

Trabalho apresentado no 45º Congresso Brasileiro de Colo-Proctologia, sob forma de Tema Livre.

SENSIBILIDADE AOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA BLEOMICINA: COLITE ULCERATIVA VERSUS CÂNCER COLORRETAL

FÁBIA A. CARVALHO, TSBCP
LUÍS MASSARO WATANABE
CÉSAR KOPPE GRISÓLIA
IRIS FERRARI

CARVALHOFA, WATANABELM, GRISÓLIA CK & FERRARI I - Sensibilidade aos efeitos genotóxicos da bleomicina: colite ulcerativa versus câncer colorretal. *Rev bras Colo-Proct*, 1997; 17(2): 150-156

RESUMO: Neste estudo foram selecionados 35 pacientes, sendo 13 sadios (grupo I); 10 pacientes com colite ulcerativa (grupo II); e 12 pacientes com câncer colorretal (grupo III). Para determinar a resposta aos efeitos mutagênicos da bleomicina em cultura de linfócitos de sangue periférico, foram realizados dois tipos de cultura para cada paciente: a primeira, sem tratamento com bleomicina (cultura espontânea) e, a segunda, tratada com bleomicina (cultura induzida). Na avaliação microscópica dos linfócitos em metástase, foram determinados o índice mitótico e as alterações cromossômicas estruturais. Os três grupos de pacientes diferiram entre si, quanto às determinações do índice mitótico nas culturas espontâneas ($p < 0,01$) e induzidas ($p < 0,001$). O grupo II apresentou índices mitóticos significativamente maiores que os dos grupos I e III. Quanto à frequência de quebras cromatídicas espontâneas por célula, não houve diferença significativa entre os três grupos de pacientes ($p = 0,39$). Quanto à frequência de quebras cromatídicas induzidas por célula, observou-se que havia diferença significativa entre os três grupos de pacientes ($p < 0,001$). O grupo III apresentou valores significativamente superiores aos verificados no grupo II, e este significativamente maiores que os do grupo I. Com base nos resultados, observou-se que a bleomicina induziu ao aumento significativo de aberrações cromossômicas nos linfócitos dos grupos de pacientes com colite ulcerativa e com câncer colorretal. A sensibilidade aos efeitos genotóxicos da bleomicina em pacientes com colite ulcerativa pode expressar maior predisposição ao câncer colorretal.

UNITERMOS: colite ulcerativa; câncer colorretal; aberrações cromossômicas; bleomicina

Diversos autores têm demonstrado associação consistente entre a colite ulcerativa e o carcinoma colorretal, o que indica o caráter pré-maligno^(4, 6, 20, 34) da doença intestinal inflamatória. Os maiores fatores de risco na gênese do carcinoma foram o acometimento total do intestino grosso ou a duração prolongada da doença intestinal inflamatória, sobretudo quando se estendeu por mais de sete a 10 anos^(4, 20). O diagnóstico precoce aliado à terapêutica cirúrgica agressiva continuam sendo os instrumentos com maior potencial de cura do câncer colorretal em pacientes com colite ulcerativa⁽¹⁸⁾. Portanto, a adoção de programas de triagem tornou-se prioritária tanto para a detecção precoce do câncer, ainda no estágio de maior possibilidade de erradicação terapêutica da doença, como para a identificação de lesões com alto potencial de malignidade, quando a ressecção colônica profilática possibilitaria a interrupção da seqüência evolutiva para o câncer.

Embora o desenvolvimento de câncer colorretal em pacientes com colite ulcerativa seja considerado a complicação mais temida dessa enfermidade^(20, 34), os programas de vigilância disponíveis têm sido pouco satisfatórios, na profilaxia dessa complicação⁽¹¹⁾. Por isso, persistem os esforços em busca de marcadores biológicos mais sensíveis e específicos, com capacidade de estabelecer o estado evolutivo da doença e a predisposição maior ao câncer.

Foi sugerido que a suscetibilidade ao câncer colorretal pode ser avaliada pela análise citogenética de linfócitos de sangue periférico⁽²⁸⁾. Essas células têm como características favoráveis baixa frequência de aberrações cromossômicas espontâneas em pessoas normais e são de fácil obtenção⁽¹⁵⁾.

Nas culturas de linfócitos de sangue periférico, a bleomicina tem sido utilizada como meio de estimar a predisposição ao câncer, baseada na sua propriedade de induzir grande número de quebras cromatídicas em células suscetíveis, causando raramente trocas entre cromátides⁽¹⁷⁾. A resposta aos efeitos genotóxicos da bleomicina, manifestada pela frequência de quebras cromatídicas induzidas por célula, permitiria a classificação de pessoas de acordo com a sensibilidade ou a resistência das células a esse agente

Trabalho realizado no Laboratório de Genética Médica da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Apoio: Fundação de Apoio à Pesquisa no Distrito Federal - FAPDF. Resumo de Dissertação de Mestrado em Imunologia e Genética Aplicadas. Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Trabalho laureado com o Prêmio Pitanga Santos de 1996 oferecido pela Sociedade Brasileira de Colo-Proctologia

radiomimético. A alta frequência de sensibilidade dos linfócitos aos efeitos mutagênicos foi confirmada em pacientes com câncer colorretal, demonstrada pelo aumento nas taxas de quebras cromatídicas por célula^(8, 17), fenômeno também observado em pacientes com colite ulcerativa por Konstantinova e Nedkova-Bratanowa⁽¹⁹⁾. Em preparações cromossômicas obtidas de cultura de linfócitos, foi demonstrado, também, o aumento significativo das anormalidades cromossômicas estruturais espontâneas de pacientes com colite ulcerativa, quando cotejadas com pacientes sadios⁽⁷⁾. Quanto à resposta celular aos efeitos genotóxicos da bleomicina, não foram encontrados relatos prévios envolvendo pacientes com colite ulcerativa.

O presente trabalho tem por objetivo verificar a instabilidade cromossômica espontânea sob efeito do agente radiomimético bleomicina, mediante cultura temporária de linfócitos de sangue periférico, em pacientes com colite ulcerativa ou câncer colorretal.

CASUÍSTICA E MÉTODO

No período de março de 1994 a março de 1995, após anamnese completa e exame colonoscópico, foram selecionados 35 pacientes consecutivos, de ambos os sexos, atendidos nas Unidades de Colo-Proctologia do Hospital Universitário de Brasília da Universidade de Brasília e do Hospital de Base do Distrito Federal. Os pacientes foram distribuídos em três grupos, segundo os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos, sendo denominados: grupo I, 13 pacientes sadios com exames clínico e colonoscópico normais; grupo II, 10 pacientes com diagnóstico de colite ulcerativa; e grupo III, 12 pacientes com diagnóstico de cancer colorretal.

As características gerais dos 35 pacientes, distribuídos nos três grupos, estão relacionadas na Tabela 1. Todos os pacientes com colite ulcerativa apresentaram curso prolongado da doença, demonstrando tratar-se de formas crônicas da patologia. A média de duração das manifestações clínicas da colite ulcerativa foi de 116,4 meses, com variação de 24 a 216 meses. Além disso, constatou-se que a extensão de acometimento do cólon, avaliada sob visão colonoscópica, foi total em oito pacientes. A colite ficou restrita ao cólon esquerdo e reto em dois pacientes. Quando à gravidade, cinco pacientes apresentaram a forma grave. Três, a forma moderada e dois, a forma leve da doença.

Nos pacientes do grupo III, todos os tumores ressecados foram adenocarcinomas. Os tumores estavam localizados na metade proximal do intestino grosso em dois pacientes, e na metade distal em 10 pacientes. A duração média das manifestações clínicas até o diagnóstico foi de 16,6 meses, variando de cinco a 72 meses. Pelo estadiamento modificado de Dukes, apenas um paciente foi classificado como estágio A, sendo os demais pacientes classificados como estágios C ou D.

Os diagnósticos colonoscópicos de colite ulcerativa e câncer colorretal foram confirmados com base em dados histopatológicos. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário de Brasília.

Tabela 1 - Características gerais dos 35 pacientes, distribuídos nos grupos I (normal), II (colite ulcerativa) e III (câncer colorretal)

Características	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Idade média (anos)	48,8	36,1	56,4
Varição da idade (anos)	35 a 65	21 a 52	28 a 71
Idade mediana (anos)	48	34,5	57
Sexo	9F:4M	9F:1M	6F:6M
Cor branca	11	8	11
Cor parda	2	2	1
Não tabagista	10	7	5
Tabagista	3	3	7
Não etilista	9	8	6
Etilista	4	2	6
Nº total de pacientes	13	10	12

Quanto aos critérios de inclusão, foram definidos os seguintes parâmetros: idade superior a 15 anos, obtenção de consentimento pós-informação e exames clínico e colonoscópico completos. Os critérios de exclusão para os três incluíram: radioterapia ou quimioterapia prévias, operações prévias, doenças associadas, doenças genéticas, antecedentes familiares de câncer e de doença intestinal inflamatória, para o grupo I; antecedentes familiares de doença neoplásica, para o grupo II e antecedentes familiares de doença intestinal inflamatória, para o grupo III.

Quanto à gravidade da doença, os pacientes com colite ulcerativa foram classificados segundo critérios já estabelecidos^(12, 36). Os pacientes com câncer colorretal foram submetidos ao tratamento cirúrgico, com ressecção radical seguindo os princípios oncológicos. O estadiamento foi realizado de acordo com a classificação modificada de Dukes⁽²¹⁾.

Nos três grupos, uma amostra de sangue periférico foi colhida de cada paciente. Nos pacientes com câncer colorretal, a amostra foi colhida antes do tratamento cirúrgico. Todas as amostras sanguíneas foram semeadas no mesmo dia de sua respectiva obtenção, utilizando-se do método de cultura temporária de linfócitos, conforme a técnica modificada de Moorhead e col.⁽²³⁾. O meio de cultura RPMI - 1640 foi suplementado com soro bovino fetal (Laboratório Cultilab, Campinas, SP) e fito-hemaglutinina (Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Ciências da Saúde - UnB, Brasília, DF), nas proporções de 20% e 4% do volume total da cultura, respectivamente. Nas últimas cinco horas de incubação, dois dos quatro frascos de cultura de cada paciente foram tratadas com bleomicina (Blenoxane, Laborterápica Bristol Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP). A concentração final de bleomicina em cada frasco foi de 30 µg/ml, seguindo o método preconizado por Hsu⁽¹⁵⁾. Durante a última hora de incubação, todas as culturas foram tratadas com colchicina alcaloid (Fischer Scientific CO, USA), para bloquear a divisão celular, em metáfase. Foram feitos, de cada paciente, dois tipos de culturas de linfócitos: o primeiro, sem tratamento com bleomicina, foi denominado cultura espontânea e o segundo, tratado com bleomicina, foi denominado cultura induzida. As

lâminas foram preparadas e coradas pelo Giemsa.

As leituras para as determinações do índice mitótico e do número de quebras cromatídicas foram realizadas por observador independente, que desconhecia a que grupo de pacientes pertenciam as lâminas preparadas. Em lâmina de amostra de cada paciente, foram determinados os índices mitóticos de culturas não tratadas e tratadas com bleomicina, com base nos cálculos dos percentuais de mitoses em 1.000 células de cultura espontânea e em 1.000 células de cultura induzida, respectivamente. Foram também determinados os números de quebras cromatídicas espontâneas e induzidas para amostra proveniente de cada paciente, pela contagem dos números de quebra em 100 metáfases da cultura espontânea e em 100 metáfases da cultura induzida, respectivamente. Para facilitar a comparação, os números de quebras cromatídicas de cada amostra foram convertidos em números de quebras cromatídicas por célula. As aberrações cromossômicas foram classificadas segundo as determinações propostas pela Chatham Bars Inn Workshop Conference⁽⁵⁾. Foram consideradas como correspondentes a duas quebras as trocas entre cromátides e as quebras isocromatídicas.

Para determinar se houve interferência dos fatores idade, sexo, tabagismo e etilismo, nos resultados da avaliação citogenética dos três grupos de pacientes, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para comparação dos índices mitóticos de culturas espontâneas e induzidas, e das freqüências de quebras cromatídicas espontâneas e induzidas por célula, foi aplicado também o teste de Kruskal-Wallis. O teste de comparações múltiplas foi utilizado para comparação entre si dos três grupos de pacientes, quanto aos valores de índices mitóticos e à freqüência de quebras cromatídicas espontâneas e induzidas por célula. O nível de significância adotada em todos os testes foi de 5% ($\alpha < 0,05$).

RESULTADOS

Os fatores, incluindo faixa etária, sexo, cor, tabagismo e etilismo, não apresentaram interferências significativas nos resultados da avaliação citogenética.

Os resultados dos índices mitóticos de culturas de linfócitos espontâneas e induzidas dos pacientes dos grupos I, II e III estão dispostos na Tabela 2. Os três grupos de pacientes diferiram entre si, quanto aos valores de índices mitóticos de culturas espontâneas ($p = 0,002$) e induzidas ($p < 0,001$). Pela análise comparativa entre os três grupos, mediante aplicação do teste de comparações múltiplas, observou-se que o grupo II apresentou valores de índices mitóticos de culturas espontâneas e induzidas significativamente superiores aos dos grupos I e III. De outro lado, os grupos I e III não diferiram entre si quanto aos valores de índices mitóticos.

Os resultados das freqüências de quebras cromatídicas espontâneas e induzidas por célula dos pacientes dos grupos I, II e III encontram-se nas Figs. 1 e 2. Quanto à freqüência de quebras cromatídicas espontâneas por célula, observou-se, no grupo I, variação de 0,01 a 0,13, mediana de 0,02 e média 0,03; no grupo II, variação de 0,01 a 0,08, mediana de 0,04 e média de 0,04 e, no grupo III, variação de 0,01 a 0,09, mediana de 0,03 e média de 0,03. No grupo I, pôde-se observar apenas um valor de quebra cromatídica por célula divergente dos demais, igual a 0,13. Pela análise comparativa, quanto ao número de quebras cromatídicas espontâneas, verificou-se que não houve diferença significativa entre os três grupos de pacientes ($p = 0,39$).

Quanto à freqüência de quebras induzidas por célula, verificou-se, no grupo I, variação de 0,01 a 0,53, mediana de 0,06 e média de 0,12; no grupo II, variação de 0,58 a 0,89, mediana de 0,67 e média de 0,69 e, no grupo III, variação de 0,83 a 2,02, mediana de 1,23 e média de 1,32. Somente um

Tabela 2 - Índices mitóticos de culturas de linfócitos espontâneas (IMCE), não tratadas com bleomicina, e de células induzidas (IMCI), tratadas com bleomicina, após análise de 1.000 células de pacientes dos grupos I (normal), II (colite ulcerativa) e III (câncer colorretal). Os pacientes de cada grupo são representados por números de 1 a 13.

N.º pacientes	Grupo I IMCE (%)	Grupo II IMCI (%)	Grupo III IMCE (%)	IMCI (%)	IMCE (%)	IMCI (%)
1	0,5	0,3	2,2	5,2	2,3	1,5
2	1,3	1,0	2,8	2,2	0,5	1,3
3	2,2	1,8	1,4	1,2	0,5	0,7
4	0,9	0,9	3,3	2,4	0,8	0,7
5	0,9	0,5	0,8	0,9	1,6	2,4
6	1,1	1,0	3,1	2,2	0,9	0,5
7	1,8	1,5	5,1	4,2	1,4	0,9
8	1,8	0,8	5,2	2,6	1,2	0,8
9	2,0	0,6	3,1	2,9	0,9	1,4
10	1,2	1,8	2,6	2,3	2,4	0,8
11	0,8	1,2	-	-	1,2	0,8
12	1,3	0,8	-	-	0,7	0,5
13	1,8	1,0	-	-	-	-
(x) média	x = 1,35	x = 1,02	x = 2,96	x = 2,61	x = 1,20	x = 1,03
(md) mediana	md = 1,30	md = 1,0	md = 2,95	md = 2,35	md = 1,05	md = 0,8
(Ö) desvio padrão	Ö = 0,52	Ö = 0,46	Ö = 1,40	Ö = 1,28	Ö = 0,63	Ö = 0,54

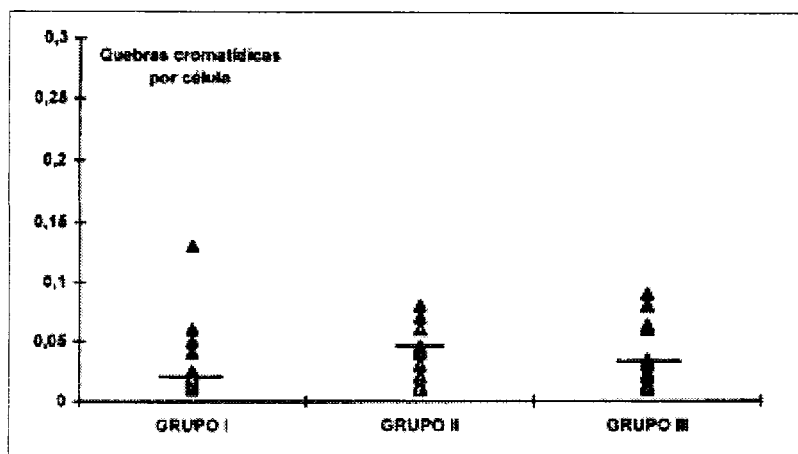


Fig. 1 - Frequência de quebras cromatídicas espontâneas por célula em amostras de cultura temporária de linfócitos de 13 pessoas normais (grupo I), 10 pacientes com colite ulcerativa (grupo II), e 12 pacientes com câncer colorretal (grupo III). O traço horizontal representa a mediana.

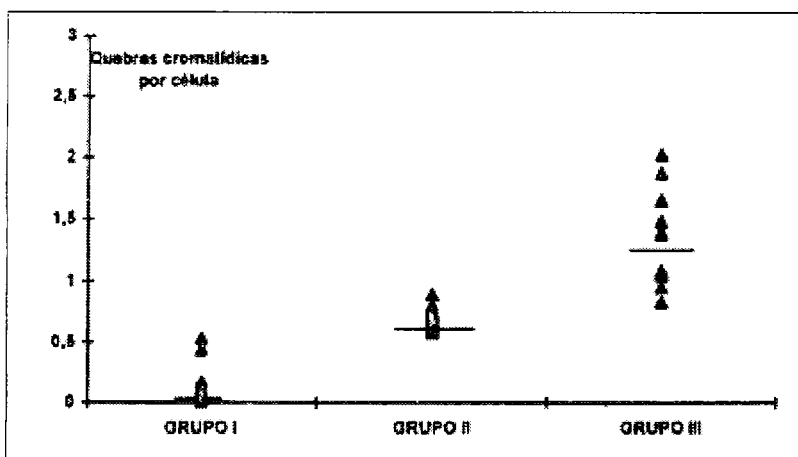


Fig. 2 - Frequência de quebras cromatídicas induzidas por célula em amostras de cultura temporária de linfócitos de 13 pessoas normais (grupo I), 10 pacientes com colite ulcerativa (grupo II) e 12 pacientes com câncer colorretal (grupo III). O traço horizontal representa a mediana.

paciente do grupo de colite ulcerativa teve valor de quebra cromatídica induzida maior do que 0,8, enquanto 83,3% dos pacientes com câncer colorretal apresentaram valores superiores a 1,0. Pela comparação dos números de quebras cromatídicas induzidas por célula, observou-se diferença significativa entre os três grupos de pacientes ($p < 0,001$). Com a aplicação do teste de comparações múltiplas entre os três grupos, determinou-se que os grupos II e III apresentaram valores de quebras induzidas por célula significativamente superiores ao grupo I. Além disso, o grupo III apresentou também valores significativamente superiores ao grupo II.

Na Fig. 3, estão representadas metáfase normal, uma quebra cromatídica, um cromossomo em anel e cromossomos multifragmentados, observadas no presente estudo.

DISCUSSÃO

No monitoramento de populações expostas é muito importante a escolha do grupo controle, e variáveis como idade, sexo, estado sócio-econômico, hábitos alimentares, consumo de álcool e fumo, devem ser consideradas durante

a análise, pois já é conhecido o papel sinérgico destes fatores na produção de aberrações cromossômicas⁽²⁵⁾.

Nesse estudo os fatores, tais como, faixa etária, sexo, cor, tabagismo e etilismo, não tiveram influências significativas nos resultados de índices mitóticos e frequência de aberrações cromossômicas.

Observamos que os valores de índices mitóticos, das culturas de linfócitos espontâneas e induzidas, de pacientes com colite ulcerativa foram significativamente maiores que os verificados nos grupos de pacientes com câncer colorretal e pessoas normais. Esses índices não diferiram significativamente entre pacientes com câncer colorretal e pessoas normais. Nos três grupos de pacientes, constatou-se que as médias e medianas dos índices mitóticos das culturas espontâneas foram maiores que as dos índices mitóticos de culturas induzidas, indicando que a bleomicina interferiu na atividade mitogênica.

A fito-hemaglutinina, agente utilizado num estudo para a indução mitótica, mostrou capacidade de estimular 80% ou mais dos linfócitos para a síntese protéica⁽²⁾, desencadeando a primeira mitose após 48 a 72 horas⁽³⁵⁾. Diversos autores, ao analisar a resposta proliferativa de culturas de linfócitos à fito-hemaglutinina, mediante incorporação com timidina ou deoxiuridina marcada, demonstraram que a resposta foi equivalente entre os pacientes com colite ulcerativa e o grupo de

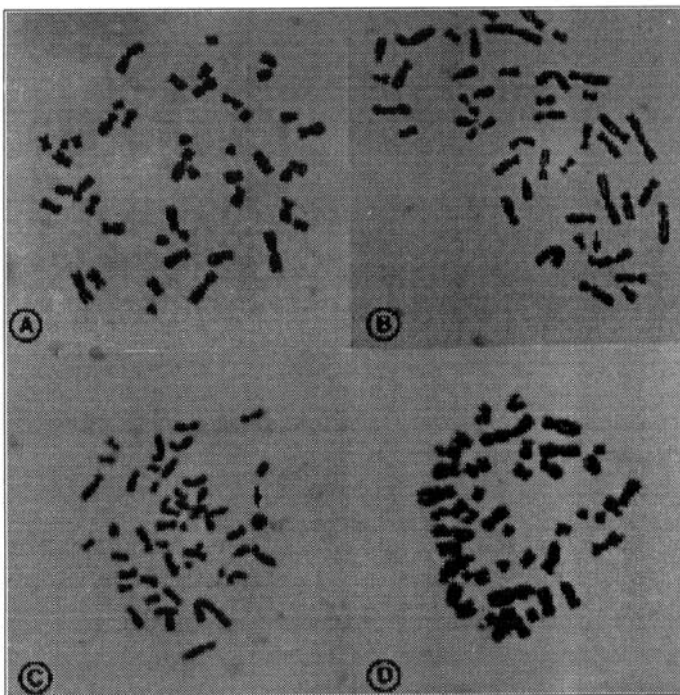


Fig. 3 - Fotomicrografias de células metafásicas em cultura de 72 horas de linfócitos periféricos (Giemsa, 1000 x) A - metáfase normal - 46, XX; B - metáfase com quebra cromatídica (seta) - 46, XY; C - metáfase com cromossomo em anel (seta) - 46, XX; D - metáfase com cromossomos multifragmentados - 46, XX.

peessoas normais^(1, 3, 26). Em contraste, Manzano e col.⁽²²⁾ observaram que os pacientes com colite ulcerativa tiveram depressão significativa da resposta à fito-hemaglutinina, em comparação ao grupo controle de pessoas sadias.

Quanto à frequência de quebras cromatídicas espontâneas, verificamos que os resultados do presente estudo foram equivalentes aos de Hsu et al.⁽¹⁷⁾, tanto para pessoas normais como para pacientes com câncer. Hsu et al.⁽¹⁷⁾ observaram em 182 pessoas normais, casualmente selecionadas, e em 232 pacientes com vários tipos de câncer, que a frequência variou de 0,00 a 0,12 quebra cromatídica espontânea por célula, atingindo média de 0,018 para pessoas normais e 0,02 para pacientes com câncer. No nosso estudo, a variação na frequência foi de 0,01 a 0,13 quebra cromatídica espontânea por célula, com mediana de 0,02 para pessoas normais e 0,03 para pacientes com câncer. Os valores médios foram idênticos, sendo de 0,03 tanto para pessoas normais quanto para pacientes com câncer.

Hsu⁽¹⁵⁾ verificou que os resultados usualmente baixos apresentados pelas pessoas normais eram muito discrepantes, quando comparados com determinadas síndromes hereditárias, caracterizadas pela alta frequência de aberrações cromossômicas espontâneas e pela maior predisposição para o câncer. Enquanto pessoas normais apresentaram frequências de 0,0 a 0,03 quebra cromatídica espontânea por célula, diversos pacientes com essas síndromes hereditárias, também denominadas síndromes de instabilidade cromossômica, apresentaram taxas de até 0,5 quebra cromatídica espontânea por célula. Essas síndromes, incluindo a síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia, anemia de Fanconi e síndrome de Werner, pela confirmada propensão ao desenvolvimento de neoplasias, suportaram o conceito de que a instabilidade genética, causada pelo aumento na frequência de aberrações cromossômicas espontâneas, está relacionada ao fenômeno do aumento da carcinogênese^(9, 14, 15). Por conseguinte, considerando as frequências baixas de quebras cromatídicas espontâneas observadas nos três grupos do presente estudo, pôde-se observar que nenhum dos pacientes poderia ser incluído dentro das síndromes de instabilidade cromossômica, com predisposição hereditária ao câncer.

Por outro lado, os resultados observados por Fireman et al.⁽⁸⁾ são conflitantes com os do presente estudo, assim como aqueles observados por Hsu et al.⁽¹⁷⁾. Fireman et al.⁽⁸⁾, mediante análise citogenética de linfócitos de pacientes com câncer colorretal e idade inferior a 40 anos, verificaram que a frequência de quebras cromatídicas espontâneas por células era significativamente maior nos pacientes com tumores localizados no cólon direito, quando cotejados com grupo controle de pessoas sadias. Nenhuma diferença foi observada entre os pacientes com câncer de cólon e o grupo controle. A análise baseou-se em apenas quatro pacientes com câncer do cólon direito, que apresentaram uma média e desvio padrão de $0,23 \pm 0,12$ quebra cromatídica espontânea por célula, quando comparadas com $0,09 \pm 0,04$ para pessoas

sadias. Para explicar este aumento, os autores sugeriram que a predisposição ao câncer de cólon direito de pacientes jovens seria provavelmente adquirida por fatores genéticos previamente determinados. No presente estudo, os quatro pacientes com câncer de cólon direito, com idade média de 46,8 anos e variação de idade de 40 a 71 anos, não diferiram dos demais pacientes, quanto ao valor médio de quebras cromatídicas espontâneas.

No nosso estudo, o grupo de pacientes com colite ulcerativa não diferiu dos grupos de pessoas normais e pacientes com câncer, quanto à frequência de quebras cromatídicas espontâneas por célula. Em contraste, Emerit et al.⁽⁷⁾ relataram aumento significativo de anormalidades cromossômicas espontâneas em 16 pacientes portadores de colite ulcerativa, quando comparadas com pacientes controles aparentemente sadios.

Os grupos de pacientes por nós selecionados com colite ulcerativa e com câncer colorretal apresentaram valores de quebras cromatídicas por célula significativamente maiores que os obtidos no grupo de pessoas normais, quando os linfócitos foram expostos à bleomicina. Todas as pessoas normais apresentaram frequências inferiores a 0,6 quebra cromatídica induzida por célula.

Hsu e col.⁽¹⁷⁾ observaram, em 335 pessoas sadias, respostas variáveis aos efeitos genotóxicos da bleomicina, desde frequências tão baixas quanto 0,08 até valores acima de 2,0 quebras induzidas por célula, com média e desvio padrão de $0,35 \pm 0,6$. Todavia, 77,3% apresentaram frequências baixas, com valores iguais ou menores que 0,8 quebra cromatídica induzida por célula, enquanto 22,7% tinham valores superiores a 0,8 e somente 11,65% acima de 1,0. Esses autores⁽¹⁷⁾ propuseram critérios de classificação, quanto ao grau de sensibilidade à bleomicina, estabelecendo arbitrariamente como pacientes hipersensíveis, quando os valores de quebras cromatídicas induzidas por célula foram superiores a 1,0; e sensíveis para frequências situadas entre 0,81 e 1,0, zona considerada limítrofe entre as classes resistentes e hipersensíveis à bleomicina. Portanto, no presente estudo, as pessoas normais foram incluídas dentro da classe resistente à bleomicina, como igualmente observado por Hsu et al.⁽¹⁷⁾ na maioria das pessoas sadias.

Assim, de acordo com os critérios propostos por Hsu et al.⁽¹⁷⁾, 83,3% dos pacientes com câncer colorretal seriam classificados como hipersensíveis, e os demais como sensíveis. Em outro estudo semelhante, envolvendo pacientes jovens com câncer colorretal, foi constatado que 88,8% apresentavam sensibilidade à bleomicina, dos quais 66,6% hipersensíveis, sendo significativamente diferentes dos 11,1% do grupo controle composto por pessoas sadias⁽⁸⁾. De outro lado, Schantz e Hsu⁽³⁰⁾ detectaram sensibilidade à bleomicina em 72% dos pacientes com carcinomas localizados no trato digestivo superior, sendo significativamente maior que os 28% das pessoas sadias sem câncer. Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos citogenéticos análogos, inclu-

indo também pacientes com carcinomas do trato digestivo superior^(31, 33). Hsu e col.⁽¹⁷⁾ sugeriram relação entre a sensibilidade à bleomicina e a carcinogenicidade decorrente da exposição aos fatores ambientais, ao demonstrar que a maioria dos pacientes com carcinomas localizados nos sistemas digestivo, respiratório ou tegumentar, caracterizados por ter contato direto com meio externo, mostrou-se sensível à bleomicina. Enquanto a maioria dos tumores de órgãos e tecidos não diretamente expostos ao meio externo, exemplificados pelos cânceres de mama e do sistema nervoso central, mostrou-se resistente à bleomicina. Assim, os resultados dos estudos anteriormente referidos^(8, 30, 31, 33), assim como, os do presente estudo, foram também coerentes com o papel dos carcinógenos ambientais na etiologia do câncer colorretal.

Todavia, no câncer do intestino grosso, alguns autores sustentaram a hipótese de que os tumores do cólon proximal e distal apresentam mecanismos genéticos distintos. Fireman et al.⁽⁸⁾ verificaram que os carcinomas do lado esquerdo tinham a média de quebras cromatídicas induzidas por células significativamente maior que a dos cânceres do cólon direito. A média de quebras cromatídicas espontâneas por célula, como já foi citado, foi significativamente maior nos tumores do lado esquerdo, em comparação com o grupo de pessoas saudáveis. Os autores sugeriram que os agentes mutagênicos ambientais tinham uma participação maior na indução dos carcinomas do cólon esquerdo. As células da mucosa colônica do lado esquerdo estavam expostas a um maior risco, em consequência ao meio intraluminal mais hostil presente nesse segmento do intestino grosso.

Em nosso estudo, os pacientes com colite ulcerativa apresentaram frequências entre 0,58 e 0,89 quebra cromatídica induzida por célula. Considerando os parâmetros preconizados por Hsu et al.⁽¹⁷⁾, apenas um paciente exibiu sensibilidade à bleomicina, mostrando frequência maior que 0,8. Todavia, as frequências de quebras cromatídicas induzidas por célula dos pacientes com colite ulcerativa foram significativamente superiores às das pessoas normais, e significativamente inferiores às verificadas nos pacientes com câncer. Assim, pôde-se observar caráter progressivo na proporção de quebras induzidas por célula, iniciando-se com valores baixos no grupo de pessoas normais, intermediários na colite ulcerativa, até valores mais elevados em pacientes com câncer colorretal.

Na elucidação dos mecanismos da carcinogênese, foram reforçados os argumentos que corroboram a teoria que indica que o câncer resulta da expressão ou função genética anormal, conseqüente ao acúmulo de múltiplos defeitos genéticos, representados por mutações, recombinações, translocações, anormalidades cromossômicas grosseiras ou ampliações, facilitadas pela perda da fidelidade dos processos de replicação, reparo e segregação do genoma^(13, 37). A aquisição seqüencial de alterações cromossômicas específicas, ao ultrapassar o limiar crítico, proporcionaria as condições de instabilidade genética, favorecendo a evolução para células

cancerosas^(13, 24). Os genomas celulares estão continuamente expostos a uma multiplicidade de fatores endógenos e ambientais com potencial de lesão direta do DNA, propiciando as condições de instabilidade cromossômica, considerada favorável para a transformação neoplásica^(15, 16). Com base em evidências epidemiológicas, sugeriu-se a existência de susceptibilidade diferencial aos efeitos mutagênicos dos carcinógenos ambientais, indicando que nem todas as pessoas, sob condições de exposição ambiental similares, apresentariam o mesmo risco para o desenvolvimento de câncer⁽¹⁵⁾. Alguns investigadores sugeriram defeitos, em uma ou mais etapas, no mecanismo de reparo do DNA, como fator predisponente para a degeneração neoplásica, assim como, o responsável pela suscetibilidade ou pela resistência aos fatores mutagênicos ambientais^(27, 32). Pero et al.⁽²⁹⁾, utilizando-se de análise bioquímica, verificaram reduzida capacidade de reparo do DNA em pacientes com suscetibilidade genética ao câncer colorretal.

A detecção de sensibilidade aos efeitos genotóxicos da bleomicina, nos pacientes com colite ulcerativa, pode também refletir uma deficiência no sistema de reparo do DNA, expressando possivelmente maior suscetibilidade à indução de câncer colorretal. Por conseguinte, o seguimento e a vigilância cuidadosa dos pacientes com colite ulcerativa e sensibilidade aumentada seriam fundamentais para a correlação entre fragilidade cromossômica e câncer colorretal. Como o risco de câncer colorretal tem aumentado de forma cumulativa de acordo com o tempo de duração da colite ulcerativa⁽¹⁰⁾, sugere-se que o risco de degeneração neoplásica pode estar relacionado com o tempo de exposição aos fatores carcinogênicos ambientais. Além disso, considerando que os pacientes do grupo II, com colite ulcerativa, apresentaram baixa frequência de quebras cromatídicas espontâneas, associada com frequências de quebras cromatídicas induzidas por célula significativamente superiores às obtidas no grupo de pessoas normais, concluiu-se que os agentes mutagênicos ambientais podem também desempenhar um importante papel na indução do carcinoma colorretal, em pacientes com colite ulcerativa. A maior frequência de quebras cromatídicas induzidas por célula no grupo de pacientes com câncer colorretal também reforça indiretamente esta hipótese.

CONCLUSÕES

A bleomicina induziu ao aumento significativo de alterações cromossômicas nos linfócitos de sangue periférico dos grupos de pacientes com colite ulcerativa e com câncer colorretal. A maior sensibilidade aos efeitos genotóxicos da bleomicina em pacientes com colite ulcerativa pode expressar maior predisposição ao câncer colorretal. Assim, como já foi relatado no carcinoma colorretal, os agentes mutagênicos ambientais possivelmente desempenham um importante papel na indução da degeneração neoplásica, em pacientes com colite ulcerativa.

**CARVALHO FA, WATANABE LM, GRISÓLIA CK & FER-
RARI I - Sensibility genotoxic effects of bleomycin: ulcerative
colitis versus colorectal cancer.**

SUMMARY: In the present study, 35 patients were selected, being 13 healthy patients (group I); 10 patients with ulcerative colitis (Group II); 12 patients with colorectal cancer (Group III). In order to evaluate the responses to the genotoxic effects of bleomycin in lymphocytes of peripheral blood cultures, two types of culture were established for each patient, the first without treatment with bleomycin (spontaneous culture) and the second treated with bleomycin (induced culture). The mitotic index and the evaluation of chromosomal aberrations were determined by microscopic analysis of lymphocytes in metaphase. The three groups of patients showed different mitotic indexes both in spontaneous and induced culture. The group II had a significantly higher mitotic index than groups I and III. When considering the number of spontaneous chromatid breaks per cell, no significant statistical difference was found among the three groups of patients. Based on the comparison of the number of induced chromatid breaks per cell, significant statistical difference was observed among the three groups. The group III showed significantly higher values than group II. The latter significantly higher than group I. The results suggest that bleomycin induced a significant increase in the frequency of structural chromosomal aberrations in lymphocytes of the patients with ulcerative colitis and colorectal cancer. The sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in patients with ulcerative colitis can express higher predisposition to colorectal cancer.

KEY WORDS: ulcerative colitis; colorectal cancer; chromosomal aberrations; bleomycin

REFERÊNCIAS

1. Aas J, Huizenga KA, Newcomer AD, Shorter RG. Inflammatory bowel disease: lymphocytic responses to inespecific stimulation in vitro. *Scand J Gastroenterol* 1972; 7(4): 299-303.
2. Ahern T, Kay JE. Protein synthesis and ribosome activation during the early stages of phytohemagglutinin lymphocyte stimulation. *Exp Cell Res* 1975; 92(2): 513-515.
3. Asquith P, Kraft SC, Rothberg AM. Lymphocyte responses to nonspecific mitogens in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1973; 65(1): 1-7.
4. Broström O, Löfberg R, Öst Å, Reichard H. Cancer surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis: a clinical, endoscopic, and histological study. *Gut* 1986; 27: 1408-1413.
5. Chatham Bars inn Workshop Conference. Karyological monitoring of normal cell populations. *Intern Ass Biol Stand* 1971.
6. Crohn BB, Rosenberg H. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (nonspecific). *Am J Med Sci* 1925; 170: 220-228.
7. Emerit I, Emerit J, Tosoni-Pittoni A, Bousquet O, Sarrazin A. Chromosome studies in patients with ulcerative colitis. *Humangenetik* 1972; 16: 313-322.
8. Fireman Z, Shabtai F, Lurie B. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis in lymphocytes from colorectal cancer patients under 40 years of age. *Dis Colon Rectum* 1994; 27(12): 1317-1320.
9. German J, Crippa LP. Chromosomal breakage in diploid cell lines from Bloom's syndrome and Fanconi's anemia. *Ann Genet* 1966; 9(4): 143-154.
10. Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, Pucillo A, Papatestas AE, KreeI I, Geller SA, Janowitz HD, Aufses Jr. AH. Cancer in universal and leftsided ulcerative colitis: factors deterring risk. *Gastroenterology* 1979; 77(2): 290-294.
11. Gyde SN, Prior P, Thompson H, Waterhouse JAH, Allan RN. Survival of patients with colorectal cancer complicating ulcerative colitis. *Gut* 1984; 25: 228-231.
12. Hartong WA, Arvanitakis C, Skibba RM, Klotz AP. Treatment of toxic megacolon: a comparative review of 29 patients. *Am J Digest Dis* 1977; 195-200.
13. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828.
14. Hittelman WM, Sen P. Heterogeneity in chromosome damage and repair rates

- after bleomycin in ataxia telangiectasia cells. *Can Res* 1988; 48: 276-279.
15. Hsu TC. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity. *In Vitro Cell Devel Biol* 1987; 23(9): 591-603.
16. Hsu TC, Cherry LM, Samaan NA. Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 17: 307-313.
17. Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM, Ramkissoon D, Schantz SP, Jessup JM, Winn RJ, Shirley L, Furlong C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to enviromental carcinogenesis. *Int J Cancer* 1989; 43: 403-409.
18. Jones HW, Grogono J, Hoare AM. Surveillance in ulcerative colitis: burdens and benefits. *Gut* 1988; 29: 325-331.
19. Konstantino B, Nedkova-Bratanowa N. Chromosomal aberrations in patients with ulcerohaemorrhagic colitis. *Digestion* 1969; 2(6): 329-337
20. Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, Ritchie JK, Williams CB. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 1990; 31: 800-806.
21. Linewear W. Staging colon cancer. *Contemp Surg* 1984; 25: 19.
22. Manzano L, Alvarez-Mon M, Vargas JA, Girón JA, Abreu L, Fernández-Corugedo, Román LI, Albarran F, Duránte A. Deficient interleukin 2 dependent proliferation pathway in T lymphocytes from active and inactive ulcerative colitis patients. *Gut* 1994; 35: 955-960.
23. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerfor DA. Chromosome preparations of leukocytes culture from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613-616.
24. Nowell PC. Molecular events in tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9): 575-576.
25. Obe G, Göbel D, Engeln H, Herha J, Natarajan AT. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics. *Mutation Res* 1980; 73(2): 377-386.
26. Parent K, Barret J, Wilson ID. Investigation of the pathogenic mechanism in regional enteritis with in vitro lymphocyte cultures. *Gastroenterology* 1971; 61(4): 431-439.
27. Parshad R, Sanford KK, Jones GM. Chromatid damage after G₂ phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. *Proc Nat Acad Sci* 1983; 80: 5612-5616.
28. Pathak S, Hopwood VL, Hughes JJ, Jackson GL. Identification of colon cancer-predisposed individuals: a cytogenetic analysis. *Am J Gastroenterol* 1991; 86(6): 679-684.
29. Pero RW, Miller DG, Lipkin M, Markowitz M, Gupta S, Winawer SJ, Enker W, Good R. Reduced capacity for DNA repair synthesis in patients with or genetically predisposed to colorectal cancer. *J Nat Cancer Inst* 1983; 70(5): 867-875.
30. Schantz SP, Hsu TC. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Head Neck* 1989; 11(4): 337-342.
31. Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, Moser RP. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA* 1989; 262(23): 3313-3315.
32. Setlow PB. Repair deficient human disorders and cancer. *Nature* 1978; 271: 713-717.
33. Spitz MR, Fueger JJ, Beddingfield NA, Annegers JF, Hsu TC, Newell GR, Schantz SP. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Res* 1989; 49(16): 4626-4628.
34. Sugita A, Sachar DB, Bodian C, Ribeiro MB, Aufses Jr. AH, Reenstein AJ. Colorectal cancer in ulcerative colitis. Influence of anatomical extended and age at onset on colitis-cancer interval. *Gut* 1991; 32: 167-169.
35. Tanaka Y, Epstein LB, Brecher G, Stohlman Jr. F. Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood. *Blood* 1963; 22(5): 614-629.
36. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048.
37. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Engl J Med* 1988; 319(9): 525-537.

Endereço para correspondência:
Fábila A. Carvalho
Casa de Saúde São Braz
SEPS 713/913 Sul Bloco G Sala 326
72390-135 - Brasília - DF
E-mail: fabia@brnet.com.br