralelamente, um duplicata de cada cultura foi utilizada para a realização dos esfregaços e posterior avaliação da transformação blástica (TB).

Os resultados obtidos possibilitaram o estabelecimento de valores médios percentuais, para o grupo controle, de 66% para a TB, 15% para o IM, 1% para as aberra-

ções numéricas e 4% para as aberrações estruturais. Nesse grupo, a presença do plasma autólogo revelou-se importante na expressão das variáveis TB e IM, cujos percentuais estiveram sempre aumentados, quando comparados aos cultivos realizados na ausência do mesmo.

As pacientes apresentaram, antes de iniciarem o tratamento, percentuais de TB não diferidos estatisticamente do controle, enquanto que os de IM estavam, em média, inferiorizados em relação a este. Nesse grupo (antes do 1º ciclo), verificou-se a existência de dois comportamentos distintos, no que se refere à atuação do plasma autólogo: um com resposta blastogênica semelhante ao controle, e outro com resposta aumentada nas culturas onde o plasma autólogo estava ausente. Esses dados sugerem a existência de algum fator inibidor da resposta, presente no plasma dessas pacientes.

Logo após a aplicação do primeiro ciclo, os percentuais de TB permaneceram inalterados, mas os valores de IM mostraram-se sensivelmente diminuídos nas pacientes que receberam CMF. Com o prosseguimento do tratamento, os valores alterados retomaram os níveis iniciais, prévios ao tratamento.

Com relação às alterações cromossômicas numéricas, o grupo de pacientes revelou um percentual médio aumentando (6%), em relação aos controles, mesmo antes de iniciarem o tratamento, sugerindo o caráter constitucional destas. As alterações observadas nas amostras subsequentes não

diferiram estatisticamente dos valores obtidos na amostra inicial, sugerindo ainda que o esquema CMF não deve afetar significativamente este tipo de aberração.

Com relação às aberrações estruturais observadas, o grupo de pacientes não se mostrou diferido do controle. As aberrações estruturais manifestaram-se estatisticamente alteradas logo após a aplicação do primeiro ciclo, mas retornaram aos padrões iniciais na amostras correspondentes à coleta final. De acordo com os resultados obtidos, parece que o esquema CMF não induz a formação de clones anômalos estáveis, detectáveis pela metodologia empregada neste trabalho.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARONSON, M.M.; MILLER, R.C.; HILL, R.B. et alii. Acute and long-term cytogenetic effects of treatment in childhood cancer. *Mutat. Res.*, **92**:291-305, 1982.
- ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C.; BURGSAEL, D.E. Chromosome damage in murine and human cells following cytoxan therapy *Tox. Rep. Biol. Med.*, **20**:545-9, 1962.
- ASHBY, R.; DAVIS, L.; DEWHURST, B.B.; et alii. Aspects of the teratology of cyclophosphamide (NSC-26271). *Cancer Treat. Rep.*, **60**:477-82, 1976.
- ASTALDI, G.; ERIDANI, S.; PONTI, G.B.; et alii. Influence of antineoplastic agents applied either "in vivo" or "in vitro" on human lymphocyte transformation in cell culture. *Blut*, **XIX**:8-16, 1969.
- AU, W.; SOKOVA, B.K.; ARRIGHI, F.E. Cytogenetic toxicity of CY and its metabolites in vitro. *Cytogenet. Cell Genet.*, **26**:108-16, 1980.
- AUER, G.U.; ARRHENIUS, E.; GRANBERG, P.O. et alii. Comparison of DNA distributions in primary breast cancers and their metastases. *Eur. J. Cancer*, **16**: 273-8, 1980.



- BAKER, G.L.; KAHL, L.E.; ZEE, B.C.; et alii. Malignancy following treatment of rheumatic arthritis with CY. *Am.J. Med.*, **83**:1-9, 1987.
- BARRET, O. Monocytosis in malignant disease. *Ann. Intern. Med.*, **73**:991, 1970.
- BECKMAN, L. Effect of phytohemagglutinin on human serum and cell proteins. *Nature*, **195**:582-3, 1962.
- BEIGUELMAN, B. A análise dos caracteres quantitativas. In: Beiguelman, B. *Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações*. 1ª ed., EDART - Editora da Universidade de São Paulo, 1977, Cap. X, pp. 329-384.
- BEIGUELMAN, B. & PISANI, R.C.B. Chromosomal aberrations in leukocyte metaphases of leprosy patients under dapsone therapy *Hansen. Int.*, **1**:53-60, 1976.
- BEIGUELMAN, B.; PISANI, R.C.B.; EL GUINDY, M.M. "In vitro" effect of dapsone on human chromosomes. *Int. J. Leprosy*, **43**:41-4, 1975.
- BENDER, R.A. & YOUNG, R.C. Effects of cancer treatment on individual and generation genetics. *Sem.Oncol.*, **5**:47-55, 1978.

- BENEDETTI, A.; CARASSAI, A.; CATALINI, V.L.; et alii.  
Cardiotossicità da 5-fluorouracile. *Clin.Ter.*,  
108:99-109, 1984.
- BIEDLER, J.L.; ALBRECHT, A.M.; HUTCHISON, D.J.; et alii.  
Drug response, dihydrofolate reductase, and cytogenetics  
of methopterin-resistant chinese hamster cells "in vi-  
tro". *Cancer Press*, 32:153-61, 1972.
- BISHUM, N.P. The cytogenetic effects of cy on a Burkitt  
tumour cell line (EB4) "in vitro". *Mutat.Res.*,  
11:258-69, 1971.
- BLOM, A.D.; ARCHER, P.G.; AWA, A.A. Variation in the human  
chromosome number. *Nature*, 216:486-9, 1967.
- BOCHKOV, N.P.; FILIPPOVA, T.V.; KUZIN, S.M.; et. alii.  
Cytogenetic effects of cyclophosphamide on human  
lymphocytes "in vivo" and "in vitro". *Mutat. Res.*,  
159:103-7, 1986.
- BORELLA, L. & GREEN, A.A. Sequestration of PHA - responsive  
cells (T-lymphocytes) in the bone marrow of leukemic  
children undergoing long-term immunosuppressive therapy.  
*J. Immunology*, 109:927-32, 1972.

- BRIDGE, M.F. & MELAMED, M.R. Leukocyte chromosome abnormalities in advanced nonhematopoietic cancer. **Cancer Res.**, **32** :2212-20, 1972.
- BROWN, R.S.; HARLEY, A.; HAYNES, M.D. et alii. Hodgkin's disease: immunologic, clinical and histologic features of 50 untreated patients. **Ann. Intern. Med.**, **67**:291-302, 1967.
- BROWN, T.; FOX, D.P.; ROBERTSON, F.W. et alii. Non-random chromosome loss in PHA-stimulated lymphocytes from normal individuals. **Mutat. Res.**, **122** :403-6, 1983.
- BURCHENAL, J.H. The historical development of cancer chemotherapy. **Sem.Oncol.**, **4**:135-46, 1977.
- CALABRESI, P. & PARKS Jr., R.E. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Goodman, L.C. & Gilman, A. **The pharmacological basis of therapeutics**, 6a. ed., Mac Millan Publishing Co, Inc., 1980 ,section XV, pp 1248-1307.
- CALLEN, J.P. Dermatomyositis and multiple malignancy in a patient treated with methotrexate. **J. Surg. Oncol.**, **24**:113-16, 1983.
- CATANIA, G.; AZZARELLO, G.; DI STEFANO, A. et alii. Antigene carcino-embrionario (CEA) e carcinoma della mammella. **Nerv. Chirur.**, **37**: 465-70, 1982.

- CHEEMA, A.R. & HERSH, E. Patient survival after chemotherapy and its relationship to "in vitro" lymphocyte blastogenesis. **Cancer** 28:851-5, 1971.
- CHRISTOPHIDIS, N. Methotrexate. **Clin. Rheum. Dis.**, 10: 401-15, 1984.
- CLEMENTS, Ph.J. & DAVIS, J. Cytotoxic drugs: their clinical application to the rheumatic diseases. **Sem. Artr. Rheum.**, 15:231-54, 1986.
- COPPOLA, M.; VULPIS, N.; BERTONCELLO, G. Relative frequency of acentrics to dicentrics caused by radiation and by chemical action on human lymphocytes. **Mutat. Res.**, 174: 75-8, 1986.
- CREAVEN & Mihich, 1977. The clinical toxicity of anticancer drugs and its prediction. **Semin. Oncol.**, 4:147-63, 1977.
- CZEIZEL, A; CZOSZ, L.; GARDONYI, J. et alii. Chromosome studies in twelve patients with retinoblastoma. **Humangenetik**, 22:159-66, 1974.
- DAMEWOOD, M.D. & GROCHOW, L.B. Prospects for fertility chemotherapy or radiation for neoplastic diseases. **Fertil. Steril.**, 45:443-59, 1986.

- de La CHAPELLE, A. & BERGER, R. Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and fragile sites. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 177:139-52, 1985.
- DEARFIELD, K.L.; JACOBSON-KRAM, D.; BROWN, N.A. et alii. Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. *Mutat. Res.*, 108:437-49, 1983.
- DEARFIELD, K.L.; JACOBSON-KRAM, D.; BUENAVENTURA, S.K. et alii. "In vitro" assays of "in vivo" exposure to CY: induction of sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes, bone-marrow cells and in cultured cells exposed to plasma. *Mutat. Res.* 108:97-104, 1985.
- DOBOS, M.; SCHULER, D.; FEKETE, G. Cyclophosphamide-induced chromosomal aberrations in nontumorous patients. *Human-genetik*, 22:221-7, 1974.
- FABRY, L. ; LEONARD, A.; WAMBERSIE, A. Induction of chromosome aberrations in Go human lymphocytes by low doses of ionizing radiations of different quality. *Radiat. Res.* 103:122-34, 1985.
- FAIRLEY, K.F.; BARRIL, J.V.; JOHNSON, W. Sterility and testicular atrophy related to ciclophosphamide therapy. *Lancet*, march 11:568-9, 1972.

- FARBER, S.; DIAMOND, L.K.; MERCER, R.D. et alii. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by the folic acid antagonist, 4-aminopterylglutamic acid (aminopterin). *N. Engl. J. Med.*, **238**:787, 1948.
- FEICHTINGER, W. & KEMETER, P. Conservative treatment of ectopic pregnancy by transvaginal aspiration under sonographic control and methotrexate injection. *Lancet*, **i(8529)**:381, 1987.
- FREIREICH, E. J.; KARON, M.; FREI, E. III Quadruple combination therapy (VAMP) for acute lymphoblastic leukemia of childhood - *Proc. Am. Cancer Res.*, **5** (Abstract 76); 20, 1961.
- FRIEDLANDER, M.L.; HEDLEY, D.W.; TAYLOR, I.W. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J. Clin. Path.*, **37**:961-74, 1984.
- GARCIA, J.; RUISANCHEZ, N.; LONGCHONG, M. et alii. Chromosomal anomalies in children treated for cancer. *Neoplasma*, **33**:657-62, 1986.
- GARCIA - PALMIERI, M.R.;, SORLIE, P.D.; COSTAS Jr., R. et alii. An apparent inverse relationship between serum cholesterol and cancer mortality in Puerto Rico. *Am. J. Epidemiol.* **114**:29-40, 1981.

- GEBHART, E.; WINDOLPH, B.; WOPFNER, F. Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. *Hum. Genet.* **56**:157-67, 1980.
- GERAEDTS, J.P.M.; MOL A; BRIET E., et alii. Klinefelter Syndrome: Predisposition to acute non-lymphocytic leukemia. *Blut*, **44**:15-20, 1982.
- GOETZ, P.; SRAM, R.J.; DOHNALOVKA, J. Relationship between experimental results in mammals and man I. Cytogenetic analysis of bone marrow injury induced by a single dose of cyclophosphamide. *Mutat. Res.*, **31**:247-54, 1975.
- GOLDIN, A.; VENDETTI, J. M.; KLINE, I., et alii. Erradication of leukemia cells (L 1210) by methotrexate and methotrexate plus citrovorum factor. *Nature*, **212**:1548, 1966.
- GREEN, A.A. & BORELLA, L. Immunologic rebound after cessation of long-term chemotherapy in acute leukemia II. "In vitro" response to phytohaemagglutinin and antigens by peripheral blood and bone marrow lymphocytes. *Blood*, **42**:99-110, 1973.
- GRINER, P.F. - A survey of the effectiveness of cy in patients with severe aplastic anemia *Am. J. Hematol.*, **8**:55-60, 1980.

GRZELAK, I.; OLSZEWSKI, W.L.; ENGESET, A. Influence of surgery on the responsiveness of blood lymphocytes in patients with advanced cancer. *J. Surg. Oncol.*, **37**:73-9, 1988.

HAMPELL, K.E.; KOBER, B.; ROSCH, D. et alii. The action of cytostatics agents on the chromossomes of human leukocytes in vitro. (Preliminary communication) *Blood*, **27**:816-23, 1966.

HARRIS, C.C. The carcinogenicity of anticancer drugs: a hazard in man. *Cancer*, **37**:1014-23, 1976.

HARRISON, R.A.; LEE, H.; FARRANT, J. Variability of lymphocyte response to PHA in patients with operable breast carcinoma: effects of cell concentration, PHA dose, serum and period of cultivation. *Clin. Oncol.*, **7**:205-12, 1981.

HART, J.S.; LIVINGSTON, R.B.; MURPHY; W. K. et alii. Neoplasia, Kinetics, and chemotherapy. *Sem. Oncol.*, **3**: 259-67, 1976.

HERSH, E.M. & HARRIS, J.E. Macrophage-lymphocyte interaction in the antigen-induced blastogenic response of human peripheral leukocytes *J. Immunol.*, **100**:1184, 1968.



- HERSH, E.M. & OPPENHEIM, J.J. Inhibition of "in vitro" lymphocyte transformation during chemotherapy in man. **Cancer Res.**, 27:98-105, 1967.
- HIGGINS, K.A. & SCHWARTZ, M.B. Treatment of persistent trophoblastic tissue after salpingostomy with methotrexate. **Fertil. Steril.**, 45:427-8, 1986.
- HILL, B.T. Resistance of mammalian tumour cells to anticancer drugs: mechanisms and concepts specifically to methotrexate and vincristine. **J. Antimicrob. Chemoth.**, 18(Suppl.B.):61-73, 1986.
- HUI, D.Y. & HARMONY J.A.K. Immunoregulatory plasma lipoproteins. **J. Biol. Chem.**, 255:11775-81, 1980.
- HSU, T.C.; SAMAN, N, et al Chromosome instability in patients with medullary carcinoma of the thyroid. **J. Am. Med. Assoc.**, 246:2046-8, 1981.
- HURVITZ, D.B.A. & HIRSCHHORN, K. Suppression of in vitro lymphocyte responses by chloroquine. **N. Engl. J. Med.**, 273:23-6, 1965.
- JAJU, M.; JAJU, M.; AHUJA, R. Cytogenetic effect of neomycin on human lymphocytes in vitro. **Ind. J. Exp. Biol.**, 24:595-8, 1986.

JASMIN, C. The chemocurability of human cancers. **Cancer Chemot. up date**, VIII(1), January-April, 1988.

JENSEN, M.K. & NYFORS, A. Cytogenetic effect of methothexate on human cells "in vivo". **Mutat. Res.**, 64:339-43, 1979.

JERRELS, Th.R.; DEAN, J.H.; RICHARDSON, G.L. et alii. Role of supressor cells in depression of "in vitro" lymphoproliferative responses of lung cancer and breast cancer patients. **J. N. C. I.** 61:1001-9, 1978.

JOENJE, H. & OOSTRA, A. Clastogenicity in Fanconi's anemia lymphocytes without exogenous metabolic activation. **Cancer. Genet. Cytogenet.**, 22:339-45, 1986.

JOHSON, G.J. & RUSSEL, P.S. Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium. **Nature**, 208:343-5, 1965.

KALTER, H. Antineoplastic drugs and spontaneous abortion in nurses. **N. Engl. J. Med.**, 314:1048, 1986.

KANEKO Y.; ROWLEY, J.D.; VARAKOJIS, D., et al Chromosome abnormalities in Down's syndrome patients with acute leukemia. **Blood**, 58:459-66, 1981.

KAPADIA, S.B.; KRAUSE, J.R.; ELLIS, L.D. et alii. Induced acute non-lymphocytic leukemia following long-term chemotherapy. **Cancer**, 45:1315-21, 1980.

KAY, J.E. Rapid activation of lymphocytes by phytohaemagglutinin. **Nature**, 215: 737-8, 1967.

KENNEDY, B.J. Hormone therapy for advanced breast cancer. **Cancer**, 18:1151-7, 1965.

LANSE, S.B.; ARNOLD, G.L.; GOWANS, J.D. et alii. Low incidence of hepatotoxicity associated with long-term, low-dose oral MTX in treatment of refractory psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. **Dig. Dis. Sciences**, 30:104-9, 1985.

LAZARUS, K. H.; HEEREMA, N.A.; PALMER, C.E., et al. The myeloproliferative reaction in a child with Down Syndrome: Cytological and chromosomal evidence for a transient leukemia. **Am. J. Hematol.**, 11:417-23, 1981.

LENTZ, R.D.; BERGSTEIN, J.; STEFFES, M.W. et alii. Postpuberal evaluation of gonadal function following cyclophosphamide therapy before and during puberty. **J. Pediatrics**, 91:385-94, 1977.

- LEVENTHAL, B.G.; WALDORF, D.S.; TALAL, N. Impaired lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in Sjogren's syndrome. *J. Clin. Invest.*, **46**:1338-45, 1967.
- LI, F.P.; CASSADY, Jr.; JAFFE, N. Risk of second tumours in survivors of childhood cancer. *Cancer*, **35**:1230-5, 1975.
- LOPES-CARDOZO, E. The effect of cytostatic therapy with CY alone or in combination with MTX on the phytohemagglutinin lymphocyte culture and on the immunoglobulins. *Oncology*, **24**:261-72, 1970.
- LUBS, H.A. & SAMUELSON, H.A. Chromosome abnormalities in lymphocyte from normal human subjects. *Cytogenetics*, **6**:402-11, 1967.
- LUEBKE, R.W.; RIDDLE, M.M.; ROGERS, R.R.; et alii. Immune function of young adult mice following in utero exposure to cyclophosphamide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **13**:25-39, 1986.
- MACY, M.; OKANO, Y.; CARDIN, A.D. et alii. Suppression of lymphocyte activation by plasma lipoproteins. *Cancer Res.*, **43**(suppl.): 24965s-25025s, 1983.

- MARTIN, D.S. & GELHORN, A. - Combinations of chemical's compounds in experimental cancer chemotherapy. **Cancer Res.**, 11:35, 1951.
- MATTEVI, M.S. & SALZANO, F.M. Senescence and human chromosome changes. **Humangenetik**, 27:1-8, 1975.
- MELNYK, J.; DUFFY, D.M.; SPARKES, R.S. Human mitotic chromosome damage following in vivo exposure to methotrexate. **Clin. Genet.**, 2:28-31, 1971.
- MERTENS, F.; JOHANSSON, B.; HEIM, S. et alii. Normal frequency of chromosome breakage in lymphocytes from patients with musculoskeletal sarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 33:299-304, 1988.
- MICHAELS, J.; DEGIOVANNI, G. CASTERMAN, S.A. Effect of various types of anaesthesia combined with surgery on cell mediated immunity. **Acta Anesthesiol. Belg.**, 2:152, 1978.
- MILLER; C.; HILL, R.B.; NICHOLS, W.W. et alii. Acute and long-term cytogenetic effects of childhood cancer chemotherapy and radiotherapy. **Cancer Res.**, 38: 3241-6, 1978.
- MONDELLO, CH.; GIORGI, R.; NUZZO, F. Chromosomal effects of methotrexate on cultured human lymphocytes. **Mutat. Res.**, 139:67-70, 1984.

MOORHEAD, J.F.; CONNOLLY, J.J.; MC FARLAND, W. Factors affecting the reactivity of human lymphocytes in vitro I: Cell number, duration of culture and surface area. *J. Immunol.*, **99**:413-9, 1967.

MURTY, V.V.S.; MITRA, A.B.; LUTHRA, U.K. Spontaneous chromosomal aberrations in patients with precancerous and cancerous lesions of the cervix uteri. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **17**:347-54, 1985.

MURTY, V.V.S.; MITRA, A.B.; DAS, B.C. et alii. Chromosomal phenotypes in patients with precancerous lesions of the uterine cervix progressed to cancer during follow-up. *Oncology*, **45**:394-8, 1988.

NASJLETI, C. E. & SPENCER, H.H. Chromosome polyploidization in human leucocyte cultures treated with streptonigrin and CY. *Cancer*, **20**:31-5, 1967.

NASPITZ, Ch. K. & RICHTER, M. The action of PHA "in vivo" and "in vitro" - a Review. *Progress Allergy*, **12**:1-85, 1968.

NORDENSON I.; BECKMAN L.; LIDÉN S.; et alii. Chromosomal aberrations and cancer risk. *Hum. Hered.*, **34**:76-81, 1984.

- PAGE, D.; POSEN, G.; STEWART, T.; et alii. Immunological detection of renal allograft rejection in man. *Transplant.*, 12:341-7, 1971..
- PASSWELL, J.H.; LEVANON, N.M.; DAVIDSON, J.; et alii. The effect of human monocytes and macrophages on lymphocyte proliferation. *Immunology*, 47:177-81, 1982.
- PASTORE, G.; ZURLO, M.G.; ACQUAVIVA, A.; et alii. Health status of young children with cancer following discontinuation of therapy. *Med. Ped. Oncol.*, 15:1-6, 1987.
- PATHAK S.; HSU, T.S.; SAMAN N.; et alii. Cytogenetic abnormalities in a patient with hypercalcemia and papillary thyroid carcinoma. *Hum. Genet.*, 60:291-3, 1982.
- PATIL, Sh. R.; CORDER, M.P.; JOCHIMSEN, P.R. et alii. Bone marrow chromosome abnormalities in breast cancer patients following adjuvant chemotherapy. *Cancer Res.*, 40:4076-80, 1980.
- PISCIOTTA, A.V.; WESTRING, D.W.; DE PRE Y.C., et alii. Mitogenic effects of PHA at different ages. *Nature*, 215:193-4, 1967.
- PROGRESS REPORT. Results of studies by cooperative Breast Cancer Group 1956-1960. *Cancer Chemoth. Rep.*, 11:109-41, 1961.

- QUAN, P.H.C. & BURTIN, P. Demonstration of nonespecific suppressor cells in the peripheral lymphocytes of cancer patients. *Cancer Res.*, **38**:288-96, 1978.
- RAPOSA, T. SCE studies monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics in vitro and in lymphocytes of leukemic patients under cytostatic therapy. *Mutat. Res.*, **57**:241-51, 1978.
- ROBINSON, L.; ARTHUR, D.C.; BALL, D.W. et alii. Cytogenetic studies of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, **42**:4289-92, 1982.
- ROSSI, A.M.; ROMANO, M.; ZACCARO, L. et alii. DNA synthesis, mitotic index, drug metabolising systems and cytogenetic analysis in regenerating rat liver. *Mutat. Res.*, **182**:75-82, 1987.
- ROZENSZAJN, L.A. & RUDNAY, J. The effects of MTX on transformation and mitosis of normal human blood lymphocytes "in vitro". *Blood*, **43**:401-9, 1974.
- RYAN, T.J.; BODDINGTON, M.M.; SPRIGGS, A.I. Folic acid antagonists and chromosomal aberrations. *J. Derm.*, **77**:283, 1970.



- SARGENT, L.M.; ROLOFF, B. & MEISMER, L.F. Mechanisms of CY induction of cytogenetic damage in human lymphocyte cultures. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 29:239-43, 1987.
- SATTAM, M.N.; NADKARNI J.J., NADKARNI J.S., et alii Immune status of untreated cervical cancer patients. **Neoplasma**, 28:111, 1981.
- SCHEIFFARTH, F.; LEYKAM, D.; WARNATZ, H. et alii. Effect of cytostatic drugs on blast transformation of lymph node and spleen cells. **Resp. Exp. Med.**, 160:196-205, 1973.
- SCHINZEL, A. & SCHMID, W. Lymphocyte chromosome studies in human exposed to chemical mutagens. **Mutat. Res.**, 40:139-66, 1976.
- SCHULER, D.; SZOLLAR, J.; KOÓS, R. et alii. The investigation of late cytogenetic effects in children with acute leukemia in long remission and-off all chemotherapy. **Hum. Genet.**, 56:339-44, 1981.
- SELEVAN, S.G.; LIND-BBOHN, M.L.; HORNUNG, R.W. et alii. A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. **N. Engl. J. Med.**, 313:1173-8, 1985.

- SHARMA, B. Effects of CY on in vitro human lymphocyte culture and mitogenic stimulation. **Transplant.**, **35**:165-8, 1983.
- SIEBER, S.M. & ADAMSON, R.H. Toxicity of antineoplastic agents in man: chromosomal aberrations, antifertility effects, congenital malformations and carcinogenic potential. **Adv. Cancer Res.**, **22**:57-153, 1975.
- SINGH, S.; JEYASEELAN, N.; SINGH, S.H. et alii. Histological study of eye malformations induced by cyclophosphamide in rat foetuses. **Ind. J. Med. Res.**, **79**:684-90, 1984.
- SOKAL, J.E. & LESSMANN, EM. Effects of cancer chemotherapeutic agents on the human fetus. **Jama**, **172**:1765-71, 1960.
- STEINBERG, A.D.; PLOTZ, P.H.; WOLFF, Sh.M. et alii. Cytotoxic drugs in treatment of non malignant diseases. **Ann. Intern. Med.**, **76**:619-42, 1973.
- STEVENSON, H.C. & FAUCI, A.S. Activation of human B lymphocytes XII - Differential effects of in vitro cyclophosphamide on human lymphocyte subpopulations involved in B-cell activation. **Immunology**, **39**:391-7, 1980.

- STRENDER, L.E.; BLOMGREN, H.; WASSERMAN, J. et alii. Adjuvant radiation therapy compared with cyclic chemotherapy in patients with mammary carcinoma II - Changes of mitogens responses of blood lymphocytes. *Acta Radiol. Oncol.*, 20:299-304, 1981.
- STRENDER, L.E.; PETRINI, B.; BLOMGREN, H. et alii. Influence of adjuvant chemotherapy on the blood lymphocyte population in operable breast carcinoma. *Acta Rad. Oncol.*, 21:217-24, 1982.
- SUCIU-FOCA, N; BUDA, J.; McMANUS, J. et alii. Impaired responsiveness of lymphocytes and serum-inhibitory factors in patients with cancer. *Cancer Res.*, 33:2373-7, 1973.
- SUSSMAN, A. & LÉONARD, J. Psoriasis, methotrexate and oligospermia. *Arch. Dermatol.*, 116:215-7, 1980.
- TAKABAYASHI, T.; LIN, M.S.; WILSON, M.G. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in fibroblasts from patients with retinoblastoma. *Hum. Genet.*, 63:317-9, 1983.
- THIERCH, J. & WASH, S. Therapeutic abortions with a folic acid antagonist, 4-aminopteroglutamic acid (4-amino P.G.A.) administered by the oral route. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 63: :1298-1304, 1952.

- THOMAS, M.R.; ROBINSON, W.L.; BOYLE, D.Y. et alii.  
Long-terms effects of CY on granulocyte colony formation  
in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumat.*,  
10:5, 1983.
- TOLCHIN, S.F; WINKELSTEIN, A.; RODNAN, G.P. et alii.  
Chromosome abnormalities from cyclophosphamide therapy in  
rheumatoid arthritis and progressive systemic sclerosis  
(scleroderma). *Arth. Rheum.*, 17:375-82, 1974.
- TRASLER, J.M.; HALES, B.; ROBAIRE, B. Chronic low dose  
cyclophosphamide treatment of adult male rats: effects on  
fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol. Rep.*,  
34:275-83, 1986.
- VOORHEES, J.J.; JANSEN, M.K.; HARRELL, E.R. et alii.  
Cytogenetic evaluation of methotrexate-treated psoriatic  
patients. *Arch. Derm.*, 100:269-74, 1969.
- WANG, N.; KANTOR, A.; SOLDAT, L. et alii. Higher frequency  
of chromosomal aberrations and polymorphism in patients  
with renal carcinoma. *Am. J. Hum. Genet.*, 34:78A, 1982.
- WASKERWITZ, M.J. & RUCCIONE, K. An overview of cancer  
children in the 1980s. *Nurs. Clin. North. Am.*, 20: 5-29,  
1985.

WEBSTER, D.J.T.; RICHARDSON, G.; BAUM, M. et alii. Effect of treatment on the immunological status of women with advanced breast cancer. *Br. J. Cancer*, **39**:676-80, 1979.

WINKELSTEIN, A.; MIKULLA, J.M.; NANKIN, H.R. et alii. Mechanisms of immunosuppression. Effects of cyclophosphamide on lymphocyte. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**:506-13, 1971.

WHITTAKER, M.G.; RHES, K.; CLARK, C.G. Reduced lymphocyte transformation in breast cancer. *Lancet*, **11**:892-3, 1971.

WOLMAN, S.R. Cytogenetics and Cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **108**:15-19, 1984.

YAMANAKA, N.; HARABOCHI, Y.; HIMI, T. et alii. Immunosuppressive substance in the sera of head and neck cancer patients. *Cancer*, **62**:1293-8, 1988.

YAMASHITA, K.; HAYASHI, H.; MURE, K. et alii. Serum immunosuppressive substance in patients with gynecologic malignancies and in pregnant women. *Cancer*, **57**:69-74, 1986.

YOFFEY, J.M.; WINSTER, G.C.B.; OSMEND, D.G. et alii.  
Morpho-logical studies in the culture of human leucocytes  
with phytohaemagglutinin. *Brit. J. Haemat.*, 11: 468-97,  
1965.

ANEXO 1 - Resultados obtidos com o Grupo Controle

IDENT	TCel	Tbc	XTBc	TCel	TBs	XTBs	IMc	XIMc	IMs	XIMs	T.Met.	AbNum	XAbNum	AbEst	XAbEst
1	200	126	63	200	126	63	27	07	25	06	30	0	00	5	17
2	200	147	74	200	134	67	28	07	21	05	30	0	00	1	03
3	200	176	88	200	118	59	155	39	63	16	30	0	00	4	13
4	200	132	66	200	103	52	45	11	30	08	30	0	00	0	00
5	200	105	53	200	101	51	13	03	8	02	30	1	03	4	13
6	200	133	67	200	155	78	71	24	24	06	30	0	00	2	07
7	200	100	50	200	90	45	31	08	20	05	30	0	00	3	10
8	200	122	61	200	127	64	49	12	18	05	30	0	00	0	00
9	200	133	67	200	110	55	51	13	6	02	30	0	00	1	03
10	200	108	54	200	110	55	46	12	55	14	30	0	00	0	00
11	200	130	65	200	120	60	21	05	13	03	30	0	00	0	00
12	200	124	62	200	88	44	53	13	13	03	30	0	00	0	00
13	200	137	69	200	140	70	39	10	35	09	30	0	00	0	00
14	200	134	67	200	131	66	130	33	96	24	30	0	00	1	03
15	200	157	79	200	141	71	32	08	18	05	30	0	00	0	00
16	200	135	68	200	137	69	66	17	11	03	30	0	00	0	00
17	200	120	60	200	110	55	104	26	9	02	30	0	00	1	03
18	200	103	52	200	90	45	38	10	8	02	30	1	03	4	13
19	200	125	63	200	82	41	110	28	67	17	30	0	00	1	03
20	200	123	62	200	120	60	106	27	81	20	30	0	00	3	10
21	200	162	81	200	140	70	106	27	54	14	30	0	00	0	00
22	200	161	81	200	135	68	167	42	103	26	30	0	00	0	00
23	200	134	67	200	116	58	25	06	12	03	30	0	00	0	00
24	200	140	70	200	134	67	37	09	17	04	30	0	00	0	00
25	200	120	60	200	109	55	57	14	20	05	30	0	00	0	00
26	200	152	76	200	144	72	60	15	17	04	30	0	00	0	00
27	200	131	66	200	116	58	31	15	4	01	30	0	00	0	00
28	200	137	69	200	137	69	40	10	30	08	30	1	03	1	03
29	200	172	86	200	158	79	90	23	44	11	30	2	07	1	03

ANEXO 2 - Resultados obtidos com o Grupo de Pacientes

SubG	IDENT	TCel	TBC	XTBC	TCel	TBs	XTBs	IMC	XIMC	IMs	XIMs	THet	AbNum	XAbNum	AbEst	XAbEst
2	1	100	71	71	200	124	62	2	01	30	08	30	2	07	2	07
2	2	200	150	75	200	157	79	38	10	32	08	30	1	03	1	03
2	3	100	67	67	200	142	71	22	01	22	06	30	1	03	0	00
2	4	200	136	68	NR	NR	NR	17	04	NR	NR	26	3	12	2	08
2	5	200	160	80	200	123	62	88	22	38	10	30	1	03	2	07
2	6	200	97	49	200	137	69	16	04	14	04	26	0	00	1	04
2	7	200	101	51	200	162	81	8	02	30	08	30	1	03	1	03
2	8	200	183	92	NR	NR	NR	44	11	NR	NR	30	5	17	0	00
2	9	200	124	62	200	116	58	20	05	11	03	30	2	07	1	03
2	10	200	140	70	200	146	73	32	08	24	06	30	0	00	3	10
2	11	200	170	85	200	160	80	70	18	40	10	26	2	08	0	00
2	12	200	178	89	200	168	84	46	12	22	06	22	2	09	0	00
2	13	200	134	67	200	125	63	41	10	31	08	30	1	03	0	00
3	1	200	93	47	NR	NR	NR	54	14	NR	NR	30	2	07	3	10
3	2	200	154	77	NR	NR	NR	6	02	NR	NR	30	0	00	3	10
3	3	100	59	59	NR	NR	NR	64	16	NR	NR	30	4	13	4	13
3	4	100	70	70	NR	NR	NR	10	03	NR	NR	30	3	10	7	23
3	5	200	137	69	NR	NR	NR	46	12	NR	NR	30	1	03	3	10
3	6	200	147	74	NR	NR	NR	5	01	NR	NR	8	0	00	0	00
3	7	100	56	56	NR	NR	NR	12	03	NR	NR	30	3	10	3	10
3	8	200	152	76	NR	NR	NR	4	01	NR	NR	13	1	08	0	00
3	9	100	56	56	NR	NR	NR	8	02	NR	NR	30	0	00	0	00
3	10	200	133	67	NR	NR	NR	4	01	NR	NR	13	0	00	1	08
3	11	100	73	73	NR	NR	NR	9	02	NR	NR	7	0	00	0	00
3	12	100	71	71	NR	NR	NR	12	03	NR	NR	9	0	00	0	00
3	13	100	68	68	NR	NR	NR	15	04	NR	NR	13	1	08	0	00
4	2	200	172	86	200	158	79	37	09	31	08	30	1	03	1	03
4	3	200	142	71	200	156	78	11	03	13	03	30	2	07	3	10
4	4	200	138	69	200	170	85	43	11	31	08	30	0	00	4	13
4	5	200	117	59	200	114	57	23	06	1	00	30	2	07	0	00
4	6	200	136	68	200	144	72	10	03	20	05	30	0	00	1	03
4	7	200	143	72	200	137	69	31	08	30	08	30	0	00	1	03
4	8	200	90	45	200	122	61	43	11	23	06	30	2	07	3	10
4	9	200	118	59	200	129	65	16	04	26	07	30	2	07	3	10
5	3	200	125	63	200	121	61	12	03	12	03	30	1	03	0	00
5	4	200	122	61	200	123	62	13	03	16	04	30	1	03	0	00
5	5	200	109	55	200	103	52	89	22	24	06	30	2	07	1	03
5	6	200	126	63	200	134	67	4	01	32	08	30	2	07	1	03
5	7	200	106	53	200	116	58	13	03	15	04	30	0	00	0	00
5	8	200	146	73	200	116	58	27	07	15	04	30	2	07	2	07
5	9	200	88	44	200	122	61	16	04	15	04	30	1	03	1	03

NR = NAO realizado