

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Estudo citogenético em neoplasias e lesões proliferativas ósseas.

João Antonio Priolli e Silva

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

Botucatu-SP

-2012-

Instituto de Biotecnologia – Gabinete do Diretor
Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18618-000 Botucatu - São Paulo - Brasil
Tel Fax 14 3815 2838 Tel 14 3811 6160 diretor@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Estudo citogenético em neoplasias e lesões proliferativas ósseas.

João Antonio Priolli e Silva

Orientador : Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

Botucatu-SP

-2012-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Silva, João Antonio Priolli e.

Estudo citogenético em neoplasias e lesões proliferativas ósseas / João Antonio Priolli e Silva. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcelo Razera Baruffi

Capes: 20205007

1. Ossos – Doenças. 2. Ossos – Câncer. 3. Câncer.

Palavras-chave: Bandeamento GTG; Citogenética; Lesões ósseas; Lesões proliferativas; Neoplasia.

Responsável

Orientador

Professor Doutor Marcelo Razera Baruffi

Laboratório GECAN – Departamento de Genética

Instituto de Biociências

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Epígrafe

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

Confúcio

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, porque sem ele não estaria numa faculdade maravilhosa e nem me formando agora. Ele sempre me protegeu, me iluminou e me guiou pelo caminho certo da vida.

Gostaria de agradecer também a minha família, em especial duas pessoas, minha mãe Rose Maria Priolli e minha avó Rosa Brucoli, por serem minha fortaleza e meu porto seguro. Elas sempre torceram muito por mim e nunca deixaram eu desistir dos meus sonhos. Sem a família nós não somos nada.

Um agradecimento especial ao meu falecido pai Márcio Castro, por me abençoar com as duas melhores heranças que um pai pode deixar aos filhos, o estudo e a educação. Além dele gostaria de agradecer uma pessoa que se tornou uma figura paterna para mim, meu tio Luiz Ferraz. Após o falecimento do meu pai ele sempre me apoiou em todos os sentidos.

Um outro agradecimento vai para as pessoas da minha turma da faculdade, a BIOMED XLIV, em especial três pessoas, Etô, Pioio e Mico, por serem meus melhores amigos e me proporcionarem momentos maravilhosos nesses quatro anos. Eles estiveram do meu lado tanto nos momentos de responsabilidade, quanto nos de diversão.

Quero agradecer uma pessoa que me tornou um ser humano melhor, minha namorada Mico. Ela esteve ao meu lado sempre que eu precisei de alguém. Ela também sempre me deu forças para superar todos os obstáculos que encontrei na faculdade.

Quero agradecer muito a todos os moradores e ex-moradores da República RT e República PMD, por terem sido minha segunda família. Eu passei por momentos maravilhosos nessa minha segunda casa. Cada um que passou por lá teve um papel muito importante na minha vida.

E por último, quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram no laboratório para que essa monografia fosse escrita, em especial a Val, Rosana, Elisa e Bruna.

Índice

1 – Resumo	09
2 – Introdução	10
2.1 - Formação das neoplasias ósseas.....	11
2.2 - Funcionamento e constituição do tecido ósseo.....	14
2.3 - Neoplasias ósseas	15
2.4 – Lesões pseudotumorais	16
2.5 – Lesões pré neoplásicas	17
2.6 – Doença de Paget	18
2.7 – Osteomielites	19
2.8 – Osteossarcoma e Condrossarcoma	23
2.9 – Processo inflamatório e tecido ósseo	24

2.10 – Processo inflamatório e neoplasias ósseas	25
2.11 - Genética das neoplasias ósseas	27
2.12 – Citogenética nas neoplasias ósseas.....	31
3 – Objetivos.....	36
4 - Materiais e Métodos.....	37
5 – Resultados.....	41
6 – Discussão.....	59
7 - Cronograma de execução.....	60
8 – Considerações finais.....	61
9 – Referências Bibliográficas.....	61
10 – Anexo.....	68

1 - Resumo

A busca pela identificação de fatores que possam apontar o diagnóstico, a resposta terapêutica e sobrevida dos pacientes portadores de neoplasias ósseas tem sido incessante. Poderá ser de grande valia na escolha da proposta terapêutica presumir a agressividade tumoral, capacidade de invasão tecidual, propensão ao desenvolvimento de metástases e resposta ao tratamento. As neoplasias ósseas constituem um grupo heterogêneo de tumores, considerando-se os sítios anatômicos e a etiologia. Existe uma grande dificuldade para se estabelecer o prognóstico nestas patologias. Estudos citogenéticos possibilitam um melhor conhecimento antecipado dessas doenças. Embora fatores ambientais e dietéticos contribuam para a etiologia do câncer, as neoplasias se originam de um processo de múltiplos passos envolvendo alterações de genes e seleção clonal da progênie variante. Estas mutações ocorrem em classes de genes reguladores da proliferação celular como os oncogenes, genes supressores de tumor, fatores de crescimento, vias de sinalização e genes de reparo de DNA. Este projeto tem por objetivo detectar e descrever alterações cromossômicas consistentes e recorrentes através da utilização da citogenética clássica e o seu envolvimento no prognóstico em neoplasias ósseas, de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Os conhecimentos sobre a biologia molecular melhoram o entendimento sobre os múltiplos aspectos da carcinogênese. Entretanto, embora, as perspectivas permaneçam, não houve até agora benefícios significativos em termos de prevenção, diagnóstico, tratamento e seguimento dos pacientes com lesões ósseas. Este projeto visa estudos na tentativa de contribuir para um melhor entendimento e, por consequência, gerar dados para posteriores empregos em terapias mais eficazes para melhorar as taxas de sobrevida e beneficiar maior número de pacientes com neoplasias ósseas.

2- Introdução

O tumor sólido é uma massa anormal provinda da desorganização do crescimento celular que resulta em um “desbalanço” da homeostase tecidual, com invasão e destruição de tecido normal adjacente; cujo crescimento excede e não é coordenado em relação àquele dos tecidos normais e que persiste da mesma maneira excessiva após a parada do estímulo que provocou a alteração (Baruffi et al, 2001).

Neoplasia significa “crescimento novo”. A idéia de tumor remete ao intumescimento causado pela inflamação e como as neoplasias também causam intumescimentos, o termo tumor foi substituído pelo termo neoplasia; já a palavra câncer é designada para denominar neoplasias malignas.

A neoplasia foi considerada por muitos como predadora do seu hospedeiro que, de forma autônoma, cresce utilizando-o como meio de energia para se nutrir e multiplicar (Kumar And Mitchel, 2006).

Há muito tempo têm sido levantadas hipóteses sobre a existência de uma base genética para o desenvolvimento do câncer humano. No entanto, somente nas últimas três ou quatro décadas foram obtidas evidências diretas de que o câncer é uma doença genética, cuja origem está relacionada às mutações que podem ser herdadas ou ocorrerem nas linhagens de células somáticas. Seria o resultado de transformações genéticas múltiplas de efeito cumulativo nas células (Baruffi et al, 2001).

No ano de 2003 houve 402.190 novos casos de neoplasias diagnosticadas em todo o Brasil com 129.960 mortes, sendo a incidência de 357,1 casos novos a cada 100.000 homens e 403,5 casos novos no sexo feminino; constituindo-se a segunda maior causa de mortes com 12,7%. (INCA, 2006).

O câncer contribui de maneira significativa para o alto índice de mortalidade na população mundial, chegando a assumir características de problema de saúde pública.

2.1 – Fisiopatologia das neoplasias malignas

Para compreender o processo carcinogênico, e planejar formas mais eficazes de tratamento, é necessário o entendimento da biologia da célula e suas interações nos tecidos, principalmente em relação aos eventos genéticos envolvidos (Baruffi, et al, 2002b). Fatores ambientais e dietéticos contribuem para a etiologia do câncer, conduzindo a alterações em genes essenciais para o controle da proliferação celular (Fearon and Cho, 1996). Essas mutações ocorrem em classes de genes como os proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo a danos no DNA, fatores celulares de crescimento e vias de sinalização tirosina kinases (Baruffi, et al, 2002 b).

Considera-se que a proliferação de células normais seja regulada por proto-oncogenes que são promotores de crescimento, contrabalançadas pelos genes supressores de tumor, que restringem o crescimento. O objetivo de grande parte da pesquisa do câncer é identificar genes que são afetados na transformação de uma única célula normal em uma neoplasia totalmente maligna e entender como cada uma destas alterações contribui para o fenótipo neoplásico (Kumar and Mitchel, 2006).

Fisiologicamente, a proliferação celular apresenta as seguintes etapas: a) ligação de um fator de crescimento a seu receptor específico na membrana celular; b) ativação transitória e limitada do receptor do fator de crescimento, que por sua vez, ativa várias proteínas transdutoras de sinais na parte interna da membrana plasmática; c) transmissão do sinal do citosol para o núcleo através de mensageiros; d) indução e ativação de fatores reguladores nucleares que iniciam a transcrição do DNA; e) entrada e progressão da célula no ciclo celular resultando em sua divisão (Baruffi et al, 2002 b).

Os oncogenes derivam dos proto-oncogenes. Os mecanismos pelos quais os proto-oncogenes são transformados em oncogenes ocorrem através de duas grandes categorias de alterações: 1) Alterações na estrutura do gene,

ocorridas por rearranjos cromossômicos estruturais, resultando na síntese de um produto gênico anormal (oncoproteína), que exerce uma função aberrante; 2) Alterações na regulação da expressão gênica, ou na amplificação gênica pelos DMs (“Double minutes”) ou HSRs (regiões homogeneamente coradas), resultando em uma produção aumentada ou inapropriada da proteína que promove o crescimento celular normal (Kumar and Mitchel, 2006).

Rearranjos cromossômicos, alterando proto-oncogenes podem acarretar as fusões gênicas, como no caso da leucemia mielóide crônica (LMC), onde o cromossomo Philadelphia (Nowell and Hungerford, 1960) envolve rearranjo cromossômico específico, a translocação $t(9;22)(q34;q11)$ (Rowley, 1973; Konopka, et al., 1985).

Genes supressores de tumores, por uma definição operacional, são elementos genéticos com uma função de regulação negativa da proliferação celular, cuja perda ou inativação permite às células apresentarem um descontrole desta regulação negativa. Os seus produtos são componentes das vias de sinalização intercelular. Esses produtos permitem à célula receber e processar sinais inibidores que controlam o ciclo celular e a transcrição nuclear, por isso eles detêm a chave para a divisão celular. Quando as células perdem componentes críticos desta rede de sinalização, ela perde a capacidade de responder a certos sinais extracelulares inibidores da proliferação, mesmo que estes sinais ainda estejam presentes no meio celular (Franks and Teich, 1999; Baruffi, et al, 2002b).

Os produtos de vários genes envolvidos com neoplasias estão localizados no núcleo, assim como as moléculas que regulam a transdução de sinais e a desregulação de sinais promotores do crescimento. Receptores de superfície celular incluem-se na categoria de receptores de fatores de crescimento, como o TGF- β e proteínas que regulam a adesão celular, como as caderinas. Sua perda pode favorecer o fenótipo maligno ao permitir a fácil desagregação das células (Kumar and Mitchel, 2006).

O gene *TP53* é um exemplo dos supressores tumorais. Está relacionado com a perda de heterozigiosidade (LOH) e está localizado no cromossomo 17p (17p13) (Prenzel et al, 2001).

A homeostase de organismos multicelulares é criticamente dependente da correta interpretação dos abundantes sinais, aos quais as células são expostas durante sua vida (Baruffi et al 2002b). Vários fatores solúveis regulam a ativação de receptores celulares, os quais são acoplados com uma rede complexa de transdução de sinal (Prenzel et al, 2001).

O controle da diferenciação e do crescimento celular ocorre por sinais conhecidos como fatores de crescimento (FC). São polipeptídeos considerados como moléculas sinalizadoras que agem como mediadores positivos da divisão celular, exercendo vários efeitos biológicos (Sweeney et al, 2001). Estes fatores têm grande afinidade de interação pelos receptores transmembrana pertencentes à família dos receptores de tirosina quinase (receptor tyrosine Kinases-RTKs) (Longatti et al, 2001). Suspeita-se que a grande maioria dos FC desempenha algum papel na carcinogênese (Kumar and Mitchel, 2006).

É sabido que os genes que impedem ou que induzem a morte celular programada também constituem importantes variáveis na equação do câncer. O primeiro gene antiapoptótico identificado foi o gene BCL-2, um membro de uma família de proteínas de homodimerização e heterodimerização, algumas das quais inibem a apoptose, enquanto outras a favorecem (Kumar and Mitchel, 2006).

Mutações que alteram a sequência de nucleotídeos na cadeia de DNA, como transição ou transversão, acarretam um pareamento inadequado das bases nucleotídicas, promovendo distorções na configuração da dupla hélice de DNA. Erros no reparo do DNA danificado se não forem imediatamente reparados, podem levar a célula ao longo da via de transformação neoplásica. Há uma classe de genes que produzem proteínas relacionadas com a função reparadora destas mutações, são os chamados genes de reparo do DNA (Lodish et al, 2000).

Mutações que levam à perda de função nos genes de reparo do DNA possuem papel importante na carcinogênese (Nishio et al, 2006).

A análise citogenética pode detectar rearranjos cromossômicos indicando o envolvimento de mutações em regiões específicas dos cromossomos, demonstrando pontos críticos do genoma em classes de genes importantes na regulação do ciclo celular, como no caso dos genes *TP53*, *MDM2*, *hMSH2*, *CDK4*, entre outros (Nishio et al, 2006).

2.2 - Funcionamento e constituição do tecido ósseo

O aparelho locomotor é formado de tecido conjuntivo, onde o osso não mineralizado é denominado de tecido osteóide; constituído de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%), que correspondem a 99% de todo o cálcio, 85% do fósforo e 65% do sódio e magnésio do corpo humano (Kumar, et al, 2000).

Existe uma variação de 12 a 15 dias entre a formação da matriz óssea e a sua mineralização. O componente orgânico é formado de células ósseas e de proteínas da matriz óssea. As células formadoras dos ossos são as osteoprogenitoras, os osteoblastos e os osteócitos (Kumar et al, 2000). A geração e estimulação dessas células são reguladas por citosinas e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (Kumar et al, 2000). A formação de osteoblastos a partir das células osteoprogenitoras é vital para o crescimento, remodelação e reparo ósseo (Kumar et al, 2000).

Os osteoblastos localizam-se na superfície óssea e sintetizam, transportam e organizam as muitas proteínas da matriz óssea, como também iniciam o processo da mineralização óssea. Exibem receptores de membrana que se ligam a hormônios (paratormônios, vitamina D e estrógeno), citocinas, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular, sendo que após serem circundados pro matriz passam a se chamar osteócitos (Kumar et al, 2000).

Os osteócitos são as mais numerosas células formadoras de tecido ósseo, que se comunicam por uma rede de túneis onde passam produtos séricos, cálcio e fósforo (Kumar et al, 2000).

Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea e são derivadas das células progenitoras hematopoiéticas, que adicionalmente originam monócitos e macrófagos, e participam do processo de liberação de substâncias que iniciam a renovação óssea (Kumar et al, 2000).

As proteínas ósseas incluem colágeno do tipo 1 e proteínas que formam principalmente os osteoblastos. O colágeno tipo 1 forma o arcabouço da matriz e corresponde a 90% do componente orgânico do osso (Kumar et al, 2000).

2.3 – Neoplasias ósseas

As doenças do tecido esquelético ocorrem pelo rompimento no equilíbrio de seu metabolismo por meio da reabsorção e da neoformação óssea (Dorfman and Czerniak, 1998). Alguns processos privilegiam a atividade osteoblástica ao invés da osteoclástica, promovendo um adensamento da massa óssea, já outros privilegiam a atividade osteoclástica determinando a rarefação óssea. É possível a ocorrência de formas mistas com o aumento de reabsorção óssea e redução da massa óssea (Dorfman and Czerniak, 1998).

Esta classe de neoplasias tem sido associada a alguns tipos de lesões ósseas que rompem o equilíbrio metabólico do tecido osteocartilaginoso como: 1) Distúrbios genéticos da cartilagem pré-óssea (exostoses osteocartilaginosas e endondromatoses); 2) Lesões por radiação; 3) Doença de Paget; 4) Infartos ósseos; 5) Osteomielite crônica; 6) Erros genéticos específicos (Wyngaarden et al, 1993)

Patologias como a Doença de Pajet, osteomielites, infartos intraósseos e lesão osteofibrosa (pseudotumores) foram associadas clinicamente ao osteossarcoma e ao fibrossarcoma, entre outros. Embora seja alta a incidência dos processos inflamatórios e degenerativos ósseos, as neoplasias ósseas não

são tão freqüentes, representando 0,6% de todas as neoplasias e 1% das neoplasias fatais (Schajowics, 2000).

A incidência destas lesões é de 0,8/100.000 habitantes e não apresenta tendência em aumentar ou diminuir, sendo que o maior número de seus diagnósticos primários são representados pelos osteossarcomas (35,1%), seguidos por condrossarcomas (25,8%), sarcomas de Ewing (16,0%) e cordomas (8,4%) (Dorfman and Cserniak, 1998). Representam a terceira maior incidência entre os tumores pediátricos, na faixa etária entre os 10 e 24 anos (de Vita Jr et al, 1997). Possui uma incidência de 4 casos do sexo masculino para 3 casos do sexo feminino e 10 casos afetando a etnia branca para 8 de outras etnias (Schajowics, 2000).

As neoplasias ósseas possuem uma grande variedade de subtipos histológicos, revelando a grande heterogeneidade de diferenciação celular nestes tumores. Fato este que torna difícil o diagnóstico histológico diferencial, bem como o clínico-radiológico. Todas as dificuldades refletem-se na terapêutica e prognóstico destes tumores (Malawer et al, 1997).

O tratamento de traumas no aparelho locomotor tanto em crianças como em jovens adultos requerem um profundo conhecimento das injúrias, seu padrão, sua incidência, mortalidade e suas diferentes conseqüências para que se evitem posteriores seqüelas e se diminua o eminente risco de morbidade e mortalidade nos adultos previamente acometidos (Meier et al, 2005). O conhecimento do padrão do cariótipo destas lesões é importante para a constituição de indicadores de prognósticos mais precisos para estes grupos de lesões ósseas (Zhang et al, 1997; Dorfman and Czerniak, 1998).

2.4 – Lesões pseudotumorais

Pseudotumor ósseo é um processo não neoplásico de etiologia desconhecida, formada por um grupo de lesões ósseas de variadas naturezas, reativas, traumáticas, inflamatórias, metabólicas, congênitas ou de causa desconhecidas, que simulam verdadeiras neoplasias benignas ou malignas.

O pseudotumor inflamatório é caracterizado pela proliferação do tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório, este infiltrado é composto das células imunes B e T, estão sempre presente no processo inflamatório que se caracteriza principalmente pela presença de linfócitos, mas podem apresentar histiócitos, macrófagos e eosinófilos (McCall, et al, 2006). Estas lesões mostram-se remissivas com o tratamento de esteróides, mas são sugestivas da realização de biópsia e da total ressecção. Ocorrem em vários tecidos, como no pulmão, fígado, estômago, pâncreas, coração, rim, bexiga e pele.

O pseudotumor inflamatório é uma lesão pseudosarcomatosa reconhecida pela sua alta freqüência em vários locais anatômicos, inclusive ósseo com sinais osteolíticos (Sciot, et al, 1997). Acomete os ossos como uma lesão muito agressiva, obrigando a utilização de terapias radicais com o ato cirúrgico, podendo deixar seqüelas após o tratamento (Williamson, et al, 2003).

Algumas lesões ósseas pseudotumorais foram descritas como os casos do: cisto ósseo solitário (simples ou unicameral); cisto ósseo aneurismático (hemático multilocular); cisto ósseo justarticular (gânglio intra-ósseo); defeito fibroso metafisário (fibroma não ossificante, xantogranuloma histiocítico); granuloma eosinofílico (histiocitose, granulomatose da célula de Langerhans); displasia fibrosa e displasia osteofibrosa; miosite ossificante (ossificação heterotópica); tumor castanho do hiperparatireoidismo; cisto epidermóide intra-ósseo; granuloma reparador de células gigantes (Próspero, 2001).

2.5 – Lesões pré neoplásicas

Os distúrbios pré-neoplásicos são de grande importância em condições clínicas relacionadas com o distúrbio da regulação da replicação celular, associado com a transformação cancerosa. As proliferações celulares regenerativas, hiperplásicas e displásicas constituem um solo fértil para origem de uma neoplasia maligna. Certos distúrbios não neoplásicos (como a gastrite atrófica crônica) exibem uma associação com câncer tão bem definida que são denominadas de condições pré-cancerosas. Existem vários exemplos de

cânceres que surgem a partir de tumores benignos, como no caso do leiomiossarcoma que evolui a partir de um leiomioma. (Kumar and Mitchel, 2006).

2.6 – Doença de Paget

Doença de Paget óssea (DPO) ou “osteíte deformante” é uma desordem caracterizada pelo rápido remodelamento ósseo, resultando em uma neoformação óssea anormal. Alguns pacientes não apresentam sintomas até a fase agressiva da patologia, sendo que a mesma pode ser detectada fortuitamente através de exames obtidos por outras razões clínicas (Alain, et al, 2006).

E a segunda doença metabólica óssea mais comum após a osteoporose no EUA e a segunda mais comum patologia óssea na Europa. Afeta aproximadamente 5% as pessoas com idade superior a 40 anos (Nellissery, et al, 1998; Sandberg, et al, 2003). Mais de 50% dos pacientes com reumatismo desenvolvem a doença de Paget, sendo que esta patologia altera significativamente as condições de vida de seus portadores, causando um significativo custo na administração do tratamento desta doença.

Clusters familiares com a DPO são descritos apresentando herança autossômica dominante com alta penetrância, entretanto o gene ou família gênica envolvida continua indefinido (Sandberg, et al, 2003). Estudos sugerem o envolvimento da pré-disposição genética na etiologia da DPO, as evidências foram demonstradas através de estudos genéticos envolvendo análises de ligação com o locus polimórfico D18S42 na região 18q em famílias com multigerações portadoras. Estudos de perda de heterozigose (LOH) em pacientes demonstraram a presença de possíveis genes supressores tumorais na região deste locus, indicando que a região 18q21.1~q22 estaria ligada à doença de Paget familiar. (Nellissery, et al, 1998; McNain, et al, 2001; Sandberg, et al, 2003).

O desenvolvimento de sarcoma é a complicação mais séria da doença de Paget. No caso original descrito por Paget em 1877, o paciente desenvolveu um fibrossarcoma (tumor de partes moles) no rádio, vinte e dois anos após seu diagnóstico inicial de Paget, e vários dos seus pacientes morreram com sarcomas. Aproximadamente 40% dos pacientes com doença de Paget apresentam alguma complicação (Alain, et al, 2006).

O nível de desenvolvimento de malignidades decorrentes da DPO no mundo varia de 0,15% a 20%, no Brasil é de cerca de 5% a 20%, sendo duas vezes mais incidentes em homens. O tipo mais comum de sarcoma derivado DPO é o osteossarcoma, atingindo 63% dos casos, sendo denominados de sarcomas de Paget ou sarcomas Pagetóides (Sandberg, et al, 2003).

Na sua patogênese parece claro que existe uma estreita relação histopatogenética entre a DPO e o osteossarcoma a ela associado, fato baseado em três observações, ainda não incluindo a genética: 1- O osteossarcoma pagetóide, ocorre (28%) em uma idade em que o osteossarcoma comum é raro, na faixa etária acima dos 50 anos. 2- Todos os osteossarcomas decorrentes da DPO surgiram em ossos já afetados por Paget. 3- Tanto no osso pagético como no sarcomatoso, verificou-se o aumento da atividade de remodelação óssea, com a presença de osteoblastos atípicos (Schajowicz, et al, 2000).

2.7 – Osteomielite

Osteomielite (OM) é uma infecção causada por microorganismos que invadem e destroem progressivamente o osso no local da infecção. Em adultos OM ocorre usualmente após complicações decorrentes de fraturas e cirurgias. O grau de acometimento da OM é influenciado por fatores como o local de acometimento, a natureza, e a severidade da injúria óssea e a virulência do microorganismo isolado no osso (Wyngaarden, et al,1993; Asensi, et al, 2007).

A maioria dos casos de osteomielite é de origem bacteriana, mas ainda não foram descobertas todas as causas da osteomielite (Wyngaarden, et al,1993); algumas causas já foram descritas, tais como a disseminação hematogênica, implantação direta após trauma e extensão da infecção de partes moles adjacentes. Além dos sinais inflamatórios e infecciosos locais as OMs apresentam sinais sistêmicos, como febre, irritabilidade e letargia. Os achados clínicos característicos incluem dor óssea, eritema e drenagem de secreção, áreas com acúmulo de secreções, deformidades, instabilidade e sinais de alterações vasculares, incapacidade funcional, distúrbios neurológicos e incapacidade funcional das articulações adjacentes (Almeida, 2007).

Os seqüestros ósseos são considerados causa primária das exarcebações intermitentes da OM (Lyra, et al, 1998). OM em ossos se inicia nas alças capilares dilatadas da metáfise, onde o fluxo sanguíneo é lento o suficiente para permitir a multiplicação do microorganismo e formação do abscesso bacteriano (Yamaguchi, et al, 2007).

Como os microorganismos por si só são incapazes de destruir o tecido ósseo, tem sido postulado que a reação inflamatória, as alterações metabólicas e as alterações vasculares desencadeadas pela invasão bacteriana possuem papéis fundamentais no desenvolvimento do foco da osteomielite e pela destruição e a regeneração óssea. Do ponto vista morfológico, as alterações principais identificadas são: a) necrose óssea, com morte dos constituintes celulares e desaparecimento da massa óssea; ocasionalmente o osso desvitalizado persiste como um fragmento morto, denominado de seqüestro; b) uma reação inflamatória importante, onde inicialmente predominam os granulócitos, mas com o tempo vão sendo substituídos por um infiltrado mononuclear; c) deposição de osso novo, originário da ativação periosteal (Wyngaarden, et al,1993).

O diagnóstico diferencial de osteomielite crônica em atividade ou superposta a outras patologias é complicado, bem como o seu próprio conceito de cura, podendo ocorrer prolongados intervalos assintomáticos (Sapienza, et al, 2005). Fatos estes que levam a esta classe de lesões a possuir um certo

“mesticismo”, caracterizando-se como um desafio, tanto para o paciente como para o ortopedista e o cirurgião; demonstrando um tratamento não efetivo pela alta incidência de sua recorrência e potencial de complicação. A condição de se apresentar de várias formas pode confundi-la através da similaridade com outras patologias, incluindo as malignas. (Museru, et al, 2001).

O diagnóstico da osteomielite baseia-se no exame físico com achados clínicos, na história do paciente, nos exames por imagem e nos exames laboratoriais (leucocitose e elevação nos níveis de proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação, análises das culturas bacterianas) (Almeida, 2007).

A hemocultura é positiva somente em torno de 50% nos casos de OM, sendo que é de suma importância à detecção rápida do microorganismo infeccioso para que haja um tratamento eficaz, isto geralmente não ocorre ou ocorre tardiamente e através da biópsia não é possível identificar para a seleção de antibióticos mais apropriados. (Kobayashi, et al, 2006; Almeida, 2007). Os microorganismos mais frequentemente isolados na osteomielite bacteriana são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli* (Almeida, 2007).

A radiografia é muito empregada pela sua disponibilidade, pelo seu baixo custo e por fazer o diagnóstico diferencial com outras patologias. A especificidade da avaliação radiológica para osteomielite é reduzida na presença de alterações prévias do osso. Relata-se sensibilidade de 55% a 60% e especificidade de até 70% para osteomielite subaguda ou crônica (Sapienza, et al, 2005).

A cintilografia óssea auxilia na detecção da osteomielite demonstrando o aumento de remodelação óssea na área infectada. Entretanto este aumento de remodelação e a hipercaptação dos difosfonatos detectadas por esta técnica ocorrem em diversas patologias, sendo um achado pouco específico (Sapienza, et al, 2005). Em outros casos a cintilografia óssea é positiva apesar da ausência de comprometimento ósseo ou articular (Almeida, 2007).

O estudo ultra-sonográfico pode ser útil na avaliação de pacientes com suspeita de osteomielite podendo detectar coleções (abscessos, por exemplo) e alterações da superfície dos ossos (como a periostite) (Almeida, 2007).

A tomografia computadorizada, além do diagnóstico, pode identificar pequenas áreas de osteólise na região cortical, focos de gás e corpos estranhos pequenos. Entretanto, também pode ser difícil à diferenciação entre manifestações de osteomielite crônica ou alterações de seqüelas ósseas por este método. Descreve-se em até 20% de resultados falso-positivos pela tomografia quando correlacionada a achados cirúrgicos correlacionados a OM (Sapienza, et al, 2005).

A ressonância magnética pode ser bastante útil nos casos inconclusivos; em comparação com a cintilografia, apresenta igual ou maior sensibilidade e especificidade na identificação da osteomielite. Além disso, fornece melhores resoluções espaciais, delineando a extensão anatômica da infecção (Almeida, 2007).

Apesar da alta sensibilidade e especificidade, próximas a 88%, o elevado custo dificulta a aplicação rotineira da ressonância magnética e a presença de implantes metálicos causa artefatos que dificultam a interpretação da tomografia e da ressonância magnética (Sapienza, et al, 2005).

Os exames histopatológicos do osso são importantes na identificação da infecção óssea; entretanto, em muitos casos a precisão diagnóstica da biópsia é limitada e prejudicada pela coleta inadequada do material e presença da antibioticoterapia prévia (Almeida, 2007).

O tratamento da osteomielite é radical, com a remoção total da área necrosada, ossos infiltrados e de partes moles adjacentes, mesmo após a terapêutica com antibióticos, que apresenta dificuldades na sua elaboração, sendo que em grande parte das vezes não ocorre a cura permanente, ou geralmente apresentam uma ação ineficaz durante o tratamento (Museru, et al, 2001).

As terapias convencionais falham em mais de 30% dos casos, acarretando amputações e perdas de funções do aparelho locomotor (Ross, et al, 2006). A cada nove pacientes portadores de osteomielite, três apresentam problemas no seu diagnóstico diferencial, três dilema a respeito de seu tratamento e três apresentam outras complicações (Museru, et al, 2001).

Muitas vezes as concentrações ideais de antibióticos (fluoroquilones., macrolóides, clidamicina, cloranfenicol, rifampicina e tetraciclina) para estas patologias podem ser citotóxicas (Düewelhenke, et al, 2007). Grande atenção é dedicada à melhoria do tratamento médico e cirúrgico para estas infecções, mas há poucos progressos (Asensi, et al, 2007).

Há ligação da OM com outras patologias ósseas, como a no caso da osteopetrose, indicando que esta classe de lesão possui uma etiologia complexa. (Albuquerque, et al, 2006).

A OM crônica apesar de ser uma entidade distinta, apresenta um grande grau de similaridade com muitos tumores ósseos e de partes moles, e sua razão de malignização no trato sinuzóide é de 0,5%, com o intervalo de malignização variado de curto a longo, de 1 a 10 anos (Lavis, et al, 2002).

Os indícios clínicos para a malignização da OM são: aumento da massa óssea, o aumento da dor, hemorragia, descarga purulenta pelo longo do trato de escape do foco infeccioso. Radiograficamente ocorre à aceleração da natureza destrutiva da lesão e de massa de partes moles (Asensi, et al, 2007).

2.8 – Osteossarcoma e Condrossarcoma

Osteossarcoma é um tumor ósseo primário maligno, é derivado da forma óssea primitiva mesenquimal. Acomete a metáfise de ossos longos, fêmur distal e tíbia proximal; o seu mais comum sub-tipo é o osteossarcoma convencional intramedular (75% dos casos). É o câncer mais comum não hematológico, acomete crianças e adultos, representa 56% de todas malignidades nos EUA. Perfazem 2,4% de todos os cânceres, 1000 novos

casos por ano. O pico de maior incidência é na segunda década de vida, ocorrendo durante o crescimento do adolescente, sugerindo uma relação entre o crescimento ósseo rápido e o desenvolvimento da malignidade. O seu tratamento utiliza quimioterapia e radioterapia com intervenção cirúrgica. Podem existir várias causas relacionadas à etiologia desta classe de neoplasias, entre eles os fatores genéticos que podem ser potencializados em algumas condições por traumas causados pelas próteses metálicas ortopédicas, radiação ionizante, doença de Paget óssea, encondromatoses, exostoses e displasia fibrosa. aumentam o risco do aparecimento do osteossarcoma (Stock, et al, 2000; Sandberg, et al, 2003; Théoleyre, et al, 2005).

O condrossarcoma é um tumor ósseo primário cartilaginoso maligno, a forma convencional é conhecida pela sua agressividade local e a resistência a químico e radioterapia, utiliza-se à cirurgia como único tratamento, tendo alto potencial de aparecer de novo ou provir de formas pré-existentes benignas de tumores cartilaginosos (Lugassy, et al, 2004; Terek, et al, 2006).

2.9 – Processo inflamatório e tecido ósseo

O esqueleto e o sistema imune compartilham de uma variedade de citocinas e fatores de transcrição, em conseqüência um sistema influencia o outro. Isto ocorre não só na medula óssea, mas também onde estão localizados sítios de doenças inflamatórias ósseas. Estas descobertas levaram a formação de uma área de trabalho denominada osteoimunologia (Wagner, et al, 2005).

Foram identificados fatores ligados a passos importantes na formação e perda de tecido ósseo como a indução do receptor ativador de fator nuclear NF-kB ligado (RANKL) ativando as células T e levando subsequente á ativação do fator de transcrição FOS/activator protein-1 (AP1). NF-kB e NF por ativação das células Tc1 (NFATc1) ativam o centro de sinalização da principal rede relacionada a perda óssea, mediada pelos osteoclastos, que são responsáveis

pela reabsorção óssea. A atuação natural do sistema de Interferon antagoniza este processo, regulando a excessiva diferenciação dos osteoclastos. O balanço destes fatores é importante na homeostase óssea (Wagner, et al, 2005).

2.10 – Processo inflamatório e neoplasias ósseas

Os primeiros cientistas a descreverem uma neoplasia decorrente de um processo inflamatório, uma úlcera crônica, foram Marjolin 1833 e Hawkins 1828 (Mcgregory, et al, 1999). Existe uma ligação entre as células neoplásicas e processos inflamatórios, onde a inflamação é reconhecida como um importante componente da carcinogênese, apesar dos mecanismos envolvidos não serem totalmente caracterizados. Está sendo sustentada a hipótese de que o mecanismo integrado do controle da resposta inflamatória é um dos estágios do sistema de carcinogênese. Em ambos os processos, estão presentes eventos envolvendo o complexo metabolismo utilizando o oxigênio (Arias, et al, 2007).

Embora seja bom ter a resposta imune contra câncer, estudos indicam que a inflamação está associada com a progressão tumoral e pode ter um papel chave na metástase do câncer (Arias, et al, 2007).

O tempo do desenvolvimento do tumor maligno e de sua expressão fenotípica é compartilhado pela resposta inflamatória, considerando-se os seguintes fenótipos: isquemia (anóxia e hipóxia); eventos leucocíticos (glicose anaeróbica); e angiogênese (hiperatividades de enzimas glicolíticas). Há tumores malignos que reconhecidamente evoluíram de seus precursores benignos, sendo relacionados em três categorias: 1^a - Doenças com pré-disposição documentada a tumores ósseos malignos; 2^a - Tumores esporádicos benignos com reconhecido risco para secundários malignos; 3^a - Ponto de partida para tumores malignos através da pré-disposição genética, retinoblastoma, Li-Fraumeni, lesões esporádicas pré-malignas como doença de

Paget, tumor de células gigantes, osteoblastoma. osteomielite crônica e sarcomas pós-irradiação (Horvai, et al, 2006).

A incidência de carcinomas e sarcomas ocorrendo em área de drenagem das osteomielites crônicas é de 1,6%, com predileção pelas extremidades ósseas (Johnston, et al, 1973; Akbarnia, et al, 1976; Kenedy, et al, 1990; Mcgregory, et al, 1999; Petersen, et al, 2004; Yoshida, et al, 2004)

Há presença não rara de neoplasias ocorrendo como uma das complicações da osteomielite crônica como nos casos do osteossarcoma fibroblástico, osteossarcoma osteoclastico, mieloma, angiossarcoma, linfoma, rabiomiossarcoma, sarcoma de células reticulares, histiocitoma fibroso maligno, fibrossarcoma, síndrome mielodisplásica, carcinoma de células escamosas e sarcoma de tecido granulomatoso, podendo causar a morte em curto espaço de tempo (Johnston, et al, 1973; Akbarnia, et al, 1976; Kenedy, et al, 1990; Mcgregory, et al, 1999; Puri, et al, 2003; Petersen, et al, 2004; Yoshida, et al, 2004; Caramella, et al, 2006)

A íntima similaridade entre a osteomielite e algumas neoplasias ósseas proporcionam dúvidas na obtenção de um diagnóstico diferencial definitivo através de exames de imagem, sendo indicada nestes casos a biópsia por aspiração com agulha fina (Caraway, et al, 2003).

Não raro os testes laboratoriais (sedimentação de eritrócitos, proteína C reativa, cálcio sérico total, albumina sérica, fosfato sérico, fosfatase alcalina, desidrogenase láctica e eletroforese de proteínas do plasma e urina) e radiológicos diagnosticam a lesão suspeita como sendo benigna, mas a evolução clínica demonstra a agressividade da lesão indicando a realização de uma biópsia cirúrgica (Puri, et al, 2003; Caramella, et al, 2006)

Investigações da relação entre osteofibrodisplasia (patologia não neoplásica) e adamantinoma (neoplasia esquelética maligna), sugerem o íntimo envolvimento destas duas patologias, onde a osteofibrodisplasia seria a precursora do adamantinoma (Knuutila, et al, 1998; Maki, et al, 2004)

O leiomiossarcoma inflamatório é um sarcoma inflamatório de partes moles do aparelho locomotor que ocorre na musculatura lisa, de difícil diagnóstico diferencial, necessitando para sua caracterização clínica de algumas técnicas como a imunohistoquímica, microscopia eletrônica e citogenética (Efstathopoulos, et al, 2006).

Há necessidade de se estabelecer uma conexão entre os estágios evolutivos do câncer e seu significado biológico, pode ser de interesse para a integração dos mecanismos patofisiológicos e o controle das lesões associadas (Arias, et al, 2007).

2.11 – Genética das neoplasias ósseas

Durante as duas últimas décadas a análise citogenética vem demonstrando um direto e decisivo potencial no exame e entendimento de neoplasias ósseas e de partes moles, benignas e malignas. Com a difícil caracterização radiológica, clínica e histológica, as análises citogenéticas fazem diferença no diagnóstico final destas patologias. Essas análises demonstram alterações cromossômicas recorrentes e específicas (Yoshida et al, 2004), particularmente as translocações, envolvendo uma grande quantidade de genes fusionados, como exemplificados a seguir: (a) rabidomiossarcoma alveolar - t(2;13)(q35;q14) e *PAX3-FKHR*, t(1;13)(p36;q14) e *PAX7-FKHR*; (b) sarcoma de partes moles alveolares - t(X;17)(p11.2;q25) e *ASP-TFE3*; (c) sarcoma de células claras - t(12;22)(q13;q12) e *AFT1-EWS*; (d) fibrossarcoma congênito t(12;15)(p13;q25) e *ETV6-NTRK*; (e) fibroblastoma de células gigantes - t(17;22)(q22;q13) e *COL1A1-PDGFB*; (f) tumor de células redondas desmoplástico - t(11;22)(p13;q12) e *WT1-EWS*; (g) sarcoma de estroma endometrial - t(7;17)(p15;q21) e *JAZF1-JJAZ*; (h) sarcoma de Ewing - t(11;22)(q24;q12) e *EWS-ERG*, t(7;22)(p15;q21) e *EWS-ETV1*, t(17;22)(q12;q12) e *EWS-E1AF*, t(2;22)(q33;q12) e *FEV-EWS*; (i) tumor miofibroblástico maligno - t(2;19)(p23;p13.1) e *ALK-TPM4*, t(1;2)(q22-23;p23) e *TPM3-ALK*; (j) condrossarcoma mixóide extraesqueleto - t(9;22)(q22;q21) e *TEC-TCF12*; (k) lipossarcoma mixóide - t(12;16)(q13;p11) e *TLS(FUS)-CHOP*,

t(12;22)(q13;q12) e *EWS-CHOP*; (l) sarcoma sinovial - t(X;18)(p11;q11) e *SYT-SSX1*, *SYT-SSX2* (Sandberg et al, 2002)

Estas alterações não possuem potenciais somente para a classificação desta classe neoplásica, servem também para o diagnóstico diferencial onde há natureza histológica confusa, e como guia para estudos moleculares para o melhor entendimento e estabelecimento de genes envolvidos na gênese do câncer (Yoshida et al, 2004).

Esta chave biológica é crucial para a compreensão da relação dos processos neoplásicos benignos e sarcomatosos com os processos precursores de neoplasias. É crucial também para a classificação de neoplasias únicas e seus sub-grupos específicos (Bouvée et al, 2005; Terek et al, 2006), possibilitando assim o desenvolvimento de um melhor entendimento e tratamento das neoplasias mesenquimais (Yoshida et al, 2004)

Como um bom exemplo do emprego da tecnologia atual utilizada nas técnicas de estudos genéticos em lesões ósseas, podemos citar as análises citogenéticas dos subtipos de condrossarcoma incluindo o condrossarcoma mesenquimal, condrossarcoma dediferenciado, condrossarcoma de células claras, condrossarcoma periostaeal, condrossarcoma secundário e condromatose sinovial primária. A diferenciação entre as encondromatoses, osteocondromas e o condrossarcoma é um bom exemplo também. As células pluripotentes, através de múltiplos passos, evoluem de encondroma a condrossarcoma de baixo grau até o condrossarcoma de alto grau central. (Bouvée et al, 2005; Terek et al, 2006).

Na evolução do encondroma à condrossarcoma de baixo grau, ocorre uma evolução cariotípica apresentando as seguintes alterações genéticas: *near* ploidia, perda de 9p21, rearranjos envolvendo *HMGA2* mapeado na região 12q13-15, sinalização ativa de *PTHLH*, inativação de sinalização hedgehog, expressão *JUNB* e expressão *COX2*. A sua evolução para alto grau sofre a seguintes alterações: aneuploidias, formação de cariótipos complexos nas

células tumorais, aumento da sinalização *PTH1H*, alterações no gene *TP53* e perda do gene *P16*, aumento da glicólise e diminuição da fosforilação oxidativa, aumento das MMP 1,2,9,13, aumento das Catepsinas B e L e alteração no *PDGFR α* (Bouvée et al 2005; Terek et al, 2006).

Foi bem caracterizado citogeneticamente o condrossarcoma mixóide, que em mais de 75% dos casos apresentam o rearranjo envolvendo os cromossomos 9 e 22. Em decorrência desta translocação ocorre a fusão de dois genes *EWS* e *TEC*. (Bouvée et al, 2005; Terek et al, 2006).

A citogenética dos osteossarcomas apresenta cariótipos complexos com pronunciada heterogeneidade de célula a célula, similar ao condrossarcoma. A descoberta de cariótipos normais em osteossarcoma deve ser mencionada aonde as linhagens destas células provavelmente vieram, fato raro em neoplasias ósseas e de partes moles.

Um retrospecto na literatura revelou as seguintes regiões cromossômicas envolvidas em alterações não balanceadas: 1p11~13; 1q10~12; 1q21~22; 11p14~p15; 12p13; 14p11~p13; 15p11~p13; 17p12~13; 19q13 e 22q11~13.

Ganhos gênicos em: 1; 4q12-13; 4q28~31; 5p13-14; 6p; 7q31~32; 8q21; 8q21.3~q22; 8q23; 8q23~q24-12; 12p; 12q13~q15; 17p11-p13; 17p11~2; 19q12~q22; 20q. Perda nos cromossomos 5q; 6q11~q14; 8p23; 9; 10; 12p12-pter; 13; 13q14; 17. Alterações cariotípicas singulares encontradas em menor frequência (5%): add(11)(p15); add(14)(q32); t(2;13)(p13;q24); t(10;13)(q22;q21); inv(6)(p23q15); 13q14 e +17 (Stock et al, 2000; Sandberg et al, 2003).

Outras alterações bem estabelecidas em sarcoma de Ewing, além da normalmente encontrada, t(11;22)(q24;q12) e t(21;22)(q22;q12) (Durbin et al, 1998), são as alterações consistentes e importantes ocorrendo em 50% dos tumores. Essas outras alterações envolvem a região 22q12; em 52% delas ocorre a trissomia do cromossomo 8; e ocorre também o ganho em 1q e perda em 16q. Todas essas alterações indicam menor sobrevivência (são fatores preditivos do mal prognóstico) (Durbin et al, 1998).

Poucos relatos de neoplasias ósseas benignas são encontrados na literatura, como os três casos de osteoma ostóide, tendo o principal achado: del(22)(q13.1) (Baruffi et al, 2001), e em osteoblastoma a expressão moderada de *FOS* e *JUN* em osteoblastoma (Sandberg et al, 2003).

As neoplasias de partes moles também mostram algumas regiões envolvidas de forma recorrente como 1q11-12; 19p13; 1p36; 1p21; 1p11; p q (r ndal et al, 1994).

Algumas entidades foram estudadas, como nos casos do fibroma condromixóide; lesão destrutiva e erosiva de difícil diagnóstico, que apresenta a ins(19;6)(p13.1;q13q25) (Smith et al, 2006). O leiomiossarcoma, neoplasia mesenquimal maligna, perfaz 10% dos cânceres de partes moles, com o envolvimento preferencial dos cromossomos 1; 7; 10; 13; 14, sofrendo perdas em 1; 13; 14; 16;18; 22, nas regiões 1p36; 1q42~qter; 2p15~pter; 3p21~p23; 8p21~pter; 10q23~qter; 11q23~qter; 13q12~q13; 13q32~qter; 18q11, e ganho na região 1q12-q31 (Sandberg, 2005). Lesões fibrosas ósseas benignas e fibroma ossificante (Xq26; 2q33) e osteofibrodisplasia (8; 12; 21) também foram relatados (Partham et al, 2004).

Lipossarcoma é o mais freqüente sarcoma de partes moles, perfazendo 20% das malignidades mesenquimais. As alterações encontradas foram: (1) no lipossarcoma bem diferenciado a amplificação da região 12q13-15 – gene *MDM2*; (2) no mixóide, a t(12;16)(q13; p11), fusão gênica – *TLS/CHOP*; (3) no pleomórfico, a amplificação 12q14; envolvendo o gene *MDM2* e mutação nos éxons 7 e 8 com perda de heterozigidade em TP53 (Sandberg, 2004; Macarenco et al, 2007).

Os progressos das tecnologias da citogenética e genética molecular vêm proporcionando uma maior facilidade para a identificação de alguns eventos críticos associados ao desenvolvimento do câncer. Entretanto ainda é pouco o conhecimento das alterações genéticas em lesões ósseas.

2.12 – A importância da Citogenética em neoplasias óssea

Na espécie humana, tal como em outros eucariontes, o substrato da informação genética é um ácido nucléico, conhecido por todos como ácido desoxirribonucléico ou ADN e que se encontra compactado de uma forma altamente organizada nos cromossomos. Os cromossomos são os veículos (vetores) da informação genética, uma vez que contem virtualmente todo o ADN de uma célula, com exceção de uma pequena porção presente na mitocôndria. Constituem, também, a forma visível dessa informação genética, pois durante uma das fases do ciclo celular, quando a célula se encontra em mitose (especialmente na fase de metáfase) podem ser vistos ao microscópio óptico.

A Citogenética é uma ciência relativamente moderna, tendo o seu principal advento ocorrido pelo desenvolvimento de técnicas de coloração e bandeamento (Caspersson, 1971) que permitiram a visualização e a caracterização dos cromossomos. O reconhecimento da importância do papel dos cromossomos nas doenças genéticas humanas impulsionou vários investigadores a desenvolverem e otimizarem técnicas de visualização e de análise dos cromossomos.

Apenas quando as células estão em divisão, os cromossomos aparecem como corpos compactados. Durante a interfase, os cromossomos aparecem como estruturas ultrafinas de cromatina dispersas no núcleo. Apesar destas diferentes formas de compactação, cada cromossomo mantém a sua estrutura e individualidade em todas as sucessivas divisões celulares.

Durante a divisão celular, cada cromossomo (par de hoólogos) pode ser identificado pelo seu tamanho, forma e estrutura das bandas. Estas propriedades permanecem constantes de geração em geração.

Apesar do domínio da era genômica, a análise tradicional dos cromossomos, ou seja, o cariótipo permanece ainda como um dos principais instrumentos de diagnósticos na caracterização de doenças genéticas. Num cariótipo, os cromossomos são organizados de acordo com o tamanho e

propriedades físicas presentes durante a divisão celular, particularmente na fase de metáfase quando os cromossomos estão num estado de máxima compactação.

Com o advento das técnicas de bandas, os cromossomos foram organizados de acordo com características próprias e que lhes conferem individualidade, podendo ser distinguidos mesmo cromossomos de igual tamanho. Cada cromossomo comporta uma série de regiões, bandas escuras e claras e que são, nada mais nada menos, que o reflexo visível de unidades funcionais ao nível molecular.

2.12.1 – Técnicas de coloração diferencial na Citogenética

a) *Técnica de Bandas QFQ (Q- bands by fluorescence using quinacrine)*

Foi a primeira técnica de bandeamento a ser desenvolvida para cromossomos humanos. Requerem a coloração dos cromossomos com um corante fluorescente – mostarda de quinacrina – e observação num microscópio de fluorescência. Os cromossomos coram segundo um padrão específico em zonas mais e menos brilhantes, formando gradientes de fluorescência. O mecanismo envolvido nesse bandeamento diferencial não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que a fluorescência mais brilhante corresponde às zonas do ADN rico em adenosina-timidina (AT), enquanto que as zonas de DNA rico em guanina-citosina (GC) tendem a perder fluorescência.

Aplica-se principalmente no estudo de polimorfismos associados aos cromossomos 3,4, acrocêntricos (13, 14, 15, 21, 22) e cromossomo Y, estudos de paternidade usando os polimorfismos como marcadores e ainda para distinção de células do doador nos transplantes.

b) Técnica de Bandas G (GTG, GTL e GTW)

É a técnica de rotina mais extensivamente utilizada para análise de cariótipo. Os cromossomos são bandeados em zonas claras e escuras, verificando-se uma resolução superior em comparação com as técnicas de fluorocromos. O padrão obtido é induzido pela tripsina, enzima proteolítica, que desnatura as proteínas cromossômicas, sendo posteriormente coradas. As regiões ricas em A-T correspondem às bandas escuras (regiões heterocromáticas e de replicação tardia) enquanto as bandas claras ricas em G-C (regiões eucromáticas e de replicação precoce) são consideradas biologicamente mais importantes, pois correspondem a regiões mais ativas em genes. O padrão de bandas obtido é semelhante ao da técnica de bandas Q.

É o método, por excelência, de pesquisa de anomalias cromossômicas em diversas situações, nomeadamente no diagnóstico pré-natal, nos casos de suspeita de doença genética, de infertilidade ou de abortamentos de repetição e nas leucemias.

Atualmente, existem corantes alternativos ao Giemsa como os corantes Wright ou de Leishman.

c) Técnicas de Bandas R (Reverse banding) – RHG, RFA

O padrão de bandas obtido é, como o próprio nome indica, inverso ao das duas outras técnicas anteriores – Q e G. O princípio básico subjacente a esta técnica, consiste no tratamento das lâminas a temperaturas muito altas em várias soluções tampão.

O mecanismo de bandamento não está totalmente esclarecido, mas pensa-se que a elevada temperatura promove uma desnaturação seletiva das proteínas cromossômicas e das sequências ricas em adenosina-timidina, mas não das guaninas-citosina que permanecem em configuração original.

Foram desenvolvidas técnicas com e sem fluorocromos (ex. Laranja de acidina e Giemsa)

As regiões ricas em C-G coram escuro ou fluorescem, enquanto as regiões ricas em A-T, caracteristicamente heterocromáticas, coram a claro ou correspondem às zonas de menos fluorescência.

Aplica-se principalmente para visualização das regiões teloméricas que coram a claro pelas bandas Q e G.

d) Técnica de Bandas C (Constitutive heterochromatin Banding) – CBG

É uma técnica que produz uma coloração seletiva de heterocromatina constitutiva que se localiza preferencialmente nos centrômeros e em determinadas regiões de alguns cromossomos: braço longo do cromossomo Y e regiões justa-centroméricas dos cromossomos 1, 9 e 16. São produzidas por incubações sucessivas em HCl, hidróxido de bário e 2xSSC (solução salina), ocorrendo duas principais etapas: (1) desnaturação do ADN durante o tratamento ácido e alcalino; (2) fragmentação e perda de ADN durante o tratamento com 2xSSC. O mecanismo subjacente à técnica baseia-se no fato de ocorrer perda de ADN nas zonas que não coram pelas bandas C, sendo sugerido por vários autores que as regiões heterocromáticas serão mais resistentes à desnaturação por se encontrarem associadas com proteínas não histônicas.

Aplica-se principalmente no estudo de cromossomos marcadores, cromossomos dicêntricos ou pseudodicêntricos, polimorfismo cromossômico e ainda no estudo de translocações envolvendo regiões heterocromáticas/centroméricas.

e) Técnicas de NOR (Silver Staining for Nucleolar Organizer Regions)

As NOR designam as regiões organizadoras do nucléolo que mantêm o núcleo em interfase, consistindo em cópias múltiplas de sequências de ADN ou genes que formam a unidade 28s do ARN ribossomal.

As bandas NOR localizam-se nas constricções secundárias dos braços curtos dos acrocêntricos exceto no cromossomo Y. Nos núcleos interfásicos aparecem sobre a forma de um a ou mais “pintas” de vários tamanhos (cistrons ribossômicos). A coloração deste tipo de bandas é conseguido pela impregnação pela prata.

Esta técnica envolve a extração do ADN, ARN e histonas, sendo sugerido que as restantes proteínas residuais não estóicas seriam os componentes cromossômicos que iriam corar pela prata, no entanto, a verdadeira natureza das proteínas responsáveis pela impregnação ainda não é conhecida. Contudo, a constatação de que apenas as regiões ativas no NOR (ou que estiveram ativas na fase precedente de formação do nucléolo) coram pela prata fez sugerir que deverão ser proteínas associadas à atividades transcripcional dos ribossomos.

Aplica-se principalmente na identificação de pontos de rotura entre translocações recíprocas e robertsonianas entre acrocêntricos, identificação de pequenos cromossomos marcadores dicêntricos e no estudo das alterações da atividade NOR durante a meiose humana e em células malignas.

f) Técnicas de Bandas de Alta Resolução – MTX

O objetivo dessa técnica é conseguir cromossomos em estado precoces da mitose (prófase ou pró-metáfase) quando estes ainda não estão muito condensados, e , portanto, com um maior número de bandas e maior grau de resolução.

Consegue-se este tipo de banda reduzindo a concentração ou tempo de exposição de colcemid, sendo, no entanto, a acumulação de um maior número de células num estado precoce do ciclo mitótico seguida de libertação sincronizada, a técnica mais usada. Como sincronizadores do ciclo celular podem usar-se, entre outros, o metatrexato (MTX) e o BrdU (bromodioxouridina). Como agente libertador usa-se vulgarmente a timidina.

Com esta técnica aumenta-se a resolução das bandas (expressa pelo nº de bandas vivíveis nos 23 cromossomos) de 400/450 (técnica de rotina) para 550/850 (ou mesmo mais). Este número pode ser estimado contando-se as bandas de cromossomos referência que permitem a extrapolação para o número total de bandas.

Esta técnica permite a detecção de anomalias mais sutis e contribui para a definição mais precisa de pontos de rotura. Tem ainda a aplicação na investigação de casos clínicos contribuindo para a localização de genes, sendo também muito usada no estudo citogenético de doenças hematológicas malignas (ex. leucemia).

3 - Objetivos

Gerais:

Este projeto de pesquisa tem como objetivo a análise citogenética das lesões proliferativas ósseas, pré-neoplásicas e neoplásicas, que constituem um grupo heterogêneo de patologias, considerando seus sítios anatômicos, a sua história natural, a dificuldade diferencial entre os subtipos histológicos e o comportamento agressivo em algumas destas lesões.

Específicos:

- Detecção de alterações cromossômicas (aneuploidias e marcadores cromossômicos) clonais características consistentes e recorrentes, envolvidas em uma possível transformação de lesões pré-neoplásicas ou pseudotumorais em neoplasias ósseas verdadeiras, identificando alterações que possam ser eventos críticos na gênese e na evolução destas lesões.

- A descrição dos pontos de quebra cromossômicos e sua relação com genes envolvidos com o controle da regulação e proliferação celular que

podem estar atuando na etiologia destas patologias, apontando regiões genômicas críticas para investigação com análises moleculares.

- Associação dos dados obtidos com as análises clínico-radiológicas e histopatológicas, auxiliando futuramente no melhor entendimento, diagnóstico, e elaboração de terapias mais precoces e eficazes.

4 – Materiais e Métodos

Aspectos éticos

Esse projeto de pesquisa está inserido em um projeto central do laboratório GECAN, com o título “Estudo genético em lesões pseudotumorais e pré-neoplásicas e sua relação com sarcomas ósseos”, que foi aprovado pelo Conselho de Ética e Pesquisa através do seguinte número: Of. 144/08 – CEP.

Coleta das amostras

Amostras de lesões ósseas serão analisadas citogeneticamente após cultura *in vitro* de curta e média duração. O material será coletado pela equipe cirúrgica da ortopedia oncológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu, São Paulo, Brasil. Serão coletadas em média três amostras mensais, perfazendo uma média aproximada de 40 casos analisados no final do projeto. As amostras de tecido a fresco coletados sob condições estéreis serão processadas prontamente em fluxo laminar de forma estéril.

Dissociação do tecido

Para a dissociação das amostras são usadas pinças, tesouras cirúrgicas e placas de Petri estéreis. A manipulação do material é realizada dentro de fluxo laminar; visando-se obter a região mais proliferativa pertencente à amostra.

Sendo desprezados coágulos sanguíneos, áreas necrosadas e tecidos adiposos e cápsulas.

Desagregação do tecido

Para a desagregação do tecido são usados dois tipos de processos, mecânicos e enzimáticos, visando condições ideais para a obtenção de uma cultura com um bom crescimento celular.

Em condições rigorosamente estéreis dentro do fluxo laminar, são utilizadas seringas descartáveis, pinças, placas de Petri e solução de Puck diluída para lavagem de amostra e para a retirada do excesso de sangue.

As amostras são fragmentadas dentro de placas de Petri contendo meio de cultura HAM F-10 (Sigma) acrescido da enzima Colagenase tipo IV (Sigma) filtrada, em uma concentração de 0,4% por um período de 20 minutos; ficam em repouso durante 20 minutos em estufa a 37°C; em seguida são submetidas por 20 minutos à agitação magnética.

Os fragmentos são submetidos a três centrifugações de limpeza a 1000 rpm por 5 minutos para a retirada de substâncias químicas e outros resíduos.

Após serem processadas, as amostras são transferidas para frascos de cultura juntamente com meio de cultura HAM F-10 (Sigma), com soro bovino fetal (20%) e incubadas a 37°C em estufa.

Cultura de tecidos

As culturas permanecem em estufa a 37°C, por algum período de tempo sem serem manipuladas, objetivando uma melhor aderência das células à parede dos frascos. Após ser observado o crescimento celular, as culturas passam a ser alimentada com troca de meio em média a cada três dias (dependendo do crescimento celular), até o momento da coleta.

As culturas são periodicamente observadas em microscópio invertido para serem colhidas em momento adequado, evitando uma superpopulação celular

e um período mais longo, que poderia favorecer o aparecimento de alterações cromossômicas “in vitro”.

As trocas do meio de cultura são realizadas sempre no mesmo período do dia tentando promover um sincronismo fisiológico na divisão celular; também são observados os níveis do pH no meio das culturas, mantendo-os sempre em torno de 7,0; quando são detectados crescimento celulares intensos em focos isolados, procede-se a tripsnização (Tripsina–EDTA – Sigma) destes frascos antes da troca do meio.

Colheita de cultura

As culturas são observadas em microscópio invertido e quando apresentam as condições ideais para a colheita, realizam-se dois tipos de condutas baseados em protocolos implantados de acordo como tipo de tumor em cultura.

O protocolo utilizado é o da colheita das culturas somente com a “sincronização celular fisiológica” (as culturas são alimentadas nos mesmos horários); adiciona-se 0,1ml de colchicina ao frasco que apresenta bom crescimento exponencial, 3 horas antes do período em que são normalmente alimentadas as culturas, deixando-se atuar por 4 horas em média.

Após a ação da colchicina as culturas são colhidas através da metodologia convencional com algumas alterações. Utiliza-se solução de Tripsina-EDTA para promover o desprendimento das células do frasco; o meio previamente separado deste frasco é utilizado para neutralizar e formar uma suspensão com as células; esta suspensão celular obtida é transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante é descartado e em seguida são adicionados ao “pellet” 5 ml de solução hipotônica de KCl 0,075M, previamente aquecidos a 37°C e homogeneizados com pipeta Pasteur. O material é incubado a 37°C por 50 minutos e em seguida centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. As células são fixadas através de dois tratamentos com metanol/ácido acético (3:1), sendo que em cada

tratamento utiliza-se a quantidade de 5ml da solução de fixação; é feita a homogeneização e as células são colocadas por 8 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos.

Após a última centrifugação descarta-se a maior parte do sobrenadante, permanecendo no tubo de centrífuga a quantidade ideal para a ressuspensão e formação de uma solução com concentração ideal para a fixação em lâminas histológicas.

Preparação das lâminas e coloração

As lâminas histológicas usadas no processo são rigorosamente limpas e mantidas úmidas em Becker; o material fixado é devidamente ressuspendido com pipeta Pasteur e pingado a uma distância de aproximadamente 1 m das lâminas úmidas e levemente inclinadas; as lâminas são então colocadas para secar a temperatura ambiente.

A primeira lâmina de cada frasco de cultura colhido destina-se à confecção de lâmina teste, e é submetida à técnica de coloração convencional com solução Giemsa (Merck) diluída em tampão fosfato 0,06M (1:30) por um período de 5 minutos; depois é secada à temperatura ambiente. Se a lâmina teste apresentar material adequado, o restante das lâminas fixadas é submetido à técnica de bandeamento GTG descrita por Scheres (1972) com algumas modificações: as lâminas são submetidas à ação da solução de tripsina (0,01% diluída em tampão fosfato 0,06M) por um tempo de poucos segundos, que varia de acordo com o tempo desde o preparo das lâminas (quanto maior este tempo, maior o tempo de imersão das lâminas na solução de tripsina). A ação da tripsina é interrompida mergulhando-se as lâminas em água destilada. Após secas, as lâminas são coradas com Giemsa (Merck) diluído em tampão fosfato 0,06M (1:30) durante 5 minutos; em seguida, realiza-se uma rápida lavagem em água corrente e as lâminas são secas à temperatura ambiente estando prontas para as análises cromossômicas.

Análises cromossômicas

A identificação e classificação dos cromossomos são baseados nas recomendações do ISCN (1985, 1991, 1995).

Para determinação de clone citogenético, utiliza-se o critério definido pelo ISCN (1991): na determinação dos clones numéricos não são incluídas as metáfases consideradas como poliplóides, ou seja, $2n > 57$ e por analogia de critérios, também não são consideradas as metáfases com $2n < 35$.

5 – Resultados

As atividades científicas no laboratório dependem diretamente da coleta das amostras de tecido para as análises, que são providas através de cirurgias de exérese de tecidos patológicos de pacientes aceitos para tratamento no Departamento de Ortopedia e Cirurgia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu. Foram coletadas e analisadas 40 amostras de pacientes com tecidos ósseos com suspeita de terem neoplasias (Tabela 1).

Desde outubro de 2011 desenvolvemos um Projeto em colaborativo com o Hospital do Câncer Amaral Carvalho, da cidade de Jaú. O projeto foi aceito pelo comitê de ética daquela Instituição, onde coletamos amostras de lesões ósseas das cirurgias lá realizadas, promovendo assim um aumento do número das amostras das patologias ósseas para os nossos estudos (Casuística das patologias do Hospital na tabela 2).

Tabela 1. Amostras coletadas e submetidas a técnicas citogenéticas

1	Tumor de células gigantes	Negativa
2	Cisto ósseo aneurismático	Negativa
3	Mieloma múltiplo	Negativa

4	Osteomielite crônica inespecífica	Positiva
5	Osteomielite crônica inespecífica	Positiva
6	Tumor de células gigantes	Positiva
7	Osteomielite crônica inespecífica	Negativa
8	Fibrossarcoma	Positiva
9	Plasmocitoma	Negativa
10	Condrossarcoma	Positiva
11	Tumor desmóide	Positiva
12	Osteossarcoma	Positiva
13	Osteossarcoma	Positiva
14	Leiomiossarcoma	Positiva
15	Fibroma desmoplástico	Positiva
16	Schwanoma	Positiva
17	Condrossarcoma	Positiva
18	Plasmocitoma	Positiva
19	Hemangioma	Negativa
20	Osteoma osteóide	Positiva
21	Plasmocitoma	Negativa
22	Cisto ósseo simples	Negativa
23	Encondroma	Positiva
24	Carcinoma espino celular	Positiva
25	Condrossarcoma	Positiva
26	Tumor de células gigantes	Positiva
27	Metástase de CA próstata	Negativa
28	Condroblastoma	Positiva

29	Hemangioma	Negativa
30	Sarcoma de Ewing	Positiva
31	Cisto ósseo	Positiva
32	Osteoma osteóide	Negativa
33	A confirmar	Negativa
34	A confirmar	Positiva
35	Osteomielite crônica	Positiva
36	Osteomielite crônica	Positiva
37	Fibrossarcoma	Positiva
38	A diagnosticar	Negativa
39	A diagnosticar	Positiva
40	Osteossarcoma	Positiva

Tabela 2. Casuística de tumores do Hospital Amaral Carvalho do período de 2000 à 2010.

Morfologia (CID-0 2ª e 3ª)	Masculino	Feminino	Total
91803 Osteossarcoma, soe	37	26	63
91813 Osteossarcoma condroblastico	1	2	3
91823 Osteossarcoma fibroblastico	1	3	4
91833 Osteossarcoma telangiectasico	1	1	2
91843 Osteossarcoma em doenca de Paget do osso	1	0	1
91853 Osteossarcoma de celulas pequenas	2	0	2
91923 Osteossarcoma paraostal	0	1	1

92203 Condrossarcoma, soe	18	10	28
92313 Condrossarcoma mixoide	1	0	1
92403 Condrossarcoma mesenquimal	1	0	1
92423 Condrossarcoma de celulas claras	1	0	1
92433 Condrossarcoma dediferenciado	0	1	1
92501 Tu cels gigantes do osso, soe	14	18	32
92503 Tu maligno cels gigantes do osso	1	1	2
92511 Tu cels gigantes de partes moles, soe	0	1	1
92603 Sarcoma de Ewing	10	3	13
92703 Tumor odontogenico maligno	1	0	1
Total	90	67	157

As amostras dos casos da tabela 1, foram coletadas e semeadas em cultura, as culturas colhidas e as células armazenadas em freezer e estão sendo paulatinamente preparadas e submetidas as análises citogenéticas de acordo com o número ideal de casos que possam ser agrupados para que seus estudos possam ser submetidos a publicação (Tabela 1).

Realizamos os estudos das análises citogenéticas e o levantamento bibliográfico relacionado com os achados encontrados em 4 casos de Processos Proliferativos Reparativos de Lesões Pseudo-tumorais ou Pré-neoplásicas, estudo citogenético ainda não descrito em literatura.

Análise citogenética da osteomielite crônica

Caso 1 -Tu 433

- M1- 45,X,-Y, del(12)(p13.1) – Figura 1
- M2- 46,XY
- M3- 46,XY,+X,-16
- M4- 46,XY,-20,+mar1
- M5- 46,XY,del(15)(q24) – Figura 2
- M6- 46,X,-Y,+X,del(3)(p25),del(15)(q24)
- M7- 45,XY,-7
- M8- 44,XY,-10,del(15)(q24),-22
- M9- 46,XY, del(15)(q24)
- M10- 47,XY,del(14)(p11),+mar2
- M11- 46,XY,del(12)(p13.1)
- M12- 46,XY,del(12)(p13.1)
- M13- 46,XY,del(15)(q24)
- M14- 46,XY
- M15- 45,XY,-16,-21,+mar3
- M16- 41,XY,-5,-8,-9,-9,del(12)(p13.1),-22
- M17- 46,XY,-1,-5,del(12)(p13.1),+mar4
- M18- 43,Y,-X,-3,-12,-16,+mar5
- M19- 46,XY,del(17)(q23)
- M20- 46,XY,del(15)(q24)
- M21- 43,XY,-3,-8,-12,-13,-14,+mar6,+mar7
- M22- 48,XY,-2,+15,+mar8,+mar9
- M23- 45,XY,-20,-21,+mar10
- M24- 45,XY,-2
- M25- 45,XY,-12

Alterações cromossômicas não clonais:

-Y[2],-X[1],+X[2],-1[1],-2[2],-3[2],del(3)(p15)[1],-5[1],-7[1],-8[2],-9[2],-10[1],
-13[1],-14[1],+15[1],del14(p11)[1],-16[1],-17[1],del(17)(q23)[1],-20[2],-21[2],
-22[2],+mar1[1],+mar2[1],mar3[1],+mar4[1],+mar5[1],+mar6[1],+mar7[1],
+mar8[1],+mar9[1],+mar10[1]

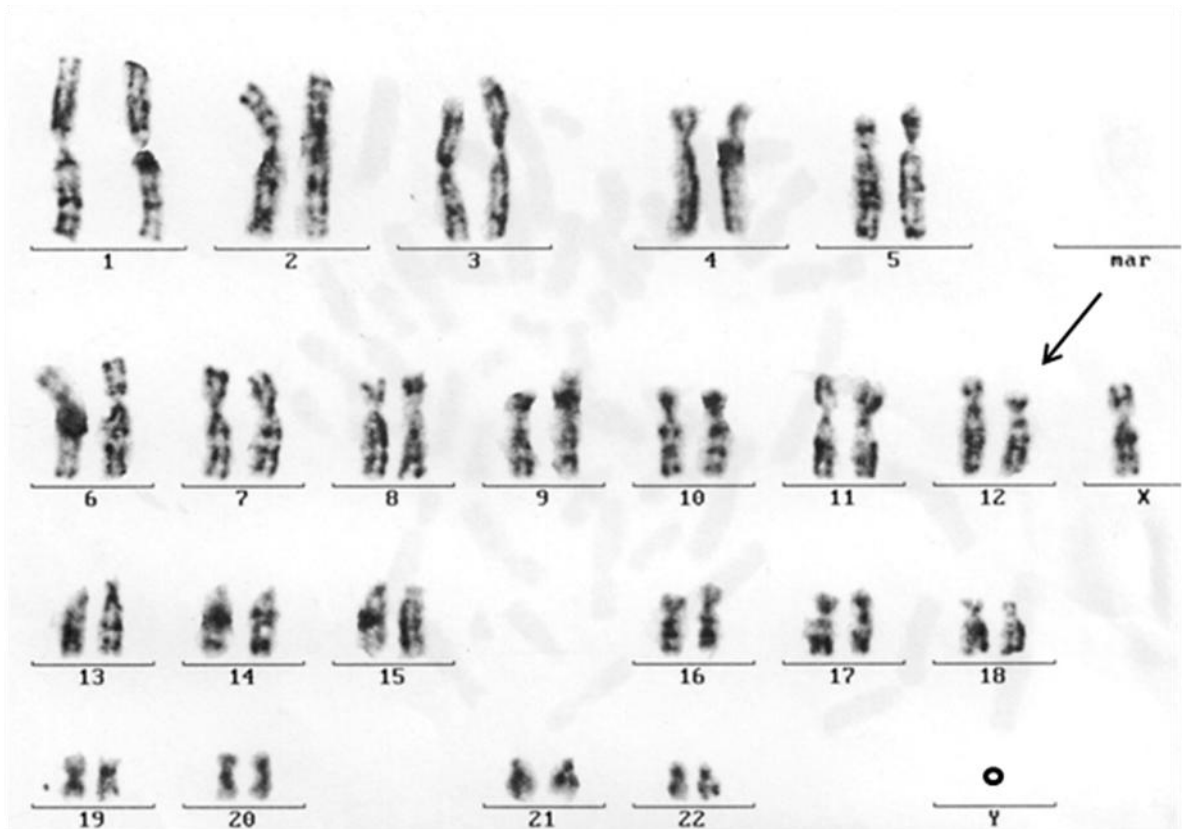
Alterações cromossômicas clonais:

-12[3],-16[3],del(12)(p13.1)[5],del(15)(q24)[6],

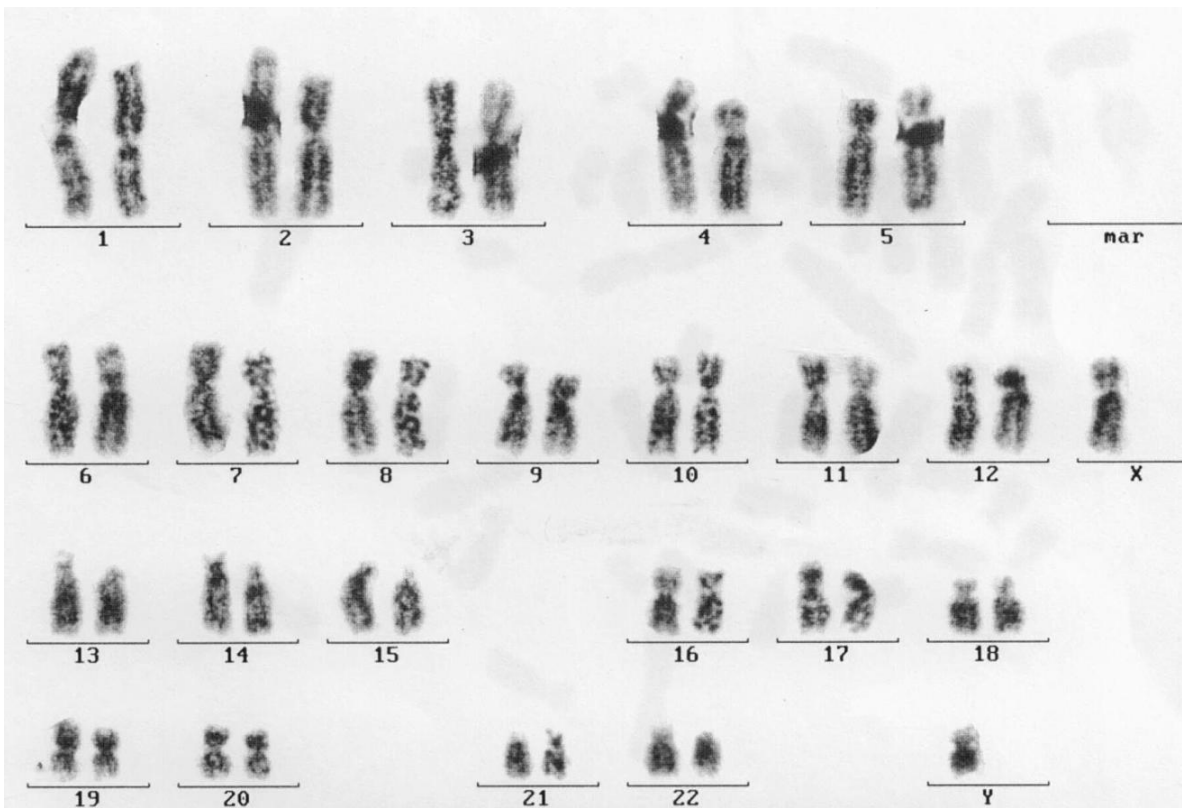
Cariótipo composto:

41~46,XY,-12[3],-16[3],del(15)(q24)[6],del(12)(p13.1)[5] cp[16]/46,XY[2]

Caso 1 – Figura 1[45,X,-Y, del(12)(p13.1)]



Caso 1 – Figura 2[46,XY, del(15)(q24)]



Análise citogenética da osteoartrite

Caso 2 -Tu 464

M1- 42,X,-X,-3,-6,-11,- 5,add(6)(?::p .2→pter),+mar

M2- 44,XX,-6,-12,del(17)(p11.1),-22,+mar2

M3- 39,XX,-4,-5,-6,-9,-11,- , add(6)(?::p .2→pter),del() (p .),-22 –
Figura 1

M4- 46,XX, 38,X,-X,-3,-5,-9,-13,-14,- 5, add(6)(?::p .2→pter),-18

M5- 46,XX, inv(X)(q12q21),-9,del(11)(p13),+21

M6- 47,XX, +mar3

M7- 46,XX,

M8- 45,XX,inv(X)(q12q21),-6

M9- 42,X,-X,-1,-11,-19

M10- 44,XX,inv(X)(q12q21),-13,-16
 M11- 46,XX
 M12- 46,XX
 M13- 46,XX
 M14- 46,XX
 M15- 43,X,-X,-10,-14
 M16- 46,XX
 M17- 44,XX,-1,-4, add(6)(?::p .2→pter)
 M18- 45,XX,-20
 M19- 46,XX, add(6)(?::p .2→pter)
 M20- 44,XX,-16,-16
 M21- 46,XX, add(6)(?::p .2→pter),add(22)(p .2)
 M22- 46,XX, add(6)(?::p .2→pter),add(22)(p .2)
 M23- 4 ,XX,+ , add(6)(?::p .2→pter), add(22)(p .2)
 M24- 46,XX
 M25- 46,XX,-15,+mar
 M26- 46,XX,
 M27- 44,XX,- , add(6)(?::p .2→pter),add(22)(p11.2),del(17)(p11.1),-21

Alterações cromossômicas não clonais:

-3[2],-4[1],-5[2],+9[1],-10[1],-12[1],-16[2],-18[1],-19[1],-20[1],-21[1],+21[1]
 -22[2],+mar1[1],+mar2[1],+mar3[1]

Alterações cromossômicas clonais:

-X[3],inv(X)(q12q21)[3]-1[3],-6[4],-9[3],-11[3],-13[3],-14[3],-15[3],
 add(6)(?::p .2→pter)[8],del() (p .) [2],add(22)(p .2)[4]

Cariótipo composto:

39~46,XX,-X[3],inv(X)(q12q21)[3]-1[3],-6[4],-9[3],-11[3],-13[3],-14[3],-15[3],
 add(6)(?::p .2→pter)[8],del() (p .) [2],add(22)(p .2)[4]
 cp[16]/46,XX[8]

Caso 2 – Figura 1 [39,XX, -4,-5,-6,-9,-11,-13,del(17)(p11.1),-22]



Análise citogenética da osteomielite crônica

Caso 3 -Tu 35

M1- 43,XX,-3,-15,del(17)(p13),-18,-19,+mar1

M2- 42,X,-X,-8,-11,-20,-21,+mar1

M3- end 46,XX

M4- 46,X,-X,-2,-21,+mar1,+mar2,+mar3

M5- 44,X,-X,add(12)(q24.3),-20 – Figura 1

M6- 44,X,-X,-11,add(12)(q24.3)

M7- 44,X,-X,-3

M8- 41,X,-X,tas(5;7)(p15.3;q36),-10,-14,-15,-16,+mar4

M9- 45,X,-X,t(17;18)(q25;p11)

M10- 44,XX,-1,-2,-2,-4,-4,-22,+mar1,+mar5

M11- 45,XX,-1,-17,+mar6
M12- 44,X,-X,-11,-12,del(17)(p13)-22,+mar2,+mar7,+mar8 – Figura 2
M13- 42,X,-X,-4,-10,-19,-21,+mar3
M14- 43,XX,-1,del(17)(p13),-10,-20,+mar1
M15- 42,X,-X,-22,-22,+mar2
M16- 38,-X-X,-1,-2,-10,-11,-12,-19,t(19;7)(p13;q36)
M17- 46,XX
M18- 47,XX,-1,-1,+15,+16,-20,+mar2,+mar9
M19- 44,XX,-1,-2,-8,-22,+mar10,+mar11
M20- 46,X,-X,+mar3
M21- 47,X,-X,+mar2,+mar12

Alterações cromossômicas não clonais:

-3[2],-4[2],tas(5;7)(p15.3;p11)[1],-8[2],-12[2],-14[1],-15[2],+15[1],-16[2],
-17[1],t(17;18)(q25;p11)[1],-
[1],t(19;7)(p13;q36)[1],end46,XX,+mar4[1],+mar5[1],
+mar6[1],+mar7[1],+,mar8[1],+mar9[1],+mar10[1],+mar11[1],+mar12[1]

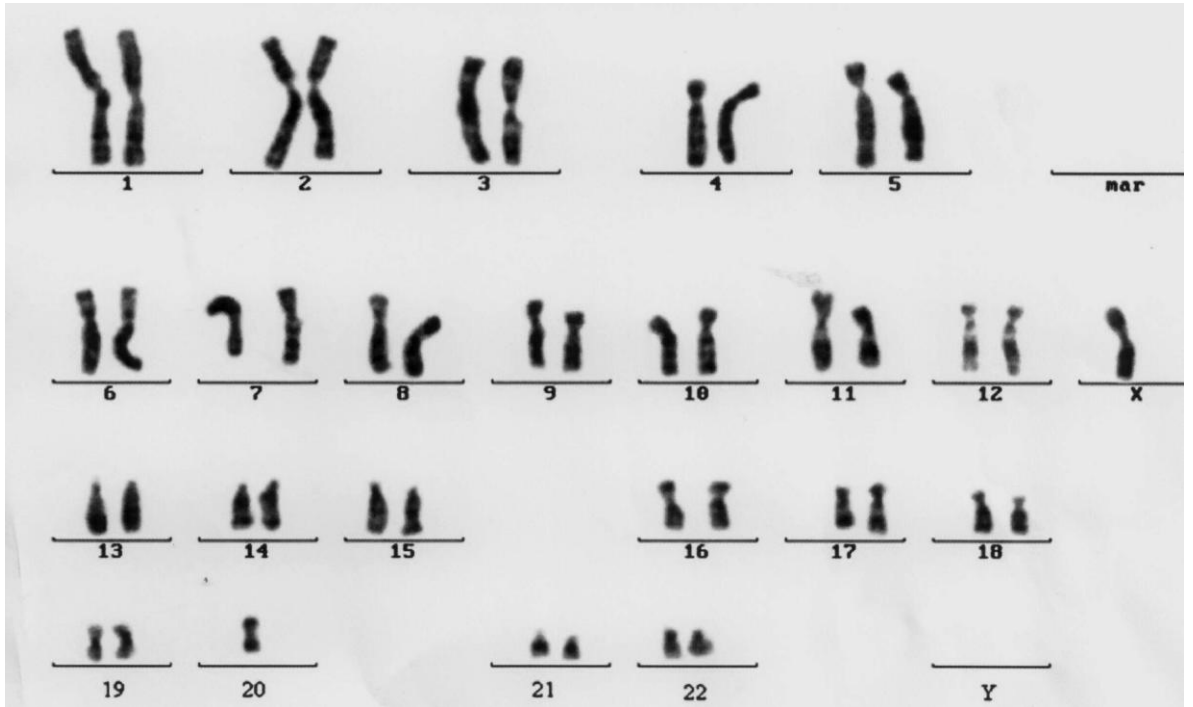
Alterações cromossômicas clonais:

-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],-19[3],-20[4],-
21[3],-22[4],+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3]

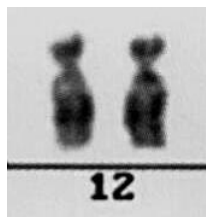
Cariótipo composto:

38~47,XX,-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],
-19[3],-20[4],-21[3],-22[4],+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3] cp[19]/46,XX[1]

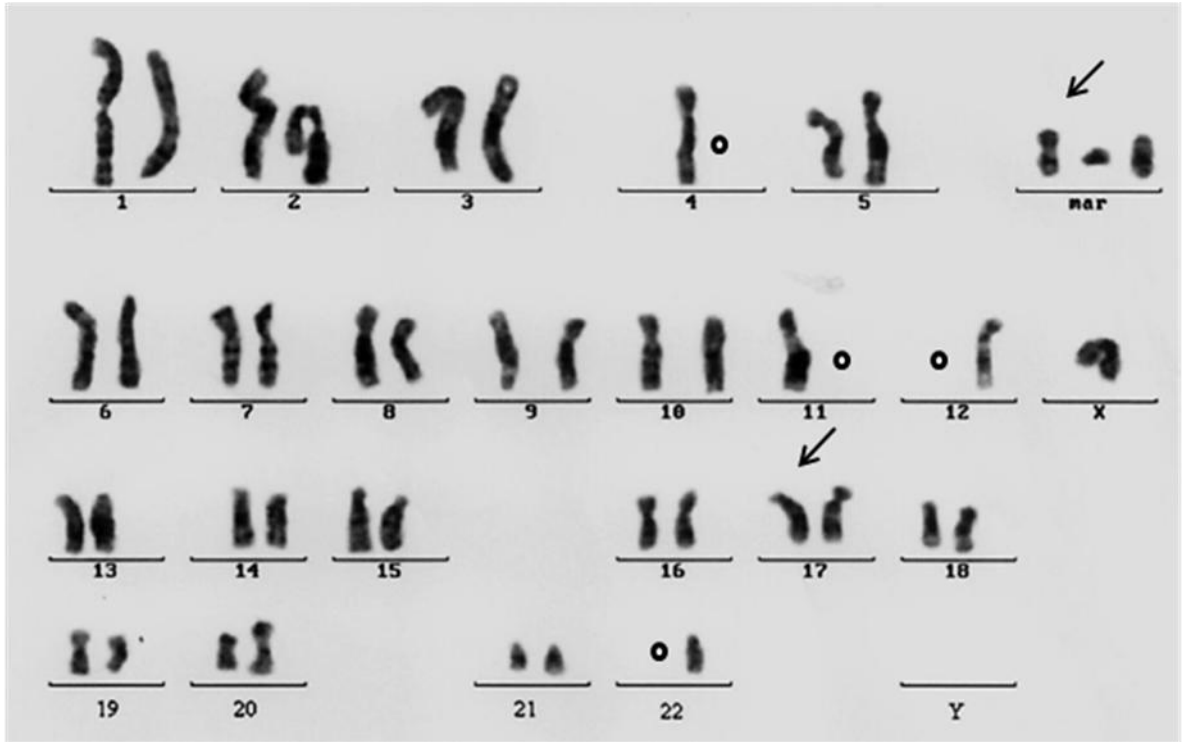
Caso 3 – Figura 1 [44,X,-X,add(12)(q24.3),-20]



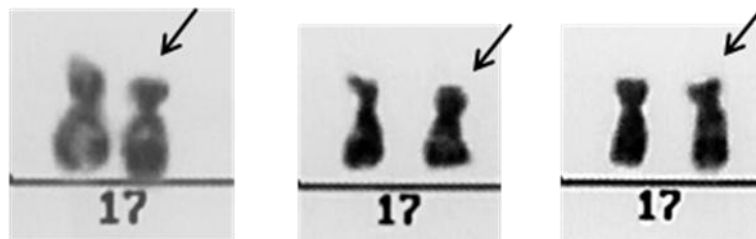
Add(12)(q24.3) – cariótipos parciais



Caso 3 – Figura 2 [44,X,-X,-4,-11,-12,del(17)(p13),-22,+mar2,+mar7,+mar8]



del(17)(p13) – cariótipos parciais



Análise citogenética da osteomielite crônica

Caso 4 -Tu 36

M1- 37,-X-Y,-3,-4,-15,del(16)(q22),-17,-17,-20,-22
 M2- 43,XY,del(12)(q24),-13,-16,-18
 M3- 37,XY,-2,-7,-8,-8,-11,-13,-17,-19,-22
 M4- 49,XY,+X,-15,+19,+21,+21
 M5- 44,XY,-6,-9,-19,+mar1
 M6- 47,XY,+21
 M7- 42,XY,-2,-4,-12,-18,-20,+mar2 – Figura 1
 M8- 43,XY,-12,-18,-20
 M9- 46,X,-Y,+mar3
 M10- 44,XY,-11,-12,add(21)(p13)
 M11- 46,XY,+11,tas(15;21)(p13;p13),add(21)(p13),del(22)(q12)
 M12- 46,Y,-X,+mar2,+mar4
 M13- 45,XY,-17,-18,+mar5
 M14- 44,XY,-10,-21
 M15- 49,XY,+14,+mar6,+mar7
 M16- 45,XY,+4,del(6)(q27),-14,-15,+17,-19
 M17- 40,XY,-2,-4,-15,-16,-20

Alterações cromossômicas não clonais:

+X[1],-X[2],-Y[2],-3[1],+4[1],-6[1],del(6)(q27)[1],-7[1],-8[1],-9[1],-10[1],-11[2],
 +11[1],del(12)(q24)[1],-13[2],+14[1],tas(15;21)(p13;p13)[1],-16[2],
 del(16)(q22)[1],+17[1],+19[1],-21[1],-22[2],del(22)(q12),+mar1[1],+mar3[1],
 +mar4[1], +mar5[1],+mar6[1],+mar7[1]

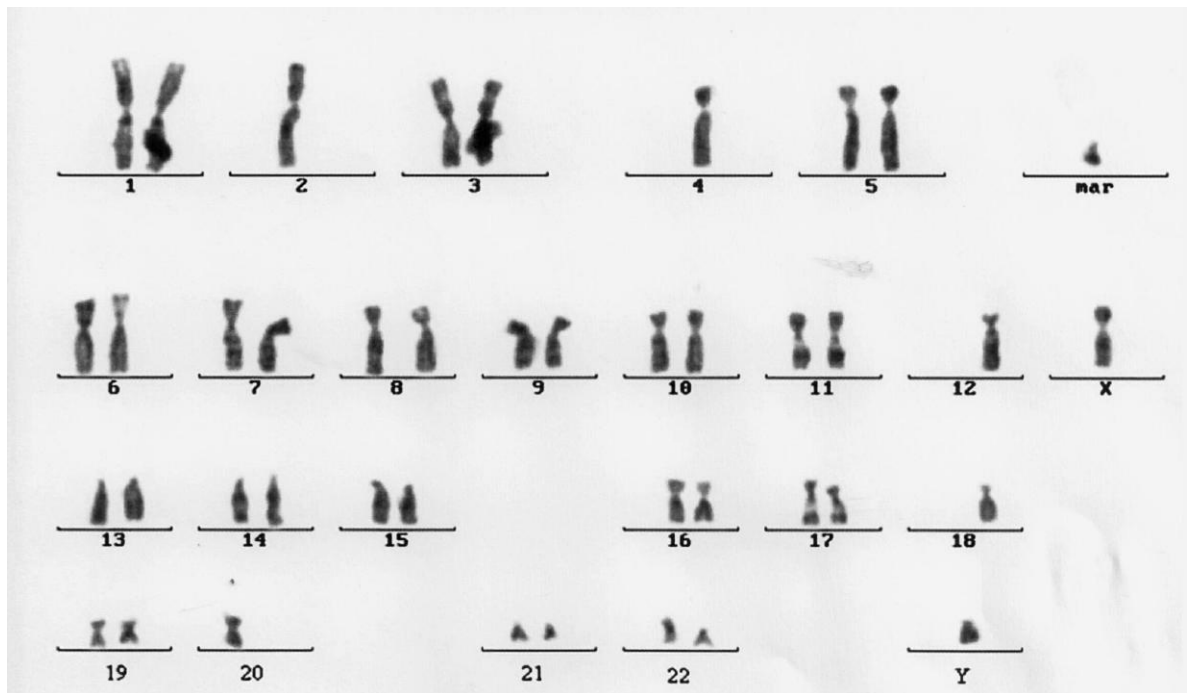
Alterações cromossômicas clonais:

-2[3],-4[3],-12[3],-15[4],-17[3],-18[4],-19[3],-20[4],+21[2],add(21)(p13)[2],
 +mar2[2],

Cariótipo composto:

37~47,XY,-2[3],-4[3],-12[3],-15[4],-17[3],-18[4],-19[3],-20[4],+21[2],+mar2[2],
add(21)(p13)[2] cp[14]/46,XY[0]

Caso 4 – Figura 1 [42,XY,-2,-4,-12,-18,-20,+mar2]



+mar2 cariótipos parciais



Análise citogenética da osteomielite crônica

CASO 1 (TU433)

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (54,1% das células analisadas)

N de cromossomos: 39 41 42 43 44 45 **46** 47 48 49 50 51 total

Número de células: 1 1 3 11 10 7 **50** 6 6 1 1 3 100

Níveis de ploidia: Hipo 33% Di 50,0% Hiper 17%

M1- 46	M24- 50	M47- 47	M70- 45
M2- 46	M25- 46	M48- 44	M71- 48
M3- 47	M26- 46	M49- 44	M72- 47
M4- 46	M27- 51	M50- 44	M73- 47
M5- 43	M28- 46	M51- 43	M74- 44
M6- 46	M29- 46	M52- 46	M75- 44
M7- 46	M30- 46	M53- 47	M76- 48
M8- 43	M31- 46	M54- 44	M77- 48
M9- 43	M32- 46	M55- 46	M78- 46
M10- 46	M33- 43	M56- 46	M79- 48
M11- 46	M34- 43	M57- 42	M80-46
M12- 45	M35- 43	M58- 46	M81- 48
M13- 45	M36- 46	M59- 46	M82- 46
M14- 46	M37- 46	M60- 46	M83- 46
M15- 47	M38- 43	M61- 46	M84- 48
M16- 42	M39- 46	M62- 46	M85- 39
M17- 51	M40- 46	M63- 46	M86- 49
M18- 46	M41- 44	M64- 46	M87- 44
M19- 43	M42- 46	M65- 45	M88- 41
M20- 46	M43- 46	M66- 45	M89- 46
M21- 46	M44- 43	M67- 46	M90- 45
M22- 43	M45- 46	M68- 46	M91- 44
M23- 46	M46- 46	M69- 46	M92- 46

M93- 46	M95- 45	M97- 46	M99- 42
M94- 46	M96- 46	M98- 44	M100-51

Análise citogenética da osteoartrite

CASO 2 (TU464)

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (54,1% das células analisadas)

N de cromossomos: 39 40 41 42 43 44 45 **46** 47 48 50 51 total

Número de células: **5** 2 5 2 8 8 **7 46** 2 3 1 1 90

Níveis de ploidia: Hipo 41,1% Di 51,1% Hiper 7,8%

M1- 39	M20- 46	M39- 44	M58- 43
M2- 41	M21- 42	M40- 46	M59- 46
M3- 44	M22- 43	M41- 46	M60- 46
M4- 43	M23- 46	M42- 46	M61- 46
M5- 46	M24- 39	M43- 50	M62- 46
M6- 40	M25- 39	M44- 41	M63- 46
M7- 44	M26- 46	M45- 46	M64- 43
M8- 46	M27- 51	M46- 46	M65- 46
M9- 39	M28- 45	M47- 46	M66- 48
M10- 47	M29- 40	M48- 46	M67- 45
M11- 46	M30- 43	M49- 46	M68- 48
M12- 46	M31- 46	M50- 46	M69- 46
M13- 39	M32- 46	M51- 45	M70- 45
M14- 43	M33- 46	M52- 45	M71- 46
M15- 46	M34- 46	M53- 45	M72- 41
M16- 46	M35- 46	M54- 46	M73- 47
M17- 46	M36- 46	M55- 44	M74- 46
M18- 46	M37- 46	M56- 43	M75- 46
M19- 46	M38- 44	M57- 46	M76- 46

M77- 48	M81- 46	M85- 46	M89- 46
M78- 44	M82- 42	M86- 44	M90- 44
M79- 46	M83- 43	M87- 46	
M80- 45	M84- 41	M88- 41	

Análise citogenética da osteomielite crônica

CASO 3 (TU35)

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (25,33% das células analisadas)

Número de cromossomos: 37 38 39 40 41 42 43 44 45 **46** 47 48 49
total

Número de células: 2 5 4 5 1 8 6 8 6 **19** 4 5 2 75

Níveis de ploidia: Hipo 60,0% Di 25,33% Hiper 14,7%

M1- 46	M16- 42	M31- 42	M46- 44
M2- 46	M17- 43	M32- 39	M47- 39
M3- 46	M18- 43	M33- 42	M48- 38
M4- 47	M19- 42	M34- 42	M49- 40
M5- 43	M20- 45	M35- 49	M50- 38
M6- 43	M21- 47	M36- 44	M51- 44
M7- 45	M22- 46	M37- 43	M52- 46
M8- 44	M23- 46	M38- 42	M53- 47
M9- 37	M24- 48	M39- 46	M54- 48
M10- 40	M25- 38	M40- 40	M55- 45
M11- 40	M26- 46	M41- 46	M56- 49
M12- 42	M27- 45	M42- 44	M57- 44
M13- 46	M28- 48	M43- 46	M58- 44
M14- 46	M29- 45	M44- 43	M59- 40
M15- 46	M30- 41	M45- 39	M60- 46

M61- 38	M65- 37	M69- 47	M73- 46
M62- 46	M66- 45	M70- 46	M74- 44
M63- 38	M67- 39	M71- 48	M75-46
M64- 42	M68- 48	M72- 46	

Análise citogenética da osteomielite crônica

CASO 4 (TU36)

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (32,0% das células analisadas)

Nº cromossomos: 38 39 40 41 42 43 44 45 **46** 47 48 49 50 total

Nº células: 1 1 4 4 6 7 1 5 **17** 2 2 2 1 **53**

Níveis de ploidia: Hipo 45% Di 32% Hiper 23%

M1- 43	M18- 43	M35- 46	M52- 46
M2- 41	M19- 49	M36- 40	M53- 48
M3- 41	M20- 49	M37- 50	
M4- 43	M21- 46	M38- 48	
M5- 43	M22- 40	M39- 45	
M6- 46	M23- 42	M40- 46	
M7- 46	M24- 45	M41- 46	
M8- 46	M25- 46	M42- 45	
M9- 46	M26- 46	M43- 42	
M10- 47	M27- 40	M44- 41	
M11- 46	M28- 45	M45- 44	
M12- 40	M29- 39	M46- 38	
M13- 46	M30- 42	M47- 41	
M14- 46	M31- 43	M48- 46	
M15- 46	M32- 42	M49- 45	
M16- 47	M33- 42	M50- 46	
M17- 43	M34- 42	M51- 43	

6 – Discussão

Nesse trabalho está descrito quatro casos de pacientes com lesões reparativas e proliferativas ósseas. Detectamos uma série de alterações citogenéticas através do bandeamento GTG e a identificação e a classificação dos cromossomos foi baseada de acordo com as recomendações do ISCN (2005).

Discutimos nesse trabalho também a possibilidade dessas lesões consideradas pré-neoplásicas após sofrerem uma série de mutações se tornarem neoplasias malignas.

Detectamos uma alteração cromossômica estrutural, consistente e não ao acaso (ocorrida em dois dos quatro casos analisados), (também detectada a monossomia 17 em um terceiro caso), alterações estas envolvendo o braço curto do cromossomo 17, onde está mapeado o gene supressor tumoral TP53.

Sabe-se que é relatado a correlação entre os processos proliferativos reparativos teciduais e as neoplasias, e a pouco tempo esta correlação vem sendo descrita em tecidos ósseos.

Há tumores malignos que reconhecidamente evoluíram de seus precursores benignos, sendo relacionados em três categorias: 1ª - Doenças com pré-disposição documentada a tumores ósseos malignos; 2ª - Tumores esporádicos benignos com reconhecido risco para secundários malignos; 3ª - Ponto de partida para tumores malignos através da pré-disposição genética, retinoblastoma, Li-Fraumeni, lesões esporádicas pré-malignas como doença de Paget, tumor de células gigantes, osteoblastoma. osteomielite crônica e sarcomas pós-irradiação.

Há presença não rara de neoplasias ocorrendo como uma das complicações da osteomielite crônica como nos casos do osteossarcoma fibroblástico, osteossarcoma osteoclastico, mieloma, angiossarcoma, linfoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de células reticulares, histiocitoma fibroso

maligno, fibrossarcoma, síndrome mielodisplásica, carcinoma de células escamosas e sarcoma de tecido granulomatoso, podendo causar a morte em curto espaço de tempo.

O câncer é uma doença genética, relacionada a um alto índice de morbidade e mortalidade, causada pelo acúmulo de mutações no DNA que ocorre por um processo de diversas etapas. Estas alterações que caracterizam as células neoplásicas podem ser investigadas em nível genético.

O estudo genético em neoplasias ósseas visando à caracterização e identificação de marcadores de prognóstico por meio de análises citogenéticas podem ser utilizados como parâmetro para diagnóstico, prognóstico e auxílio da escolha de uma terapia mais adequada nos casos de neoplasias ósseas.

Apesar das neoplasias ósseas estarem sendo estudadas geneticamente na literatura, ainda são pouco conhecidas as alterações genéticas em lesões ósseas, para determinação do prognóstico e por consequência a aplicação de um tratamento eficaz.

7 – Cronograma de execução

Previsão inicial de duração do projeto: maio de 2011 a julho de 2012.

Maio de 2011 a fevereiro de 2012: Coleta do material no Hospital das Clínicas de Botucatu, preparação das amostras a serem analisadas, cultivo das células tumorais, coleta das células tumorais, preparação de lâminas para análise no microscópio, captura da imagem em sistema de microscopia, bandeamento cromossômico, análise de cariótipos.

Fevereiro de 2012 a julho de 2012: Caracterização das alterações cromossômicas detectadas, comparação dos achados com a literatura e confecção de um relatório final e de um artigo.

8 – Considerações Finais

Apesar do progresso alcançado no tratamento de pacientes com neoplasias ósseas, o prognóstico permanece incerto e o tratamento penoso.

A aplicação da mesma terapêutica, para a maioria dos pacientes, fundamentada somente no diagnóstico clínico, radiológico e histológico parece não ser mais suficiente para elevar o número de pacientes que apresentarão sobrevida mais longa.

Os conhecimentos sobre citogenética melhoram o entendimento sobre os múltiplos aspectos da carcinogênese. No entanto, ainda é escasso o conhecimento sobre alterações genéticas em lesões ósseas, dificultando assim um diagnóstico mais preciso e por conseqüência um tratamento mais eficaz.

As lesões ósseas por mim estudadas estão inclusas no item primeiro dos resultados, relacionado a evolução de um processo não neoplásico a malignidade onde se encontram doenças que possuem uma pré-disposição documentada a evoluírem a tumores ósseos malignos, demonstrando a necessidade de se estabelecer uma conexão entre os estágios evolutivos do câncer através das análises genéticas.

9 – Referências Bibliográficas

AKBARNIA, B.A.; WIRTH, C.R.; COLMAN, N. Fibrossarcoma arising from chronic osteomyelitis. **J Bone Joint Surg Am.**,v. 58-A(1), p.123-125.

ALAIN S.; BRUN-STRNG, C.; MIMAUD,V.; et al. Epidemiology, impact, management, and cost of Paget's disease of bone in France. **Joint Bone Spine**, v74(1): p. 90-95, 2006.

ALBUQUERQUE, M.A.P.; MELO, E.S.; JORGE W.A., et al. Osteomyelitis of the mandible associated with autosomal dominant osteopetrosis: A case report. **Oral Surg Med pathol Oral Radiol Endod**, v.102, p. 94-98, 2006.

ALMEIDA E. Avaliação da atividade inflamatória na osteomielite crônica. *Lincx Serviços de Saúde*, disponível em: <mailto:drabetty@lincx.com.br?cc=siqueira@lincx.com.br>, 2007.

ARIAS J-I; ALLER, M-A; ARIAS J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. **Mol Cancer**, v.16: p.06-29, 2007.

ASENSI, V.; MONTES, A.H.; VALLE, E.; et al. The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis. **Nitric Oxide**, v.16: p.44-53, 2007.

BARUFFI, M.R.; BARBIERI-NETO, J.; PINA-NETO; et al: Distinct nonrandom patterns of chromosomal deletions in Giant-cell lesions of bone. **Genet. Mol. Biology**, v.25, n. 3, p. 265-270, 2002a.

BARUFFI, M.R.; VOLPON, J.B.; CASARTELLI, C.: Osteois osteomas with chromosome alterations involving 22q. **Cancer Genet. Cytogenet.** V. Jan 15, n. 124(2), p. 127-131, 2001.

BARUFFI, M.R.; BAHIA, M.O.; CARDOSO, P.C.S.; et al. Genes e Câncer: Revisão. **Revista Paraense de Medicina**, v. 16(2): p. 52-56, 2002 b.

BOUVÉE, J.V.W.G.; CLETON-JASSEN, A.M.; TARMINAU, A.H.M.; et al. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. **Lancet Oncol**, v.6: p. 599-607, 2005.

CARAMELLA, C.; ROUJEAU, T.; DRAPÉ J.L. ; et al. Osteosarcomaa presenting as a solitary focus of osteolysis in the calvarium. **Joint Bone Spine**, v. 73: p. 459-461, 2006.

CARAWAY, N.P.; FANNING, C.V.; STEWART, J.M.; et al. Coccidioidomycosis osteomyelitis masquerading as a bone tumor. **Acta Cytol**, v. 47: p.777-782, 2003.

DE VITA, J.R. V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A.: **Cancer principles & of oncology**. Lippiincott-Raven. Inc New York, 1997.

DORFMAN, H.D.; AND CZERNIAK, B.: General Considerations. In: **Bone Tumors**. Mosby, Inc., St Louis, 1998.

DUEWELHENKE, N.; KRUT, O.; EYSEL, P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations of primary human osteoblast and cell lines. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51(1): p.54-63, 2007.

DURBIN, M; RANDALL, R.L.; JAMES, M.; et al. Ewing's sarcoma masquerading as osteomyelitis. **Clin Orthop**. V. 357, p. 176-185, 1998.

EFSTATHOPOULOS, N.; LAZARETTOS, J.; NIKOLAU, V.; et al. Inflammatory leiomyosarcoma of the ankle: A case report and review of the literature. **The J Foot Ankle Surg**, v. 45(2): p.127-130, 2006.

HORVAI, A. and KRISHMAN, U.K Premalignant conditions of bone. **J Orthop Sci**, v. 11: p. 412-423, 2006.

INCA. Estimativa de Incidências e Mortalidade por Câncer no Brasil <http://www.inca.org.br>, 2006.

ISCN: An International System for Human Cytogenetics Nomenclature. F. Mitelman, S. Karger, Basel, 2005.

JOHNSTON, R;M.; MILLES, J.S. Sarcomas arising from chronic osteomyelitis sinuses. **J Bone Joint Surg Am.**, v.55(1), p:162-168, 1973.

KENEDY, C.; STOKER, D.J. Case report: Malignant fibrous histiocytoma complicating chronic osteomyelitis. **Clin Radiol**.v.41(6):p. 435-4366, 1990.

KOBAYASHI,N.; BAUER,T.W.; SAKAI, H.; et al. The use of newly developed real-time PCR for the rapid identification of bacteria in culture-negative osteomyelitis. **Joint Bone Spine**, v.73(6): p. 745-747, 2006.

KONOPKA, J.B.; WATANABA, S.M.; SINGER, J.W.; et al. Cell lines and clinical isolates derived from Ph-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl protein with a common structural alteration. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82: p. 1810-1814, 1985.

KUMAR, V.; COTRAN, V.; COLLINS, R.S.; et al. **Patologia Estrutural e Funcional – Robbins**. Ed. 6ª, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., Brasil, p. 1252, 2000.

KUMAR, V. and MITCHEL, R.N. Robbins & Cotran: **Fundamentos de Patologia** 7.ed. Elseiver Editora Ltda, Rio de Janeiro, R.J.,Brasil, p.848, 2006.

LAVIS, J.F.; GIGON, S.; MICHOT, C.; et al. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis of the mandibule. A case report. **Arch Pediatr**, v. 9: p. 1252-1255, 2002.

LODISH, H.; BERCK, A.; ZIPURSKY S.L.; MATSUDARIA, P.; BALTIMORE, D.; DORNELL J.; **Molecular cell Biology**, 4 edition. New York; w.h. Freeman and Company 1055-1081, 2000.

LONGATTI, P.; COMOGLIO, P.M.; BARDELLA. Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets: the model of the met oncogene **Curr Drug Targets**, v. 2(1), 4p. 1-45, 2001.

LUGASSY, G; SHARAM, R.; NEMETS, A. et al. Severe osteomyelitis of the jaw in long-term survivors of multiple myeloma: a new clinical entity. **Am J Med**, v.117(6): 440-1, 2004.

LYRA, P.P.R.; DINIZ, E.M.A.; CECCON, M.E.J.; et al. Osteomielite neonatal com apresentação clínica incomum: descrição de caso. **Pediatria (SP)**, v.20(3): p. 271-274, 1998.

MACARENCO, R.S.; ERICKSON-JOHNSON, M.; WANG, X.; et al. Cytogenetic and molecular cytogenetic findings in a dedifferentiated lipossarcoma with neural-like whirling pattern and metaplastic bone formation. **Cancer Genet Cytogenet**. V. 172: p. 147-150, 2007.

MAKI, M.; ATHANASOU, N. Osteofibrous dysplasia and adamantinoma: correlation of proto-oncogene, product and matrix protein expression. **Human Pathol**, v. 35(1): p.69-74, 2004.

MALAWER, M.M.; LINK, M.P.; DONALDSON, S.S.: Sarcomas of bone. In: **Cancer Principles & practice of oncology**. Lippincott-Raven, Inc. Philadelphia, 1997.

MCGREGORY, J.E.; PRITCHARD, D.J.; UNNI, K.K.; et al. Malignant lesions arising in chronic osteomyelitis. **Clin Orthop Relat Res**, v.362: p.181-189, 1999.

McNAIN, J.D.K.; DAMRON, T.A.; LANDAS, S.K.; et al. Inheritance of osteosarcoma and Paget's disease of bone: A familial loss of heterozygosity study. **J. Mol Diagn**, v.3(4): p.171-177, 2001.

MEIER, R.; KRETTEK, C.; GRIME, K.; et al. The multiply injured child. **Clin Orthop Relat Res**, v. 432: p.127 – 131, 2005.

MUSERU, L.M.; MCHARO, C.N. Chronic osteomyelitis: a continuing orthopaedic challenge in developing countries. **Int Orthop**, v.25 (2):p.127.

NELLISSERY, M.J.; PADALECKI, S.S.; BRKANAC, Z.; et al. Evidence for a novel osteosarcoma tumor-suppressor gene in the chromosome 18 region genetically linked with Paget disease of bone. **Am J Human Genet**, v.63: p.817-824, 1998.

NISHIO, J.; CENTRY, J.D.; HEFF, J.R.; et al. Monoallelic deletion of the p53 gene through chromosomal translocation in a small cell osteosarcoma. **Virchows Arch**, v. 448(6): p. 852-856, 2006.

RND A , C.; RHYDOLM, A.; WILLÉN, H.; et al. Cytogenetic intratumor heterogeneity in soft tissue tumors. **Cancer Genet Cytogenet**. V.78: p. 127-137, 1994.

PARTHAM, D.M.; BRIDGE, J.A.; LUKACS, J.L.; et al. Cytogenetic distinction among benign fibro-osseous lesions of bone in children and adolescents: value of karyotypic findings in differential diagnosis. **Pediatr Dev Pathol**, v. 7(2): p. 105, 2004.

PRENZEL, N.; FISCHER, O.M.; STREIT, S.; et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocr Relat Cancer**, v. 8(1): p. 11-31, 2001.

PRÓSPERO, J.D. **Tumores ósseos**, 1ª ed. Editora Roca Ltda, São Paulo, S.P, p. 280, 2001.

PURI, A.; PARANIS, S.A.; UDUPA, K.V.; et al. Fibroblastic osteosarcoma arising in chronic osteomyelitis. **Clin Radiol**, v.58(2): p.170-172, 2003.

ROSS, J.J. Angiogenic gene therapy as a potential therapeutic agent in chronic osteomyelitis. **Med Hypotheses**, v.67(1): p.161-163, 2006.

ROWLEY, J.D.. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. **Nature**, v. 243, p. 290-293, 1973.

SANDBERG, A.A.. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Leiomyosarcoma. **Cancer Genet Cytogenet.** v. 161: p. 1-19, 2005.

SANDBERG, A.A.. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Liposarcoma. **Cancer Genet Cytogenet.** v. 155: p. 1-24, 2004.

SANDBERG, A.A.. Cytogenetics and molecular genetics of bone and soft-tissue tumors. **Am J Med Genet.** V. 115(3): p. 189-193, 2002.

SANDBERG, A.A.; BRIDGE, J.A.. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. **Cancer Genet Cytogenet.** v. 145: p. 1-30, 2003.

SAPIENZA, M.T., HIRONAKA, F., LIMA, A.L.L.M., et al. Avaliação de atividade inflamatória na osteomielite crônica. Contribuição da cintilografia com anticorpos policlonais. **Rev. Assoc. Med. Brás**, São Paulo, vol.46(2). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-4230200000200004. 2005.

SCHAJOWICZ F: Introdução. em: **Neoplasias Ósseas e Lesões Pseudotumorais: Patologia, Radiologia e Tratamento**. Revinter Ltda., Rio de Janeiro, R.J., 2000.

SCIOT, R.; DAL CIN, P.; HERNANDEZ, J.M. et al. Inflammatory myofibroblastic tumor of bone: report of two cases with evidence of clonal chromosomal changes. **Am J Surg Pathol**, v.21(10): p.1166-1172, 1997.

STOCK, C.; KARGER, L.; FINK, F.M.; et al. Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas. **Genes Chromosomes Cancer**. v. 28(3): p. 329-336, 2000.

SWEENEY, C.; FAMBROUGH, D.; HUARD, C.; et al. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. **J Biol Chem**. v. 276(25), p. 22685-22698, 2001.

TEREK, R.M. Recent advances in the basic science of chondrosarcoma. **Orthop Clin North Am**, v.37(1): p.9-14, 2006.

THÉOLEYRE, S.; MORI, K.; CHERRIER, B.; et al. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma. **BMC Cancer**, v.5: p.1-10, 2005.

WAGNER, E.W.; EFERL, R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. **Immunol Rev**, v. 208: p. 126-140, 2005.

WILLIAMSON, R.A.; PAUEKSAKON, P.; COKER, N.J. Inflammatory pseudotumor of the temporal bone. **Otol Neurotol**, v.;24(5):p.818-22. 2003.

WYNGAARDEN, J.B., SMITH, L.H., BENNET, J.C. Cecil – Tratado de Medicina Interna. 19th edição. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, R.J., Brasil, v.1, p.1038, 1993.

YAMAGUCHI, C.K.; TSUNODA, A.; MATOS, P.G.; et al. Avaliação da osteomielite crônica pela tomografia computadorizada e ressonância

magnética. Revista de Reumatologia. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/revista>, 2007.

YOSHIDA, C.; KOJIMA, H.; ISHIGAKI, T.; et al. Association of pyoderma gangrenosum and sterile osteomyelitis in a patient having myelodysplastic syndrome with der(1;7)(q10;q10). **Eur J Haematol**, v.72: p. 149-153, 2004.

ZHANG, Z-F.; CORDON-CARDO, C.; ROTHMAN, N.; et al. Methodological issues in the use of tumor markers in cancer epidemiology. **Appl Biomarkers Cancer Epidemiol**. v. 201, p. 213, 1997.

10 – Anexo

Técnicas citogenéticas em sangue periférico

a) Estimulação do crescimento de Linfócitos

Método de fabricação e utilização de Fitohemaglutinina

- 40g de feijão preto (escolher os grãos inteiros);
- lavar bem em água de torneira e deixar em imersão overnight em geladeira;
- posteriormente triturar o feijão em 200ml de solução fisiológica 0,85%;
- coloca-se o líquido em dois frascos;
- agitação contínua durante 12 horas dentro da câmara fria;
- centrifuga-se em refrigerada acima de 5000rpm por 1 hora;
- retira-se o sobrenadante e dilui-se em solução fisiológica na proporção de 1ml de fito para 12ml de solução;
- esteriliza-se por micro-filtração.
- separa-se 0,4ml de fito em frascos para utilização;

- para cada 10ml de meio utiliza-se 0,4ml de fito. Colocar no momento da utilização do meio.

Lavagem das hemácias

- coloca-se todo o sangue a ser lavado em um tubo de centrifuga, acrescenta-se solução fisiológica 0,85%, quase na mesma quantidade de sangue e centrifuga-se;

- desprezar o sobrenadante e repetir esta operação por mais duas vezes;

- material velho costuma hemolizar, daí será necessário lavar até que o sobrenadante fique claro.

Cultura de células de sangue

- Meio TC 199 (RPMI) – 4,5ml

- Soro Humano – 0,5ml

- Fitohemaglutinina – 0,1ml

- 100µl de antibiótico

b) Procedimento

Retirar cerca de 5ml de sangue com heparina por punção venosa. Esperar sedimentar por mais ou menos duas horas. A sedimentação em um indivíduo normal fornece cerca de 2ml de plasma.

Preparar o meio em condições estéreis, colocar a papa de leucócitos a ser cultivado no meio (10ml), homogenizar com pipeta Pasteur e distribuir 5ml em cada frasco (utiliza-se 5ml de meio para cada 1ml de plasma a ser cultivado).

Coloca-se em estufa a 37°C, durante 72 horas.

c) Colheita

Após 72 horas pingar 0,1ml de colchicina em cada frasco, agitar levemente e deixar em estufa por mais ou menos 40 minutos.

Passado esse tempo, colocar a cultura em tubo de centrifuga. Agitando o frasco para que se desprenda todo o material fixado do fundo.

Centrifuga-se por cinco minutos a 1500rpm.

Despreza-se o sobrenadante e coloca-se 5ml de solução hipotônica (KCl 0,75M, previamente aquecida a 37°C).

Agitar levemente com pipeta e colocar em estufa a 37°C por 30 minutos.

Centrifugar e desprezar o sobrenadante.

Acrescenta-se 5ml de fixador (1ml de ácido acético e 3ml de álcool metílico), agitar com pipeta e centrifugar novamente por 5 minutos.

Desprezar o sobrenadante e repetir este mesmo procedimento com 3ml de fixador, centrifugando por 10 minutos.

Após a centrifugação, despreza-se o sobrenadante e coloca-se o fixador na quantidade de acordo com o material obtido.

Confeccionar as lâminas e corá-las para análise.