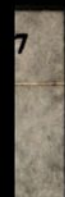


Agnes Cristina Fett Conte

Estudo Citogenético em Pacientes Jovens
Portadores de Neoplasias



1910000609



AGNES CRISTINA FETT CONTE

**ESTUDO CITOGENETICO EM PACIENTES
JOVENS PORTADORES DE NEOPLASIAS**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Elóiza Helena Tajara



609/93

São José do Rio Preto

1992



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista - UNESP, com auxílio financeiro da FAPESP, do CNPq e da FUNDUNESP.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Eloíza Helena Tajara



Dedico este trabalho

Ao meu filho Arthur,

minha maior riqueza.

Ao José Carlos, companheiro
imprescindível e melhor amigo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista - UNESP, com auxílio financeiro da FAPESP, do CNPq e da FUNDUNESP.

Tolstói

"A grande miséria do homem não é a pobreza, a doença ou a hostilidade dos acontecimentos, mas a infelicidade de ignorar porque nasce, sofre e morre"

Etienne Laazy

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra Eloiza Helena Tajara da Silva, exemplo de

dignidade e capacidade. Dedico este trabalho à execução deste trabalho e pela confiança e amizade que sempre demonstrou.

A Profa. Dra Marileira Varella Garcia, grande pesquisadora

e amiga, a quem devo parte de minha formação científica, pelo carinho, interesse e colaboração em todos os momentos, inclusive na análise da pró-forma. Ao meu filho Arthur,

minha maior riqueza. As Profas Dra Ilda Casartelli e Dértia

Villaalba Freire-Maia, membros da banca examinadora, pela atenção na análise da pró-forma e pelas valiosas sugestões e críticas apresentadas.

Ao José Carlos, companheiro

Ao Pós-Graduando Marcelo Ferreira Lourenço, pelo carinho

imprescindível e melhor amigo. e disponibilidade na execução de serviços de edição do texto.

A todos os Professores do Departamento de Biologia, pela

convivência amigável e incentivo que sempre ofereceram.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, do Departamento de

"Pode-se viver no mundo uma vida magnífica, quando se sabe trabalhar e amar, trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha".

Números e Estatística, pela assessoria estatística. **Tolstoi**

Ao amigo Josué Rodrigues dos Santos, funcionário do De-

"A grande miséria do homem não é a pobreza, a doença ou a hostilidade dos acontecimentos, mas a infelicidade de ignorar porque nasce, sofre e morre"

de Pós-Graduação, da Biblioteca, do Centro de Micro-

scopia e aos demais funcionários deste Instituto, pela prestada e eficiência com que sempre me atenderam. **Etienne Lamy**

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, exemplo de dignidade e capacidade científica, pela orientação no planejamento e execução deste trabalho e pela confiança e amizade que sempre demonstrou.

A Profa. Dra. Marileira Varella Garcia, grande pesquisadora e amiga, a quem devo parte de minha formação científica, pelo carinho, interesse e colaboração em todos os momentos, inclusive na análise da pró-forma.

As Profas. Dras. Anita Wajntal, Cacilda Casartelli e Dértia Villalba Freire-Maia, membros da banca examinadora, pela atenção na análise da pró-forma e pelas valiosas sugestões e críticas apresentadas.

Ao Pós-Graduando Marcelo Ferreira Lourenço, pelo carinho e disponibilidade na execução de serviços de edição do texto.

A todos os Professores do Departamento de Biologia, pela convivência amigável e incentivo que sempre ofereceram.

Ao Prof. Dr. James Robert Coleman, do Departamento de Botânica, pelo auxílio na revisão do Summary.

Ao Prof. Antonio José Manzato do Departamento de Análise Numérica e Estatística, pela assessoria estatística.

Ao amigo Josué Rodrigues dos Santos, funcionário do Departamento de Biologia, pelo apoio técnico-laboratorial.

As secretárias do Departamento de Biologia, aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, da Biblioteca, do Centro de Microscopia e aos demais funcionários deste Instituto, pela presteza e eficiência com que sempre me atenderam.



A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

Aos Serviços de Cirurgia Pediátrica, Hematologia, Cirurgia Plástica, Patologia, Pediatria, Dermatologia, Ortopedia e Otorrinolaringologia da Faculdade Regional de Medicina, pelo envio das amostras e esclarecimentos diagnósticos.

As companheiras de Laboratório Profas Nilce Barril Gama e Rosa S. Kawasaki Oyama, pela amizade, troca de experiências e esforços dedicados à implantação da técnica para cultura de tecidos sólidos.

As amigas Brasilina de F. Mafei, Maria Rosana S. Ferreira e Telma G. Catib, pelo interesse e colaboração.

A amiga Profa Eny M. G. Bertollo, pela amizade e confiança que sempre me despertou e pelo apoio sincero durante a realização desse trabalho.

As Profas Dras Ana Elizabete Silva e Eliana Morielle Versute pelo incentivo e pela convivência amiga.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação pelas sugestões recebidas e pelo ambiente cordial e de solidariedade, indispensável para a realização de um bom trabalho.

Aos meus queridos alunos e estagiários, com os quais estou aprendendo constantemente, pelo carinho e estímulo.

Aos meus pais Hitler e Meyre por todo amor, honestidade e independência que sempre me ensinaram e pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

A todos os meus familiares e amigos, em especial à vovó Nida e vovô Carlos (**in memoriam**) por tanta dedicação e afeto.



Aos meus sogros Cleide e José pela acolhida carinhosa e pela disponibilidade em cuidar do Arthur.

A todos os amigos do Grupo Espírita Bezerra de Menezes, em especial ao Sr. José Queid e Sra Marilda, pelo exemplo de vida, solidariedade e amizade.

Aos pacientes e seus familiares, pela contribuição imprescindível e exemplo de humildade e amor à vida.

Ao meu esposo José Carlos, meu melhor amigo, pelo amor e compreensão sempre demonstrados.

Ao meu filho Arthur, meu tesouro, pelo carinho e força que seus olhinhos me transmitem e pela fragilidade e confiança de seus abraços, que me incentivam a lutar e a confiar sempre.

A Deus por tudo e por todos.

III. RESULTADOS

III.1. Análise de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas

III.2. Tumores mesenquimais

A. Tecido hematopoiético

B. Tecido conjuntivo e derivados

C. Tecido endotelial

III.3. Tumores epiteliais

A. Pele

B. Glândula

C. Outros

III.4. Tumores formados por mais de um tipo celular ou de

crises incerta

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Nomenclatura e classificação dos neoplasmas	1
I.2. Fatores cromossômicos e câncer	6
I.3. Fatores gênicos e câncer	14
I.4. Predisposição ao câncer	21
I.5. Instabilidade cromossômica, sítios frágeis e neoplasias ..	23
I.6. Heteromorfismos e neoplasias	24
I.7. Objetivos	27
II. MATERIAL E MÉTODOS	29
II.1. Material	29
II.2. Métodos	29
II.2.1. Linfócitos e blastos do sangue periférico	31
II.2.2. Tecidos neoplásicos sólidos	33
III. RESULTADOS	38
III.1. Análise de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas	41
III.2. Tumores mesenquimais	49
A. Tecido hematopoético	49
B. Tecido conjuntivo e derivados	56
C. Tecido endotelial	61
III.3. Tumores epiteliais	63
A. Pele	63
B. Glândula	69
C. Outros	72
III.4. Tumores formados por mais de um tipo celular ou de origem incerta	73

IV. DISCUSSÃO	89
IV.1. Instabilidade cromossômica e câncer	90
IV.2. Heteromorfismos e neoplasias	96
IV.3. Anomalias cromossômicas e neoplasias	97
A. Tumores mesenquimais	100
A.1. Tecido hematopoético	100
A.2. Tecido conjuntivo e derivados	104
A.3. Tecido endotelial	106
B. Tumores epiteliais	107
B.1. Pele	107
B.2. Glândula	111
B.3. Outros	113
C. Tumores formados por mais de um tipo celular ou de origem incerta	113
V. RESUMO E CONCLUSÕES	120
VI. SUMMARY	122
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
VIII. APÊNDICE	170
VIII.1. Meios de cultura e soluções	170
VIII.2. Ficha padronizada para realização de exame citogenético	177

I. INTRODUÇÃO

I.1. Nomenclatura e classificação dos neoplasmas

O neoplasma é uma doença genética que requer, para seu desenvolvimento, eventos sequenciais múltiplos nos quais alterações constitucionais ou adquiridas conferem às células vantagens de proliferação e padrão de diferenciação alterado (BOGLIOLO *et al.*, 1987; PONDER, 1990; LASKO *et al.*, 1991).

A aquisição de determinadas mutações somáticas pode dar à lesão um comportamento benigno com crescimento lento, localização restrita e, em consequência, com poucos danos aos seus portadores, exceto quando estão em locais críticos como em algumas regiões do sistema nervoso central, o que pode ser letal. A ocorrência de mutações específicas torna a população celular mais agressiva, com características invasivas e capacidade de metastização, o que causa grandes prejuízos aos seus hospedeiros, inclusive sua morte (DIAMANDOPOULOS & MEISSNER, 1985; PATHAK, 1989/1990; RUBIN & FARBER, 1990; COTRAN *et al.*, 1991).

Algumas células normais, como as linfóides, têm propriedades de invasão de tecidos e disseminação pelo organismo, mas não mostram divisões mitóticas autônomas, que constituem um dos sinais mais importantes da lesão tumoral. Talvez seja essa uma das razões pelas quais as leucemias e linfomas, que são neoplasias do tecido hematopoético, mostram um número menor de tipos de alterações genéticas que aquelas de tecidos sólidos (PATHAK, 1989/1990).

Na grande maioria dos casos, a caracterização de neoplasia benigna ou maligna pode ser feita histologicamente. Os tumores benignos geralmente são bem diferenciados e sua estrutura pode ser



típica do tecido de origem, do qual recebe o nome acrescentado do sufixo "oma". Alguns exemplos são o lipoma, formado a partir de lipócitos, e o hemangioma, formado a partir de vasos sanguíneos. Em alguns casos, a nomenclatura refere a aparência macroscópica característica da lesão, como no caso dos pólipos de cólon. A persistência de certos termos históricos, contudo, faz com que alguns tumores altamente malignos, como por exemplo o hepatoma, o melanoma, o seminoma e o neuroblastoma, permaneçam com designação similar à dos tumores benignos (ROBBINS **et al.**, 1986; RUBIN & FARBER, 1990).

A nomenclatura das neoplasias malignas é feita geralmente com base no tecido de origem. São chamadas carcinomas quando derivadas de células epiteliais de qualquer uma das três camadas germinativas. Assim, um câncer que surge na epiderme, que tem origem ectodérmica, é um carcinoma, do mesmo modo que aqueles procedentes das células mesodérmicas do revestimento dos túbulos renais ou do trato gastrintestinal. Por outro lado, as neoplasias que provêm do tecido mesenquimal são denominadas sarcomas, tais como o lipossarcoma, que é derivado do tecido gorduroso, o linfossarcoma, do tecido linfático e o rabdomiossarcoma, que é formado a partir do músculo estriado (DIAMANDOPOULOS & MEISSNER, 1985).

Existem alguns tumores que se comportam como benignos, porém apresentam características de lesão maligna, e vice-versa. O exemplo mais conhecido é o carcinoma basocelular da pele, que histologicamente é maligno, invade progressivamente os tecidos, mas nunca metastiza. Da mesma forma, o crescimento de alguns adenomas de glândula salivar, que são classificados como benignos, pode ser tão agressivo que desafia mesmo uma cura cirúrgica (RUBIN & FARBER, 1990).



Tabela 1. Nomenclatura das neoplasias benignas e malignas segundo COTRAN et al. (1991), com modificações. (1990).

A Tabela 1 resume a classificação das neoplasias benignas e malignas, segundo COTRAN et al. (1991), com modificações. De acordo com essa tabela, são consideradas simples as neoplasias formadas por um só tipo celular, mistas as que apresentam mais de um tipo, geralmente derivados de uma única camada germinativa, e compostas as que contêm uma variedade de tipos celulares representativos de mais de uma camada germinativa. Os cânceres referentes ao tecido hematopoético, embora de origem mesenquimal, recebem as designações de leucemias e linfomas.

As leucemias são neoplasias malignas das células hematopoéticas primordiais, caracterizadas por substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas. Na maior parte dos casos, as células leucêmicas caem na corrente sanguínea, onde podem ser encontradas em grande número. Tradicionalmente essas neoplasias são classificadas de acordo com o tipo celular acometido e o estado de maturidade das células malignas. Assim, são agrupadas em agudas as que se caracterizam pela presença de células imaturas no sangue (blastos) e por uma evolução rápida e fatal nos pacientes que não são tratados, e crônicas as que apresentam células bem diferenciadas, pelo menos no início, e evolução mais lenta. Uma subdivisão adicional separa-as em linfocíticas e não-linfocíticas ou mielóides, referindo-se ao tipo celular predominante (JAMRA & LORENZI, 1983; HOFFBRAND & PETTIT, 1988; COTRAN et al., 1991). As linfocíticas podem ser referidas como leucemias de células B ou T, quando se originam dos linfócitos bursa- ou timo-dependentes, respectivamente (FOON & TODD, 1986). Os linfomas são neoplasias que se caracterizam pela proliferação de células originadas do tecido linfóide, isto é,



Tabela 1. Nomenclatura das neoplasias benignas e malignas segundo COTRAN *et al.* (1991), com modificações.

Tecido de Origem - Tipo ou Localização	Benigno	Maligno
A. Formados por um único tipo celular (simples)		
I. Mesenquimal		(Sarcomas)
(1) Hematopoético	adenoma papiloma adenoma papilar cistadenoma	adenocarcinoma leucemias linfomas cistadenocarcinoma
(2) Conjuntivo e derivados	fibroma mixoma lipoma condroma osteoma	fibrossarcoma mixossarcoma lipossarcoma condrossarcoma sarcoma osteogênico
(3) Endotelial e correlatos	nevo hemangioma - capilar - cavernoso	melanoma (melanocarcinoma) angiossarcoma carcinoma de células renais (hiperplasia)
(4) - Vasos linfáticos	linfangioma	linfangiossarcoma
- Sinóvia		sarcoma sinovial
(5) Ducto biliar	adenoma dos ductos biliares	carcinoma dos ductos biliares
- Mesotélio (células de revestimento das cavidades corporais)		mesotelioma
(6) - Envoltórios cerebrais	meningioma	meningioma invasivo
(7) - Glomus	tumor glômico	coriocarcinoma
(8) Muscular	leiomioma	leiomiossarcoma
- músculo estriado	rabdomioma	rabdomiossarcoma
II. Epitelial		(Carcinomas)
(1) Escamoso estratificado	papiloma de células escamosas	carcinoma espinocelular
(2) Camada basal da pele ou de seus anexos	ceratose cisto epidérmico tricrofolliculoma	carcinoma basocelular tricoepitelioma
(3) Glândulas anexas da pele		
- Glândulas sudoríparas	adenoma de glândulas sudoríparas	carcinoma de glândulas sudoríparas
- Glândulas sebáceas	adenoma de glândulas sebáceas	carcinoma de glândulas sebáceas

Tabela 1. (continuação)

Tecido de Origem - Tipo ou Localização	Benigno	Maligno
(4) Revestimento epitelial		
- Glândulas ou ductos		
- grupo bem diferenciado	adenoma papiloma adenoma papilar cistadenoma	adenocarcinoma carcinoma papilar adenocarcinoma papilar cistadenocarcinoma
- grupo pouco diferenciado		carcinoma medular carcinoma indiferenciado (simples)
(5) Trato respiratório		carcinoma broncogênico
(6) Neuroectoderma	nevo	melanoma (melanocarcinoma)
(7) Epitélio renal	adenoma tubular renal	carcinoma de células renais (hipernefroma)
(8) Fígado	adenoma de células hepáticas	hepatoma (carcinoma hepatocelular)
(9) Ducto biliar	adenoma dos ductos bilíares	carcinoma dos ductos bilíares (colangiocarcinoma)
(10) Epitélio do trato urinário (transicional)	papiloma de células transicionais	carcinoma papilar carcinoma de células transicionais carcinoma de células escamosas
(11) Epitélio placentário	mola hidatiforme	coriocarcinoma
(12) Epitélio testicular		seminoma carcinoma embrionário
B. Formados por mais de um tipo celular derivados geralmente de uma única camada germinativa (mistos)		
(1) Glândulas salivares	adenoma pleomórfico (tumor misto de glândulas salivares)	tumor misto maligno de glândulas salivares
(2) Primórdio renal		tumor de Wilms (nefroblastoma)
C. Formados por mais de um tipo celular derivados de mais de uma camada germinativa (compostos)		
(1) Gônadas ou restos embrionários	teratoma maduro cisto dermóide	teratoma imaturo

são tumores primários desse tecido, com um curso letal, a menos que sejam controlados ou erradicados. Com base em seu aspecto histológico, esses tumores são divididos em dois grupos principais: Hodgkin e não Hodgkin, os quais diferem entre si em vários aspectos, apresentando quadros particulares de manifestações clínico-laboratoriais (ROSENBERG **et al.**, 1982; JAMRA & LORENZI, 1983; HOFFBRAND & PETTIT, 1988; COTRAN **et al.**, 1991).

As leucemias e linfomas, ainda hoje, são classificados principalmente com base em critérios morfológicos, embora muitos autores utilizem tais critérios combinados com o imunológico e o citogenético. A Tabela 2 mostra a nomenclatura mais comum das leucemias e dos linfomas, segundo as classificações FAB (French-American-British Cooperative Group) (BENNETT **et al.**, 1976), de WINTROBE (1981) e de HOFFBRAND & PETTIT (1988), com modificações.

1.2. Fatores cromossômicos e câncer

Vários eventos sequenciais são necessários para que uma célula normal se transforme em maligna. A maioria desses eventos envolve modificações constitucionais ou adquiridas do material genético, tais como deficiências, rearranjos e mutações na molécula de DNA, que podem afetar a regulação gênica e resultar em divisão celular alterada (CHIAO **et al.**, 1990). Anomalias mitóticas em células cancerosas foram descritas desde o fim do século passado e sua análise permitiu que um grande número de dados fosse obtido revelando a base cromossômica da doença (SANDBERG, 1985, 1990; YUNIS, 1985; NOWELL & CROCE, 1986; HSU, 1987; HEIM & MITELMAN, 1986a, 1989; MITELMAN **et al.**, 1989; ROWLEY, 1985, 1990b). Até o presente momento,



Tabela 2. Classificação das doenças neoplásicas do sistema hematopoiético segundo as classificações FAB, de WINTROBE (1981) e de HOFFBRAND & PETTIT (1988), com modificações.

I. LEUCEMIAS

A. Não-linfocítica ou mielóide

1. Crônica (LMC)

típica
atípica
juvenil
eosinofílica
basofílica
monocítica

2. Aguda (LMA)

M1 - mielocítica (ou mieloblástica) sem diferenciação
M2 - mielocítica com diferenciação
M3 - pró-mielocítica, hipergranular
M3V - pró-mielocítica, microgranular
M4 - mielomonocítica
M5a - monocítica, pobremente diferenciada
M5b - monocítica, bem diferenciada
M6 - eritroleucemia
M7 - megacariocítica

B. Linfocítica

1. Crônica (LLC)

de células linfossarcomatosas

2. Aguda (LLA)

L1 - células pequenas, morfologia homogênea
L2 - células grandes, morfologia heterogênea
L3 - tipo Burkitt - células grandes, morfologia homogênea

II. LINFOMAS

A. Tipo Hodgkin

esclerose nodular
predominância linfocítica
celularidade mista
deficiência linfocítica

B. Tipo não-Hodgkin

1. Nodular

linfocítico pouco diferenciado
misto
Burkitt
indiferenciado não Burkitt
histiocístico

2. Difuso

linfocítico bem diferenciado (LBD)
LBD com diferenciação plasmocitóide
linfocítico intermediário
imunoblástico
linfoblástico
tipo "Lennert"
micose fungóide
plasmacitoma
inclassificável
composto
histiocitose maligna

as informações na literatura indicam que cerca de 15.000 amostras de neoplasmas exibem alterações cariotípicas. Dessas, 179 ocorrem consistentemente em 51 tipos diferentes de doenças hematológicas malignas ou pré-malignas e tumores sólidos (MITELMAN *et al.*, 1990).

A maioria das neoplasias mostra anomalias cromossômicas múltiplas. O primeiro evento citogenético que ocorre é chamado primário e é considerado essencial para a transformação neoplásica. Pelo fato de estar presente na maioria das células, indica que resulta em vantagem de proliferação herdável e em origem monoclonal da lesão. As alterações secundárias, adquiridas posteriormente e decorrentes da instabilidade do genoma tumoral, são responsáveis pela progressão e dispersão das células malignas (HEIM & MITELMAN, 1986b; PATHAK, 1986, 1989/1990; SANDBERG, 1990). HEIM & MITELMAN (1989) reconheceram um outro grupo de anomalias, as não clonais, que não apresentam relação sequencial com as anteriores e podem ocorrer com tal frequência que impedem o reconhecimento das alterações patogeneticamente importantes. A Tabela 3 mostra algumas alterações cromossômicas consistentes já descritas em neoplasmas humanos. Um dos melhores exemplos é o do linfoma de Burkitt, cuja característica é a ocorrência da translocação entre os cromossomos 8 e 14 e, menos frequentemente, entre os cromossomos 8 e 2 ou 8 e 22 (VAN DEN BERGHE, 1983; NOWELL & CROCE, 1986; NOWELL, 1989).

O estabelecimento de aberrações cromossômicas primárias em muitos tipos de tumores tem contribuído para o diagnóstico, o prognóstico e a escolha da terapia mais adequada nessas doenças (SANDBERG, 1985, 1990; FRANKE *et al.*, 1986; YUNIS & BRUNNING, 1986; CROCE, 1987; SANDBERG & TURC-CAREL, 1987; MITELMAN *et al.*, 1989; HEIM & MITELMAN, 1989, entre outros), e também para a sua prevenção

Tabela 3. Alguns neoplasmas humanos com alterações cromossômicas consistentes já conhecidas, segundo SANDBERG (1990) com modificações.

Neoplasma	Alteração cromossômica
BENIGNOS	
meningioma e neuroma acústico	-22 ou 22q-
tumor misto de glândula salivar	t(3;8)
lipoma	t(9;12) t(12;v)
MALIGNOS	
Leucemias	
mielóide crônica	t(9;22)
mielóide aguda	
M1	t(11;14)
M2	t(8;21) +4
M3	t(15;17)
M4	inv(16)
linfocítica crônica	t(11;14) del(2q)
linfocítica aguda	
L1	t(9;22)
L2	t(4;11)
L3	t(8;14)
Linfoma de Burkitt	t(8;14) t(2;8) t(8;22)
Carcinomas	
retinoblastoma	del(13q)
tumor de Wilms	del(11p)
neuroblastoma	del(1p)
carcinoma de célula pequena do pulmão	del(3p)
melanoma	del(6q)
tumor de ovário	t(6;14)
tumor de próstata	del(10q)
tumor testicular	i(12p)
Sarcomas	
lipossarcoma	t(12;16)
rabdomiossarcoma	t(2;13)
sarcoma de Ewing	t(11;22)
sarcoma sinovial	t(X;18)
leiomiiossarcoma	t(3;21) del(21p)



e para a identificação dos genes envolvidos no processo neoplásico (ROWLEY, 1990c).

Já é conhecido que as leucemias, em especial as agudas, podem ser caracterizadas por eventos cromossômicos primários que, além de estarem provavelmente relacionados com o seu desenvolvimento, permitem sua divisão em entidades diferentes. Tais grupos coincidem em parte com aqueles definidos com base em critérios morfológicos, citoquímicos e imunológicos (BENNETT, 1976; FOON & TODD, 1986) e podem estar associados com tempo de sobrevida do paciente e manifestações clínicas peculiares. Um bom exemplo é o tipo M2 da leucemia mieloide aguda (LMA), que possui pelo menos três subtipos citogenéticos definidos pelas translocações $t(8;21)$, $t(6;9)$ e $t(9;22)$, o primeiro deles com um melhor prognóstico quando comparado aos demais (SANDBERG & TURC-CAREL, 1987; YUNIS *et al.*, 1988). No caso da LMA associada à inversão do cromossomo 16, tipo M4, os afetados apresentam alto risco de comprometimento do sistema nervoso central, enquanto entre aqueles em que se observa a monossomia do cromossomo 7 há uma incidência elevada de hemorragias e infecções (SANDBERG, 1990). Entre os portadores de leucemia linfocítica aguda, por sua vez, números cromossômicos hiperdiplóides indicam uma sobrevida maior em relação aos que apresentam números hipodiplóides ou alterações cromossômicas estruturais, possivelmente pela presença de cópias extras de genes que controlam a expressão das células malignas (YUNIS & BRUNNING, 1986; PENAUX *et al.*, 1989; SECKER-WALKER, 1990; TSUCHIYA *et al.*, 1990).

No caso dos pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC), a presença da translocação $t(9;22)$, que origina um cromossomo 22 de tamanho menor conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph1),



resulta em sobrevida maior, resposta mais favorável à quimioterapia e períodos significativamente maiores entre o diagnóstico e a crise blástica (ROWLEY, 1988; 1990c). Com relação ao curso clínico dessa doença, em cerca de 80% dos que entram na fase terminal são observadas alterações cromossômicas secundárias, caracterizadas por um segundo Ph1, um isocromossomo do braço longo do cromossomo 17 ou um cromossomo 8 extra. Apenas 20% apresentam a linhagem original Ph1 positiva inalterada. Assim, a análise citogenética periódica dos afetados pode prever o aparecimento das crises blásticas e permitir a utilização precoce de medidas de controle da progressão da doença (ROWLEY, 1990a).

Qualquer revisão bibliográfica sobre câncer revela que a maior parte das informações citogenéticas existentes aborda as doenças hematológicas malignas, embora elas constituam apenas cerca de 10% das neoplasias humanas (SANDBERG, 1988a,b). Dos 15.000 neoplasmas já estudados através de técnicas de bandamento cromossômico, os tumores sólidos correspondem a apenas 21% do total (MITELMAN, 1991), apesar de apresentarem uma mortalidade maior em relação às neoplasias hematológicas (TRENT *et al.*, 1990). A escassez dos dados citogenéticos desses tumores se deve principalmente a dificuldades específicas na cultura e análise de suas células. Entre tais dificuldades podem ser destacados o baixo índice mitótico nas preparações obtidas diretamente da lesão, a morfologia dos cromossomos que nem sempre permite uma análise cariotípica detalhada, além da frequente contaminação *in vivo* dos tecidos tumorais por bactérias ou fungos, o que impede o seu cultivo. Um outro problema é o estabelecimento do evento primário, pois suas manifestações clínicas são



mais tardias que nas leucemias e, portanto, as células são geralmente examinadas em fases mais avançadas da doença, quando já ocorreram muitas anomalias secundárias (SANDBERG & TURC-CAREL, 1987; ATKIN, 1989; TEYSSIER, 1989; TRENT **et al.**, 1986, 1990; SANDBERG, 1990).

Alguns desses problemas vêm sendo superados (LIMON, 1992) e muitos dados já foram obtidos, tanto em relação à definição citogenética de subgrupos, como no esclarecimento do diagnóstico e do prognóstico da doença (TURC-CAREL **et al.**, 1988; DE LA CHAPELLE, 1989). Um bom exemplo é o do histiocitoma fibroso maligno, no qual a presença do marcador 19p+ está relacionada positivamente com a recidiva da doença enquanto marcadores em anel estão correlacionados negativamente. No meningioma, um tumor neurogênico benigno onde a perda do cromossomo 22 é um evento comum, a hiperdiploidia indica um comportamento mais agressivo da lesão (BUYS, 1991). De modo similar, o carcinoma de bexiga não invasivo ou pouco invasivo apresenta células diplóides ou próximas do número diplóide, enquanto os mais invasivos mostram células triplóides ou tetraplóides (SANDBERG, 1988a). Outros dados revelaram quatro tipos diferentes desse carcinoma, cariotipicamente diversos mas praticamente indistinguíveis na análise histopatológica. Eles são caracterizados por um isocromossomo de braço curto do cromossomo 5, pela trissomia 7, pela monossomia 9 e pela deficiência parcial do cromossomo 11. Os dois primeiros grupos são mais invasivos e recorrentes e sua detecção auxilia na escolha da terapia mais adequada para essa doença (SANDBERG, 1988a; ATKIN, 1989; HEIM & MITELMAN, 1989).

Os avanços da citogenética têm atingido também as lesões benignas e pré-malignas. Segundo SANDBERG (1990), durante muito tempo foi suposto que todos os tumores benignos eram citogenetica-



também provável que alguns eventos genéticos sejam responsáveis pela transformação para o estado maligno. Entretanto, muitos estudos têm referido a ocorrência de anomalias cariotípicas em células de tecidos normais (LIMON **et al.**, 1990; CASALONE **et al.**, 1992; HERBERGS **et al.**, 1992; SOZZI **et al.**, 1992; entre outros) ou em células provenientes de tumores benignos (ATKIN, 1989; TEYSSIER & FERRE, 1989; CASARTELLI **et al.**, 1990, 1992; GAMA, 1991; SREEKANTIAH & SANDBERG, 1991; CAVALLI **et al.**, 1992; SANDBERG, 1992; entre outros). Muitas dessas alterações são específicas, o que auxilia no diagnóstico dos tumores. Alguns exemplos são a deficiência do cromossomo 22 e a perda ao Y em meningiomas (ROGATTO & CASARTELLI, 1988; HEIM **et al.**, 1989b), a translocação entre os cromossomos 3 e 8 nos tumores de glândula salivar (SANDBERG, 1988a; SANDROS **et al.**, 1990) e as anomalias envolvendo a banda 12q13-15 no lipoma (MANDHAL **et al.**, 1988; DAL CIN & SANDBERG, 1989; SREEKANTIAH **et al.**, 1990a). Um aspecto interessante é que a mesma alteração pode ser observada em algumas lesões benignas e em suas correspondentes malignas. Por exemplo, as bandas 12q13-15 mostram envolvimento recorrente em tumores benignos e malignos do tecido adiposo bem como em tumores benignos de glândula salivar e da musculatura lisa. Nos lipomas, ocorrem principalmente translocações entre as bandas 12q13-15 e os segmentos 1p, 2p, 3q e 21q, enquanto nos lipossarcomas o rearranjo observado é a translocação t(12;16)(q13;p11). Outros exemplos semelhantes são conhecidos entre os leiomiomas e leiomiossarcomas, e entre os meningiomas e meningiomas sarcomatosos (SREEKANTIAH & SANDBERG, 1991).

Embora os tumores benignos possam ser associados a translocações específicas capazes de induzir proliferação celular, é



também provável que alguns eventos genéticos sejam responsáveis pelo tipo de comportamento da lesão. A ausência de transformação maligna nesses casos pode ser consequência da presença de determinados fatores nas etapas iniciais do processo, ou da ausência de mutações necessárias para a transformação (SANDBERG, 1992). É possível que certos genes críticos permaneçam inativos, enquanto outros, que dão vantagens de crescimento para o tipo celular específico num determinado estágio de diferenciação, são ativados (CAVALLI *et al.*, 1992; FLETCHER, 1992). Esses últimos também estariam envolvidos no desenvolvimento de tumores malignos, porém associados com outras mutações, como aquelas que conferem características de invasividade e metastização (KHAN & EVANS, 1991). As bandas cromossômicas comuns a rearranjos em diferentes padrões de comportamento neoplásico estariam relacionadas, portanto, apenas com o crescimento celular inespecífico (SOBEL, 1990; SREEKANTIAH & SANDBERG, 1991). Alterações adicionais seriam necessárias para mudanças nesses padrões. (CHECHT, 1988b; McAL) Apesar de não existirem conclusões sobre os eventos que ocorrem durante a progressão maligna, não há dúvida de que os estudos moleculares associados aos dados citogenéticos fornecerão o esclarecimento necessário para o entendimento da etiologia e do comportamento biológico dos tumores.

1.3. Fatores gênicos e câncer

O trabalho simultâneo da citogenética e da biologia molecular tem aberto caminhos para o mapeamento de genes envolvidos na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer. Entre eles estão os oncogenes, que são genes capazes de induzir a transformação

neoplásica em condições naturais ou experimentais e são resultantes de alterações de genes normais denominados proto-oncogenes (GORDON, 1985; PIMENTEL, 1985; ;E BRAEKELEER, 1988). Os proto-oncogenes são altamente conservados ao longo da evolução e já foram observados em muitas espécies diferentes, o que demonstra seu importante papel no funcionamento celular (SPANDIDOS & ANDERSON, 1989). A descoberta dos oncogenes derivou de extensos trabalhos realizados com retrovírus causadores de câncer em animais. O vírus do sarcoma de Rous de galinhas foi o primeiro no qual foi demonstrada a presença de um oncogene, o **src**, cujo homólogo normal foi identificado no DNA de células não transformadas de diferentes vertebrados, inclusive do homem (McCLAIN, 1984; WEBER & McCLURE, 1987; BARBACID, 1990). Atualmente, mais de 55 oncogenes foram identificados no genoma humano (Tabela 4), muitos dos quais já foram mapeados (SANDBERG, 1990). Sua nomenclatura geralmente utiliza apenas três letras relacionadas com o nome do retrovírus no qual foi originalmente detectado (HECHT, 1988b; McALPINE *et al.*, 1990; SANDBERG, 1990).

Os produtos codificados pelos oncogenes atuam no crescimento e diferenciação celular (MARX, 1990) e, entre eles, estão fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, enzimas associadas com receptores, moduladores de transmissão de sinais através da membrana plasmática e outros que atuam no núcleo celular, aparentemente de forma direta na duplicação ou transcrição do DNA e mesmo nos eventos pós-transcricionais (GORDON, 1985; FRANKE *et al.*, 1986; WEBER & McCLURE, 1987; HUBER, 1989; KLEIN, 1990; BARBACID, 1990).

A ativação de um proto-oncogene pode contribuir para a



Tabela 4. Localização de alguns oncogenes já identificados no cariótipo humano, segundo SANDBERG (1990) e McALPINE et al. (1990), com modificações.

Oncogene	Localização Cromossômica	Oncogene	Localização Cromossômica
lck	1p35-p32	abl	9q34
myc-L1	1p32	ret	10q11.2
B-lym	1p32	H-ras-1	11p15.5
jun	1p31-32	int-2	11q13
N-ras	1p13	bcl-1	11q13.3
ski	1q22-q24	ets-1	11q23
myc-N	2p24	K-ras-2	12p12.1
rel	2p13-p12	int-1	12q13
lco	2q14-q21	gli	12q13
thr-B	3p24-p22	flt-1	13q12
raf-1	3p25	fos	14q24.3
kit	4p11-q22	akt-1	14q32
csf-1R	5q33-q35	fes	15q25-q26
pim	6p21	erb-B2	17q11-q12
K-ras-1	6p12-p11	erb-A2L	17q252
fyn	6q21	yes-1	18q21.3
ros-1	6q16-22	bcl-2	18q21.3
myb	6q22-q23	erv-1	18q22-qter
mas-1	6q24-27	mel	19p13.2
ral-A	7p22-p15	bcl-3	19q13
ara-F2	7p12-q21	src	20q12-q13
egf-R	7p13-p12	ets-2	21q22.3
met	7q31	yescp	22q11-q12
mos	8q11	pdg-FB	22q12.3-q13.1
lyn	8q13-qter	ara-F1	Xp11.4-p11.23
pvt-1	8q24	mcf-2	Xq26.3-q27.1

patogênese do câncer (SPANDIDOS & ANDERSON, 1989) e decorre de uma variedade de mecanismos, entre eles a mutação gênica em ponto. O gene humano **H-ras-1**, isolado de carcinoma de bexiga, foi o primeiro cuja ativação ficou demonstrada como resultante da substituição de uma glicina por uma valina em sua cadeia protéica (BARBACID, 1987). A presença de genes mutantes da família **ras**, **H-ras**, **K-ras** e **N-ras**, tem sido descrita em uma série de tumores, como nos de colon (BOS *et al.*, 1987; FORRESTER *et al.*, 1987), mama (SPANDIDOS, 1987), pele (OGISO *et al.*, 1988; ANANTHASWAMY *et al.*, 1989; COROMINAS *et al.*, 1989; DICKER *et al.*, 1990; VAN DER SCHROEFF *et al.*, 1990), e nas mielodisplasias (LIU *et al.*, 1987) e leucemias agudas (SPANDIDOS & ANDERSON, 1989). Esses achados têm permitido a utilização desse e de outros oncogenes como indicadores importantes no prognóstico do câncer (SPANDIDOS, 1992).

A amplificação gênica é um outro tipo de mecanismo que ativa proto-oncogenes através de duplicações sucessivas resultando em muitas cópias ativas numa mesma célula, visualizadas citogeneticamente sob a forma de regiões homogeneamente coradas ou de material genético extra cromossômico denominado "double minutes" (GORDON, 1985; SCHWAB, 1989). A amplificação do **N-myc**, por exemplo, é verificada em neuroblastomas e tumores relacionados (SCHWAB *et al.*, 1983; BRODEUR *et al.*, 1984; CILLO *et al.*, 1989; BERNE *et al.*, 1989; JIMBO *et al.*, 1989; TAYLOR & LOCKER, 1990), e em melanoma (BAUER *et al.*, 1990), e está associada com capacidade metastática e mau prognóstico dessas doenças (BERNARDS *et al.*, 1991).

MITELMAN & HEIM (1988) verificaram o envolvimento de apenas 71 bandas nas aberrações cromossômicas primárias de 1985 diferentes neoplasias. Dessas, 27 coincidem com a localização de oncoge-

nes já descritos, o que sugere que tal associação não deve ser casual. Realmente, já existem muitos dados mostrando que as aberrações cromossômicas, em especial as translocações, podem levar a modificações críticas de proto-oncogenes, alterando sua estrutura ou os mecanismos que controlam sua expressão (CROCE & KLEIN, 1985; KANDA, 1985; MITELMAN & HEIM, 1988). Esse tipo de ativação parece ocorrer em muitos tumores e já é bem conhecida entre as leucemias e linfomas. Por exemplo, nas células do linfoma de Burkitt, o proto-oncogene **c-myc**, localizado na banda 8q14, é translocado próximo ao gene da cadeia pesada das imunoglobulinas, presente na banda 14q32. Os pontos de quebra em translocações variantes desse tumor compreendem aqueles em 2p12 e 22q11, onde já foram mapeados os genes **kappa** e **lambda**, respectivamente, da cadeia leve de imunoglobulinas (DALLAFAVERA *et al.*, 1982, 1983; LEDER *et al.*, 1983; KLEIN & KLEIN, 1984; NOWELL & CROCE, 1986). Na leucemia mielóide crônica, por sua vez, ocorre justaposição do proto-oncogene **c-abl** e da região bcr ("breakpoint cluster region") na translocação t(9;22)(q34;q11) (HEISTERKAMP *et al.*, 1984; BARTRAM *et al.*, 1985; ROWLEY, 1990c).

Mais recentemente, foram descritos rearranjos análogos em leucemia T, que envolvem novamente o gene **c-myc** além do gene codificador da cadeia **alfa/delta** do receptor da célula T (TCRA/TCRD) (ROWLEY, 1990c). Esses dados e outros obtidos em diferentes neoplasias das células B e T sugerem que tais rearranjos não são casuais e, talvez em consequência de recombinações incorretas entre sequências homólogas de cromossomos diferentes (CROCE, 1987), colocam próximos genes responsáveis pela regulação do crescimento (proto-oncogenes) e genes ativos no tipo celular em questão, esses últimos

levando à expressão inadequada dos primeiros (GREAVES, 1989; ROWLEY, 1990a,c; SECKER-WALKER, 1990).

Entre os tumores sólidos, podem ser encontrados outros exemplos que reforçam algumas das afirmações acima. É o caso dos carcinomas papilares de tiróide que mostram a inversão $inv(10)(q11.2q21)$, cujos pontos de quebra coincidem com as regiões onde o proto-oncogene RET e a sequência H4 estão localizados e fornece a base estrutural para a fusão RET-H4, responsável pela codificação da sequência quimérica transformante ptc (PIEROTTI *et al.*, 1992).

Uma outra classe de genes relacionados com o processo neoplásico é a dos genes supressores de tumor, também conhecidos como anti-oncogenes ou oncogenes recessivos (ANDERSON & SPANDIDOS, 1988; KNUDSON, 1989). As evidências para a existência desse grupo têm sido obtidas do estudo de tumores em *Drosophila* que são causados por mutações recessivas, de experimentos de fusão de células tumorais com normais resultando em híbridos normais, da reversão do potencial oncogênico em células transfectadas com um oncogene através de sua inativação e, principalmente, dos estudos sobre o comportamento de tumores pediátricos humanos (PAUL, 1989). Esses genes parecem atuar como supressores da atividade de oncogenes e sua alteração em ambos os homólogos, com consequente perda do seu papel regulador, pode levar ao processo maligno. O fenômeno ocorre com padrão de herança recessiva no nível celular, ao contrário do comportamento dos oncogenes cuja ativação, mesmo em um único alelo, induz à transformação neoplásica (CAVENEY *et al.*, 1986; HANSEN, & CAVENEY, 1988; GREEN, 1988; WEINBERG, 1989).

O retinoblastoma, um tumor raro de retina, tem sido usado



como o protótipo para o estudo dos genes supressores do câncer (BUCHANAN *et al.*, 1987; SOBEL, 1990). Nessa neoplasia ocorre a perda funcional dos alelos **RB1** mapeados na banda 13q14 e, consequentemente, do seu produto, que parece estar relacionado com o controle do ciclo celular (CARNEY, 1990; CHIAO *et al.*, 1990). Alterações estruturais do gene **RB1** foram detectadas no DNA do tecido normal e tumoral de pacientes com retinoblastoma familiar e apenas no DNA tumoral daqueles com a forma esporádica da doença. As alterações mais frequentemente observadas têm sido pequenas deficiências ou mutações em ponto que resultam em produtos de tradução alterados (LASKO *et al.*, 1991).

A perda de heterozigosidade de sequências gênicas no DNA de células de retinoblastoma e de outros tumores, particularmente dos hereditários, tem fornecido evidências moleculares da deficiência de segmentos cromossômicos e indicam a localização possível de genes envolvidos na patogênese da doença. É o caso do tumor de Wilms (KOUFOS *et al.*, 1984), da polipose adenomatosa familiar (BODMER *et al.*, 1987; REES *et al.*, 1992), da neurofibromatose acústica bilateral (ROULEAL *et al.*, 1987) e da neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (LARSSON *et al.*, 1988), entre outros. A homozigose de certas regiões do genoma, especialmente 3p24, 11p15, 13q14 e 17p13, é frequente em neoplasias muito diferentes e pode significar efeitos pleiotrópicos de certos genes. Duas dessas regiões são associadas com a localização de oncossupressores: a banda 13q14 com o gene **RB1** já citado e a 17p13 com o gene **p53** (EJIMA *et al.*, 1988; LASKO *et al.*, 1991).

O gene **RB1** aparece mutado em vários tipos de tumores mas a transmissão hereditária de seus alelos alterados induz somente um



pequeno número deles, o que está de acordo com a especificidade tecidual da proteína RB1. Do mesmo modo, mutações do gene **p53** são observadas em várias neoplasias e levam à perda de função recessiva em alguns casos e em outros pode ter um efeito dominante negativo e características de um oncogene (LASKO **et al.**, 1991; LEVINE **et al.**, 1991; HECHT & HECHT, 1991; IGGO & SCHARER, 1992).

I.4. Predisposição ao câncer

A predisposição ao câncer tem sido demonstrada em aproximadamente 1% do total de casos da doença (FUNDERBURK **et al.**, 1982; GILMAN **et al.**, 1984; MARKKANEN **et al.**, 1987; CUNNINGHAM & DICKERMAN, 1988; LASKO **et al.**, 1991) e pode ser considerada em três grupos principais: predisposição a um tipo específico de tumor, frequente em algumas famílias mas que também aparece esporadicamente na população, predisposição a tumores de diferentes tipos, que segregam em parentes próximos, e síndromes que aumentam o risco para certas neoplasias. Entre essas últimas pode ser citada a síndrome de Beckwith-Wiedemann, caracterizada por onfalocele, macroglossia e gigantismo, e que está associada com risco elevado de neoplasias embrionárias como o tumor de Wilms e com anomalias constitucionais envolvendo a banda 11p15 (HAAS **et al.**, 1987; LITTLE **et al.**, 1988; HENRY **et al.**, 1989). Outras doenças causadas por mutações mendelianas também aparecem associadas com tumores e incluem a síndrome de Langer-Giedion, a neoplasia endócrina múltipla tipos 1, 2A e 2B, a polipose adenomatosa familiar, as neurofibromatoses tipo 1 e 2, e as síndromes de instabilidade cromossômica (SCHROEDER, 1982; CAIRNEY **et al.**, 1987; DALLAPICCOLA, 1987; TAKEKIYA **et al.**, 1987; ROSENDORFF &



BERNSTEIN, 1988; COHEN & LEVI, 1989; LASKO **et al.**, 1991).

Entre as cromossomopatias constitucionais que têm predisposição ao câncer está a síndrome de Down, com ocorrência de leucemias aproximadamente dezoito a vinte vezes maior do que a população geral (TOUGH **et al.**, 1961; COHEN & ERKMAN, 1966; MILLER, 1970; HECHT **et al.**, 1986). Pacientes com a síndrome de Klinefelter também têm risco aumentado de câncer de mama e existem inúmeras referências de neoplasias extragonadais nessa síndrome e em outras com aberrações dos cromossomos sexuais, como a síndrome de Turner (SANDBERG, 1983; HORSMAN **et al.**, 1987; VERP & SIMPSON, 1987) e a do duplo Y (GILGENKRANTZ, 1988), embora a relação entre elas ainda seja obscura.

O primeiro estudo da incidência de aberrações cromossômicas constitucionais em um grande número de pessoas com leucemias e condições afins foi feito por ALIMENA **et al.** (1985). Eles analisaram 1.400 pacientes e encontraram 18 deles com tais aberrações (1,3%). BENITEZ **et al.** (1987) obtiveram uma frequência semelhante em 718 indivíduos, enquanto FETT-CONTE (1987) detectou uma portadora de translocação t(15;Y) entre dezesseis pacientes com neoplasias.

Segundo HECHT (1987), PONDER (1990) e SANDBERG (1990), os estudos da incidência de anomalias cromossômicas constitucionais entre portadores de câncer deveriam incluir pacientes pediátricos, uma vez que tais aberrações podem levar seus portadores a óbito antes da vida adulta.

Um outro fenômeno citogenético que foi implicado na transformação neoplásica é representado pelos sítios frágeis (SF). Conforme definição proposta por SUTHERLAND (1979), os SF são regiões cromossômicas que sob determinadas condições *in vitro* originam frag-



I.5. Instabilidade cromossômica, sítios frágeis e neoplasias

A relação entre frequência elevada de aberrações cromossômicas adquiridas em tecido normal e predisposição ao câncer já está bem estabelecida nas síndromes de instabilidade cromossômica, doenças que estão associadas a defeitos no sistema de reparo ou de duplicação do DNA (COHEN & LEVY, 1989). Por exemplo, os pacientes com síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia telangiectasia mostram alta incidência de neoplasias e maior sensibilidade a diferentes agentes genotóxicos (CAIRNEY *et al.*, 1987; RÜMMELEIM *et al.*, 1992).

As células normais de pacientes portadores de câncer e, algumas vezes, de seus parentes saudáveis, também podem mostrar instabilidade cromossômica (NORDENSON *et al.*, 1984; ROSER *et al.*, 1989; FURUYA *et al.*, 1989; SCAPPATICCI *et al.*, 1989; BARRIOS *et al.*, 1990) embora tal situação nem sempre tenha sido confirmada por diferentes autores (TEDESCHI *et al.*, 1987; MERTENS *et al.*, 1988; MERTENS & JOHANSSON, 1988a,b). Apesar disso, não é possível descartar a hipótese de que pessoas cujos cromossomos são menos estáveis sejam mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores (HEIM *et al.*, 1989c; BARRIOS *et al.*, 1990). É esperado mesmo que um gradiente de instabilidade possa existir nas populações humanas, possivelmente relacionada com a ação de stress mutagênico (HSU *et al.*, 1989; RÜMMELEIN *et al.*, 1992).

Um outro fenômeno citogenético que foi implicado na transformação neoplásica é representado pelos sítios frágeis (SF). Conforme definição proposta por SUTHERLAND (1979), os SF são regiões cromossômicas que sob determinadas condições *in vitro* originam frag-



mentos, deficiências e figuras multirradiais.

Uma possível relação entre pontos específicos de quebra envolvidos em rearranjos observados em neoplasias e a localização de SF foi primeiramente proposta por HECHT & SUTHERLAND (1984). Em função da localização de 21 SF e de 50 pontos de quebra encontrados em neoplasias, esses autores verificaram uma associação estatisticamente significativa entre eles, que foi posteriormente confirmada por DE BRAEKLIER *et al.* (1985). Mais recentemente, POPESCU *et al.* (1990) e CAPOROSI *et al.* (1991) também observaram uma relação significativa entre localização de sítios frágeis, oncogenes e sítios de integração de vírus oncogênicos. De forma mais específica, JORDAN *et al.* (1989) e WEBB & HEATH (1991), LIU *et al.* (1989), VERNOLE *et al.* (1990), e SOKOVA *et al.* (1992) encontraram um aumento significativo no nível do FRA3B e outros, entre portadores da síndrome de von Hippel-Lindau, de câncer de pulmão, de neuroblastoma e de melanoma, respectivamente. Tal resultado, entretanto, não foi observado por PORFIRIO *et al.* (1989) em pacientes com carcinoma de pulmão. SUTHERLAND & SIMMERS (1988) já haviam colocado em dúvida associações desse tipo.

Em vista da controvérsia, parece razoável aguardar os esclarecimentos em nível molecular da estrutura e função dos SF para que o papel efetivo de tais regiões em neoplasias seja concluído.

1.6. Heteromorfismos e neoplasias

A heterocromatina constitutiva é composta de sequências de DNA satélite altamente repetitivas cujo papel e organização molecular ainda não foram completamente esclarecidos (KRISTOFFERSSON & PEEBLES, 1982), enquanto especificamente a inversão parcial do 9qh

et al., 1989). Existem sugestões de que pode estar envolvida na proteção contra agentes clastogênicos de áreas vitais do genoma, como o centrômero, os organizadores nucleolares e a eucromatina, no controle do mecanismo de atração entre homólogos e não homólogos e na promoção de trocas cromossômicas meióticas e mitóticas, contribuindo assim para a evolução ou para o desenvolvimento do câncer (SAMPAIO, 1983; REGE-CAMBRIM **et al.**, 1990).

A heterocromatina representa cerca de 20% do genoma humano e aparece em maior quantidade nos cromossomos 1, 9, 16 e Y (BABU & VERMA, 1986). Além da técnica de bandamento C, as regiões que contêm heterocromatina podem ser avaliadas por diferentes técnicas de bandamento, como Q, Ag-NOR, DA/DAPI, HOECHST/NETROPSIN, entre outras, e também com o uso de endonucleases de restrição seguido de coloração por Giemsa (VERMA & DOSIK, 1980; SCHULZE **et al.**, 1984; BABU & VERMA, 1986; WAHEDI & PAWLOWITZKI, 1987).

Os cromossomos que apresentam polimorfismos das regiões heterocromáticas, ou heteromorfismos, podem ser classificados pelo tamanho, posição, intensidade de coloração do bloco heterocromático e/ou por combinações diferentes desses critérios (VARELLA-GARCIA, 1982). A classificação proposta por PATIL & LUBS (1977), por exemplo, é baseada na medida do comprimento das bandas C dos cromossomos 1, 9 e 16 comparadas com o tamanho do braço curto do cromossomo 16.

A frequência de alguns heteromorfismos varia significativamente em certas populações humanas, sendo de modo geral mais proeminente em negros (VARELLA-GARCIA, 1982; ANDRADE, 1986). As inversões pericêntricas do bloco heterocromático do cromossomo 9, (9qh), ocorrem numa frequência de 1 a 3% em caucasóides (HOWARD-PEEBLES, 1982), enquanto especificamente a inversão parcial de 9qh



ou o aumento dessa região ocorre em 10% e 2%, respectivamente, nesse grupo populacional (VERMA & DOSIK, 1980; VARELLA-GARCIA, 1982).

Vários estudos têm tentado associar os heteromorfismos, tais como as variações do tamanho dos segmentos heterocromáticos, a frequência de inversões totais e parciais e o grau de simetria/assimetria entre homólogos, com doenças humanas. O aumento da região heterocromática do cromossomo 9 (9qh+), por exemplo, e as inversões pericêntricas têm sido discutidos como possíveis fatores de risco para retardo mental, malformações e anomalias cromossômicas na prole. Entretanto, em nenhuma dessas condições o significado clínico dos heteromorfismos foi suficientemente esclarecido (WAHEDI & PAWLOWITZKI, 1987; KRISTOFFERSSON *et al.*, 1989).

Em relação a um possível envolvimento dos polimorfismos heterocromomáticos na propensão ao câncer, um grande número de dados tem sido obtido e discutido por diversos autores que estudaram pacientes com diferentes tipos de doenças malignas.

ATKIN (1977) foi o primeiro a sugerir uma relação entre heteromorfismo de tamanho da heterocromatina do cromossomo 1 e susceptibilidade a algumas formas de câncer, como o carcinoma de ovário. Em 1979, SHABTAI & HALBRECHT observaram um aumento na frequência de heteromorfismos dos tipos 1qh+, 9qh+, além de inversão parcial ou total da heterocromatina dos cromossomos 1 e 9 em portadores de doenças hematológicas malignas e pré-malignas. Esses resultados foram confirmados por outros autores em pacientes com leucemias e doenças afins (ADHVARYU *et al.*, 1987, 1989; LABAL DE VINUESA *et al.*, 1984, 1985, 1988b; PETKOVIC *et al.*, 1987; KRISTOFFERSSON *et al.*, 1989), com carcinoma de cérvix uterino (ATKIN & BRITO



BABAPULLE, 1983; GHOSH **et al.**, 1986; MURTY **et al.**, 1987), com câncer de mama (BERGER **et al.**, 1985), com carcinoma e adenoma de colon e reto (HEIM **et al.**, 1985; SHABTAI **et al.**, 1985; LABAL DE VINUESA **et al.**, 1988a), com mieloma múltiplo (RANNI **et al.**, 1987) e com outros tumores sólidos (SUCIU, 1986; KOPF **et al.**, 1989). Contudo, muitas outras investigações não evidenciaram a mesma relação, tais como a de KIVI & MIKELSAAR (1980) em carcinoma de ovário e mama, AGUILAR **et al.** (1981) em carcinoma de estômago, colon, mama e útero, BERGER **et al.** (1983) em sarcoma de tecidos moles, as de SAMPAIO (1983, 1989) e SCHULZE **et al.** (1984) em algumas doenças hematológicas malignas e pré-malignas, e as de KRISTOFFERSON **et al.** (1985) em linfoma não Hodgkin.

O assunto, como pode ser deduzido, é polêmico e exige certamente mais dados para que sejam feitas conclusões.

1.7. Objetivos

Com base nas considerações citadas, fica evidente a importância tanto da pesquisa de aberrações cromossômicas específicas na célula neoplásica, principalmente em tumores sólidos onde os conhecimentos são mais restritos, quanto da investigação de anormalias e heteromorfismos cromossômicos constitucionais e adquiridos em seus portadores. Além disso, parece promissor o estudo de pacientes jovens que, se predispostos a neoplasias, podem não sobreviver até a idade adulta.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1)** Investigar a ocorrência de alterações e heteromorfismos cromossômicos constitucionais em linfócitos normais do sangue periférico

de pacientes jovens portadores de lesões benignas ou malignas, através de técnicas de bandamento cromossômico.

II.1. Material

2) Avaliar a instabilidade cromossômica através da análise de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas em células normais e/ou de tecido neoplásico provenientes de 29 indivíduos, três deles desses pacientes.

3) Pesquisar a ocorrência de aberrações cromossômicas clonais e não clonais nas células neoplásicas dos indivíduos.

Os pacientes foram encaminhados por diferentes serviços do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto e por clínicas particulares dessa cidade.

Os pacientes, 16 do sexo feminino e 13 do sexo masculino, eram caucasóides e tinham idades variando de quatro meses a 24 anos. De cada um deles foram colhidos dados sobre ocorrência de outros casos de neoplasias na família, evolução clínica da doença, atividades profissionais/exercidas e possíveis exposições a agentes tóxicos, além de outras informações que constam no item VIII.2..

A Tabela 5 contém os dados relativos ao tipo de lesão, seu comportamento, se benigno ou maligno, e sexo e idade dos 29 pacientes na época do estudo.

II.2. Métodos

Os meios de cultura e soluções utilizados para linfócitos e blastos do sangue periférico e para tecido sólido estão detalhados no item VIII.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material

Foram estudadas citogeneticamente amostras de linfócitos e/ou de tecido neoplásico provenientes de 29 indivíduos, três deles com leucemia, três com linfoma, 14 com tumores sólidos benignos e nove com tumores sólidos malignos. Com exceção de dois casos, o material foi obtido anteriormente ao tratamento quimio e radioterápico e foi encaminhado por diferentes serviços do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto e por clínicas particulares dessa cidade.

Os pacientes, 16 do sexo feminino e 13 do sexo masculino, eram caucasóides e tinham idades variando de quatro meses a 24 anos. De cada um deles foram colhidos dados sobre ocorrência de outros casos de neoplasias na família, evolução clínica da doença, atividades profissionais exercidas e possível exposição a agentes tóxicos, além de outras informações que constam no item VIII.2..

A Tabela 5 contém os dados relativos ao tipo de lesão, seu comportamento, se benigno ou maligno, e sexo e idade dos 29 pacientes na época do estudo.

II.2. Métodos

Os meios de cultura e soluções utilizados para linfócitos e blastos do sangue periférico e para tecido sólidos estão detalhados no item VIII.

Tabela 5. Caracterização da casuística quanto ao tipo e comportamento da lesão, sexo e idade dos pacientes (M: masculino; F: feminino; a: anos; m: meses; Be: benigno; Ma: maligno).

Caso	Lesão	Sexo	Idade
	Tipo	Comportamento	
608	lipoma	Be	F 6a
653	leucemia linfocítica aguda (L2)	Ma	F 16a
691	nevo melanocítico dérmico	Be	M 11a
696	nevo melanocítico dérmico	Be	F 11a
697	linfoma histiocítico difuso	Ma	F 3a
701	sarcoma de Ewing	Ma	F 4a
704	carcinoma basocelular	Ma	F 20a
706	tricoepitelioma	Ma	M 18a
708	linfoma linfocítico difuso bem diferenciado	Ma	M 10a
714	nevo azul variante celular	Be	F 11a
715	leucemia mielóide aguda	Ma	F 7a
724	adenocarcinoma de supra renal	Ma	M 5a
728	hepatoblastoma bem diferenciado	Ma	M 4m
740	adenocarcinoma gástrico moderadamente diferenciado	Ma	M 24a
748	bócio colóide multinodular	Be	F 18a
799	linfangioma cavernoso	Be	M 2a
823	leucemia linfocítica aguda (L1)	Ma	M 1a
824	adenocarcinoma de supra renal	Ma	F 2a
829	nevo melanocítico dérmico	Be	F 14a
840	cisto primordial (maxilar)	Be	F 7a
843	linfoepitelioma	Ma	F 11a
847	hemangioma capilar subcutâneo	Be	F 1a
851	quelóide	Be	F 12a
856	cicatriz hipertrófica	Be	M 9a
857	fibromatose plantar	Be	M 14a
858	linfoma linfocítico difuso pouco diferenciado	Ma	M 4a
868	teratoma maduro	Be	M 2a
920	hemangioma cavernoso	Be	F 4a
968	tumor de Wilms trifásico clássico	Ma	M 3a

* Designação dos tumores segundo resultados de exames hematológicos ou histopatológicos.

II.2.1. Linfócitos e blastos do sangue periférico

Foram cultivados linfócitos do sangue periférico dos pacientes, segundo a técnica descrita por MOORHEAD *et al.* (1960), com modificações.

Em cada frasco de cultivo foram adicionados aproximadamente 0,5ml de sangue, 6,0ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% d soro sanguíneo humano do tipo AB e 0,2ml de fito-hemaglutinina (PHA), fornecida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

Para cada paciente foram montados três ou quatro frascos de cultivo. Para aqueles com diagnóstico de leucemia foram montados dois ou três frascos adicionais que não receberam PHA e serviram para a análise dos blastos periféricos, ou seja, as células da linhagem maligna.

Após a semeadura, as culturas foram transferidas para estufa bacteriológica onde permaneceram a 37 C por 70 ou 24-48 horas, dependendo de serem destinadas à análise de linfócitos ou de blastos periféricos, respectivamente. Após esse período, foi adicionada colquicina em concentração final de $4,0 \times 10^{-5}$ M por cerca de 30 minutos e, em seguida, realizada a hipotonização do material com solução de KCl 0,075 M. A fixação foi feita com metanol: ácido acético (3:1) em três etapas de 20, 10 e cinco minutos, alternadas com a troca de fixador após centrifugações a 1000 rpm por oito minutos. A suspensão celular foi gotejada em lâminas geladas e úmidas, que foram secas ao ar. Após um período não superior a 24 horas, as lâminas foram incubadas em estufa a 85-90 C por 20 minutos.

Algumas lâminas foram submetidas à técnica de coloração usual. Para tanto, foram previamente hidrolisadas em solução salina duas vezes concentrada ($2 \times \text{SSC}$) a 60°C por cinco minutos e lavadas rapidamente em água desionizada gelada e em água destilada corrente por 10 minutos. Posteriormente, foram submetidas a um banho de solução tampão Sørensen, pH 6,8, coradas por cerca de quatro minutos com solução de Giemsa 2% e lavadas em água destilada.

As demais lâminas foram utilizadas para bandamento G e C. Para bandamento G, desenvolvido segundo GROUCHY & TURLEAU (1977) com modificações, o material foi imerso sequencialmente em solução de álcool metílico 50% e água destilada por dois minutos cada, e em tampão Sørensen, pH 6,8, por no mínimo 30 minutos. Logo após, foi tratado com solução de tripsina 0,2%, por um tempo variável de um a 20 segundos. Em seguida, o material foi imerso em solução salina de PBS por dois minutos, corado com solução de Giemsa 2% por três minutos e lavado em água destilada.

O bandamento C seguiu a técnica de SUMNER (1972) com modificações. O material foi colocado em HCl 0,2 N por 15 minutos e lavado em água destilada gelada. Posteriormente, foi tratado com solução de hidróxido de bário 5% a 37°C , por tempo variável de três a 30 minutos, com água destilada, e com dois banhos de solução salina $2 \times \text{SSC}$ a temperatura ambiente por 10 minutos e a 60°C por 60 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em água destilada gelada, desidratadas durante cinco minutos em álcool 70% e em álcool 90%, sendo finalmente coradas com solução de Giemsa 2%.

Para a pesquisa de quebras e falhas cromossômicas em linfócitos de sangue periférico foram analisadas 100 metáfases em coloração usual. Para caracterização do cariótipo foram analisadas



pelo menos 20 metáfases em bandamento G e 10 em bandamento C, sendo que, dessas últimas, pelo menos cinco foram fotografadas.

Todas as células em divisão provenientes de frascos sem estimulador mitótico foram consideradas como pertencentes à linhagem maligna. Devido ao curto período de cultura, as alterações observadas em duas ou mais células, independente de serem ou não da mesma réplica, foram consideradas clonais e indicativas de padrão semelhante **in vivo** (MORGAN & HECHT, 1985; MICHALOVÁ **et al.**, 1990).

A identificação e classificação dos eventos citogenéticos foi realizada de acordo com a Paris Conference (1971, 1975), ISCN de 1978, de 1985 e a de 1991. Especificamente, a classificação dos heteromorfismos foi realizada segundo PATIL & LUBS (1977), e se baseou na medida do comprimento das bandas C dos cromossomos 1, 9 e 16, comparadas com o tamanho do braço curto do cromossomo 16.

Para comparar as frequências observadas e esperadas de quebras e falhas cromossômicas em linfócitos de pacientes com lesões malignas e benignas, assim como para testar a homogeneidade das distribuições desses parâmetros entre os casos estudados, foi utilizado o teste estatístico do qui-quadrado (χ^2), sendo fixado em 1% o nível de significância (SOKAL & ROHLF, 1969). As frequências esperadas foram calculadas com base nos dados de LUBS **et al.** (PARIS CONFERENCE, 1971).

II.2.2. Tecidos neoplásicos sólidos

O estudo citogenético dos neoplasmas sólidos foi realizado após cultura das células obtidas de amostras do tecido tumoral, segundo técnica proposta por LIMON **et al.** (1986), com modificações.



Colheita

As amostras, com cerca de 0,5 a 1,0 cm³, foram colhidas assepticamente e transferidas para um recipiente estéril devidamente etiquetado contendo solução de Hanks com antibióticos. O material foi levado ao laboratório, acompanhado de informações gerais sobre o paciente, e foi mantido à temperatura ambiente ou a 5 C^o por um período não superior a 24 horas entre a colheita e o seu processamento, a fim de assegurar a viabilidade do mesmo.

Assepsia e descontaminação

Todas as amostras foram manipuladas em câmara de fluxo laminar vertical ou horizontal, previamente limpa com solução germicida e álcool 70%. Com o objetivo de eliminar possíveis contaminações introduzidas por ocasião da colheita e transporte, o material foi transferido para uma placa de Petri e lavado em três banhos consecutivos de solução de Hanks com antibióticos e fungicida.

Desagregação

O tecido, colocado em uma placa de Petri contendo algumas gotas de meio de cultura Ham F-10, foi cortado em pequenos fragmentos de 1-2 mm³ com auxílio de uma tesoura ou bisturi e de uma pinça. O material foi, então, transferido para um frasco plástico descartável com 0,5 ml de collagenase e 4,5 ml de meio completo e incubado a 37 C^o por 24 a 72 horas, dependendo do tipo tumoral, para desagregação enzimática. Espécimes maiores receberam 1-2 ml de collagenase e 9-18 ml de meio completo.



Cultivo celular

Após a ação da collagenase, a suspensão celular obtida foi pipetada várias vezes para melhor separação das células e, em seguida, centrifugada durante cinco minutos a 1000 rpm. O sedimento foi lavado em 5-10ml de meio de cultura e distribuído em três frascos plásticos descartáveis de 25 ml (Descarplast ou Costar) com 3,5 ml de meio de cultura suplementado com 10-20% de soro fetal bovino. Após 24 horas de incubação a 37 °C, o meio contendo material necrótico foi retirado e substituído. Para avaliação da atividade mitótica, os frascos foram examinados diariamente em microscópio invertido e o meio de cultura foi trocado a cada 4-5 dias, dependendo do crescimento celular observado. Nos casos em que esse crescimento não foi satisfatório, o meio utilizado a partir do sétimo dia de cultivo foi enriquecido com apenas 5% de soro fetal bovino, concentração essa inferior às concentrações utilizadas nos primeiros dias. Esse procedimento permitiu a seleção de células malignas em detrimento das normais, geralmente predominantes após uma semana de cultivo e sensíveis à ausência de soro (CHEN & SHAW, 1913; MIYAMOTO et al., 1988).

Bloqueio, hipotonização, fixação e coloração

As culturas que mostraram número suficiente de metáfases foram bloqueadas com a adição de 50 µl de colcemide (concentração final de 0,02 µg/ml) por uma a três horas. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído por 8 ml de solução hipotônica de citrato de sódio 1% pré-aquecida e o material foi reincubado por trinta



minutos. As células que, após esse tratamento, ainda permaneciam aderidas ao frasco foram destacadas com o auxílio de um raspador ("scraper") e a suspensão obtida foi centrifugada por cinco minutos a 1000 rpm. Em seguida, o material foi fixado com solução de metanol: ácido acético (3:1) em três etapas de 20, 10 e cinco minutos, alternadas com a troca de fixador após centrifugações a 1000 rpm por seis minutos. A suspensão celular foi gotejada em lâminas geladas e úmidas que foram flambadas, incubadas em estufa a 85-90 °C por 20 minutos e posteriormente submetidas à técnica de bandamento G.

Quando necessário, as lâminas foram também submetidas à técnica de bandamento Ag-NOR, segundo HOWELL & BLACK (1980), para coloração das regiões organizadoras do nucléolo. Para isso, foram pipetadas, nas lâminas, a solução reveladora e a solução aquosa de nitrato de prata. Essas foram cobertas com lamínulas, incubadas por três a 10 minutos a 55-60 °C, lavadas em água corrente e, posteriormente, coradas com solução de Giemsa a 2% por cinco minutos.

Análise cromossômica

A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico marca Carl Zeiss JENA, modelo JENAVAL e os eventos citogenéticos fotografados em microscópio Carl Zeiss OBERKOCHEN, standard WL, com filme Kodak Panatomic X, 32 ASA. As cópias fotográficas foram feitas em papel Kodabrome Print RC F3 ou Kodabromide F3.

Foi estudado o maior número possível de metáfases de cada uma das réplicas cultivadas. A análise foi considerada total quando permitiu a identificação de todos os cromossomos da célula, e parcial quando pelo menos sete pares cromossômicos puderam ser



III. RESULTADOS

identificados. Em algumas metáfases só foi possível a contagem exata ou aproximada dos cromossomos e/ou a exclusão ou confirmação de alguma aberração que estava sendo investigada. A análise deste tipo foi denominada simples. A investigação em coloração usual só foi realizada em metáfases cujos cromossomos, após o tratamento com tripsina, não apresentaram bandas.

A identificação e classificação dos eventos citogenéticos seguiram os critérios gerais utilizados para análise dos linfócitos. Foi considerada clonal a alteração estrutural ou hiperdiploidia observada em duas ou mais células oriundas de réplicas diferentes da mesma cultura. Em relação às hipodiploidias, a clonalidade só foi considerada quando a anomalia estava presente em três células de duas ou mais réplicas da cultura. A poliploidia e a endoreduplicação, mesmo obedecendo a esses critérios, não foram consideradas anomalias clonais (MITELMAN, 1985; MERTENS *et al.*, 1989a; SANDBERG, 1990).

Os resultados citogenéticos obtidos a partir de linfócitos foram considerados. Os resultados citogenéticos obtidos a partir de células tumorais não cresceram *in vitro* e apenas os resultados citogenéticos obtidos a partir de linfócitos foram considerados.

A Tabela 6 apresenta os dados relativos ao tipo celular estudado em cada caso. O número de metáfases analisadas após cultura de linfócitos e do tecido neoplásico de cada indivíduo está apresentado na Tabela 7.

Nenhum dos pacientes apresentou história familiar de neoplasia ou de exposição crônica a agentes tóxicos, salvo o caso

III. RESULTADOS

Foram cultivadas amostras de linfócitos de 39 indivíduos e tecido neoplásico benigno e maligno de 43, mas em 14 deles (seis portadores de leucemias e oito de tumores sólidos) tais amostras sofreram contaminação ou não mostraram crescimento celular satisfatório. Dos 29 indivíduos restantes, os linfócitos de 25 e o tecido neoplásico de 19 deles foram analisados citogeneticamente. Portanto, o cultivo de 36% (14/39) das células normais e de 56% (24/43) das neoplásicas resultaram em insucesso. No primeiro grupo, a causa do insucesso foi a qualidade ou número insuficiente de metáfases obtidas. No segundo, a principal causa foi a ausência de crescimento (17/43), seguida da contaminação da cultura (7/43), que na maioria dos casos (6/7) foi observada, em microscópio invertido, durante a desagregação enzimática.

Em relação aos linfócitos, as culturas dos casos 608, 653, 691 e 706 não puderam ser repetidos porque os pacientes após a colheita do material, foram encaminhados para radio ou quimioterapia ou se recusaram a novos testes. Em dez casos (697, 708, 724, 799, 823, 824, 829, 843, 851 e 858), as células tumorais não cresceram *in vitro* e apenas os resultados citogenéticos obtidos a partir de linfócitos foram considerados.

A Tabela 6 apresenta os dados relativos ao tipo celular estudado em cada caso. O número de metáfases analisadas após cultura de linfócitos e do tecido neoplásico de cada indivíduo está apresentado na Tabela 7.

Nenhum dos pacientes apresentou história familiar de neoplasia ou de exposição crônica a agentes tóxicos, salvo o caso

Tabela 7. Número de esfíndas analisadas em cada caso, após cultura de linfócitos ou de células do tecido neoplásico (Ma: malignos; Be: benignos; B: bandamento G; C: bandamento C; P: análise simples).

Tabela 6. Resultados relativos ao tipo celular estudado em cada caso (Ma: malignos; Be: benignos).

Caso	Linfócitos	Tecido neoplásico		Total
		Sólido	Não sólido	
Ma 653	10	29	14	43
697	10	69	15	84
701	10	9	5	14
704	14	10	1	25
715	10	8	4	12
724	7	10	6	13
728	10	71	25	106
740	10	34	24	68
823	10	10	6	16
824	12	10	1	23
843	10	10	1	21
858	3	10	1	14
968	10	69	20	99
Be 608	11	95	15	121
691	11	14	6	21
748	10	10	2	22
799	10	10	1	21
829	10	10	1	21
840	10	6	13	19
847	10	51	11	62
851	10	10	1	21
856	10	18	20	38
857	10	26	6	32
868	10	12	3	15
920	5	130	4	135
920	5	130	4	135
Total 565	235	683	191	1.249
Total	25	17	2	

Tabela 7. Número de metáfases analisadas em cada caso, após cultura de linfócitos ou de células do tecido neoplásico (Ma: malignos; Be: benignos; G: bandamento G; C: bandamento C; U: coloração usual; T: análise total em bandamento G; P: análise parcial em bandamento G; S: análise simples).

Caso	Linfócitos				Células do tecido neoplásico				
	G	C	U	Total	T	P	U	S	Total
Ma 653					7	7	9		23
697	20	12	100	132					
701	20	10	100	130	29	16	35	4	84
704	20	10	100	130	69	15	29	2	115
706					9	5	1	3	18
708	20	14	100	134					
715	20	10	100	130	8	4	6	1	19
724	20	7	100	127					
728	20	10	100	130	71	25	24	9	129
740	20	10	100	130	34	24	6	5	69
823	20	10	100	130					
824	20	12	100	132					
843	20	10		30					
858	20	3	100	123					
968	20	10	100	130	69	20	1	7	97
Be 608								32	32
691					95	15	29	11	150
696	20	11	100	131	12	5	32		49
714	20	11	100	131	14	6	24		44
748	20	10	100	130		2	46	1	49
799	20	10	100	130					
829	20	10	100	130					
840	20	10	100	130	6	13	20	16	55
847	20	10	100	130	51	11	5		67
851	20	10	100	130					
856	26	10	100	136	18	20	11	10	59
857	20	10	100	130	26	6	7	7	46
868	20		100	120	12		3	2	17
920	20	5	100	125	160	4		6	170
Total	506	235	2.400	3.141	683	191	279	116	1.269

740 que era fumante (cerca de 20 cigarros por dia). Doze pacientes (701, 704, 708, 724, 728, 799, 829, 840, 858, 868, 920 e 968) foram submetidos a raio X para investigação diagnóstica antes do estudo citogenético e dois (799 e 823) fizeram uso de antibióticos nesse mesmo período. Exceto os pacientes 653 e 843, que foram estudados após um intervalo de dois anos e um mês do tratamento quimio/radioterápico e após 20 dias do início do tratamento radioterápico, respectivamente, os demais foram investigados anteriormente a essas terapias.

A análise dos linfócitos submetidos ao bandamento G não revelou alterações cromossômicas constitucionais em qualquer dos indivíduos da amostra. Contudo, a análise em bandamento C detectou variantes heteromórficas nos casos 696, 697 e 851. Os dois primeiros apresentaram inversão parcial do cromossomo 9 e cariótipo 46,XY,inv(9)(p11q12.1), enquanto o caso 851 mostrou aumento da região 9qh (Figura 1a-f). O primeiro e o último eram portadores de tumores benignos de pele e o segundo de linfoma.

III.1. Análise de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas

A Tabela 8 apresenta a frequência de metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas entre 100 linfócitos estudados em coloração usual, numa amostra de 24 indivíduos. Pode ser observado que nove deles exibiram frequência de metáfases com anomalias superior a 5%, em especial os casos 724 e 728 cujas frequências foram 42% e 39%, respectivamente. Com exceção dos pacientes 696 e 799, os outros sete eram portadores de neoplasias malignas.



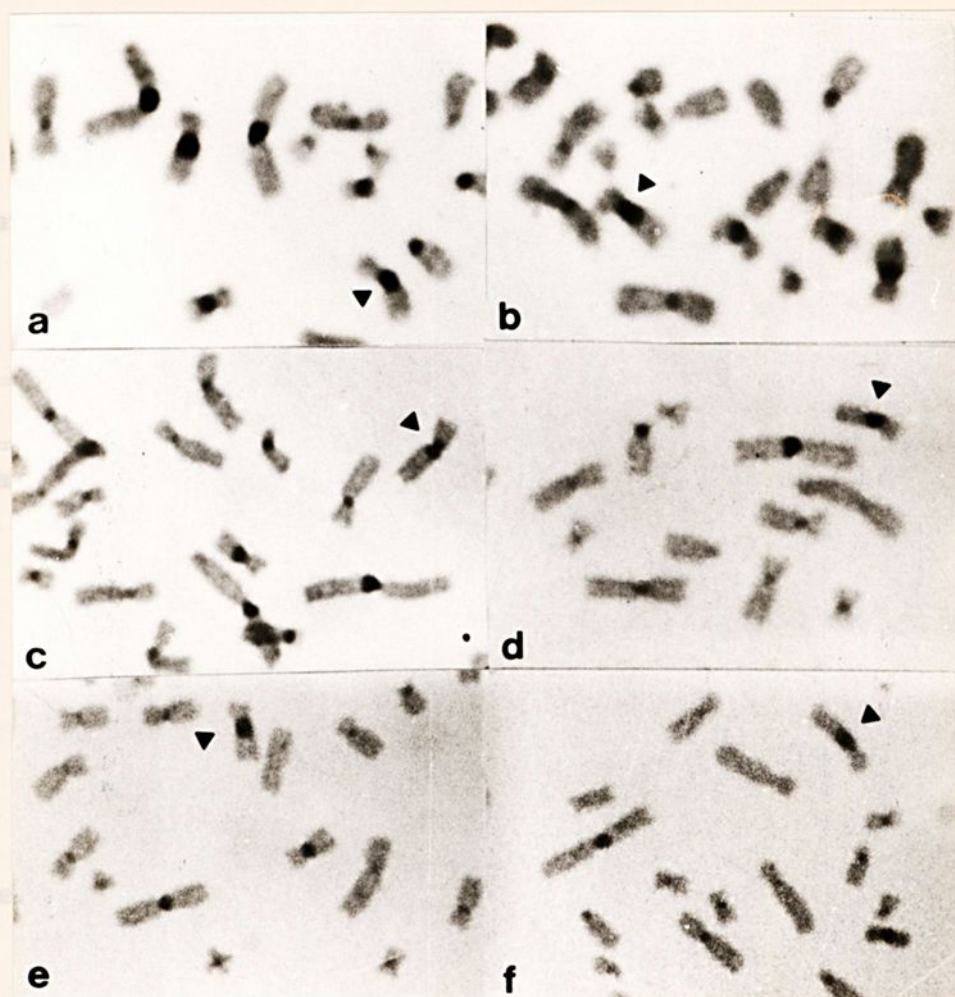


Figura 1. Metáfases parciais de linfócitos exibindo a inversão parcial da região heterocromática do cromossomo 9 nos casos 696 (a,b) e 697 (c,d), e o aumento dessa região no caso 851 (e,f).

Tabela 8. Frequência percentual de metáfases de linfócitos com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas em 24 casos (Ma: malignos; Be: benignos).

	Caso	%
Ma	697	5
	701	0
	704	15
	708	13
	715	12
	724	42
	728	39
	740	4
	823	12
	824	5
	858	12
Be	968	5
	696	11
	714	4
	748	5
	799	8
	829	2
	840	4
	847	1
	851	2
	856	4
	857	2
	868	4
	920	4

A distribuição das quebras e falhas ao longo dos braços curto e longo e na região centromérica, por cromossomo ou grupo cromossômico para cada indivíduo, pode ser observada na Tabela 9. Em alguns segmentos cromossômicos esses eventos foram encontrados em frequências iguais ou superiores a 3% em dez pacientes, dois dos quais com lesões benignas (696 e 799) e oito com neoplasmas malignos (697, 704, 708, 715, 724, 728, 823 e 858). Contudo, na maioria deles, as anomalias não ocorriam nas mesmas regiões do braço cromossômico afetado, com exceção dos casos 724 e 823. No primeiro, as quebras e falhas vistas no braço longo do cromossomo 2 foram mais frequentes na região proximal (6/10) que nas regiões mediana (2/10) e terminal (2/10), enquanto no segmento Bq, entre os 16 eventos observados, doze eram terminais e quatro eram medianos. No caso 823, as anomalias detectadas em Cq foram mais frequentes na região proximal (8/9) que na região mediana (1/9), e a morfologia dos cromossomos envolvidos era diferente.

As amostras dos pacientes 724 e 728 foram as que exibiram maior número de quebras e falhas cromossômicas. Os linfócitos de ambos foram cultivados como os dos demais casos e com dez dias de intervalo entre as duas culturas. A Tabela 10 mostra que a distribuição das alterações nos diferentes grupos cromossômicos desses dois indivíduos diferem significativamente das frequências esperadas com base nos dados de LUBS **et al.** (PARIS CONFERENCE, 1971), no nível de 1% de significância. Em ambos os pacientes, os cromossomos do grupo B mostraram anomalias em uma frequência bastante superior ao esperado, ao contrário dos grupos E, F e G com valores inferiores ao esperado.

A Tabela 11 apresenta a distribuição das quebras e falhas



Tabela 9. Distribuição das frequências de quebras e falhas ao longo dos braços curto (p), longo (q) e na região centromérica (c) dos cromossomos ou grupo cromossômico observadas na análise de linfócitos de 24 pacientes (Ma: malignos; Be: benignos).

Caso	Total de Eventos	1		2			3		B			C+X			D	16			17+18			F		G+Y
		p+q	c	p	q	c	p+q	c	p	q	c	p	q	c	q	p	q	c	p	q	c	p+q	c	q
Ma 697	7	3				1			1					2										
701	0																							
704	15	2							3			8			1						1			
708	13	1					1		4			4								1		1		1
715	12				2				2			4			2		1							
724	77	4		1	10		5		1	16		4	26	1	4	1	1				1		1	1
728	69	7		2	3	1	2		1	19	1	7	18	2	3		1				2			
740	4						1		1					1	2									
823	18	1	1		1		2		2			9			1					1				
824	6											1	2	1	1									1
858	13	2			1							1	6		3									
968	5	2					1					1	1											
Be 696	11						2		2			1	3		2						1			
714	5						1		1			1					1				1			
748	5	1							1					1	1									1
799	9	1		1								2	5											
829	2											1			1									
840	4				1							1	1		1									
847	1	1																						
851	2	1																						
856	4						1		1			2			1									
857	2											1									1			
868	5	1		1				1				2												
920	4						2					1			1									
Total	293	27	1	5	18	2	18	1	5	50	1	19	96	6	24	1	4		1	6	2	2		4

Tabela 10. Comparação das frequências relativas de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas observadas (O) e esperadas (E) em relação ao tamanho dos cromossomos metafásicos, nos casos 724 e 728 (teste do qui-quadrado χ^2 , **: $P < 0,01$).

Distribuição	Grupo cromossômico					Total	χ^2	gl
	A	B	C+X	D	E+F+G+Y			
724								
O	20	17	31	4	5	77	15,51**	4
E	17,23	9,16	28,26	7,96	14,39			
728								
O	15	21	27	3	3	69	30,02**	4
E	15,44	8,21	25,33	7,13	12,89			
Tamanho relativo do lote 2n	46,58	24,76	76,42	21,52	38,90	208,18		

* Com base nos dados de LUBS et al. (PARIS CONFERENCE, 1971).

cromossômicas observadas nos 12 pacientes portadores de neoplasias malignas e nos 12 portadores de lesões benignas e a das casualmente esperadas com base nos dados de LUBS et al. (PARIS CONFERENCE, 1971). No primeiro grupo, além de uma frequência muito maior desses eventos, a distribuição dos mesmos diferiu significativamente da esperada (χ^2 : $X = 43,70$; 6 g.l.; $P(0,01)$), mesmo quando os casos 724 e

Tabela 11. Comparação das frequências relativas de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas observadas (O) e esperadas (E) em relação ao tamanho dos cromossomos metafásicos, nos casos de lesões malignas (Ma) e benignas (Be) (teste do qui-quadrado de X^2 , **: $P(0,01)$).

Distribuição	Cromossomo ou grupo cromossômico							Total	χ^2 gl		
	1	2	3	B	C+X	D	E+F+G+Y				
Ma	O	23	22	12	51	99	17	15	239	43,70**	6
	E	19,38	18,42	15,68	28,43	87,73	24,70	44,66			
Be	O	5	3	7	5	21	7	5	53	7,19	6
	E	4,30	4,08	3,48	6,30	19,46	5,48	10,90			

Tamanho relativo do lote 2n#		16,88	16,04	13,66	24,76	76,42	21,52	38,90	208,18		

Com base nos dados de LUBS et al. (PARIS CONFERENCE, 1971). Tanto os casos 698 e 849 apresentaram maior número de células com endorreduplicação (19% e 6%). A amostra 847 não exibiu metáfases com essas alterações. A frequência média de poliploidia e endorreduplicação em lesões malignas foi de 12% e 2% e em lesões benignas de 16% e 3%, respectivamente.

cromossômicas observadas nos 12 pacientes portadores de neoplasias malignas e nos 12 portadores de lesões benignas e a das casualmente esperadas com base nos dados de LUBS **et al.** (PARIS CONFERENCE, 1971). No primeiro grupo, além de uma frequência muito maior desses eventos, a distribuição dos mesmos diferiu significativamente da esperada ($\chi^2 = 43,70$; 6 g.l.; $P < 0,01$), mesmo quando os casos 724 e 728 não foram considerados ($\chi^2 = 27,53$; 6 g.l.; $P < 0,01$), o que não ocorreu com o segundo grupo ($\chi^2 = 7,19$; 6 g.l.; $P < 0,01$). De maneira geral, os cromossomos dos grupos E, F e G revelaram quebras menos frequentemente que o esperado, enquanto os demais grupos tiveram mais anomalias que o esperado, em especial os grupos B e C.

Em relação ao estudo de células tumorais realizado no presente trabalho, entre as 15 amostras de lesões malignas, incluindo leucemias e linfomas, e as 14 de lesões benignas. Apenas 19 amostras puderam ser analisadas citogeneticamente, em função de contaminações ou ausência de crescimento celular, sendo oito de neoplasias malignas e 11 de benignas.

A frequência de células poliplóides detectadas entre os tumores sólidos variou de zero a 60%, com média de 16%, e a de endorreduplicação variou de zero a 19%, com média de 2%. Os casos 608, 968, 840 e 857 foram os que mostraram maior frequência de poliploidia (60%, 60%, 31% e 22%, respectivamente), enquanto os casos 608 e 868 apresentaram maior número de células com endorreduplicação (19% e 6%). A amostra 847 não exibiu metáfases com essas alterações. A frequência média de poliploidia e endorreduplicação em lesões malignas foi de 12% e 2% e em lesões benignas de 16% e 3%, respectivamente.



Na tentativa de relacionar os dados obtidos, os casos foram reunidos em três grupos: tumores mesenquimais, tumores epiteliais e tumores formados por mais de um tipo celular ou de origem incerta. As características clínicas e citogenéticas de cada caso serão descritas a seguir, essas últimas resumidas na Tabela 12, que apresenta os achados cariotípicos de todos os pacientes, com exceção do caso 968 que será detalhado separadamente. As designações de **Ma** e **Be** após o número do caso se referem a neoplasma maligno e benigno, respectivamente.

III.2. Tumores mesenquimais

A. Tecido hematopoético

Caso 653 Ma - Leucemia linfocítica aguda (L2)

Em maio de 1984, a paciente foi diagnosticada L2 e apresentava sinais típicos de sua doença. Foi iniciada, na época, a quimioterapia e a paciente mostrou remissão completa da doença mas, seguidos alguns meses, desenvolveu mielopatia tóxica pós-quimioterapia. O tratamento foi suspenso temporariamente e após novos reforços, aplicados até setembro de 1986, apresentou quadro clínico completamente assintomático. Em outubro de 1988, ou seja, depois de dois anos e um mês, a paciente, com 16 anos de idade, retornou com queixa de manchas rochas nos membros, fraqueza e broncopneumonia. Foi então colhido sangue para análise citogenética. Em seguida, recebeu quimioterapia mas evoluiu para parada cardiorrespiratória, indo a óbito no mesmo mês.

O material obtido que foi cultivado por 72 horas com PHA



não mostrou condições de análise, enquanto aquele cultivado por 24 horas e sem adição de mitogênicos resultou em 23 metáfases. Dessas, sete foram totalmente e sete parcialmente analisadas em bandamento G e nove foram analisadas em coloração usual. Todas as células apresentaram um rearranjo complexo envolvendo os cromossomos 4, 7 e 11. A qualidade do material não permitiu o completo esclarecimento do evento e foi sugerida a seguinte fórmula cariotípica: 46,XX,t(4;7;11)(4qter->4q21::11q13->11pter;7qter->7p14->4pter;11qter->11q13::4q21->4p14::7p22->7pter) (Figura 2 e 3). Nenhuma célula exibiu poliploidia, endoreduplicação ou outra alteração numérica ou estrutural.

Caso 697 Ma - Linfoma histiocístico difuso

Cerca de cinco meses antes do diagnóstico, a paciente, com três anos de idade, apresentou dor e aumento de volume da região inferior do abdome, febre e vômitos. Uma parte do material, retirada na ressecção do tumor, foi cultivada mas não apresentou crescimento **in vitro**. A análise cariotípica dos linfócitos do sangue periférico revelou inversão parcial da heterocromatina constitutiva do cromossomo 9, após bandamento C (Figura 1c,d), e frequência de metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas igual a 5%.

A paciente, que não havia sido exposta a raio X ou ingerido medicamentos na época do estudo foi, então, submetida a tratamento quimioterápico e apresentou boa evolução.

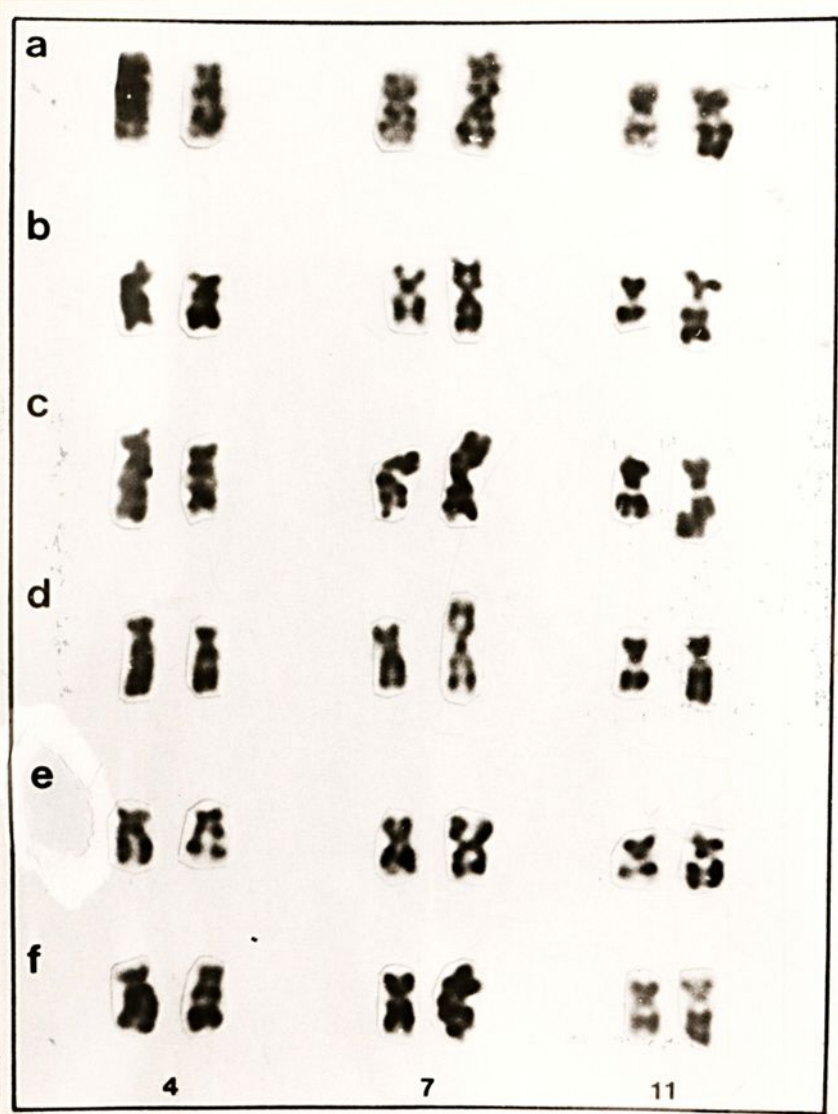


Figura 2. Cariogramas parciais de blastos do caso 653 ilustrando o rearranjo complexo envolvendo os cromossomos 4, 7 e 11. Os cromossomos homólogos normais estão apresentados à esquerda.

Caso 746 Ma - Linfoma linfocítico difuso bem diferenciado

A paciente, de 10 anos de idade, manifestou pequenas tumorações localizadas atrás das orelhas, que doam à palpção e incham. Foi feita a excisão de cefalica com o uso de um corte de

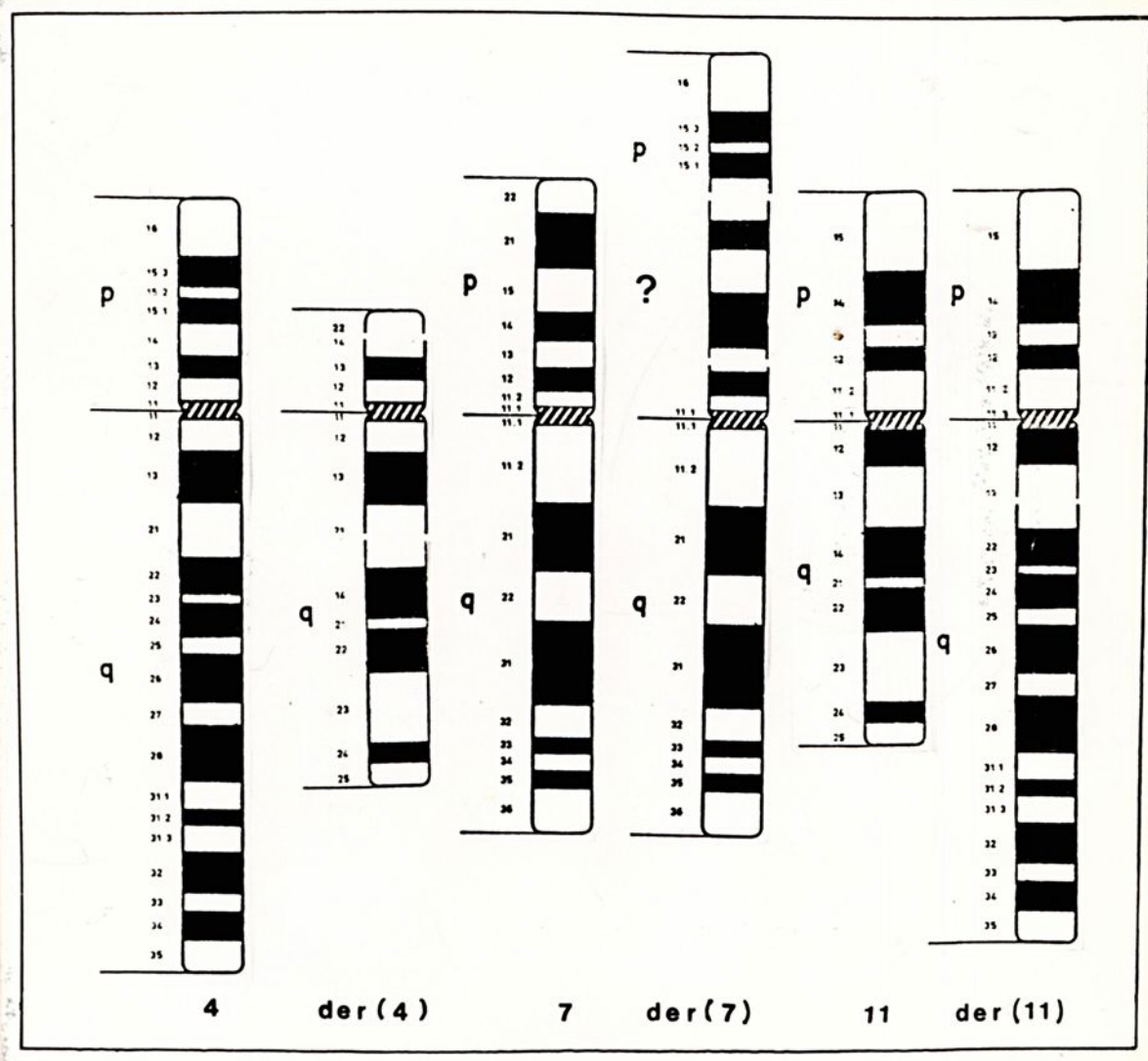


Figura 3. Representação esquemática dos cromossomos 4, 7 e 11 normais e alterados do caso 653, com cariótipo sugerido como: 46,XX,t(4;7;11)(4qter-→4q21::11q13-→11pter;7qter-→?:4p14-→4pter;11qter-→11q13::4q21-→4p14::7p22-→7pter).

Caso 708 Ma - Linfoma linfocítico difuso bem diferenciado

A paciente, de 10 anos de idade, manifestou pequenas tumorações localizadas atrás das orelhas, que doíam à palpação e inchavam. Foi feita a exérese de gânglios cervicais e uma parte do material foi enviada ao laboratório para cultivo mas as células não cresceram **in vitro**. A análise dos linfócitos do sangue periférico, que foram colhidos um dia após a realização de raio X de tórax, revelou cariótipo normal e 13% de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

Caso 715 Ma - Leucemia mieloide aguda

A leucemia da paciente foi diagnosticada em maio de 1989, quando ela tinha sete anos de idade, época em que foi realizado o estudo citogenético. Sua história consistia de sangramento gengival, fadiga, fraqueza, anemia, gânglios palpáveis e manchas rochas pelo corpo, sintomas esses que se iniciaram cerca de um mês antes do primeiro exame clínico. A paciente, que não havia sido exposta a raio X ou ingerido drogas na época do diagnóstico e dos exames laboratoriais, recebeu tratamento quimioterápico, mas sua evolução não foi satisfatória e desenvolveu quadro de aplasia pulmonar com óbito em junho do mesmo ano.

Uma amostra do sangue periférico foi cultivada em duas e três réplicas, respectivamente por 72 e 48 horas, com e sem adição de PHA. Nas culturas sem estímulo mitogênico, foram observadas apenas 19 metáfases, uma delas com endoreduplicação. Foi realizada análise total em oito, parcial em quatro, usual em seis metáfases e

simples em uma, que exibiram cariótipo 45,XX,-8,-15,+mar, com exceção de uma célula que não apresentou a monossomia 15. Embora a qualidade do material analisado não tenha permitido a caracterização completa do marcador, ele provavelmente derivou de um cromossomo 8 com deficiência intersticial do seu braço longo (Figura 4).

Nas réplicas que receberam PHA, 12% das células apresentaram quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

Caso 823 Ma - Leucemia linfocítica aguda (L1)

O paciente, de um ano de idade, foi encaminhado ao médico com queixa de manchas arroxeadas pelo corpo, diarreia e febre, além de edema nos membros inferiores e desmaios, sintomas esses iniciados dois meses antes da consulta. Foi colhida uma amostra de sangue, durante uso de antibióticos, para realização de estudo citogenético.

Os linfoblastos periféricos não apresentaram crescimento em culturas de 48 horas e só foi possível a análise dos linfócitos, que mostraram cariótipo normal e quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas em 12% deles.

Caso 858 Ma - Linfoma linfocítico difuso pouco diferenciado

Figura 4. Cariogramas parciais de blastos do caso 715, mostrando a monossomia dos cromossomos 8 e 15 e o cromossomo marcador.

O paciente, com quatro anos de idade, apresentou uma massa abdominal com 15 dias de evolução. Uma parte do material foi cultivada e não mostrou crescimento *in vitro*. A análise citogenética dos linfócitos do sangue periférico, colhidos cinco dias após radio-

grafia torácica e abdominal, mostrou cariótipo normal e 12% das células com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

B. Tecido conjuntivo e derivados

Caso 698 Be - Lipoma

A paciente, de seis anos de idade, manifestava uma massa abdominal com quatro anos de evolução. O material foi cultivado em

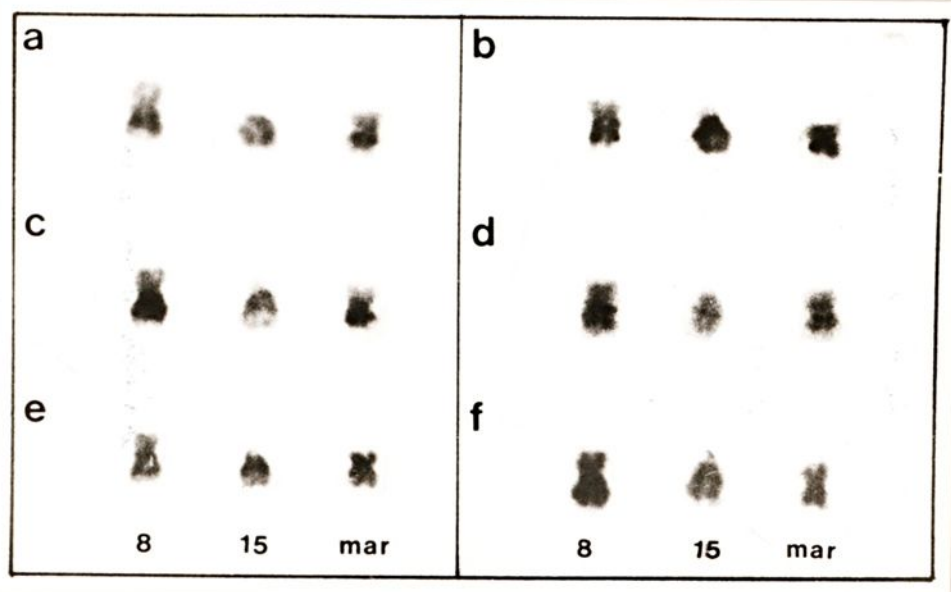


Figura 4. Cariogramas parciais de blastos do caso 715, mostrando a monossomia dos cromossomos 8 e 15 e o cromossomo marcador.

O paciente, de 14 anos, era epilético desde os três meses de idade e manifestava retardo mental. Há mais de um ano apresentava queixa de nodulação dolorosa na região plantar esquerda que crescia progressivamente. Parte da lesão foi cultivada por 11

grafia torácica e abdominal, mostrou cariótipo normal e 12% das células com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

B. Tecido conjuntivo e derivados

Caso 608 Be - Lipoma

A paciente, de seis anos de idade, manifestava uma massa abdominal com quatro anos de evolução. O material foi cultivado em três réplicas e mostrou crescimento celular nas primeiras 24 horas. Permaneceu em cultivo por 12 dias e sofreu bloqueio da divisão celular com adição de colcemide por uma hora, obedecendo os protocolos rotineiramente utilizados no laboratório. Todas as 32 metáfases obtidas, entretanto, apresentaram cromossomos com aspecto "pulverizado" (Tabela 12; Figura 5). Dessas, 19 puderam ser identificadas como polilplóides e seis exibiram endoreduplicação. Não houve crescimento dos linfócitos, cultivados na mesma época das células do tumor, e a família não permitiu a realização de um novo exame. A criança não havia sido exposta a drogas ou a raio X e não desenvolveu doenças nas semanas que antecederam o estudo citogenético.

Caso 857 Be - Fibromatose plantar

O paciente, de 14 anos, era epilético desde os três meses de idade e manifestava retardo mental. Há mais de um ano apresentava queixa de nodulação dolorosa na região plantar esquerda que crescia progressivamente. Parte da lesão foi cultivada por 11



Tabela 12. Aberrações cromossômicas não clonais, excluídas as poliploidias e endoreduplicações sem outras alterações, total de metafases analisadas (ME) e período de cultivo em dias (PC) nos tumores sólidos estudados, exceto o caso 968. Com exceção do caso 608, cada fórmula cariotípica corresponde a uma célula estudada (Ma: maligno; Be: benigno).

Caso	ME	Aberração cromossômica	PC
TUMORES MESENQUIMAIS			
Tecido conjuntivo e derivados			
608 Be	32	pvz(v)	12
857 Be	46	46,XY,22p+ 45,XY,-9 45,XY,-18 45,XY,-20 91,XXYY,-18	11
Tecido endotelial			
847 Be	67	46,XX,-7,+mar 45,-X,-X,+7mar 46,X,+9,-X 45,XX,-6 45,XX,-14 44,XX,-15,-17 45,XX,-C	11
920 Be	170	88,XXXX,t(5;6)(q31;q23)x2,-8,-8,-9,-19 46,XX,del(9)(p13-pter),-12,+mar 46,XX,6q- 45,XX,-11 45,XX,-C 45,XX,-14 44,X,-X,-9 87,XXX,-X,-5,-12,-14,-15	5-7
TUMORES EPITELIAIS			
Pele			
691 Be	150	46,XY,t(1;12)(p36;q34) 46,XY,t(1;3) 46,XY,+E,-C 46,XY,dmin 45,XY,-5 45,XY,-7 45,XY,-14 45,XY,-18 45,XY,-20 45,XY,-G 44,XY,-5,-7 44,XY,-B,-G 44,XY,-10,-21 44,XY,-18,-21 43,XY,-4,-8,-9 43,XY,-4,-9,-17 43,XY,-5,-7,-19 43,XY,-6,-10,-11 43,X,-X,-1,-21 92,XXYY,+8,-5, 92,XXYY,+16,-12 89,XXYY,-10,-10,-13	15

Tabela 12. (continuação).

Caso	HE	Aberração cromossômica	PC
696 Be	49	46,XX,4q+ 46,XX,13q+ 46,XX,Dq+ 46,XX,Gq+ 47,XX,+mar 45,XX,-7 45,XX,-18 45,XX,+C,-E,-F	23
704 Ma	115	46,XX,t(3;5)(q21;q31) 46,XX,t(10;13)(q22;q32) 45,XX,del(2)(q33-qter),-9 46,XX,del(2)(q33-qter),1q+,-5,+mar 46,XX,del(7)(p11-pter),-22,+mar 46,XX,13q-,14q+ 46,XX,-18,+mar 45,XX,-C,-D,+mar 45,XX,-22 45,XX,-6 44,XX,-14,-22 43,XX,-4,-15,-19	9
706 Ma	18	45,XY,-18,-18,+mar 45,XY,-11	13
714 Be	44	45,XX,-22	20
856 Be	59	46,XY,-C,+mar 47,XY,+C,+D,+D,-1,-B,	10
Glândula			
728 Ma	129	46,XY,-19,+mar 46,XY,+18,-12 45,XY,-19 45,XY,-D 45,XY,-G 44,XY,-9,-20 44,XY,-C,-C 40,XY,-1,-2,-B,-C,-D,-16 92,XXYY,-1,+C 81,XY,-X,-4-11,-14,-18,-19,-21,-22,-22	6-16
740 Ma	69	46,XY,del(1)(p31-pter) 46,XY,del(2)(p23-pter) 46,XY,del(4)(q31-qter) 46,XY,del(9)(q22-qter),-21,+mar 46,XY,Bp- 47,XY,+1 46,XY,+8,-12 45,XY,-1 45,XY,-C,ace,ace 45,XY,-19 45,XY,-G 88,XXYY,-B,-C,-C,-16	7

Tabela 12. (continuação).

Caso	HE	Aberração cromossômica	PC
748 Be	49	45,X,-X 41,XX,-1,-D,-D,-F,-G 92,XXXX,+F,+G,-C,-17	4
Outros			
840 Be	55	47,XX,-1,-10,+mar,+mar,+mar 46,XX,+C,-B,-19,+mar 47,XX,+C,+G,-1 47,XX,+C 46,XX,+C,-2 46,XX,+C,-3 46,XX,+C,-D 45,XX,-C 45,XX,-D 45,XX,-17 45,XX,-21 44,XX,-C,-22 43,XX,-1,-C,-C 91,XXXX,-1 90,XXXX,-D,-17 88,XXXX,-C,-C,-C,-18	22
TUMORES FORMADOS POR MAIS DE UM TIPO CELULAR OU DE ORIGEM INCERTA			
701 Ma	84	46,XX,t(2q;Dq) 43,X,del(3)(p13-)pter),+?16,-X,-3,-8,-18 46,XX,13q++ 47,XX,+mar 46,XX,+18,-C 45,XX,-B 45,XX,-14 45,XX,-21 45,XX,-22 45,XX,-G 43,XX,-C,-18,-19 42,-X,-X,-E,-G 38,XX,+2,-1,-3,-B,-C,-C,-C,-C,-C,-G 43,-X,-X,-12	14
868 Be	17	44,XY,-13,-14,-15,+mar 41,X,-Y,-5,-5,-7,-11,-16,+?mar 43,XY,-1,-3,-9,-21,+?r 45,XY,-19 37,-X,-Y,-7,-11,-12,-14,-18,-21,-21	10

Figura 5. Metáfases do caso 868 mostrando cromossomos com aspecto "pulverizado".

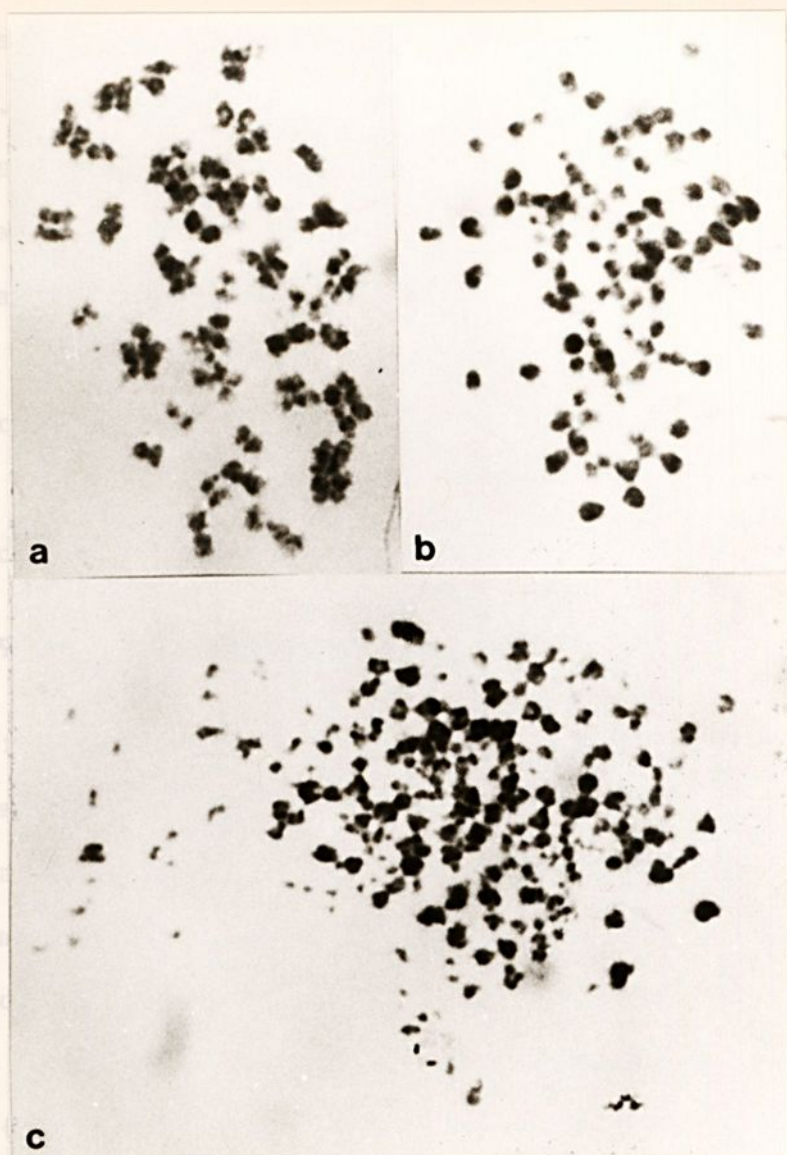


Figura 5. Metáfases do caso 608 mostrando cromossomos com aspecto "pulverizado".

dias em três réplicas que sofreram ação da colcemide por duas horas. Foram analisadas 46 células, 26 totalmente e seis parcialmente após bandamento G, sete em coloração usual e sete foram submetidas à análise simples. Dez eram poliplóides e cinco mostraram alterações cariotípicas diversas (Tabela 12), duas delas com monossomia 18. Os linfócitos do sangue periférico não revelaram alterações constitucionais e apenas 2% continham quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. O paciente não referiu radiografias ou exposição a drogas na época do estudo.

C. Tecido endotelial

Caso 799 Be - Linfangioma cavernoso

O paciente, de dois anos de idade, apresentava uma tumoração na região submandibular direita. Após realização da ressecção da massa cística, uma amostra foi cultivada em três réplicas, que mostraram contaminação por bactérias 24 horas após a semeadura. A análise dos linfócitos do sangue periférico revelou quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas em 9% deles. O paciente fazia uso de antibiótico e foi submetido a raio X de pescoço cerca de 15 dias antes da colheita do sangue para estudo citogenético.

Caso 847 Be - Hemangioma capilar subcutâneo

A criança, de um ano de idade, era portadora de um hemangioma congênito localizado na região temporal direita, que apresentava crescimento progressivo e sangramento periódico após trauma. Após exérese, uma parte do material foi cultivada em três réplicas

por 11 dias, que sofreram ação de colcemide por duas horas para bloqueio das divisões celulares. Sessenta e sete metáfases foram analisadas, 51 totalmente e 11 parcialmente após bandamento G e cinco em coloração usual. Sete apresentaram alterações estruturais e numéricas que constam da Tabela 12.

O estudo dos linfócitos não revelou alterações cariotípicas constitucionais e apenas 1% deles apresentou quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. Não havia história de exposição a raio X ou a drogas na época da investigação citogenética.

Caso 920 Be - Hemangioma cavernoso

A paciente, de quatro anos de idade, era a única portadora na família da síndrome "blue-rubber-bleb nevus" ou síndrome de Bean, de herança autossômica dominante e caracterizada por hemangiomas congênitos disseminados pelo corpo. Com vinte e dois dias de vida, foi submetida a cirurgia para retirada de uma lesão na mão esquerda, que mostrou recidiva com comprometimento grave dos tecidos adjacentes e foi retirada quatro anos depois. Uma amostra do material foi cultivada em três réplicas, das quais uma contaminou por bactérias. Uma réplica foi cultivada por cinco e outra por sete dias quando, então, foi adicionado colcemide por uma hora. Foram obtidas 170 metáfases das quais 160 foram totalmente e quatro parcialmente analisadas após bandamento G e seis foram submetidas a uma análise simples. Entre os achados citogenéticos (Tabela 12), foram observadas 19 células com poliploidia e uma com endorreduplicação. Oito apresentaram alterações estruturais e numéricas, entre elas, uma com translocação envolvendo os cromossomos 5 e 6, uma com deficiência do

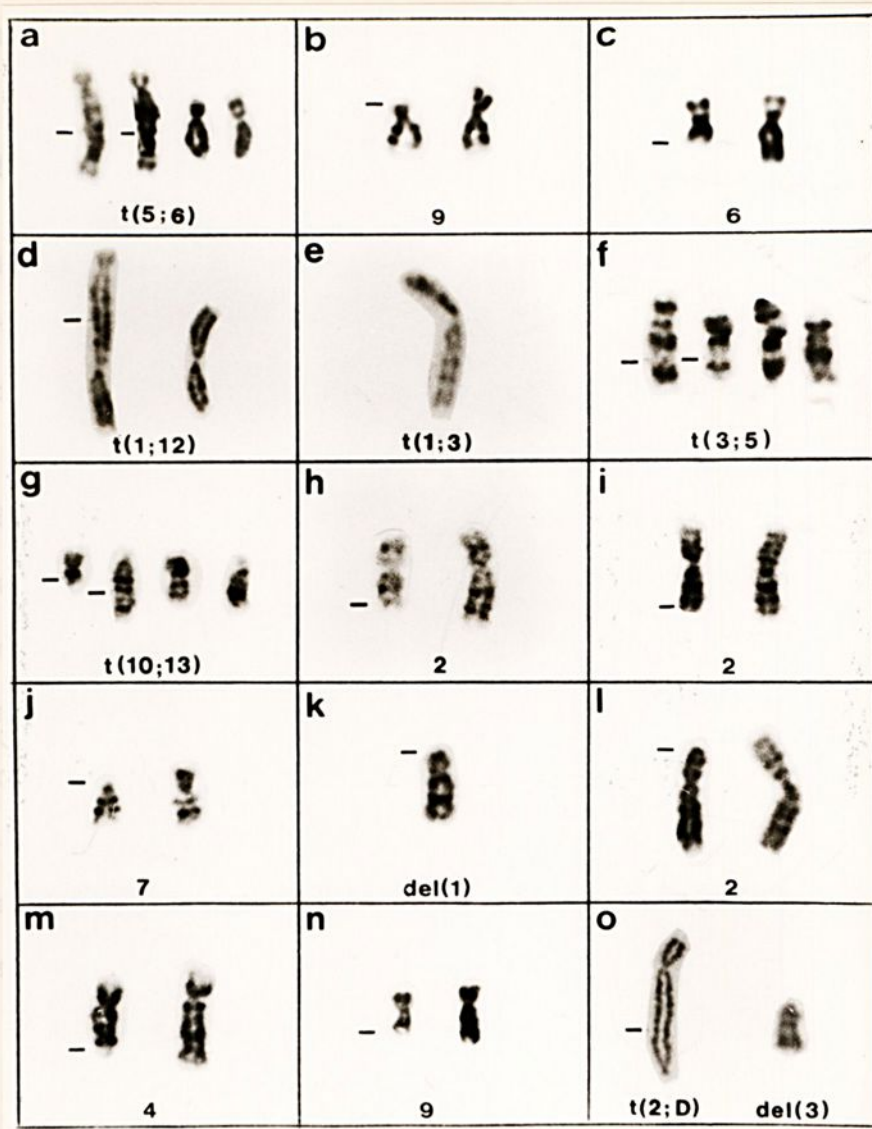
cromossomo 9 e outra com deficiência do cromossomo 6 (Figura 6a-c). A análise dos linfócitos, colhidos 20 dias após uma radiografia da mão, não mostrou alterações cariotípicas constitucionais e 4% deles exibiram quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

III.3. Tumores epiteliais

A. Pele

Caso 691 Be - Nevo melanocítico dérmico

O paciente, que tinha 11 anos de idade e não havia sido submetido a raio X ou ingerido medicamentos na época, apresentava um nevo localizado na base do nariz, com crescimento progressivo e três anos de evolução. A lesão foi retirada e cultivada em três réplicas por 15 dias e submetida à ação de colcemide por uma hora e meia. Foram obtidas 150 células das quais 95 foram totalmente e 15 parcialmente analisadas após bandamento G, 29 foram analisadas em coloração usual e 11 foram examinadas apenas para contagem do número cromossômico ou para detecção de alguma alteração específica. A maioria delas possuía 46 cromossomos, 25 eram poliplóides e uma mostrou endoreduplicação. Entre as alterações estruturais e numéricas detectadas em 23 células, uma célula exibiu a translocação $t(1;12)(p36;q34)$, uma outra apresentou uma translocação envolvendo os cromossomos 1 e 3, cinco eram monossômicas para o 5 e/ou 7 e duas possuíam trissomia E associada a monossomia C (Tabela 12; Figura 6 d,e). Esse foi o único caso em que foi observado um "double minutes" em uma das metáfases.



Caso 704 Ha - Carcinoma basocelular

Figura 6. Cariogramas parciais mostrando aberrações cariotípicas não clonais: (a) $t(5;6)$, (b) $del(9p)$ e (c) $del(6q)$ do caso 920; (d) $t(1;12)$ e (e) $t(1;3)$ do caso 691; (f) $t(3;5)$, (g) $t(10;13)$, (h) $del(2q)$, (i) $del(2q)$ e (j) $del(7p)$ do caso 704; (k) $del(1p)$, (l) $del(2p)$, (m) $del(4q)$ e (n) $del(9q)$ do caso 740; (o) $t(2q;Dq)$ e $del(3p)$ do caso 701. Os traços indicam os pontos de quebras e, sempre que possível, os cromossomos homólogos normais são apresentados à direita.

A análise dos linfócitos do sangue periférico não foi realizada porque a família não compareceu às solicitações para coleta de material.

Caso 696 Be - Nevo melanocítico dérmico

A paciente, de 11 anos de idade, manifestava nevos pigmentados congênitos por todo o corpo e alguns começaram a apresentar prurido e crescimento progressivo. A amostra da biopsia de um deles, localizado no tórax, foi cultivada por 23 dias em três réplicas e submetida à ação de colcemide por duas horas. Quarenta e nove metáfases foram analisadas, 12 total e cinco parcialmente em bandamento G e 32 em coloração usual. Uma célula era poliplóide e oito mostraram diferentes alterações numéricas e estruturais, duas delas com aumento do braço longo de um cromossomo D (Tabela 12). A análise dos linfócitos revelou inversão parcial da região heterocromática do cromossomo 9, após bandamento C (Figura 1 a,b), e 11% de células com quebras cromossômicas e cromatídicas. A criança não havia sido exposta a raio X ou medicamentos na época do estudo.

Caso 704 Ha - Carcinoma basocelular

A paciente, de 20 anos de idade, era dona de casa e apresentava uma lesão de pele no sulco nasogeniano à direita, com cerca de três meses de evolução e crescimento progressivo. Foi realizada a exérese e uma porção do material foi cultivada por nove dias e submetida à ação de colcemide por duas horas. Das 115 metáfases estudadas, 69 foram totalmente e 15 parcialmente analisadas após

bandamento G, 29 foram analisadas em coloração usual e duas foram submetidas à análise simples. Com exceção de duas células poliplóides, o número cromossômico na maioria das outras foi 46. Entre as 13 com alterações cariotípicas, foram observadas uma com translocação $t(3;5)(q21;q31)$, uma com translocação $t(10;13)(q22;q32)$, duas com deficiência $del(2q)$, presentes na mesma réplica, e uma com deficiência $del(7p)$, além de células com marcadores, aumento do braço longo do cromossomo 14 e monossomia 22 (Tabela 12; Figura 6 f-j). A análise de linfócitos do sangue periférico, colhido uma semana após radiografia facial, revelou 15% deles com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

Caso 706 Ma - Tricoepitelioma

O paciente, de 18 anos de idade, era servente de pedreiro e procurou o médico com queixa de lesões papulosas por todo o rosto, que se iniciaram onze anos antes da consulta. A amostra de uma das lesões, retirada da região nasogeniana esquerda foi cultivada em três réplicas por 13 dias e submetida à interrupção da divisão celular pela ação de colcemide por duas horas. Dezoito metáfases foram analisadas, nove total e cinco parcialmente após bandamento G, uma em coloração usual e três foram submetidas à análise simples. Três células eram poliplóides e duas apresentaram outras alterações cariotípicas (Tabela 12). A análise dos linfócitos não pode ser realizada porque o crescimento celular *in vitro* foi insatisfatório e o paciente não respondeu à solicitação para realização de novo exame.

Caso 851 Be - Quelbide

Caso 714 Be - Nevo azul variante celular

A paciente, de 11 anos de idade e com surdo-mudez, apresentava um nevo no cotovelo direito que havia aparecido cerca de dois anos antes da consulta. Após exérese uma parte do material foi cultivada em três réplicas mas apenas duas mostraram crescimento celular e, após 20 dias, sofreram ação de colcemide por duas horas. Foram analisadas 44 metáfases, 14 total e seis parcialmente após bandamento G e 24 em coloração usual. Três eram poliplóides e apenas uma metáfase apresentou alteração cariotípica, a monossomia do cromossomo 22 (Tabela 12). A análise dos linfócitos não mostrou alterações cromossômicas constitucionais e a frequência de metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas foi de 4%. A paciente não havia sido exposta a raio X ou a medicamentos na época do estudo.

Caso 829 Be - Nevo melanocítico dérmico

A paciente, de 14 anos de idade, apresentava manchas pigmentadas congênitas por todo o corpo, algumas com crescimento progressivo. Uma delas, retirada da região frontal, foi cultivada em três réplicas que não mostraram qualquer crescimento celular. A análise citogenética dos linfócitos, colhidos dez dias depois de um raio X da região cervical, revelou alterações cariotípicas do tipo quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas em 2% deles.

Caso 851 Be - Quelbide

A paciente, aos 11 anos de idade, foi submetida à ressecção de um lipoma localizado na região escapular direita. A cicatriz apresentou crescimento progressivo, prurido e dor e foi retirada um ano depois. Parte do material foi cultivada em três réplicas, que não apresentaram qualquer crescimento celular. A análise citogenética dos linfócitos revelou aumento da região heterocromática do cromossomo 9, após bandamento C (Figura 1 e, f), e frequência de apenas 2% de metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. Não havia história de exposição a drogas ou raio X na época do estudo.

Caso 856 Be - Cicatriz hipertrófica

Esse paciente, de nove anos de idade, apresentava retardo mental, era filho de pais alcoólatras e foi adotado logo após o nascimento. Cinco meses antes da consulta médica sofreu uma escoriação no pescoço, que evoluiu para cicatriz dolorosa com crescimento progressivo. Uma amostra da lesão foi cultivada por 10 dias. Foram analisadas 59 metáfases, 18 totalmente e 20 parcialmente após bandamento G, 11 em coloração usual e 10 foram analisadas apenas para contagem de cromossomos ou para detecção de alguma anomalia. Nove eram poliplóides e uma exibiu endoreduplicação. Foram observadas apenas duas células com alteração estrutural ou numérica (Tabela 12). A análise citogenética dos linfócitos não mostrou alterações cariotípicas constitucionais e 4% deles apresentaram quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. O paciente não fez uso de medicamentos e nem foi exposto a raio X na época do estudo.



B. Glândula

Caso 724 Ma - Adenocarcinoma de supra renal

O paciente, com cinco anos de idade, foi encaminhado ao hospital com queixa de puberdade precoce e agressividade, aumento da massa muscular, pêlos pubianos, pênis aumentado e de uma massa tumoral localizada no abdome revelou adenocarcinoma de supra-renal. Uma amostra dessa tumoração foi cultivada em quatro réplicas e nenhuma delas apresentou crescimento celular. A análise citogenética foi realizada apenas nos linfócitos do sangue periférico, e 42% deles apresentaram falhas e quebras cromossômicas e cromatídicas. O paciente havia sido exposto a raio X de abdome para investigação diagnóstica poucos dias antes do estudo citogenético.

Caso 728 Ma - Hepatoblastoma bem diferenciado

O paciente, de quatro meses de idade, apresentava uma massa abdominal no flanco direito com dor à palpação. Uma parte do tumor, retirado após lobectomia inferior do fígado, foi cultivada em quatro réplicas que, após 6 a 16 dias, sofreram a ação de colcemide por uma hora a uma hora e trinta minutos. Foram estudadas 129 metáfases, das quais 71 foram totalmente analisadas e 25 parcialmente após bandamento G, 24 foram examinadas em coloração usual e nove foram submetidas à análise simples. Onze células eram poliplóides, sete exibiram endoreduplicação e em oito foram observadas diferentes alterações, entre elas, monossomia 18 e 19, presença de marcador e trissomia 18 (Tabela 12). A análise dos linfócitos revelou fre-

quência de metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas igual a 39%. O paciente havia feito duas radiografias de abdome, respectivamente oito e quatro dias antes da retirada de sangue para estudo citogenético.

Caso 740 Ma - Adenocarcinoma gástrico moderadamente diferenciado

Esse paciente, de 24 anos de idade, era fumante (cerca de 20 cigarros por dia), trabalhava como laminador em uma fábrica de colchões e apresentava dor e queimação epigástrica há dois anos. Apesar de medicado nesse período, não apresentou melhora do quadro clínico e foi submetido a gastrectomia sub-total.

Uma parte da lesão foi cultivada em três réplicas por sete dias e sofreu bloqueio da divisão celular com colcemide por duas horas. Sessenta e nove metáfases foram analisadas, 34 total e 24 parcialmente após bandamento G, seis em coloração usual e cinco foram submetidas à análise simples. Dessas, cinco apresentaram poliploidia e duas endoreduplicação. Entre as diversas alterações estruturais e numéricas detectadas em 12 células, foram observadas deficiências parciais dos cromossomos 1, 2, 4 e 9 e trissomias 1 e 8 (Tabela 12, Figura 6 k-n). A análise dos linfócitos do paciente não mostrou alterações cariotípicas constitucionais e 5% deles mostraram quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. O paciente não ingeriu drogas ou foi exposto a raio X na época da colheita do material para estudo citogenético.

Caso 748 Be - Bócio colóide multinodular

A paciente, de 18 anos e estudante, manifestou uma pequena tumoração no pescoço que aumentou progressivamente ao longo de dois anos. Foi realizada a ressecção cirúrgica da lesão e uma amostra do material foi cultivada em três réplicas por quatro dias, com bloqueio da divisão celular após adição de colcemide por duas horas. Foram obtidas 49 metáfases, 46 das quais foram analisadas em coloração usual, duas foram parcialmente analisadas após bandamento G e uma foi submetida à análise simples. Três metáfases eram poliplóides e, com exceção de perdas e ganhos cromossômicos aparentemente casuais, as demais não apresentaram outro tipo de alteração (Tabela 12). A análise dos linfócitos não mostrou anomalias constitucionais e 5% deles exibiram quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas. A paciente não referiu exposição a raio X ou uso de drogas na época que antecedeu o estudo.

Caso 824 Ma - Adenocarcinoma de supra renal

Na idade de dois anos, a paciente desenvolveu um adenocarcinoma de supra-renal que não apresentou crescimento celular **in vitro**. Não foi possível o acesso às informações sobre a evolução da doença e a análise citogenética ficou restrita aos linfócitos periféricos, 5% dos quais exibiram apenas aberrações cariotípicas adquiridas, do tipo quebras e falhas. A paciente não fez radiografias e não tomou medicamentos na época que antecedeu a colheita do material para estudo citogenético.



C. Outros

Caso 840 Be - Cisto primordial

A paciente, de sete anos de idade, apresentou uma tumoração endurecida no maxilar, à direita, com crescimento progressivo por cerca de dois meses, febre e edema local. Após a exérese, o exame anatomopatológico revelou um cisto primordial com dois dentes inclusos, um incisivo e um canino. Parte da lesão foi cultivada por 22 dias em três réplicas, que sofreram a ação da colcemide por duas horas para bloqueio da divisão celular. Foram analisadas 55 células, seis totalmente e 13 parcialmente após bandamento G, 20 em coloração usual e dezesseis foram examinadas apenas para a contagem de cromossomos ou detecção de alguma anomalia. Dezesete eram poliplóides, três exibiram endoreduplicação e 16 mostraram cromossomos marcadores, trissomia C e outras alterações numéricas aparentemente casuais (Tabela 12). Os linfócitos da paciente, que foi submetida a raio X de face cerca de 40 dias antes do estudo citogenético, não manifestaram alterações cromossômicas constitucionais ou frequência aumentada de quebras e falhas cromossômicas ou cromatídicas.

Caso 843 Ma - Linfopitelioma

A paciente, de 11 anos de idade, apresentou queixa de tumorações na região retroauricular direita e submandibular esquerda com crescimento progressivo e três a quatro meses de evolução. O exame histopatológico da biópsia revelou um linfopitelioma com metástase glanglionar. Uma parte do material foi cultivada, mas não houve crescimento celular e a análise citogenética se restringiu aos

linfócitos, que não mostraram alterações cariotípicas constitucionais. A criança havia iniciado o tratamento radioterápico cerca de 20 dias antes da colheita do material e, por esse motivo, a análise de metáfases para pesquisa de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas não foi realizada.

III.4. Tumores formados por mais de um tipo celular ou de origem incerta

Caso 701 Ma - Sarcoma de Ewing

A paciente, de quatro anos de idade, apresentava dor e calor local na coxa direita, com início aproximadamente um ano antes do exame clínico. Foi submetida à biópsia da lesão e parte do material obtido foi cultivada em três réplicas por 14 dias e a divisão celular foi bloqueada com a adição de colcemide por uma hora. Foram analisadas 84 células, 29 totalmente e 16 parcialmente após bandamento G, 35 foram estudadas em coloração usual e quatro foram examinadas apenas para contagem do número cromossômico ou para detecção de alguma anomalia específica. Foram observadas quatro células poliploides e uma com endoreduplicação. O número cromossômico na maioria delas foi 46 e, entre as alterações cariotípicas encontradas em quatorze células (Tabela 12), foram detectadas a translocação entre os braços longos dos cromossomos 2 e D, a deficiência parcial do cromossomo 3, o aumento do braço longo de um cromossomo 13, a presença de marcador e a trissomia 18 (Figura 6 o).

O estudo citogenético dos linfócitos, colhidos um dia após radiografia de fêmur, não revelou qualquer alteração constitucional ou adquirida.

Caso 868 Be - Teratoma maduro

O paciente, de dois anos de idade, manifestou massa abdominal de consistência dura com duas semanas de evolução, localizada abaixo do fígado e à frente do rim direito. Foi realizada a laparotomia e o exame histopatológico do material revelou um teratoma.

Uma amostra do tumor foi cultivada por dez dias em três réplicas, duas das quais descartadas por contaminação bacteriana. Foram obtidas 17 metáfases, 12 analisadas totalmente após bandamento G, três em coloração usual e duas foram submetidas à análise simples. Entre os achados citogenéticos (Tabela 12) foram observadas uma célula poliplóide e uma com endoreduplicação, além de perdas cromossômicas casuais e presença de marcadores.

A análise dos linfócitos, colhidos uma semana após radiografia do tórax e abdome, mostrou 12% das metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas.

Caso 968 Ma - Tumor de Wilms

O exame físico do paciente, de dois anos de idade, realizado em março de 1991, revelou ausência de anomalias fenotípicas, com exceção de uma massa abdominal à direita de mais ou menos cinco centímetros em seu maior diâmetro e indolor, que havia sido notada quatro dias antes da consulta. A ultrassonografia abdominal e a urografia excretora levantaram a hipótese de tumor de Wilms. O exame anatomopatológico, após exérese, diagnosticou nefroblastoma trifásico clássico, estadio I, multifocal, sem anaplasia de

células tumorais e sem comprometimento de gânglios linfáticos. O tumor era unilateral e tratava-se de caso esporádico na família. O paciente iniciou, na época, o tratamento quimioterápico e até dezembro de 1991 mostrou boa evolução.

O material recebido para cultivo foi submetido à desagregação enzimática durante 24 horas e foi mantido em cultura por cinco dias, quando então sofreu bloqueio da divisão mitótica com o uso de colcemide por 60 minutos. O crescimento celular foi observado já na fase de desagregação e as células apresentaram morfologia epitelíoblastóide e fibroblástóide. Foram montadas três réplicas das quais a de número III foi a que apresentou o menor número de células em condição de análise e dessas foram obtidas 127 metáfases, 76 das quais eram poliplóides (Figura 7) e duas mostraram endoreduplicação. Das 97 células com condições de estudo, oito foram submetidas apenas à análise simples, 20 foram parcialmente e 69 completamente analisadas após bandamento G. Entre as 80 células cujo número cromossômico foi estabelecido, este variou de 35 a 184 (Tabela 13) e apenas uma célula manifestou cariótipo normal.

Além das inúmeras aberrações numéricas, 85 células (87,6%) exibiram associações teloméricas de um, dois, três ou quatro cromossomos, que originaram dicêntricos, policêntricos e anéis (Figura 8 a-p). Vinte e uma células mostraram apenas uma fusão e 64 mostraram de duas a 12 fusões teloméricas em diferentes combinações (Figura 9a-d). Com exceção dos cromossomos 1, 8, 9, X e Y, todos os demais participaram dessas alterações, sendo que os cromossomos 4, 5, 12, 13, 14, 17, 20 e 21 apresentaram ambos os braços envolvidos em associações.

Tabela 13. Frequência absoluta de metáfases com



Figura 7. Metáfase poliplóide do caso 968 com aproximadamente 180 cromossomos.

Tabela 13. Frequência absoluta de metáfases com números cromossômicos variando de 35 a 184, observadas entre as 70 células analisadas do caso 968, nas quais o número cromossômico pode ser estabelecido.

Número cromossômico	Número de metáfases
35	1
38	1
39	1
41	1
43	4
44	7
45	9
46	17
47	3
77	1
80	1
81	1
83	1
85	1
86	2
87	1
88	2
89	4
90	2
91	3
92	4
94	1
174	1
184	1

Figura 8. Exemplos de associações teloméricas observadas no caso 968. (a) 7p+15q, (b) 7p+7p, (c) 4q+5q, (d) 7p+19p, (e) r(12), (f) 14p+20q, (g) 5q+11p, (h) r(20), (i) 14p+17p, (j) 14p+14p, (k) 12p+17p, (l) 7p+12p, (m) 12p+14p, (n) 7p+12p, (o) 7p+14p, (p) 7p+20q. Sempre que possível os cromossomos homólogos normais são representados.



Figura 8. Exemplos de associações teloméricas observadas no caso 968. (a) 7p;15q, (b) 7p;7p (c) 4q;5q, (d) 7p;19p, (e) r(12), (f) 14p;20q, (g) 5q;11p, (h) r(20), (i) 14p;17p, (j) 14p;14p, (k) 12p;17p, (l) 7p;13p, (m) 12q;14p, (n) 7p;12q, (o) 7p;14p, (p) 7p;20q. Sempre que possível os cromossomos homólogos normais são apresentados.



Figura 9. Metáfases mostrando (a e c) duas, (d) três e (b) sete associações teloméricas e um cromossomo em anel.

Nas Tabelas 14 e 15 estão apresentados, respectivamente, os 22 tipos de associações teloméricas recorrentes e os 58 tipos de associações não recorrentes. A fusão telomérica mais frequente ocorreu entre os braços curtos dos cromossomos 14 e 17, observada em 52 células (Figura 8i). Fusões de homólogos foram vistas em cinco metáfases e envolveram os segmentos 7p, 14p, 15q e 20q (Figura 8). As frequências com que cada cromossomo participou dos rearranjos citados estão detalhadas na Tabela 16.

Seis cromossomos dicêntricos ou policêntricos exibiram um segmento intermediário de origem desconhecida (Figura 10) e três dicêntricos resultaram da fusão de um cromossomo completo, através do seu telômero, com um outro manifestando deficiência. Esses últimos foram identificados como translocações $t(1;7;15)(p35;p22;q26)$, $t(4;13)(q12;p13)$ e $t(4;16)(q21;q24)$, e considerados fusões parciais (Figura 11).

Além das associações teloméricas, outros três tipos de anomalias estruturais foram observadas: as translocações $t(3;6)(p11;p11)$ e $t(1;14)(?p11;?p11)$, e o isocromossomo $i(17q)$ (Figura 12a-c). As bandas 11p13-15 não sofreram alteração em qualquer dos rearranjos observados.

O bandamento C dos cromossomos policêntricos mostrou marcação correspondente à dos centrômeros vistos em bandamento G e a marcação pela prata, através do bandamento Ag-NOR, evidenciou NORs intermediárias.

As aberrações cromossômicas numéricas detectadas nas células tumorais, além da poliploidia, consistiram preferencialmente em perda de cromossomos. Apenas duas metáfases apresentaram trissomias, uma delas do 2 e a outra do 22. A Tabela 17 mostra o número de



Tabela 14. Tipos e frequências absolutas de associações teloméricas recorrentes observadas em 97 metáfases do caso 968 e identificação das réplicas onde foram encontradas.

Associação telomérica	Número de células afetadas	Réplica
5q;7p	3	I, II, III
5q;12q	2	I, II
7p;11p	2	I, II
7p;12q	4	I, II
7p;13p	3	I, II
7p;14p	2	I, II
7p;20q	4	I, II
12q;14p	2	I, II
12q;15q	5	I, II
12p;17p	3	I, II
13p;17q	2	I, III
13p;20q	5	I, II
14p;14p	2	I, II
14p;15q	2	I, II
14p;17p	52	I, II, III
14p;20q	9	I, II, III
15q;17p	2	I, II
17p;20q	2	I, II
17p;21q	2	I, II
20q;20q	5	I, II
r(12)	4	I, II
r(20)	3	I, II

Tabela 15. Tipos de associações teloméricas

Associação telomérica	Réplica
2q:17pq:5q	I
2q:17p	I
3p:6p	I
3q:7p	II
3q:10q	II
4q:5q	II
4p:7p	II
4q:21p	I
5q:11p	I
5q:13p	I
5q:14p	I
5q:20q	I
5q:20q:?	II
6p:7p	I
6p:12q	I
6p:14p	II
6p:12q:20q:21p	I
6p:20q	II
7p:7p	II
7p:13pq:7p	II
7p:10q	I
7p:15q	I
7p:17p	II
7p:19q	II
7p:20q:?	I
11p:5pq:14p	I
11p:12q	II
11p:14p	I
11p:15q	I
11p:17p	I
11p:17q	I
11p:20q	I
11p:22q	I
12p:13p	II
12q:13p	I
12p:20pq:20p	II
12q:17p	I
12q:20q	II
12q:20q:?	II
13p:14p	II
13p:15q	I
13p:17p	II
13p:18p	I
13p:21q	I
13p:21p	I
14p:5pq:20q	I
14p:12pq:15q	II
14q:17p	I
14p:20q:?	III
14p:21p	I
15q:15q	II
15q:20q	I
15q:20q:?	I
17p:20q:?	II
17p:22q	II
18p:20q	I
19p:20q	II
r(?)	II, III

Tabela 16. Frequências absoluta e relativa de envolvimento de cada cromossomo nas associações teloméricas observadas em 97 células do caso 968.

Cromossomo	Número de associações teloméricas	Frequência (%)
2	2	0,5
3	3	0,8
4	3	0,8
5	16	4,3
6	6	1,6
7	31	8,3
10	2	0,5
11	11	3,0
12	35	9,4
13	22	6,0
14	81	22,0
15	18	5,0
16	1	0,2
17	73	19,6
18	2	0,5
19	2	0,5
20	54	14,5
21	7	2,0
22	2	0,5

Figura 10. Exemplos de associações teloméricas em (a) 3q e 20q, (b) 7q e 20q e (c) 7q e 20q mostrando pontos intermédios.

Cromossomos biológicos normais são apresentados.

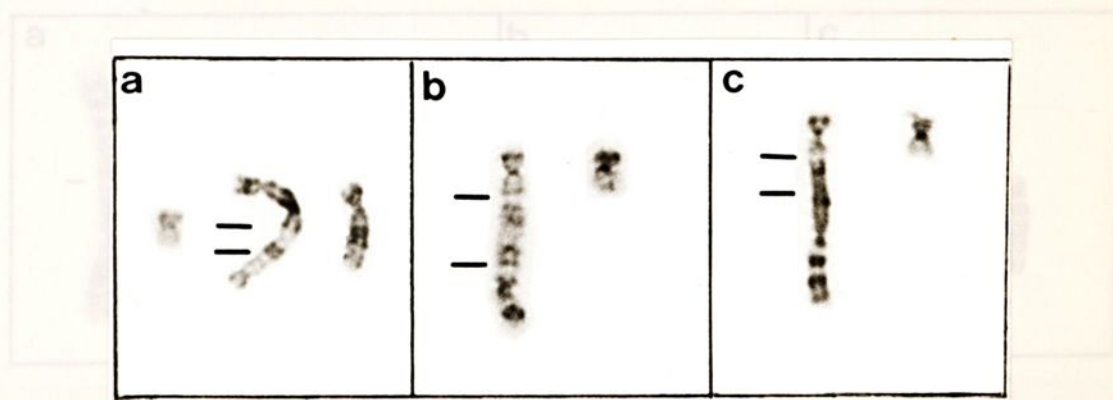


Figura 11. Cariogramas parciais do caso 968 mostrando: (a) translocação $t(17;15)$, (b) $t(4;13)$ e (c) $t(4;16)$. Sempre que possível, os cromossomos homólogos normais são apresentados.

Figura 10. Exemplos de associações teloméricas entre (a) 5q e 20q, (b) 17p e 20q e (c) 7p e 20q mostrando segmentos intermediários não identificados. Sempre que possível os cromossomos homólogos normais são apresentados.

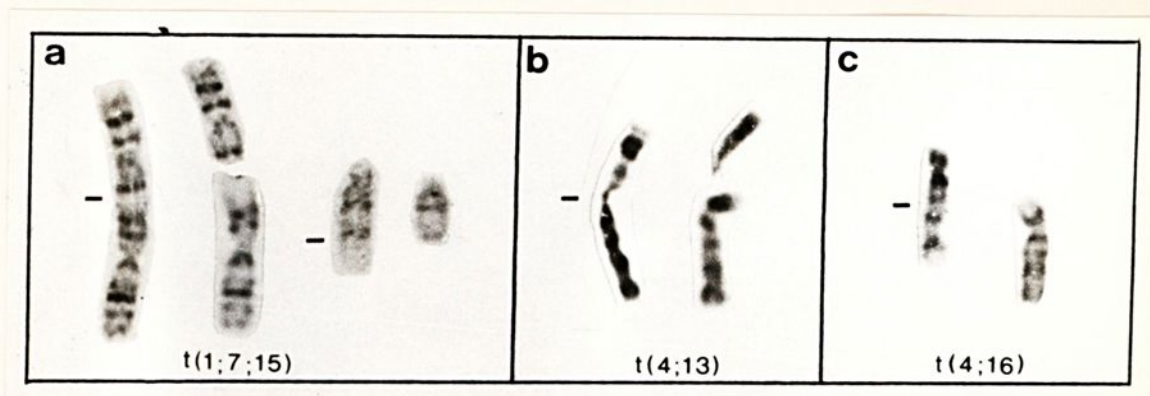


Figura 11. Cariogramas parciais do caso 968 mostrando: (a) translocação $t(1;7;15)$, (b) $t(4;13)$ e (c) $t(4;16)$. Sempre que possível, os cromossomos homólogos normais são apresentados.

Tabela 17. Número de células com perda de determinados cromossomos entre as 50 analisadas do caso 943 cujos cromossomos perdidos puderam ser identificados.

Cromossomo ausente Número de células

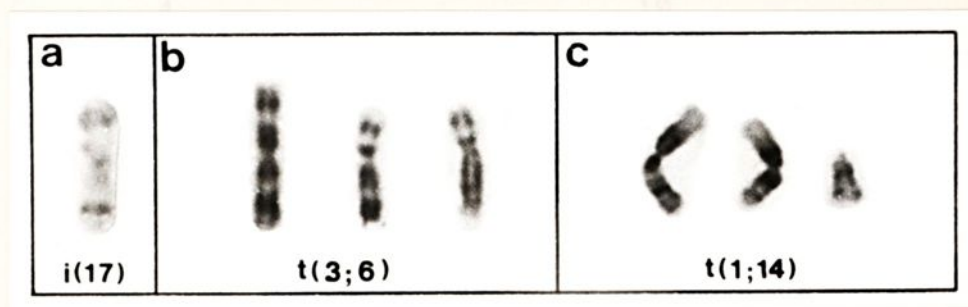


Figura 12. Anomalias cromossômicas sem envolvimento de telômeros. (a) $i(17q)$, (b) $t(3;6)(p11;p11)$ e (c) $t(1;14)(7p11;7p11)$. Sempre que possível, os cromossomos homólogos normais são apresentados.

Tabela 17. Número de células com perda de determinados cromossomos entre as 69 analisadas do caso 968 cujos cromossomos perdidos puderam ser identificados.

Cromossomo ausente	Número de células
1	3
2	4
3	2
4	10
5	13
6	5
7	6
8	6
9	4
10	8
11	8
12	13
13	9
14	14
15	5
16	6
17	17
18	8
19	14
20	7
21	8
22	6
X	6
Y	2

células com perda de determinados cromossomos entre as 69 analisadas cujos cromossomos perdidos puderam ser identificados. Aparentemente houve perda preferencial de alguns cromossomos, em especial do 17.

Associações teloméricas ou outras alterações não foram observadas em 120 metáfases obtidas após cultura de linfócitos, realizada na mesma época da cultura de células da amostra tumoral e, portanto, posterior à ultrassonografia abdominal e à urografia excretora.

IV. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram cultivados tecido normal ou neoplásico de 43 indivíduos. Contudo, não foram obtidos resultados em alguns deles em função da contaminação ou da ausência de crescimento celular satisfatório das amostras. O insucesso variou de 36% nas culturas de linfócitos a 56% nas de células neoplásicas. Esses valores são elevados e, por isso, algumas considerações devem ser feitas. Em primeiro lugar, o cultivo de linfócitos e blastos resultou em número ou qualidade de metáfases insuficientes nos pacientes com leucemias e linfomas, pois o plasma, ainda que diluído, apresenta índices leucocitários tão elevados que podem inibir o crescimento celular **in vitro**, por competição de elementos nutritivos ou pela própria densidade (FRESHNEY, 1987). No caso de tecidos sólidos, um dos problemas enfrentados foi a contaminação das amostras. Como tal evento foi observado na grande maioria dos casos durante a desagregação enzimática, sua origem provavelmente se deu em fases anteriores à desagregação, como na colheita e transporte, ou no próprio material **in vivo**, o que é comum, por exemplo, em lesões de pele e do trato gastrointestinal (TEYSSIER, 1989). O manuseio durante todas as etapas do cultivo é um outro fator que deve ser considerado, e fica evidente quando ocorre em fases posteriores ao processamento inicial do espécime. Esse fato, entretanto, parece explicar a contaminação detectada em apenas uma das amostras recebidas.

O insucesso nas culturas de tumores também foi decorrente da ausência de crescimento celular, provavelmente em virtude das condições oferecidas. Embora as células neoplásicas apresentem exigências similares às das células normais (GAMA, 1991; LIMON, 1992),



os resultados dependem de características próprias da lesão, da ausência de tecido necrótico e, evidentemente, do ambiente para o cultivo, que implica, por exemplo, em frasco, meio e suplementos adequados (FRESHNEY, 1987; LEIBOVITZ, 1986; LIMON, 1992).

GAMA (1991) concluiu que o meio HAM F-10, enriquecido com 20% de soro, L-glutamina e insulina, e o uso de frascos Descarplast constituem uma forma eficiente para a cultura de células tumorais em condições laboratoriais semelhantes às aquelas em que foi realizado o presente trabalho. Entretanto, já é conhecido que diferentes tipos celulares têm exigências diversas em relação ao substrato e meio, à concentração de soro e, em consequência, aos suplementos necessários para o crescimento (LIMON, 1992). Portanto, a padronização de condições de cultivo não constitui uma conduta ideal quando a variabilidade das amostras é grande, embora ela se torne quase sempre uma regra em situações com limitação de recursos.

IV.1. Instabilidade cromossômica e câncer

Os estudos já realizados em células tumorais confirmam as premissas da mutação somática do câncer, ou seja, que as alterações genéticas são essenciais para a transformação neoplásica. Contudo, os mecanismos e fatores desencadeantes envolvidos em tais alterações nem sempre estão bem esclarecidos. Por exemplo, existem apenas evidências indiretas de que uma alta frequência de danos no genoma somático contribui para o aparecimento de novos rearranjos que conferem à célula vantagens de crescimento e diferenciação alterada (MERTENS *et al.*, 1988). De fato, em nível populacional, taxas altas de aberrações cromossômicas adquiridas são indicativas de risco de

neoplasma para indivíduos expostos a agentes clastogênicos (FORNI, 1984; LOPEZ-LARRAZA **et al.**, 1990). A incidência aumentada de câncer nas síndromes de instabilidade cromossômica, tais como a síndrome de Bloom, a anemia de Fanconi e a ataxia telangiectasia (COHEN & LEVY, 1989) também oferece razões lógicas para sustentar essa hipótese (MERTENS, 1988; HEIM **et al.**, 1989c; BROGGER **et al.**, 1990). Além disso, a instabilidade genética dos tumores malignos, recentemente relacionada com hipometilação do DNA (JONES & BUCKELY, 1990; KOKALJ-VOKAC, 1992) e que é certamente responsável pelas suas propriedades invasivas e de metastização (SANDBERG, 1990), constitui um outro argumento a favor de que frequências elevadas de aberrações cromossômicas adquiridas predisõem a características neoplásicas (VOLPE, 1988; PATHAK, 1989/1990).

Outros dados sobre o problema provavelmente serão obtidos com a análise prospectiva que está sendo realizada em aproximadamente três mil indivíduos normais, monitorizados para a presença de aberrações cromossômicas, micronúcleos, trocas entre cromátides-irmãs e desenvolvimento de neoplasias (BROGGER **et al.**, 1990). A investigação de quebras cromossômicas induzidas por substâncias clastogênicas específicas em células normais de pacientes com câncer também poderá fornecer evidências sobre a predisposição constitucional à instabilidade genética e à neoplasia e poderá revelar diferentes graus de resposta a tais agentes (HSU **et al.**, 1989; RÜMMELEIN **et al.**, 1992).

Vários estudos já obtiveram resultados conflitantes sobre a frequência de anomalias cromossômicas adquiridas em células normais de pacientes com câncer, em parte explicáveis pelas diferenças metodológicas entre laboratórios. Uma instabilidade aumentada foi



observada nos estudos de NORDENSON **et al.** (1984), FURUYA **et al.** (1989), HSU **et al.** (1989), ROSER **et al.** (1989), SCAPPATICCI **et al.** (1989), BARRIOS **et al.** (1990) e de RÜMMELEIN **et al.** (1992), mas não nos estudos de TEDESCHI **et al.** (1987), MERTENS & JOHANSON (1988a,b), MERTENS **et al.** (1988) e de HEIM **et al.** (1989c). Além disso, tais trabalhos referem a ausência de tratamento químico ou radioterápico na época do estudo, mas nenhum deles cita a utilização de outras drogas, tais como antibióticos ou de raio X para investigação diagnóstica, práticas essas que dificilmente não são usadas durante o manuseio inicial de pacientes portadores de neoplasias.

No presente estudo, entre os 24 pacientes analisados em relação a esse parâmetro, 12 com neoplasias malignas e 12 com tumorações benignas, nove (37%) mostraram frequências elevadas de metáfases com anomalias, sendo sete do primeiro grupo e dois do segundo. Dentre os nove, seis deles haviam sido expostos a raio X para investigação diagnóstica nos dias que antecederam a colheita do sangue (cinco com neoplasmas malignos e dois com benignos), e dois fizeram uso de antibiótico nessa época (um com neoplasma maligno e outro com benigno). Entretanto, outros seis pacientes da amostra (dois do primeiro grupo e quatro do segundo grupo), que também haviam sido expostos a raio X, não apresentaram frequências elevadas de metáfases com anomalias.

As radiações ionizantes bem como muitos antibióticos lesam o DNA e seus efeitos podem ser verificados pela frequência aumentada de quebras e falhas cromossômicas (NATARAJAN **et al.**, 1982; SCHMID **et al.**, 1984; LOPEZ-LARRAZA **et al.**, 1990). Contudo, tais efeitos dependem da dose, do período de exposição e da variação (MULLEN **et al.**, 1987; SIMPSON **et al.**, 1987; SUTHERLAND & SIMPSON,



individual na resposta a esses agentes, sendo que os valores de radiosensibilidade normais foram definidos entre 97 a 180 rads (HARDEN, 1988). Segundo KELSEY (1992), as estimativas de doses de radiação de corpo inteiro durante uma urografia excretora e um raio X de tórax, por exemplo, são de 0,12 e 0,01 rads, respectivamente. Considerando-se que a finalidade do uso do raio X em alguns dos indivíduos da amostra foi de investigação diagnóstica, a dose aplicada esteve muito aquém dos valores citados como desencadeantes de efeitos clastogênicos e, portanto, não parece ser responsável pelos dados obtidos.

É interessante que a distribuição das frequências de quebras e falhas observada nos pacientes com neoplasias malignas diferiu significativamente da esperada ($P < 0,01$), o que não ocorreu com aquela observada nos portadores de tumorações benignas. A frequência desses eventos também foi muito maior nos pacientes do primeiro grupo. Esses resultados sugerem que a instabilidade genética pode ser um fator de predisposição ao câncer. Contudo, a participação de agentes mutagênicos não pode ser descartada, ou mesmo a possibilidade de que a própria condição maligna induza aberrações cromossômicas.

Os sítios frágeis constituem um fenômeno citogenético relacionado com instabilidade cromossômica, mas seu significado em câncer não está ainda esclarecido. Sua distribuição no genoma não é casual (HECHT **et al.**, 1990) e a sítios frágeis que têm sido associados com pontos de quebra na mesma banda envolvida em rearranjos nas células tumorais de pacientes (YUNIS & SORENG, 1984). Embora associações desse tipo nem sempre tenham sido confirmadas (MULERIS **et al.**, 1987; SIMMERS **et al.**, 1987; SUTHERLAND & SIMMERS,



1988; SOZZI **et al.**, 1990), a coincidência de sítios frágeis com as bandas mais frequentemente envolvidas em rearranjos de certas neoplasias tem sido observada não somente em portadores dos processos malignos mas em pelo menos em um dos seus pais, o que pode indicar predisposição genética à doença e perda de genes supressores (LIU **et al.**, 1989; VERNOLE **et al.**, 1990; SOKOVA **et al.**, 1992).

Entre os modelos moleculares da estrutura dos sítios frágeis estão a inibição específica da progressão da forquilha de duplicação do DNA em condições específicas e sequências polipurina/polipirimidina, amplificadas em consequência de duplicações prévias ou de recombinação meiótica anômala, mas que não se duplicam e não se condensam corretamente na mitose (LUKUSA **et al.**, 1990). Tal estrutura não estaria em desacordo com a hipótese de perda de função dos genes contidos na sequência, entre os quais podem estar onco-supressores, como sugerido por VERNOLE **et al.** (1990). Do mesmo modo, não pode ser excluída a possibilidade de que os sítios frágeis sejam regiões mais susceptíveis a rearranjos cromossômicos induzidos ou adquiridos (BARRIOS **et al.**, 1989).

No presente trabalho, os casos 724 e 823 mostraram localização preferencial de quebras e falhas nas regiões 2q proximal e Bq terminal, e na porção Cq proximal, respectivamente. Entretanto, não foi possível determinar com precisão as bandas envolvidas em tais eventos porque as células onde eles ocorreram foram analisadas apenas em coloração usual. Tais quebras poderiam indicar a presença de sítios frágeis, uma vez que na região 2q proximal já foram localizados quatro deles, três dos quais ocorrem na ausência de ácido fólico e um apenas na presença de afidicolina. Além disso, já foram

localizados dois sítios frágeis no segmento Bq terminal, um no cromossomo 4 e outro no cromossomo 5, ambos dependentes da afidicolina, e vários outros de diferentes naturezas na região proximal do braço longo de diversos cromossomos do grupo C (HECHT *et al.*, 1990; SANDBERG, 1990; McALPINE *et al.*, 1990).

O meio de cultura utilizado pelo presente estudo foi o RPMI 1640, que é rico em ácido fólico e não é adequado para a manifestação espontânea de sítios frágeis folato sensíveis do mesmo modo que daqueles dependentes da adição de drogas, como a afidicolina (KECK & EMERIT, 1979; SUTHERLAND, 1979; LI *et al.*, 1986). Desse modo, a explicação para os achados nesses pacientes não parece ser decorrente das condições *in vitro*, embora a expressão de sítios frágeis, como o FRAXA não associado à síndrome fra(X), tenha sido descrita em células normais de pacientes com carcinoma de esôfago e com poroqueratose de Mibelli, em condições de cultivo ricas em ácido fólico (CASALONE *et al.*, 1990). Parece mais provável, portanto, que as frequências elevadas de alterações adquiridas preferenciais ou não nos dois pacientes e em outros da amostra são resultantes de fatores que agiram *in vivo*, sejam eles endógenos ou exógenos.

Em relação à exposição a agentes mutagênicos apenas o paciente 740 era fumante e, apesar disso, não apresentou número elevado de metáfases com aberrações cromossômicas. É sabido, contudo, que os indivíduos fumantes exibem uma frequência alta de lesões no DNA, atribuídas provavelmente ao oxigênio ativo gerado pela metabolização das 1200 entidades químicas presentes no cigarro, muitas das quais são mutagênicas ou carcinogênicas (NAKAYAMA *et al.*, 1985; LITTLEFIELD & JOINER, 1986; JANSSON *et al.*, 1988).

IV.3. Anomalias cromossômicas e neoplasias

IV.2. Heteromorfismos e neoplasias

Muitos autores têm estudado a relação entre heteromorfismos e câncer em portadores de diferentes doenças malignas e pré-malignas (ATKIN & BAKER, 1977; SHABTAI & HALBRECHT, 1979; ATKIN & BRITO-BABAPULLE, 1985; PETKOVIC *et al.*, 1983, 1985b, 1991; REY *et al.*, 1985; LUNDGREN *et al.*, 1991). Os resultados, contudo, têm sido conflitantes e a sua aparente contradição pode ser atribuída ao caráter subjetivo das análises, à seleção do grupo investigado e às diferenças étnicas das amostras, ou mesmo à metodologia empregada e a fatores casuais (PETKOVIC *et al.*, 1991). De qualquer modo, não há dúvidas de que pacientes com alguns tipos de neoplasias como, por exemplo, carcinomas e adenomas de colon mostram frequências significativamente mais altas de variantes heteromórficas (ATKIN & BRITO-BABAPULLE, 1985; LAVAL DE VINUESA *et al.*, 1988a), o que poderia levar a quebras cromossômicas e recombinação e facilitar o aparecimento de alterações genéticas envolvidas na transformação neoplásica (SHABTAI *et al.*, 1985; KÜPF *et al.*, 1989; REGE-CAMBRIN, 1990).

No presente trabalho, foram estudados heteromorfismos cromossômicos evidenciados por bandamento C, em 24 indivíduos. Dois desses (8,3%) apresentaram heteromorfismos de posição, caracterizados como inversão parcial de 9qh, e um outro (4,2%) mostrou aumento de tamanho da mesma região. Tais achados estão muito próximos das frequências encontradas em caucasóides que correspondem respectivamente a 10% e 2% e, portanto, não reforçam a relação de heteromorfismos com câncer. de PATIAR (1986) chamam a atenção pelo

IV.3. Anomalias cromossômicas e neoplasias

Os fatores genéticos desempenham um importante papel no desenvolvimento do câncer humano e podem ser particularmente influentes nos pacientes pediátricos onde a exposição ao ambiente ainda é pequena. Vários tumores sólidos pediátricos são hereditários e alguns estão especificamente associados a aberrações cromossômicas, evidenciando o envolvimento de determinadas regiões do genoma no processo maligno.

Os indivíduos com a trissomia do cromossomo 21 apresentam um risco aumentado de desenvolverem leucemias agudas, principalmente na infância (HAYASHI *et al.*, 1988), mas um número crescente de trabalhos tem descrito pacientes com outras anomalias cromossômicas constitucionais e leucemias ou tumores sólidos (PATHAK, 1986; PATHAK & GOODACRE, 1986; MARKKANEN *et al.*, 1987; CUNNINGHAM & DICKERMAN, 1988; GROUPE FRANÇAIS DE CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE, 1988; LIST *et al.*, 1992). Segundo HECHT (1987), a síndrome de Down parece representar apenas o topo do iceberg, enquanto a massa submersa, representada por outras aberrações constitucionais, também pode ter relação com o câncer. O autor sugere que o caminho para o esclarecimento dessa questão é determinar a incidência de anomalias constitucionais entre pessoas com câncer, especialmente leucemias. Neste sentido, dois trabalhos já foram realizados em pacientes com leucemias e condições afins (ALIMENA *et al.*, 1985; BENITEZ *et al.*, 1987), que encontraram indivíduos com cromossomopatias numa frequência baixa e comparável à de anomalias em recém-nascidos (GROUPE FRANÇAIS DE CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE, 1988), o que impede maiores conclusões. Contudo, trabalhos como o de PATHAK (1986) chamam a atenção pelo



fato de terem sido detectadas translocações constitucionais em dois pacientes com neoplasias de célula T, com envolvimento dos segmentos 14q11 e 14q32, etiologicamente relacionados com esse tipo de câncer. Tais achados levaram o autor a propor que indivíduos com aberrações constitucionais envolvendo esses segmentos estão predispostos a tais doenças.

Por outro lado a grande maioria dos pacientes com câncer que são investigados é de adultos, enquanto deveria incluir crianças, pois determinadas alterações cromossômicas constitucionais, se associadas ao câncer, podem comprometer a sobrevida destes pacientes (HECHT, 1987; PONDER, 1990).

No presente trabalho, o estudo citogenético realizado em 25 indivíduos portadores de neoplasias malignas e tumorações benignas não revelou qualquer alteração cromossômica constitucional que pudesse ser relacionada à condição do seu portador. Isso provavelmente foi consequência do tamanho pequeno da amostra ou, ainda, da variabilidade de neoplasias estudadas. Além disso, os pacientes não foram selecionados pela presença de dados familiares sugestivos de predisposição ao câncer.

Entre os 19 pacientes em que as células neoplásicas puderam ser analisadas, três mostraram alterações cromossômicas clonais ou recorrentes e os demais apresentaram alterações numéricas ou estruturais classificadas como não clonais, achados esses que serão discutidos a seguir.

Um grande número de células das diferentes lesões estudadas exibiram aneuploidias, sendo as monossomias os tipos mais frequentes. Com exceção do caso 968, os demais não mostraram perdas ou ganhos preferenciais. Embora essas anomalias tenham sido caracteri-



zadas como não clonais, chama a atenção a perda dos cromossomos 18, 5 e 7, 22 e 19 nos casos 857, 691, 704 e 728, especialmente pelo fato de que a perda de heterozigosidade de segmentos de alguns desses cromossomos tem sido muitas vezes relacionada com diferentes lesões (LASKO **et al.**, 1991).

A existência de aneuploidias em células tumorais pode levar a outros erros mitóticos, pois a reunião dos cromossomos na placa metafásica, a sua ligação com as fibras do fuso e a segregação mitótica se tornam mais complexas quando o número cromossômico está alterado (CHEN, 1983; WOLMAN, 1986). Além disso, os consequentes desequilíbrios gênicos podem resultar em vantagens de crescimento por perda de genes supressores ou amplificação de oncogenes (WEINBERG, 1989).

Além das aneuploidias, um outro achado nas células estudadas que merece ser discutido é a presença de poliploidia e endoreduplicação, cujas frequências médias obtidas foram de 16% e 2%, respectivamente. Esses fenômenos têm sido referidos em uma série de doenças como, por exemplo, em tumores de pele (CHEN & SHAN, 1973; BECHER **et al.**, 1983; OCHI **et al.**, 1984; COWAN **et al.**, 1988; GATTUSO **et al.**, 1990), câncer gástrico (ARETXABALA **et al.**, 1988), diferentes lesões colônicas (SVENDSEN **et al.**, 1989) e carcinomas espinocelulares de língua (HEMMER **et al.**, 1990). São muitas vezes acompanhados de anomalias estruturais e associados a um prognóstico ruim, como em câncer de mama ou ovariano (HEMMER **et al.**, 1990), talvez em consequência das alterações da dosagem gênica que podem aumentar a taxa de mutação (LASKO **et al.**, 1991).

Segundo CHEN & SHAW (1973), tanto a poliploidia como a



endorreduplicação ocorrem em cerca de 15% a 18% das células tumorais **in vitro**, com predomínio das endorreduplicações nos repiques iniciais e das poliploidias nos posteriores. Considerando que a grande maioria dos espécimes estudados permaneceram por poucos dias em cultura e não foram subdivididos, e que a frequência de células poliplóides foi muito maior que aquela de endorreduplicação, os achados parecem mais resultado de mutações que ocorreram **in vivo** do que **in vitro**.

A presença de cromossomos marcadores, muitas vezes encontrados em células de tumores, também foi observada na maioria das amostras estudadas, porém de forma não clonal com exceção do caso 715, com leucemia mielóide aguda.

Os cromossomos marcadores surgem provavelmente em situações de instabilidade genética que, em virtude das frequentes quebras no DNA, podem levar à formação de rearranjos únicos, com efeitos difíceis de serem avaliados. Entretanto, é possível que algumas vezes confirmem vantagens de proliferação às células, com consequências importantes no início ou na progressão do processo neoplásico (ATKIN & BAKER, 1988; WU *et al.*, 1988).

A. Tumores mesenquimais

A.1. Tecido hematopoético

No grupo das leucemias e linfomas estudados, a análise das células malignas só foi possível nos casos 653 e 715. O caso 653, com leucemia linfocítica aguda (LLA-L2), apresentou um rearranjo complexo envolvendo os cromossomos 4, 7 e 11, não completamente



esclarecido em virtude da qualidade do material obtido. Na verdade, os cromossomos metafásicos dos pacientes afetados por essa doença frequentemente apresentam morfologia ruim com bandas indistinguíveis. Esse fato dificulta a análise e resulta em poucas descrições detalhadas das aberrações cromossômicas presentes, ao contrário do que ocorre nas leucemias mielóides agudas (LMA) (SANDBERG, 1990).

Entre as anomalias cariotípicas primárias e consistentemente observadas na LLA-L2, destacam-se a translocação $t(4;11)(q21;q23)$ e outras translocações entre os cromossomos 14 e 19 e a banda 11q23, que também é envolvida em vários outros tipos de neoplasias (BLOOMFIELD, 1985; ROWLEY, 1990a; SANDBERG, 1990; WATSON *et al.*, 1992). Esses pontos de quebra coincidem, no cromossomo 4, e são próximos, no cromossomo 11, àqueles sugeridos para a alteração do caso 653. A presença do cromossomo 7 no rearranjo, apesar de não relacionada especificamente à LLA, não surpreende pois esse cromossomo, juntamente com os cromossomos 1, 8 e 9, aparece comumente envolvido nas alterações numéricas e estruturais secundárias já descritas nessa neoplasia (MITELMAN, 1985; HEIM & MITELMAN, 1986a).

É interessante que os estudos moleculares mostram que em 11q23.3 está mapeado o oncogene **ets-1** (McALPINE *et al.*, 1990), cuja ativação tem sido sugerida ser resultante da sua transposição para a banda 4q21. Os mecanismos pelos quais a $t(4;11)$ participa da gênese da neoplasia são, contudo, ainda desconhecidos (ORAZI *et al.*, 1988; SANDBERG, 1990).

A banda 11q13 descrita pelo presente trabalho com possível participação no rearranjo do caso 653, contém o oncogene **b1c-1**, o gene supressor de tumor **ST3** e o gene para a neoplasia endócrina múltipla do tipo I (JUNJEN & VAN HEYNINGEN, 1990). No cromossomo 4



há apenas a descrição de um oncogene em 4p11-q22, o **kit**, e no cromossomo 7 existem três oncogenes no braço curto, o **ara-F2**, o **egr-f** e o **ral-A**, e um no braço longo, o **met** (McALPINE **et al.**, 1990). Levando-se em conta a ausência de dados moleculares, a participação de um ou de alguns desses oncogenes no processo maligno em questão fica difícil de ser discutida.

A paciente 653 foi estudada citogeneticamente após um intervalo de dois anos e um mês dos tratamentos radio e quimioterápico, os quais estão associados, com um risco aumentado de desenvolvimento de um câncer secundário (PEDERSEN-BJERGAARD **et al.**, 1987; GENUARDI **et al.**, 1988). A maioria dos agentes utilizados nesse tratamento é mutagênica e os danos que eles podem causar no DNA variam de mutações em ponto até anomalias cromossômicas, sendo as células hematopoéticas as mais susceptíveis a esses agentes. Muitas vezes esses danos são reparados, mas alguns podem escapar do sistema de reparo e originar clones celulares potencialmente malignos responsáveis pelo aparecimento de um outro tipo de neoplasia ou, então, dando características mais agressivas para a doença primária (GENUARDI, 1988; SECKER-WALKER **et al.**, 1989).

A paciente não desenvolveu uma nova neoplasia, mas sim uma recidiva de sua doença, diagnosticada quatro anos antes e clinicamente estável por um período de cerca de dois anos após o tratamento. Infelizmente, o estudo citogenético não foi realizado na época do diagnóstico e, portanto, não é possível afirmar se o clone detectado realmente representa a alteração cromossômica primária. Contudo, a ausência de outras alterações citogenéticas e a coincidência dos cromossomos envolvidos na translocação com aqueles asso-

ciados a esse tipo de leucemia sugerem que a anomalia estava presente durante toda a evolução da doença.

A paciente 715, portadora de leucemia mielóide aguda (LMA) cujo subtipo não foi definido, apresentou o cariótipo 45,XX,-8,-15,+mar. Embora a qualidade do material analisado não tenha permitido a caracterização completa do marcador, ele apresentou um padrão de bandas sugestivo de cromossomo 8 com deficiência intersticial de braço longo, não sendo notada a presença de qualquer porção do cromossomo 15 nesse marcador.

Aberrações cromossômicas clonais têm sido observadas em mais de 70% dos pacientes com leucemia mielóide aguda (BLOOMFIELD, 1985) e há evidências de que os achados cariotípicos têm uma relação direta com o prognóstico dos pacientes acometidos (YUNIS *et al.*, 1988; ARTHUR *et al.*, 1989). Os principais rearranjos cromossômicos específicos observados na LMA incluem a translocação t(8;21)(q22;q22) no subtipo M2, a translocação t(15;17)(q22;q21) no M3, a inversão inv(16)(p13q22) no M4, a translocação t(9;11)(p21;q23) e suas variantes no subtipo M5, além da trissomia do cromossomo 8 e da monossomia parcial ou completa dos cromossomos 5 e 7 que aparecem em diversos subtipos (PEARSON *et al.*, 1987; ROWLEY, 1988; FENAUX *et al.*, 1989; SANADA *et al.*, 1989; MICHALOVA *et al.*, 1990).

Translocações com quebras em 8q22 e 8q23, deficiências dos segmentos 8q12, 8q21 e 8q23, bem como trissomias e monossomias do cromossomo 8 e, menos frequentemente, monossomias e deficiências do cromossomo 15, já foram referidas em vários grupos de LMA (MITELMAN, 1985; SANDBERG, 1990). A translocação t(8;21)(q22;q22), por exemplo, caracteriza o subtipo M2 da LMA mas pode ser observada



em 7% dos pacientes com o subtipo M4 (GOVAERTS *et al.*, 1988; MASERATI *et al.*, 1992). O envolvimento da banda 8q22 também é frequente nas aberrações observadas em várias outras leucemias que, na maioria dos casos, vêm acompanhadas de anomalias adicionais (MITELMAN, 1985). É interessante que, no presente trabalho, o marcador observado parece consistir de um cromossomo 8 com deficiência intersticial do braço longo. Segundo GOVAERTS *et al.* (1988), a deficiência parcial do cromossomo 8 é essencial para o desenvolvimento dessa doença e não a translocação t(8;21) como anteriormente proposto por ROWLEY (1984). Vale a pena salientar que na região proximal do braço longo desse cromossomo já foram localizados dois oncogenes, o *mos* e o *lyn*, que podem ter sido ativados em decorrência do rearranjo presente (SANDBERG, 1990).

A monossomia 15, também observada nesse caso, parece ter ocorrido como um evento secundário, uma vez que não foi vista em uma das células, e pode ter levado à perda de genes supressores e a um potencial mais agressivo da doença.

A.2. Tecido conjuntivo e derivados

Os achados citogenéticos no caso 608, um lipoma, foram bastante interessantes. Todas as células obtidas do tumor mostraram cromossomos atípicos com aspecto "pulverizado" e a maioria delas era poliplóide ou exibia endoreduplicação. Vale a pena salientar que o procedimento utilizado no cultivo das células tumorais foi o mesmo que para os demais casos e que a paciente não havia sido exposta a agentes citotóxicos conhecidos na época do estudo.

Os dados da literatura revelam que o lipoma é o tumor de



partes moles mais comum na espécie humana (MANDAHL **et al.**, 1988). É considerado benigno do ponto de vista clínico e histológico e geralmente é assintomático e tem crescimento lento, além de mostrar uma alta taxa de recorrência e ausência de metástases (SANDBERG, 1990; SREEKANTIAH **et al.**, 1990a,b). Os lipomas têm sido extensivamente estudados e cerca de 300 já foram analisados citogeneticamente (SANDBERG, 1990). Baseados na natureza consistente dos rearranjos observados em 70% dessas neoplasias, foram evidenciados seis subgrupos que se caracterizam por número diplóide normal, rearranjos das regiões 12q13-q15, 6p22-23 e banda 13q12, presença de cromossomo em anel ou outras translocações sem participação da região 12q13-15 (SANDBERG, 1990; SREEKANTIAH & SANDBERG, 1991).

A presença de cromossomos "pulverizados" ou de poliploidia e endorreduplicação em lipomas não foi citada na literatura consultada. Contudo, SREEKANTIAH **et al.** (1990a), em uma análise de seis dessas neoplasias, observaram várias alterações cariotípicas muito complexas que os autores atribuíram ao alto grau de instabilidade cromossômica de alguns desses tumores. A instabilidade genômica poderia explicar certos achados do caso 608, como a poliploidia, contudo, a pulverização ou fragmentação cromossômica não parece refletir uma incidência aumentada de quebras mas sim uma perda da integridade do material genético (MOORHEAD, 1970). Os mecanismos envolvidos nesse fenômeno são desconhecidos, mas sabe-se que ele pode ser induzido por alguns agentes químicos e biológicos como, por exemplo, citosina arabinosídeo, cloranfenicol, vírus do sarampo e vírus Sendai (MOORHEAD, 1970; BISHUM **et al.**, 1973; BRUSICK, 1987). Embora a paciente tenha negado exposição crônica a substâncias tóxicas, o contato com tais agentes pode ter ocorrido de forma



esporádica e, dependendo da sensibilidade apresentada, ter sido efetivo no desenvolvimento dos eventos observados.

Não foram encontradas referências sobre achados citogenéticos em fibromatose plantar, um processo fibroblástico infiltrante e localmente recorrente. Os resultados obtidos dessa lesão no presente trabalho (caso 857) consistiram principalmente de células normais e de duas células com monossomia do cromossomo 18. Existem sugestões da presença de genes supressores tumorais nesse cromossomo, em virtude da perda de heterozigosidade descrita em carcinoma de células renais, de mama e colo retal (LASKO *et al.*, 1991). Contudo, a ausência de clonalidade observada não fala a favor da participação do cromossomo 18 na lesão apresentada pelo paciente, e indica que os achados devem ter sido apenas casuais.

A.3. Tecido endotelial

Os hemangiomas e linfangiomas são lesões caracterizadas pela presença de canais vasculares, que raramente malignizam (HOLLAND & FREI, 1982). Entre os processos desse tipo estudados (casos 847 e 920), os resultados compreenderam apenas alterações esporádicas. Entretanto, no caso 920, portador da síndrome de Bean, foi observada a translocação $t(5;6)$, com envolvimento da banda 6q23 onde está mapeado o oncogene **myb** (SANDBERG, 1990). Além dessa, uma outra célula mostrou deficiência parcial do cromossomo 6 com quebra na mesma região. A revisão bibliográfica sobre o assunto não revelou estudo citogenético em hemangioma cavernoso ou na síndrome de Bean, de modo que a participação do oncogene **myb** ou da banda 6q23 no comportamento agressivo da lesão estudada não pode ser avaliada.



B. Tumores epiteliais

B.1. Pele

A maior parte das análises citogenéticas de lesões de pele citadas na literatura foi realizada em melanoma, principalmente metastático, havendo um número menor de referências em lesões melanocíticas benignas e em outros tumores de pele (PARMITER *et al.*, 1988; OYAMA, 1991). O melanoma constitui um modelo para a análise de carcinogênese. Essa doença começa como um nevo melanocítico, que algumas vezes evolui para nevo displástico e posteriormente para o melanoma primário (KACKER *et al.*, 1990). Seus achados citogenéticos geralmente consistem de um grande número de células aneuploides com múltiplas anomalias e envolvimento não casual dos cromossomos 1, 3, 6, 7, 9, 10, 11 e 19, particularmente do 1, 6 e 7 (LIMON *et al.*, 1988; PARMITER *et al.*, 1988; TRENT *et al.*, 1989; NEDOSZYTSO *et al.*, 1992). Os rearranjos mais específicos são aqueles das bandas 1p11-p22, 1q11-q12, 6p11-q11, 6q11-q27 e 7q11 (MITELMAN *et al.*, 1990; TRENT *et al.*, 1990). Embora também presente em vários outros tipos de tumor, alterações numéricas e estruturais do cromossomo 1 são as mais frequentes (MITELMAN, 1985; TRENT *et al.*, 1989) e têm sido associadas com a progressão e o grau de malignidade (BALABAN *et al.*, 1984; PEDERSEN *et al.*, 1986; TRENT *et al.*, 1989).

É interessante que, no presente trabalho, entre as diversas alterações numéricas e estruturais não clonais observadas em um caso de nevo (691), foram detectadas translocações dos cromossomos 1, 3 e 12. Em uma célula, a translocação envolveu a banda 1p36, onde



está mapeado o gene para a síndrome do melanoma-nevo displástico (BALE **et al.**, 1989; BRUNS & DRACOPOLI, 1990; SANDBERG, 1990). Essa doença é herdada com padrão de herança autossômico dominante e se caracteriza pela presença de nevos pigmentados que frequentemente evoluem para melanoma (GREENE, 1984; KRAEMER & GREENE, 1985; BLACK & HUNT, 1990). Deve ser destacado também que translocações da banda 1p36 já foram descritas em células malignas de pacientes com melanoma (PEDERSEN **et al.**, 1986; COWAN **et al.**, 1988; KACKER **et al.**, 1990). Em vista disso, e considerando que um nevo benigno pode sofrer diferenciação anormal e progredir para uma neoplasia (RICHMOND **et al.**, 1986), os achados citogenéticos do caso 691, embora não clonais, podem indicar sua transformação e reforçam a utilidade dos dados citogenéticos no prognóstico de lesões benignas ou pré-malignas.

O caso 691 foi o único da amostra que apresentou "double minutes" (DM) em uma de suas células, o que parece ser um achado casual ou representar um artefato de técnica. Os DM, assim como as regiões homogeneamente coradas (HSR), constituem aberrações cromossômica raramente observadas em células normais (BRODEUR & SEEGER, 1986). No câncer humano representam citogeneticamente o fenômeno da amplificação gênica, em especial de oncogenes, e da sensibilidade a agentes químicos (SREEKANTIAH & BHARGAVA, 1992). Embora essas anomalias sejam encontradas em diversos tipos de neoplasias, elas prevalecem nos neuroblastomas humanos não tratados, especialmente os DM, e resultam da amplificação do oncogene **N-myc** (BRODEUR & SEEGER, 1986; FRANKE **et al.**, 1986).

A grande maioria das células de uma cicatriz hipertrófica



(caso 856) mostrou cariótipo normal e duas células revelaram trissomias, monossomias, em uma associada com um cromossomo marcador, que foram considerados achados esporádicos. A cicatriz é um processo benigno que, entretanto, pode aparecer associado com câncer (HOLLAND & FREI, 1982). A revisão bibliográfica realizada não identificou estudos citogenéticos nesse tipo de lesão, de modo que os resultados normais encontrados não puderam ser comparados com outros dados da literatura.

Ainda no grupo das lesões de pele, foram estudadas as amostras de dois carcinomas basocelulares (caso 704 e 706) e uma delas mostrou alterações citogenéticas que merecem ser discutidas. Foram observadas várias células com aberrações cromossômicas estruturais não clonais, como as translocações $t(3;5)$ e $t(10;13)$, duas deficiências envolvendo o mesmo segmento do braço longo do cromossomo 2 e uma deficiência do braço curto do cromossomo 7, entre outras. Esses achados, aparentemente casuais, se tornam interessantes quando comparados com aqueles já descritos na literatura para algumas lesões de pele, em especial carcinomas basocelulares e espinocelulares. Tais tumores mostram frequências elevadas de rearranjos não clonais, além de alterações clonais simples ou múltiplas citogeneticamente não relacionadas (MERTENS *et al.*, 1992).

Segundo MERTENS *et al.* (1989b), as anomalias não clonais na realidade refletem pequenos clones celulares que, em função do número de células estudadas, não são caracterizados como tais. Contudo, em dois carcinomas basocelulares estudados por OYAMA (1991) e no presente caso, o número de metáfases analisadas após bandamento G foi suficiente para revelar, com uma probabilidade de 90%, clones com frequência de pelo menos 2% (HOOK, 1977). Deve ser salientado,



porém, que a deficiência do braço longo do cromossomo 2 detectada não foi considerada clonal em função dos critérios adotados, mas tal possibilidade não pode ser totalmente descartada.

A observação de diferentes clones citogeneticamente não relacionados em lesões de pele (JIM **et al.**, 1988; ALEDO **et al.**, 1989a; HEIM **et al.**, 1989a; OYAMA, 1991) sugere origem policlonal nesses casos (HEIM **et al.**, 1989a; SCAPPATICCI **et al.**, 1989; CASATI **et al.**, 1991). A presença de focos primários múltiplos em preparações histológicas de carcinomas epiteliais vêm ao encontro dessa hipótese (SLAUGHTER **et al.**, 1953), do mesmo modo que o fato do tecido estar constantemente exposto a agentes carcinogênicos como a luz ultra-violeta, o que aumenta a probabilidade de diferentes células sofrerem transformação (MERTENS **et al.**, 1989a, 1992). Entretanto, os diferentes clones também poderiam ser resultado de uma seleção ocorrida **in vitro** e não refletirem a situação **in vivo**. HEIM **et al.** (1989b), em um estudo da evolução cariotípica de um carcinoma espinocelular, descartaram tal possibilidade. Seus resultados mostraram que as condições de cultivo não só não foram responsáveis pelo aparecimento das múltiplas aberrações cromossômicas, como exerceram uma pressão seletiva negativa sobre as mesmas.

Uma outra explicação para a presença de múltiplos clones em lesões de pele é a ocorrência de uma mutação que confere instabilidade genética e susceptibilidade à ação de vários agentes físicos e químicos e leva à aquisição de constituição genética heterogênea (AXELROD & KUCZEK, 1989; PATHAK, 1989/1990). As aberrações cromossômicas seriam, portanto, secundárias a essa mutação, o que indicaria origem monoclonal e não policlonal dos tumores (WOLKMAN,



1986; HOLLIDAY, 1989).

Mais recentemente, MERTENS **et al.** (1992) sugeriram que as alterações presentes nas lesões de pele não têm importância patogênica no início ou progressão desses tumores, em virtude da ausência de denominadores citogenéticos comuns, das discrepâncias entre os achados citogenéticos e os dados obtidos em estudos de citometria de fluxo, e do grande número de rearranjos observados.

Em relação especificamente às translocações e deficiências detectadas, deve ser salientado que rearranjos clonais e não clonais de acrocêntricos são comuns em lesões cutâneas e podem estar relacionados com o seu desenvolvimento (MITELMAN, 1985; ALEDO **et al.**, 1988; HEIM **et al.**, 1988; OYAMA, 1991). O segmento 7p, que está envolvido frequentemente em anomalias estruturais de lesões melanocíticas (PARMITER **et al.**, 1988; TRENT **et al.**, 1989; MITELMAN **et al.**, 1990), parece estar associado com o aumento na expressão do gene para o receptor do fator de crescimento epidérmico, localizado em 7p12-p13 (McALPINE **et al.**, 1990), o que pode conferir vantagem seletiva de crescimento para a lesão (LIMON **et al.**, 1988; SOZZI **et al.**, 1990).

Com base em todas essas observações, é preciso cautela para considerar o aparecimento dos rearranjos detectados no carcinoma basocelular estudado como meramente casuais, muito embora não tenham sido classificados como clonais.

B.2. Glândula

O hepatoblastoma é um tumor raro de fígado que ocorre principalmente em crianças. Existem apenas dois trabalhos que rela-



tam a presença de clones anormais nesse tipo tumoral (BARDI *et al.*, 1991) e um deles detectou, entre outras anomalias, um cromossomo derivado do 19, resultante de uma translocação $t(4;19)$ (PETKOVIC *et al.*, 1985a). O caso 728 do presente trabalho, portador do neoplasma em questão, apresentou três células com perda do cromossomo 19. Levando em conta as observações da literatura, é possível que os resultados obtidos não sejam casuais. Contudo, há necessidade de um maior número de dados para sugerir que as alterações do cromossomo 19 possam ter importância nesse tipo de lesão.

O adenocarcinoma gástrico é um tumor de estômago relacionado com fatores carcinogênicos. Os dados da literatura têm revelado que anomalias estruturais dos cromossomos 1 e 4, em especial da banda 1p22, e trissomia dos cromossomos 8 e 9 são eventos comuns nessa lesão (CASARTELLI & ROGATTO, 1986; SANDBERG, 1990; PANANI *et al.*, 1992). Segundo XIAO *et al.* (1992), a trissomia do cromossomo 8 indica um subgrupo citogenético nessa entidade. Os achados citogenéticos do adenocarcinoma gástrico estudado (caso 740) compreenderam trissomia dos cromossomos 1 e 8 e deficiências parciais dos cromossomos 1, 2, 4 e 9, com quebras nas bandas 1p31, 2q23, 4q31 e 9q22, entre outras alterações.

As informações da literatura coincidem com os achados citogenéticos obtidos e sugerem que eles, mesmo tendo sido observados como eventos esporádicos, podem estar relacionados com o desenvolvimento do processo maligno, pois o número de células estudadas foi pequeno e talvez insuficiente para a detecção de um clone.

Com relação ao caso 748, uma lesão hiperplásica de tirbide, foram observadas trissomias, monossomias e poliploidia. Essas

anomalias parecem representar eventos casuais, embora outros autores já tenham feito referências semelhantes em células de bócio multinodular (GAMA, 1991; ROQUE *et al.*, 1992) e de adenomas de tireóide (ANTONINI, 1992), e sugerido que tais achados possam ter um papel importante na patogênese das lesões proliferativas da tireóide ou mesmo na sua progressão (ROQUE *et al.*, 1992).

B.3. Outros

Os resultados do caso 840, um cisto primordial, compreenderam, entre outras, seis células com trissomia C. Apesar dos cromossomos extras não terem sido identificados eles apresentaram morfologias diversas, portanto, as trissomias encontradas provavelmente não envolviam os mesmos cromossomos, mas podem indicar instabilidade do tumor. Dada a ausência de dados na literatura sobre esse tipo de lesão, os resultados aguardam confirmação.

C. Tumores formados por mais de um tipo celular ou de origem incerta

Análises citogenéticas de sarcoma de Ewing, um tumor maligno de osso, têm revelado um rearranjo cromossômico consistente que envolve as bandas 11q24 e 22p12 (TURC-CAREL *et al.*, 1988; SANDBERG, 1990) associado ou não à hiperdiploidia (KODAMA *et al.*, 1991). Tal rearranjo não foi observado no caso 701 analisado, que manifestou, além de células normais, um grande número de anomalias estruturais e numéricas esporádicas.

Os teratomas são doenças do desenvolvimento embrionário associadas algumas vezes a anomalias congênitas e a aberrações

cromossômicas constitucionais (HOLLAND & FREI, 1982). Apenas células com cariótipo normal e poliploidia são descritas na literatura (SANDBERG, 1990), o que condiz com os achados do material presente-mente estudado (caso 868).

Os resultados obtidos da análise de um tumor de Wilms (caso 968) foram interessantes, principalmente pelo fato de que até o presente não foram descritos nessa patologia.

Esse tumor, também chamado nefroblastoma, é a neoplasia renal mais comum na infância e corresponde a 6% de todos os neoplasmas pediátricos, com uma incidência de 1:10.000 recém-nascidos (COMPTON **et al.**, 1988; BOWN **et al.**, 1989; COWELL **et al.**, 1989). Histologicamente, mostra grande diversidade e é indistinguível das fases iniciais do desenvolvimento do rim (SKUSE & ROWLEY, 1989; WANG-WUU **et al.**, 1990). A maioria dos casos é esporádica e cerca de 1% é familiar, com padrão de herança autossômica dominante, expressividade variável e 63% de penetrância. O tumor geralmente é diagnosticado na idade de 2 a 5 anos e pode ocorrer uni ou bilateralmente. Todos os casos bilaterais e cerca de 30% dos unilaterais parecem ser herdados e têm idade de manifestação mais precoce que os esporádicos (HOFFMAN, 1989; SANDBERG, 1990).

Os pacientes com tumor de Wilms podem apresentar outras anomalias fenotípicas que incluem aniridia, hemi-hipertrofia, nevos pigmentados, alterações renais e citomegalia visceral (MILLER **et al.**, 1964; SKUSE & ROWLEY, 1989). Entre eles é definido um subgrupo, referido como complexo WAGR, que apresenta tumor de Wilms, aniridia, displasia gonadal e retardo mental (NARAHARA **et al.**, 1984; SEAWRIGHT **et al.**, 1988; WOLMAN **et al.**, 1990; SANDBERG, 1990). Também



na síndrome de Beckwith-Wiedemann, que inclui onfalocoele, macroglossia e macrosomia, os afetados apresentam um risco de 5 a 10% de desenvolverem neoplasias embrionárias, inclusive tumor de Wilms (LITTLE **et al.**, 1988; BROWN **et al.**, 1992). Alguns deles apresentam anomalias cromossômicas constitucionais envolvendo o braço curto do cromossomo 11, especificamente a região 11p15 (HENRY **et al.**, 1989).

Com base no estudo de 58 casos familiares de tumor de Wilms, a exemplo do que havia sido proposto anteriormente para o retinoblastoma (KNUDSON, 1971), KNUDSON & STRONG (1972) concluíram que tais tumores resultavam de duas mutações somáticas. Alguns anos depois, foram descritas deficiências intersticiais do braço curto do cromossomo 11 em pacientes com a associação aniridia-tumor de Wilms e em gêmeos monozigóticos concordantes para aniridia e retardo mental, mas discordantes para tumor de Wilms (FRANCKE **et al.**, 1978; VEKEMANS **et al.**, 1989). Esses achados reforçaram a teoria dos dois passos mutacionais para o desenvolvimento do câncer (SKUSE & ROWLEY, 1989), também confirmada por um grande número de dados moleculares.

A perda da heterozigosidade para marcadores do segmento 11p no tumor de Wilms foi descrita simultaneamente por quatro grupos em 1984 (FEARON **et al.**, 1984; KOUFOS **et al.**, 1984; ORKIN **et al.**, 1984; REEVE **et al.**, 1984) e posteriormente observada por outros pesquisadores (BROWN **et al.**, 1989; MANNENS **et al.**, 1990). Os resultados, associados aos dados citogenéticos, evidenciaram que dois genes, em 11p13 e 11p15, estão associados ao tumor de Wilms mas não são os mesmos responsáveis pela aniridia (DAVIS **et al.**, 1988; GRUNDY **et al.**, 1988; LITTLE **et al.**, 1988; HENRY **et al.**, 1989; CALL **et al.**, 1990; FRANKE, 1990; PRITCHARD-JONE **et al.**, 1990; WADEY **et al.**, 1990). O fato de dois genes participarem na iniciação desse tumor indica um



processo altamente complexo que deve atuar no desenvolvimento do rim (HOFFMAN, 1989). É possível mesmo que outros genes também estejam envolvidos, uma vez que algumas descrições recentes têm mostrado casos familiares de tumor de Wilms sem qualquer rearranjo constitucional em 11p, tanto em nível citogenético quanto em nível molecular (GRUNDY, 1988; HUFF **et al.**, 1988).

No paciente 968, não foi detectada qualquer anomalia fenotípica além do tumor ou história de casos semelhantes na família. A análise dos linfócitos também não revelou alterações constitucionais em 11p13-15 ou em outras bandas cromossômicas. As células tumorais, contudo, exibiram um grande número e variabilidade de associações teloméricas.

Os telômeros são estruturas especiais localizadas nas extremidades dos cromossomos que, apesar de não conterem genes, são vitais para a integridade dos cromossomos, mantendo-os estáveis e impedindo-os de se fundirem espontaneamente (SALTMAN, 1989; HECHT & HECHT, 1991; MOYSIS, 1991). Sua importância é tal que os telômeros foram altamente conservados ao longo da evolução, sendo encontrados desde em protozoários até no homem (HASTIE & ALLSHIRE, 1989; MOYZIS, 1991).

Associações teloméricas são eventos raros em linfócitos e fibroblastos normais na espécie humana, mas já foram observadas em células senescentes (BENN, 1976), expostas a vírus (SALTMAN **et al.**, 1989), ou cultivadas na presença de afidicolina (FUSTER **et al.**, 1990). Além disso, também têm sido encontradas em portadores de ataxia telangiectasia, de xeroderma pigmentoso e da síndrome de Thiberge-Weissenbach (DUTRILLAUX **et al.**, 1978; FUSTER, 1990; CASATI, **et al.**, 1990). Foi também detectada em carcinomas de pulmão, ovário,



1991). O mais intrigante é o número crescente de descrições a respeito da ocorrência dessas associações em várias lesões benignas e em alguns tipos de câncer (PATHAK, 1988; SANDBERG, 1990; PETEIN & VERHEST, 1992). A primeira descrição em neoplasias foi feita por FITZGERALD & MORRIS (1984) em dois pacientes com leucemia linfocítica e outras se seguiram em leucemia linfocítica aguda (MORGAN *et al.*, 1986), em histiocitoma fibroso maligno (MANDAHL *et al.*, 1985), em mixomas cardíacos (DEWALD *et al.*, 1987), em tumores renais (KOVACS *et al.*, 1987), em carcinomas espinocelulares (ALEDO *et al.*, 1988, 1989b; PATHAK *et al.*, 1988) e em uma linhagem linfoblastóide de um paciente com linfoma (SALTMAN *et al.*, 1989).

Foi sugerido que as associações teloméricas podem ser resultado de alterações na estrutura e função dos telômeros (FITZGERALD & MORRIS, 1984). Esses elementos apresentam sequências de base repetidas (FARR *et al.*, 1991; GREIDER, 1991) e são alongados pela ação da enzima telomerase ou encurtados pela ação da enzima primase durante a síntese de DNA (HECHT & HECHT, 1991). A presença de sequências repetidas análogas poderia facilitar o pareamento de telômeros antes da duplicação cromossômica, levando a posteriores associações caso fosse mantido o pareamento na etapa seguinte do ciclo celular, o que poderia ocorrer em consequência de condições específicas, tais como senescência, viroses, agentes químicos e neoplasia (HOLMQUIST & DANCIS, 1979; PATHAK *et al.*, 1988; SALTMAN *et al.*, 1989; FUSTER *et al.*, 1990; HECHT & HECHT, 1991).

A redução das unidades de repetição teloméricas já foi observada em células somáticas que sofreram muitas divisões, como aquelas provenientes de alguns tecidos de indivíduos idosos (HASTIE *et al.*, 1990). Foi também detectada em carcinomas de pulmão, ovário,



cblon, bsseos e renais, entre eles, tumor de Wilms (HASTIE **et al.**, 1990; BARDI **et al.**, 1991; SCHWARTZ **et al.**, 1991; HOLZMANN **et al.**, 1992; PETEIN & VERHEST, 1992). O encurtamento progressivo do telômero, provavelmente decorrente da perda da enzima telomerase já verificada nessas condições (HASTIE **et al.**, 1990), pode tornar os cromossomos menos estáveis e facilitar o aparecimento de rearranjos, pontes cromossômicas, deficiências e duplicações (PATHAK **et al.**, 1988; HASTIE & ALLSHIRE, 1989; HOLZMANN **et al.**, 1992), ou afetar a expressão de genes próximos ao local (SALTMAN **et al.**, 1989). Sua participação, portanto, não pode ser excluída do desenvolvimento e progressão do processo maligno (HECHT & HECHT, 1991).

A ausência de fragmentos no caso 968 e a baixa frequência de células com translocações recíprocas ou segmentos intercêntricos não identificados, esperados em virtude da formação de pontes cromossômicas, pode ser explicada pela presença de um único centrômero ativo ou da formação contínua de associações teloméricas. A aparente não casualidade de certas fusões indica que algumas associações têm maior probabilidade de ocorrência ou então são vantajosas para as células.

Em relação à presença de dois ou mais centrômeros em um cromossomo, já foi observado que alguns deles são inativos, pois não exibem proteínas detectáveis por anticorpos anticinetocono (SALTMAN **et al.**, 1989), e seu DNA duplica anteriormente ao dos centrômeros ativos (VIG & STERNES, 1991). Interessante é que já foram detectados cromossomos de células tumorais com seu único centrômero inativo, o que pode constituir um dos mecanismos da gênese da aneuploidia em câncer (VIG **et al.**, 1989, 1990; VIG & STERNES, 1991).



V. RESUMO E CONCLUSÃO

O papel da poliploidização nesse caso é desconhecido, mas pode corresponder a um dos passos oncogenéticos que foi precedido pela mutação responsável pelas associações terminais. As monossomias observadas, em especial a perda do cromossomo 17, podem também compreender alterações secundárias que levam à deficiência de genes importantes no processo neoplásico, como o **p53**.

Estudos moleculares do tumor, tais como a investigação da presença de unidades de repetição teloméricas e da expressão de oncogenes e de genes supressores, poderão esclarecer alguns detalhes dos mecanismos envolvidos nos rearranjos observados e a relação entre as anomalias cromossômicas e a patogênese desse tumor de Wilms.

O estudo das regiões específicas dos cromossomos 1, 2, 16 e Y, realizadas em 24 pacientes, revelou inversão parcial de leucinas observada em 22 no cromossomo Y e 46 no cromossomo 16. Em dois casos o aumento do número de leucinas observadas sugere uma relação entre a alteração cromossômica e a doença.

Alterações clonais foram observadas em células tumorais de três pacientes. Um deles, portador de leucemia aguda, apresentou a translocação t(4;7)(i) e outro, com leucemia aguda, mostrou monossomia 9 e 15, e um cromossomo 17. Tais alterações confirmam observações prévias de envolvimento de

V. RESUMO E CONCLUSÕES

O câncer é uma doença genética somática. A transformação e a progressão neoplásica envolvem uma série de etapas nas quais ocorrem alterações genéticas constitucionais ou adquiridas que incluem aberrações cromossômicas e ativação ou perda funcional de genes específicos. A identificação dessas anomalias pode ser valiosa no diagnóstico, prognóstico e classificação dos neoplasmas, além de auxiliar na escolha de uma terapia adequada.

O presente trabalho investigou a ocorrência de anomalias cromossômicas em linfócitos normais e em células neoplásicas de 29 pacientes, 14 com lesões benignas e 15 com lesões malignas. A análise dos linfócitos não mostrou alterações constitucionais, mas detectou instabilidade cromossômica significativamente maior nos pacientes com lesões malignas que naqueles portadores de lesões benignas. Tal achado sugere que a instabilidade cromossômica pode ser um fator predisponente da doença ou que a própria condição maligna induz instabilidade genética.

O estudo das regiões heterocromáticas dos cromossomos 1, 9, 16 e Y, realizado em 24 pacientes, revelou inversão parcial da região 9qh em dois deles e aumento da mesma região em um outro. Esses achados não foram significativos para sugerir uma relação entre heterocromatina constitutiva e câncer.

Alterações clonais foram observadas nas células neoplásicas de três pacientes. Um deles, portador de leucemia linfóide aguda, apresentou a translocação $t(4;7;11)$ e outro, com leucemia mielóide aguda, mostrou monossomia 8 e 15, e um cromossomo marcador. Tais alterações confirmam observações prévias do envolvimento desses



cromossomos em leucemia aguda. Os achados cariotípicos no terceiro paciente, que apresentava tumor de Wilms, consistiram de fusões teloméricas em 87,6% das metáfases, com envolvimento de quase todos os cromossomos. As associações teloméricas são eventos raros, não sendo conhecidas descrições de sua ocorrência em tumor de Wilms. Embora as alterações do DNA nas fusões terminais não estejam bem esclarecidas, é possível que a instabilidade telomérica participe da oncogênese e da progressão tumoral.

Os outros casos estudados no presente trabalho mostraram, além de metáfases normais, anomalias numéricas e estruturais não clonais. É interessante que algumas delas consistiram de rearranjos envolvendo cromossomos ou bandas cromossômicas frequentemente alterados em tumores semelhantes ou nos seus correspondentes com maior potencial maligno. Esses resultados indicam que os estudos citogenéticos podem constituir um auxiliar importante no diagnóstico e prognóstico das neoplasias.

The study of heterochromatic regions of chromosomes 1, 9, 14 and Y was performed on lymphocytes from 24 patients. An inv(9) was observed in two individuals and 9qh+ in another. These results were not sufficiently significant to suggest a relationship between constitutive heterochromatin and malignancy.

Clonal changes were found in neoplastic cells from three patients. One had acute lymphoblastic leukemia and a t(4;7)(11;1) and another one had acute myelogenous leukemia and monosomy 9 and 13.

VI. SUMMARY

Cancer is a somatic genetic disease. The neoplastic transformation and the progression of cancer are considered as multistep processes in which sequentially acquired or constitutional genetic abnormalities occur, including chromosome aberrations, activation and loss of specific genes. The identification of those abnormalities can assist in the diagnosis, prognosis and subclassification of the tumors, and hence in the selection of the appropriate treatment.

The present study investigated the frequencies of chromosome anomalies in neoplastic cells and lymphocytes from 29 patients, 14 with benign and 15 with malignant lesions.

The analysis on lymphocytes showed no structural or numerical constitutional alterations but detected a higher rate of spontaneous chromosomal instability in patients with malignant disease compared to those with benign lesions. This finding suggests that chromosome instability may be a predisposing factor for the development of malignancies or that the malignant condition itself may cause genetic instability.

The study of heterochromatic regions of chromosomes 1, 9, 16 and Y was performed on lymphocytes from 24 patients. An inv(9) was observed in two individuals and 9qh+ in another. These results were not sufficiently significant to suggest a relationship between constitutive heterochromatin and malignancy.

Clonal changes were found in neoplastic cells from three patients. One had acute lymphoblastic leukemia and a t(4;7;11) and another one had acute myelogenous leukemia and monosomy 8 and 15,



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

and a marker chromosome. Both findings confirm previous observations of involvement of those chromosomes in acute leukemia. K.H., VYAS, R.

The karyotypic findings from the third case, a Wilms' tumor, consisted of telomeric fusions in 87,6% of metaphases, with involvement of almost all chromosomes. Telomeric associations are rare events and, to our knowledge, this is the first description of their occurrence in Wilms' tumor. Although the DNA changes in terminal fusions are not completely elucidated, it is possible that telomeric instabilities could play a role in oncogenesis and in tumor progression. polymorphisms in patients with malignant

Besides normal metaphases, the other cases in the present study showed numerical and structural nonclonal abnormalities. Of interest is the fact that some of them consisted of rearrangements involving chromosomes or chromosome bands commonly rearranged in similar tumors or in their malignant counterparts. Those results indicate that cytogenetic studies can constitute an important tool in diagnosis and prognosis of cancer. two pre-tumoral lesions from XP

patients. *Int. J. Cancer*, v. 44, p. 79-83, 1989a.

ALEJO, R., AURIAS, A., AVRIL, M.-F., DUTRILLAUX, B. Jumping end-to-end and dicentric in a case of squamous cell carcinoma from a patient with xeroderma pigmentosum. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 40, p. 95-103, 1989b.

ALINENA, G., BILLSTRÖM, R., CASALONE, R., GALLO, E., HITELMAN, F., PASQUALI, F. Cytogenetic pattern in leukemic cells of patients with constitutional chromosome anomalies. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 16, p. 207-218, 1985.

ANANTHASWAMY, H., APPELEGATE, L.A., GOLDBERG, L.H., BALES, E.S.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHVARYU, S.G., DAVE, B.J., TRIVEDI, A.H., JANI, K.H., VYAS, R. Heteromorphism of C-band positive chromosomal regions in CML patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 27, p. 33-38, 1987.
- ADHVARYU, S.G., JANI, K.H., TRIVEDI, A.H., DAVE, B.J., RAWAL, U.M. Y chromosome in leukemia patients. A study on the heteromorphic nature of its heterochromatic segment. **Neoplasma**, v. 36, n. 3, p. 343-347, 1989.
- AGUILAR, L., LISKER, R., RUZ, L., MUTCHINICK, O. Constitutive heterochromatin polymorphisms in patients with malignant diseases. **Cancer**, v. 47, p. 2437-2439, 1981.
- ALEDO, R., AURIAS, A., CHRÉTIEN, B., DUTRILLAUX, B. Jumping translocation of chromosome 14 in a skin squamous cell carcinoma from a xeroderma pigmentosum patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 33, p. 29-33, 1988.
- ALEDO, R., DUTRILLAUX, B., LOMBARD, M., AURIAS, A. Cytogenetic study on eleven cutaneous neoplasms and two pre-tumoral lesions from XP patients. **Int. J. Cancer**, v. 44, p. 79-83, 1989a.
- ALEDO, R., AURIAS, A., AVRIL, M.-F., DUTRILLAUX, B. Jumping end-to-end dicentrics in a case of squamous cell carcinoma from a patient with xeroderma pigmentosum. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 40, p. 95-103, 1989b.
- ALIMENA, G., BILLSTRÖM, R., CASALONE, R., GALLO, E., MITELMAN, F., PASQUALI, F. Cytogenetic pattern in leukemic cells of patients with constitutional chromosome anomalies. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 16, p. 207-218, 1985.
- ANANTHASWAMY, H., APPELEGATE, L.A., GOLDBERG, L.H., BALES, E.S.

Deletion of the c-Ha-ras-1 allele in human skin cancers. **Mol. Carcinog.**, v. 2, p. 298-301, 1989.

ANDERSON, M.L.M., SPANDIDOS, D.A. Onco-suppressor genes and their involvement in cancer. **Anticancer Res.**, v. 8, p. 873-880, 1988.

ANDRADE, J.A.D. **Heteromorfismos Q em uma Amostra de Recém-Nascidos Negrbides da Cidade de São Paulo**, Tese de Doutorado, Departamento de Morfologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1986.

ANTONINI, P., VENUAT, A.M., CAILLOU, B., SCHLUMBERGER, M., PARMENTIER, C., BERGER, R., BERNHEIM, A. Cytogenetic studies of 19 cases of thyroid papillary carcinomas. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session V, 1992.

ARTHUR, D.C., BERGER, R., GOLOMB, H.M., SWANSBURY, G.J., REEVES, B.R., ALIMENA, G., VAN DEN BERGHE, H., BLOOMFIELD, C.D., DE LA CHAPELLE, A., DEWALD, G.W., GARSON, O.M., HAGEMEIJER, A., KANEKO, Y., MITELMAN, F., PIERRE, R.V., RUUTU, T., SAKURAI, M., LAWLER, S.D., ROWLEY, J.D. The clinical significance of kariotypy in acute myelogenous leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 40, 203-216, 1989.

ARETXABALA, X., ROA, I., YONEMURA, Y., ARAYA, J.C., HIROSE, N., MIWA, K., MIYASAKI, I. Pacientes con cancer gastrico: analisis del "padron de ploidia del ADN". **Rev. Méd. Chile**, v. 116, p. 977-980, 1988.

ATKIN, N.B. Chromosome 1 heteromorphism in patients with malignant disease: a constitutional marker for a high risk group? **British Medical Journal**, v. 1, p. 385, 1977.

ATKIN, N.B. Solid tumor cytogenetics. Progress since 1979. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 40, p. 3-12, 1989.

- ATKIK, N.B., BAKER, M.C. Pericentric inversion of chromosome 1: frequency and possible association with cancer. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 19, p. 180-184, 1977.
- ATKIN, N.B., BAKER, M.C. Small memacentric marker chromosomes, particularly isochromosomes in cancer. **Hum. Genet.**, v. 79, p. 96-102, 1988.
- ATKIN, N.G., BRITO-BABAPULLE, V. Chromosome 1 C-band heteromorphisms in patients with carcinoma *in situ* and invasive carcinoma of the cervix uteri. **Aust. NZ. J. Obstet. Gynaec.**, v. 23, p. 73-76, 1983.
- ATKIN, N.B., BRITO-BABAPULLE, V. Chromosome 1 heterochromatin variants and cancer: a reassessment. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 18, p. 325-331, 1985.
- ATKIN, N.B., BACKER, M.C., PETKOVIĆ, I. Squamous cell carcinoma of the skin with an unusual marker chromosome. **Cytobios**, v. 54, p. 161-166, 1988.
- AXELROD, D.E., KUCZEK, T. Clonal heterogeneity in populations of normal cells and tumor cells. **Computers Math. Applic.**, v. 18, n. 10/11, p. 871-881, 1989.
- BABU, A., VERMA, R.S. Characterization of human chromosomal constitutive heterochromatin. **Can. J. Genet. Cytol.**, v. 28, n. 5, p. 631-644, 1986.
- BALABAN G., HERLYN, M., GUERRY IV, D., BARTOLO, R., KOPROWSKI, H., CLARK, W.H., NOWELL, P.C. Cytogenetics of human malignant melanoma and premalignant lesions. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 11, p. 429-439, 1984.
- BALE, S.J., DRACOPOLI, N.C., TUCKER, M.A., CLARK, W.H.JR., FRASER, M.C., STANGER, B.Z., GREEN, P., DONIS-KELLER, H., HOUSMAN, D.E.,



- GREENE, M.H. Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, p. 1367-1371, 1989.
- BARBACID, M. Ras genes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 56, p. 779-827, 1987.
- BARBACID, M. Ras oncogenes: their role in neoplasia. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 20, p. 225-235, 1990.
- BARDI, G., JOHANSSON, B., PANDIS, N., BEKASSI, A.N., KULLENDORFF, C.-M., HAGERSTRAND, I., HEIM, S. i(8q) as the primary structural chromosome abnormality in a hepatoblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 51, p. 281-283, 1991.
- BARDI, G., PANDIS, N., MANDAH, N., HEIM, S., SKIFAS, K., WILLEN, H., PANAGIOTOPOULOS, G., RYDHOLM, A., MITELMAN, F. Chromosomal abnormalities in giant cell tumors of bone. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 57, p. 161-167, 1991.
- BARRIOS, L., MIRÓ, R., CABALLIN, M.R., FUSTER, C., CUEDEA, F., SUBIAS, A., EGOZCUE, J. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 41, p. 61-70, 1989.
- BARRIOS, L., MIRÓ, R., CABALLIN, M.R., FUSTER, C., CUEDEA, F., SUBIAS, A., EGOZCUE, J. Chromosome instability in bladder carcinoma patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, p. 107-111, 1990.
- BARTRAM, C.R., KLEIN, A., GROSVELD, G. C-abl and bcr Rearrangement in Philadelphia-Negative CML. In: **Leukemia: Recent Advances in Biology and Treatment**, Alan R. Liss, New York, p. 41-48, 1985.
- BAUER, J., SOKOL, L., STRIBRŇÁ, J., KREMEN, M., KRAJSOVÁ, I., HAUSNER, P., HEJNAR, P. Amplification of N-myc oncogene in human



- melanoma cells. **Neoplasma**, v. 37, n. 3, p. 233-238, 1990.
- BECHER, R., GIBAS, Z., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A. Nonrandom chromosome changes in malignant melanoma. **Cancer Res.**, v. 43, p. 5010-5016, 1983.
- BENITEZ, J., VALCARCEL, E., RAMOS, C., AYUSO, C., CASCOS, A.S. Frequency of constitutional chromosome alterations in patients with hematologic neoplasias. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 24, p. 345-354, 1987.
- BENN, P.A. Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 28, p. 465-473, 1976.
- BENNETT, J.M., CATAUSKY, D., GALTON, D.A.G, SULTAN, C. Proposal for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group. **Br. J. Haematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.
- BERGER, R., BERNHEIM, A., MITELMAN, F., RYDHOLM, A. C-band pattern in lymphocytes of patients with soft tissue sarcomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 9, p. 145-150, 1983.
- BERGER, R., BERNHEIM, A., KRISTOFFERSSON, U., MITELMAN, F., OLSSON, H. C-band heteromorphism in breast cancer patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 18, p. 37-42, 1985.
- BERNARDS, R., RUSTGI, A.K., VAN'TVEER, L., HATEBOER, G., BEIJERBERGEN, R., BILLAUD, M. Regulation of cellular gene expression by n-myc in neuroblastoma. **In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors.** Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session II, 1992.
- BERNE, J., MCCOLL, I., ADINOLFI, R. Recessive mutations and



- chromosome deletions leading to cancer. **Br. J. Surg.**, v. 76, p. 327-330, 1989.
- BISHUN, N.P., WILLIAMS, D.C., MILLS, J., LLOYD, N., RAVEN, R.W., PARKE, D.V. Chromosome damage induced by chemicals. **Chem. Biol. Interactions**, v. 6, p. 375-392, 1973.
- BLACK, W.C., HUNT, W.C. Histologic correlations with the clinical diagnosis of dysplastic nevus. **Amer. J. Surg. Pathol.**, v. 14, n.1, p. 44-52, 1990.
- BLOOMFIELD, C.D. Chromosomal abnormalities in acute leukemia. **Schweiz. Med. Wschr.**, v. 115, n. 43, p. 1501-1505, 1985.
- BODMER, W.F., BAILEY, C.J., BODMER, J. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. **Nature**, v. 328, p. 614-616, 1987.
- BOEHE, T., RABBITTS, T.H. A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man. **Eur. J. Biochem.**, v. 185, p. 1-17, 1989.
- BOGLIOLO, L., PEREIRA, F.E.L., GUIMARÃES, R.C. Transtornos do Crescimento e da Diferenciação Celular. II. Neoplasias (Tumores). **In: LOPES, E.R., CHAPADEIRO, E., RASO, P., TAFURI, W.L. (eds.). Patologia**, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 4a. ed., p. 180-205, 1987.
- BOS, J.L., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancer. **Nature**, v. 327, p. 293-297, 1987.
- BOWN, K.W., SHAWA A.P.W., POIRIER, V., TYLER, S.J., BERRY, P.J., MOTT, M.G. Loss of chromosome 11p alleles in cultured cells from Wilms' tumors. **Br. J. Cancer**, v. 60, p. 25-29, 1989.
- BRODEUR, G.M., SEEGER, R.C., SCHWAB, M., VARMUS, H.E., BISHOP, J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas

correlates with advanced disease stage. **Science**, v. 224, p. 1121-1124, 1984.

BROGGER, A., HAGMAR, L., INGER, LISE, H., HEIM, S., HÖGSTEDT, B., KNUDSEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I., REUTERWALL, C., SALOMAA, S., SKERFVING, S., SORSA, M. An inter-nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 45, p. 85-92, 1990.

BROWN, K.W., SHAW, A.P.W., POIRIER, U., TYLER, S.J., BERRY, P.J., MOTT, M.F., MAITLAND, N.J. Loss of chromosome 11p alleles in cultured cells derived from Wilms' tumours. **Br. J. Cancer**, v. 60, p. 25-29, 1989.

BROWN, K.W., GARDNER, A., WILLIAMS, J.C., MOTT, M.G., McDERMOTT, A., MAITLAND, N.J. Paternal origin of 11p15 duplications in the Beckwith-Wiedemann syndrome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 66-70, 1992.

BRUNS, G.A., DRACOPOLI, N.C. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 1. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 55, p. 77-85, 1990.

BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology**. Plenum Press, New York, 2o. ed., p. 13-52, 1987.

BUCHANAN, J.A., CAVENEE, W.K. Genetic markers for assessment of retinoblastoma predisposition. **Disease Markers**, v. 5, p. 141-152, 1987.

BUYS, C.H.C. Overview and Prospects. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 52, n. 2, p. 207-213, 1991.

CAIRNEY, A.E.L., ANDREWS, M., GREENBERG, M., SMITH, D., WEKSBERG, R. Wilms tumor in three patients with Bloom syndrome. **J. Pediatr.**, v. 113, n. 3, p. 539-549, 1990.

v. 111, n. 3, p. 414-416, 1987.

CALL, K.M., GLASER, T., ITO, C.Y., BUCKLER, A.J., PELLETIER, J., HABER, D.A., ROSE, E.A., KRAL, A., YEGER, H., LEWIS, W.H., JONES, C., HOWSMAN, D.E. Isolation and characterization of a zing-finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. **Cell**, v. 60, p. 509-520, 1990.

CAPOROSSI, D., BACCHETTI, S., NICOLETTI, B. Synergism between aphidicolin and adenoviruses in the induction of breaks at fragile sites on human chromosomes. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 54, n. 1, p. 39-54, 1991.

CARNEY, D.N. Molecular Genetics of Lung Cancer. In: **European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**, 2, Leuven, 30/07-01/08/1990. Abstracts, A9.

CASALONE, R., MINELLI, E., PORTENSOSO, P., GIUDICI, A. Clonal duplication of the Y chromosome and fra(X)(q28) in a case of epidermoid carcinoma of the esophagus. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 45, p. 269-271, 1990.

CASALONE, R., CASALONE, G., MINELLI, E., PORTENTOSO, P., RIGHI, R., MERONI, E., GIUDICI, A., POZZI, C., BONO, A.V. Significance of the clonal and sporadic chromosome abnormalities in nonneoplastic renal tissue. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session VI, 1992.

CASARTELLI, C., ROGATTO, S.R. Cytogenetic study of a gastric human tumor. **Rev. Brasil. Genet.**, v. IX, n. 3, p. 521-538, 1986.

CASARTELLI, C., RUZZENE, M.A.M. ROGATTO, S.R., BARBIERI-NETO, J., PHILBERT, P.M.P. Cytogenetic study of mesenchymal neoplasias. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 13, n. 3, p. 539-549, 1990.

- CASARTELLI, C., RODRIGUEZ, R., BARBIERI-NETO, J., PHILBERT, P.M.P.,
MATHES, A.C.S. Benign breast pathologies: cytogenetic analysis.
**In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics
of Human Solid Tumors.** Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session
VII, 1992.
- CASATI, A., STEFANINI, M., GIORGI, R., GHETTI, P., NUZZO, F.
Chromosome rearrangements in normal fibroblasts from xeroderma
pigmentosum homozygotes and heterozygotes. **Cancer Genet.
Cytogenet.**, v. 51, p. 89-101, 1991.
- CAVALLI, L.R., ROGATTO, S.R., CAVALLI, I.J., SILVEIRA, R.
Characterization of chromosome alterations in fibroadenomas of
the breast. **In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and
Molecular Genetics of Human Solid Tumors.** Porto/Espinho, 26-
29/04. Abstracts Session VII, 1992.
- CAVENEY, W.K., KOUFOS, A., HANSEN, M.F. Recessive mutant genes
predisposing to human cancer. **Mutat. Res.**, v. 168, n. 1, p. 3-14,
1986.
- CHEN, T.R., SHAW, M.W. Stable chromosome changes in a human
malignant melanoma. **Cancer Res.**, v. 33, p. 2042-2047, 1973.
- CHEN, T.R. Chromosome changes in 6-TG-resistant mutant strains
derived from a karyotypically stable human line, C32. **Cytogenet.
Cell Genet.**, v. 35, p. 181-189, 1983.
- CHIAO, P.J., BISCHOFF, F.Z., STRONG, L.C., TAINSKY, M.A. The current
state of oncogenes and cancer: experimental approaches for
analyzing oncogenetic events in human cancer. **Cancer Metast.
Rev.**, v. 9, p. 63-80, 1990.
- CILLO, C., LING, V., HILL, R.P. Gene amplification and tumor



- progression. **Pathol. Biol.**, v. 37, n. 9, p. 1032-1033, 1989.
- COHEN, P.E., ERKMAN, B. Combined mongolism and leukemia. **Amer. J. Dis. Child.**, v. 112, p. 429-443, 1966.
- COHEN, M.M., LEVI, H.P. Chromosome Instability Syndromes. **Ad. Hum. Genet.**, Vol 18, Plenum Publishing Corporation, p. 43-149, 1989.
- COMPTON, D.A., WEIL, M.M., JONES, C., RICCARD, V.M., STRONG, L.C., SAUNDERS, G.F. Long range phisical map of the Wilms' tumor-aniridia region on human chromosome 11. **Cell**, v. 55, p. 827-836, 1988.
- COROMINAS, M., KAMINO, H., LEON, J., PELLICERE A. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is H-ras involved in differentiation as well as proliferation? **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 86, p. 6372-6376, 1989.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4a ed., p. 197-243, 1991.
- COWAN, J.M., HALABAN, R., FRANCKE, U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 80, n. 14, p. 1159-1164, 1988.
- COWELL, J.K., WADEY, R.B., BUCKLE, B.B., PRITCHARD, J. The aniridia-Wilms' tumour association: molecular and genetic analysis of chromosome deletions on the short arm of chromosome 11. **Hum. Genet.**, v. 82, p. 123-126, 1989.
- CROCE, C.M. Role of chromosome translocations in human neoplasia. **Cell**, v. 49, p. 155-156, 1987.
- CROCE, C.M., KLEIM, G. Chromosome translocations and human cancer. **Sci. Amer.**, v. 252, p. 44-50, 1985.
- CUNNINGHAM, M., DICKERMAN, J.D. Fragile X syndrome and acute

- lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 62, n. 11, p. 2383-2386, 1988.
- DALLA-FAVERA, R., BREGNI, M., ERICKSON, J., PATTERSON, D., GALLO, R., CROCE, C.M. Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 7824-7827, 1982.
- DALLA-FAVERA, R., MARTINOTTI, S., GALLO, R.C., ERICKSON, J., CROCE, C.M. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. **Science**, v. 219, p. 963-967, 1983.
- DAL CIN, P., SANDBERG, A.A. Chromosome changes in soft tissue tumors: benign and malign. **Cancer Invest.**, v. 7, p. 63-76, 1989.
- DALLAPICCOLA, B. Cytogenetics of mendelian mutations associated with cancer proneness. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 26, p. 85-94, 1987.
- DAVIS, L.M., STALLARD, R., THOMAS, G.H., COUILLIN, P., JUNIEN, C., NOWAK, N.J., SHOWS, T.B. Two anonymous DNA segments distinguish the Wilms' tumor and aniridia loci. **Science**, v. 241, p. 840-842, 1988.
- DE BRAEKELEER, M. Proto-oncogenes, growth factor genes, receptor genes, differentiation genes and structural rearrangements in human cancer. **Anticancer Res.**, v. 8, p. 1325-1328, 1988.
- DE BRAEKELEER, M., SMITH, B., LIN, C.C. Fragile sites and structural rearrangements in cancer. **Hum. Genet.**, v. 69, n. 2, p. 112-116, 1985.
- DE LA CHAPELLE, A. Conference Overview. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 41, n. 2, p. 211-214, 1989.
- DEWALD, G., AHL, R.J., SPURBECK, J.L., CARNEY, J.A., GORDON, H.



Chromosomally abnormal clones and nonrandom telomeric translocations in cardiac myxomas. **Mayo Clin. Proc.**, v. 62, p. 558-567, 1987.

DIAMANDOPOULOS, G.T., MEISSNER, W.A. In: KISSANE, J.M., ANDERSON, W.A.D. (eds.). **Anderson's Pathology**. The C.V. Mosby Company, Missouri, 8a. ed., p. 514-559, 1985.

DICKER, A.P., VOLKENANDT, M., ALBINO, A.P. Mutational analysis of human N-ras genes in malignant melanoma. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 1, p. 257-269, 1990.

DUTRILLAUX, B., CROQUETTE, M.F., VIEGAS-PEQUIGNOT, E., AURIAS, A., COGET, J., COUTURIER, J., LEJEUNE, J. Human somatic chromosome chains and rings. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 20, p. 70-77, 1978.

EJIMA, Y., SASAKI, M.S., KANEKO, A., TANOOKA, H. Types, rates, origin and expressivity of chromosome mutations involving 13q14 in retinoblastoma patients. **Hum. Genet.**, v. 79, p. 118-123, 1988.

FARR, C., FANTES, J., GOODFELLOW, P., COOKE, H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7006-7010, 1991.

FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B., FEINBERG, A.P. Somatic deletion and duplication of genes on chromosome 11 in Wilms' tumours. **Nature**, v. 309, p. 120-178, 1984.

FENAU, P., PREUDHOMME, C., LAI, J.L., MOREL, P., BEUSCART, R., BAUTERS, F. Cytogenetics and their prognostic value in **de novo** acute myeloid leukaemia: a report on 283 cases. **Brit. J. Haematol.**, v. 73, p. 61-67, 1989.

FERTI-PASSANDONOPOULOU, A.D., PANANI, A.D. Common cytogenetic findings in primary breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 27, p. 289-298, 1987.



- FETT-CONTE, A.C. Estudo Cromossômico em Leucemia, Linfoma e Câncer de Pulmão. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 1987.
- FITZGERALD, P.H., MORRIS, C.M. Telomeric association of chromosomes in Beta-cell lymphoid leukemia. **Hum. Genet.**, v. 67, p. 385-390, 1984.
- FLETCHER, C.D.M. The role of cytogenetics and molecular analysis in the classification of benign/borderline soft tissue tumours. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session IV, 1992.
- FOON, K.A., TODD, R.F. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. **Blood**, v. 68, n. 1, p. 1-31, 1986.
- FORNI, A. Chromosomal aberrations in monitoring exposure to mutagens-carcinogens. **IARC Sci. Publ.**, v. 59, p. 325-337, 1984.
- FORRESTER, K., ALMOGUERA, C., HAN, K. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. **Nature**, v. 327, p. 198-303, 1987.
- FRANCKE, U. A gene for Wilms' tumor? **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 692-694, 1990.
- FRANCKE, U., RICCARDI, V.M., HUTNER, H.M., BORGES, W. Interstitial del(11p) as a cause of the aniridia-Wilms' tumor association: band localization and a heritable basis. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 30, p. 81A, 1978.
- FRANCKE, U., YANG-FENG, T.L., BRISSENDEN, J.E., ULLRICH, A. Chromosomal mapping of genes involved in growth control. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 41, p. 855-



866, 1986.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**,

Alan R. Liss, New York, 253 p., 1987.

FUNDERBURK, S.J., KLISAK, I., SPARKES, R.S., CARREL, R.E. Familial

Y/autosome translocation in two unrelated girls. **Ann. Genet.**, v.

25, p. 119-122, 1982.

FURUYA, T., OCHI, H., WATANABE, S. Common fragile sites in

chromosomes of bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes

from healthy persons and leukemia patients. **Cancer Genet.**

Cytogenet., v. 43, n. 1, p. 131-138, 1989.

FUSTER, C., MIRÓ, R., BARRIOS, L., EGOZCUE, J. Telomere association

of chromosomes induced by aphidicolin in a normal individual.

Hum. Genet., v. 84, p. 424-426, 1990.

GAMA, N.B. **Estudo Citogenético de Neoplasias Benignas e Malignas**

Humanas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências,

Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 1991.

GATTUSO, P., REDDY, V., SOLANS, E., KATHURIA, S., ARANHA, G.V.,

JACOBS, H.K., WALLOCH, J. Is DNA ploidy of prognostic

significance in stage I cutaneous melanoma? **Surgery**, v. 108, p.

702-709, 1990.

GENUARDI, M., ZOLLINO, M., SERRA, A., LEONE, G., MANCINI, R., MANGO,

G., NERI, G. Long-term cytogenetic effects of antineoplastic

treatment in relation to secondary leukemia. **Cancer Genet.**

Cytogenet., v. 33, n. 2, p. 201-211, 1988.

GHOSH, P.K., SHOME, D., SAHAY, S., PAL, A., GHOSH, R. Polymorphism

of constitutive heterochromatin in cancer of cervix uteri. **Indian**

J. Med. Res., v. 84, p. 601-606, 1986.

GILGENKRANTZ, S. XYY males and leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**,

- v. 30, p. 337-338, 1988.
- GILMAN, P.A., WANG, N., FAN, S.F., REEDE, J., KHAN, A., LEVENTHAL, B.G. Familial osteosarcoma associated with 13;14 chromosomal rearrangement. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 13, p. 123-131, 1984.
- GORDON, H. Oncogenes. **Mayo Clin. Proc.**, v. 60, p. 697-713, 1985.
- GOVAERTS, L., DAENEN, S., BONG, B., BREED, A., JONG, B. Deletion (8)(q22) as the only chromosomal abnormality in a patient with RAEB-t with progression to acute myelocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 30, p. 319-321, 1988.
- GREAVES, M.F. The contribution of molecular genetics to the study of leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 40, p. 217-230, 1989.
- GREEN, A.R. Recessive mechanisms of malignancy. **Br. J. Cancer**, v. 58, p. 115-121, 1988.
- GREENE, M.H. Dysplastic nevus syndrome. **Hosp. Pract.**, p. 91-108, 1984.
- GREIDER, C.W. Chromosome first aid. **Cell**, v. 67, n. 4, p. 645-647, 1991.
- GROUCHY, J.D.E., TURLEAU, C. **Atlas des Maladies Chromosomiques**, Paris Expasion Scientifique Francise, 1977.
- GROUPE FRANCAIS DE CITOGNETIQUE HEMATOLOGIQUE. Cytogenetic findings in leukemic cells of 56 patients with constitutional chromosome abnormalities. **Cancer Genetic. Cytogenetic.**, v. 35, p. 243-252, 1988.
- GRUNDY, P., KOUFOS, A., MORGAN, K., LI, F.P., MEADOWS, A.T., CAVENEE, W.K. Familial predisposition to Wilms' tumor does not map to the short arm of chromosome 11. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 374-378, 1988.

- HAAS, O.A., ZOUBEK, A., GRÜMAYER, E.R., FERSTL, G., GADNER, H. Das Wiedemann-Beckwith-syndrom: klinische charakteristik, konstituionelle chromosomenomalien und tumorinzidenz. **Klin. Pädiat.**, v. 199, p. 283-291, 1987.
- HANSEN, M.F., CAVENEE, W.K. Tumor suppressors: recessive mutations that lead to cancer. **Cell**, v. 53, p. 172-173, 1988.
- HARDEN, D.G. Chromosomes and Cancer Families. In: MILLER, R.W. (ed.). **Unusual Occurrences as Dues to Cancer Etiology**, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, p. 233-242, 1988.
- HASTIE, N.D., ALLSHIRE, R.C. Human telomeres: fusion and interstitial sites. **Trends in Genetics**, v. 5, n. 10, p. 326-331, 1989.
- HASTIE, N.D., DEMPSTER, R.M., DUNLOP, M.G., THOMPSON, M., GREEN, D.K., ALLSHIRE, R.C. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. **Nature**, v. 346, n. 6287, p. 866-868, 1990.
- HAYASHI, Y., EBUCHI, M., SUGITA, K., NAKASAWA, S., SATO, T., KOJIMA, S., BESSHO, F., KONISHI, S., INABA, T., HANADA, R., YAMAMOTO, K. Cytogenetic findings and clinical features in acute leukemia and transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome. **Blood**, v. 72, n. 1, p. 15-23, 1988.
- HECHT, F. Risks of hematologic malignancy with constitutional chromosome abnormalities. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 24, p. 375-377, 1987.
- HECHT, F. Solid tumor breakpoint update. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 31, p. 129-131, 1988a.
- HECHT, F. Oncogene location update. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 31, n. 1, p. 142-143, 1988b.
- HECHT, F., RAMESH, K.H., LOCKWOOD, D.H. A guide to fragile sites on human chromosome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 44, p. 37-45,



1990.

HECHT, F., HECHT, B.K., MORGAN, R., SANDBERG, A.A., LINK, M.P.
Chromosome dues to acute leukemia in Down's syndrome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 21, p. 93, 1986.

HECHT, F., HECHT, B. The telomere in cancer: all's not well that doesn't end well. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 54, p. 245-246, 1991.

HECHT, F., HECHT, B. Total loss of chromosome 17 and p53 gene in solid cancers. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 57, p. 229, 1991.

HECHT, F., SUTHERLAND, G.R. Fragile sites and cancer breakpoints. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 12, p. 179-181, 1984.

HEIM, S., MITELMAN, F. Numerical chromosome aberrations in human neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 22, p. 99-108, 1986a.

HEIM, S., MITELMAN, F. Secondary chromosome aberrations in the acute leukemias. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 22, p. 331-338, 1986b.

HEIM, S., MITELMAN, F. Primary chromosome abnormalities in human neoplasia. **Ad. Cancer Res.**, v. 52, p. 1-41, 1989.

HEIM, S., BERGER, R., BERNHEIM, A., MITELMAN, F. Constitutional C-band patterns in patients with adenomatosis of the colon and rectum. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 18, p. 31-35, 1985.

HEIM, S., JIN, Y-S., MANDAH, N., BIORKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Multiple unrelated clonal chromosome abnormalities in an *in situ* squamous cell carcinoma of the skin. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 36, p. 149-153, 1988.

HEIM, S., MERTENS, F., JIN, Y.S., MANDAH, N., JOHANSSON, B., BIORKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Diverse chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the skin.

Cancer Genet. Cytogenet., v. 9, p. 69-76, 1989a.

HEIM, S., HOHANSSON, B., MERTENS, F. Constitutional chromosome instability and cancer risk. **Mutat. Res.**, v. 221, p. 39-51, 1989c.

HEIM, S., MANDAH, N., JIN, Y., STROMBLAD, S., LINDSTRÖM, E., SALFORD, L.G., MITELMAN, F. Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 52, p. 136-138, 1989b.

HEISTERKAMP, N., STEPHENSON, G., GROSVELD, G., GROFFEN, J. The involvement of human c-abl and bcr in the philadelphia translocation. **In: Genes and Cancer**, Alan R. Liss Inc., New York, p. 547-567, 1984.

HEMMER, J., SCHÖN, E., KREIDLER, J., HAASE, S. Prognostic implications of DNA ploidy in squamous cell carcinomas of the tongue assessed by flow cytometry. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 116, p. 83-86, 1990.

HENRY, I., JEANPIERRE, M., COUILLIN, P., BARICHARD, F., SERRE, J.-L., JOURNEL, H., LAMOUROUX, A., TURLEAU, C., GROUCHY, J. & JUNIEN, C. Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. **Hum. Genet.**, v. 81, p. 273-277, 1989.

HERBERGS, J., DE BRUINE, A., VALLINGA, M., RAMAEKERS, F.C.S., DE GOEIJ, A.F.P.M., TEN KATE, J., HOPMAN, A.H.N. Chromosome 7 aberrations in adenomas of the colon. **In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors** Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session III, 1992.

HOFFBRAND, A.V., PETTIT, J.E. **Hematologia Clínica Ilustrada**, Editora Manole, São Paulo, p. 8.2-10.24, 1988.

- HOFFMAN, M. One Wilms' tumor is cloned; are there more? **Science**, v. 246, p. 1387, 1989.
- HOLLAND, J.F., FREI, E. **Cancer Medicine**, Philadelphia, Lea & Fabiger, Second Edition, 2465 p., 1982
- HOLLIDAY, R. Chromosome error propagation and cancer. **Trends in Genetics**, v. 5., p. 42-45, 1989.
- HOLMQUIST, G.P., DANCIS, B. Telomeric replication, kinetochore organizers and satellite DNA evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4566-4570, 1979.
- HOLZMANN, K., HENN, W., SEITZ, G., WELTER, C., BLIN, N. Tumor specific diminution of chromosomal telomeres. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session VI, 1992.
- HOOK, E.B. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limites and comments on use. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 29, p. 94-97, 1977.
- HORSMAN, D.E., PANTZAR, J.T., DILL, F.J., KALOUSEK, D.K. Klinefelter's syndrome and acute leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 26, p. 375-376, 1987.
- HOWARD-PEEBLES, P.N. X-linked mental retardation with a fragile sites in Xq and an inversion of chromosome No. 9. **Hum. Hered.**, v. 32, p. 139-141, 1982.
- HOWELL, W.M., BLACK, A.D. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.
- HSU, T.C. A historical outline of the development of cancer cytogenetics. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 28, p. 5-26, 1987.



- HSU, T.C., JOHNSTON, D.A., CHERRY, L.M., RAMKISSOON, D., SCHANTZ, S.P., JESSUP, J.M., WINN, R.J., SHIRLEY, L., FURLONG, C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 43, p. 403-409, 1989.
- HUBER, B.E. Therapeutic opportunities involving cellular oncogenes: novel approaches fostered by biotechnology. **The FASEB Journal**, v. 3, p. 5-13, 1989.
- HUFF, V., COMPTON, D.A., CHAO, L.Y., STRONG, E.C., GEISER, C.F., SAUNDERS, G.F. Lack of linkage of familial Wilms' tumor to chromosomal band 11p13. **Nature**, v. 336, p. 377-378, 1988.
- IGGO, R., SCHARER, E. Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session II, 1992.
- ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 21, p. 309-404, 1978.
- ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. HARNDEN, D.G., PATH, F.R.C., KLINGER, H.P. (eds). Karger, Basel, 117 p., 1985.
- ISCN: Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an international system for human cytogenetic nomenclature. MITELMAN, F. (ed.). Karger, Basel, 56 p., 1991.
- JAMRA, M., LORENZI, T.F. **Leucócitos, Leucemias e Linfomas**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1983.
- JANSSON, T., CURVALL, M., HEDIN, A., ENZELL, C.R. In vitro studies of the biological effects of cigarette smoke condensate. III. Induction of SCE by some phenolic and related constituents



- derived from cigarette smoke. **Mutat. Res.**, v. 20, p. 17-24, 1988.
- JIMBO, T., KANEKO, M., INAMURA, Y., SAWAGUCHI, S. Amplification of N-myc oncogene in various childhood cancer. **Japan J. Exp. Med.**, v. 59, p. 43-46, 1989.
- JIN, Y-S., HEIM, S., MANDAHIL, N., BIORKLUND, A., WENNERBERG, J., MITELMAN, F. Multiple apparently unrelated clonal chromosome abnormalities in a squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 32, p. 93-100, 1988.
- JONES, P.A. BUCKLEY, J.D. The role of DNA methylation in cancer. **Adv. Cancer Research**, v. 54, p. 1-23, 1990.
- JORDAN, D.K., DIVELBISS, J.E., WAZIRI, M.H., BURNS, T.L., PATIL, S.R. Fragile site expression in families with Von Hippel-Lindau disease. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 39, n. 2, p. 157-166, 1989.
- JUNIEN, C., VAN HEYNINGEN, V. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 11. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 55, p. 153-169, 1990.
- KACKER, R.K., GIOVANELLA, B.C., PATHAK, S. Consistent karyotypic abnormalities in human malignant melanomas. **Anticancer Res.**, v. 10, p. 859-872, 1990.
- KANDA, N. Oncogenes and chromosome aberrations in human cancer. **Acta Haematol. JPN**, v. 48, p. 1864-1873, 1985.
- KECK, M., EMERIT, I. The influence of culture medium composition on the incidence of chromosomal breakage. **Hum. Genet.**, v. 50, p. 277-283, 1979.
- KELSEY, C.A. Riscos Relativos da Radiação e Outros Perigos Comuns. In: JUHL, J.H., CRUMMY, A.B. (eds.). **Interpretação Radiológica** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5a. ed., p. 1-16, 1992.



- KHAN, S.A., EVANS, A. An examination of the chromosomal abnormalities of benign tumors may be provide a lead to the identification of "metastasis genes". **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 54, n. 1, p. 139-141, 1991.
- KIVI, S., MIKELSAAR, A-V. Q and C-band polylorphisms in patients with ovarian or breast carcinoma. **Hum. Genet.**, v. 56, p. 111-114, 1980.
- KLEIN, G. Multistep emancipation of tumors from growth control: can it be curbed in a single step? **BioEssays**, v. 12, n. 7, p. 347-350, 1990.
- KLEIN, G., KLEIM, E. Oncocene activation and tumor progression. **Carcinogenesis**, v. 5, n. 4, p. 429-435, 1984.
- KNUDSON, A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 68, p. 820-823, 1971.
- KNUDSON, A.G. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. **Cancer**, v. 63, n. 10, p. 1888-1891, 1989.
- KNUDSON, A.G., STRONG, L.C. Mutation and Cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 48, n. 2, p. 313-322, 1972.
- KODAMA, R., DOI, O., HIGASHIYAMA, M., MORI, Y., HORAI, T., TETEISHI, R., AOKI, Y., MISAWA, S. Establishment and characterization of a new Ewing's sarcoma cell line. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 57, p. 19-30, 1991.
- KOKALJ-VOKAC, N., ALMEIDA, A., LEFRANCOIS, D., GERBAULT-SEUREAU, M., MALFOY, B., DUTRILLAUX, B. Hypomethilation and chromosome instability in transformed and cancer cells. **In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors.** Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session VII, 1992.

- KÖPF, I., ISLAM, M.Q., FRIBERG, L.G., LEVAN, G. Familial occurrence of cancer and heteromorphism of the heterochromatic segment of chromosome 1. **Hereditas**, v. 110, p. 79-83, 1989.
- KOUFOS, A., HANSEN, M.F., LAMPKIN, B.C. Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumor. **Nature**, v. 309, p. 170-172, 1984.
- KOVAKS, G., MULLER-BRECHLIN, R., SZUCS, S. Telomeric association in two human renal tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 28, p. 263-366, 1987.
- KRAEMER, K.H., GREENE, M.H. Dysplastic nevus syndrome. **Dermatologic Clinics**, v. 3, n. 2, p. 225-237, 1985.
- KRISTOFFERSSON, U., BERGER, R., BERNHEIM, A., AKERMAN, M., OLSSON, H., MITELMAN, F. C-band polymorphism in non-Hodgkin lymphoma. **Hereditas**, v. 103, n. 1, p. 85-87, 1985.
- KRISTOFFERSSON, U., BERNHEIM, A., BERGER, R., NILSSON, B., HEIM, S., MANDAH, N., MITELMAN, F. Constitutional C-band polymorphism in lymphocytes from patients with chronic myeloid leukemia. **Hereditas**, v. 110, p. 145-148, 1989.
- LABAL DE VINUESA, M., LARRIPA, I., MUDRY DE PARGAMENT, M., BRIEUX DE SALUM, S. Heterochromatic variants and their association with neoplasias. I. Chronic and acute leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 13, p. 297-302, 1984.
- LABAL DE VINUESA, M., LARRIPA, I., MUDRY DE PARGAMENT, M., BRIEUX DE SALUM, S. Heterochromatic variants and their association with neoplasias. II. Preleukemic states. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 14, p. 31-35, 1985.
- LABAL DE VINUESA, M., MUDRY DE PARGAMENT, M., SLAVUTSKY, I., MEISS,



- R., CHOPITA, N., LARRITA, I. Heterochromatic variant and their association with neoplasias. IV. Colon adenomas and carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 31, p. 171-174, 1988a.
- LABAL DE VINUESA, M., SLAVUTSKY, I., MUDRY DE PARGAMENT, M., LARRIPA, I. Heterochromatic variants and their association with neoplasias. V. Non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 31, p. 175-178, 1988b.
- LARSSON, C., SKOGSEID, B., OBERG, K. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. **Nature**, v. 332, p. 85-87, 1988.
- LASKO, D., CAVENEY, W., NORDENSKJÖLD, M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. **Annu. Rev. Genet.**, v. 25, p. 281-314, 1991.
- LEDER, P., BATTEY, J., LENOIR, G., MOULDING, G., MURPHY, W., POTTER, H., STEWART, T., TAUB, R. Translocations among antibody genes in human cancer. **Science**, v. 222, p. 765-771, 1983.
- LEIBOVITZ, A. Development of tumor cell lines. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19, p. 11-19, 1986.
- LEVINE, A.J., MOMAND, J., FINLAY, C.A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453-456, 1991.
- LI, X-Z., REIDY, J.A., WHEELER, V.A., CHEN, A.T.L. Folic acid and chromosome breakage. III. Types and frequencies of spontaneous chromosome aberrations in proliferating lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 173, p. 131-134, 1986.
- LIMON, J. Methodological developments in the cytogenetics of epithelial tumors. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session I, 1992.

- LIMON, J., DAL CIN, P., SANDBERG, A.A. Amplification of long term collagenase disaggregation for cytogenetic analysis of human solid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 23, p. 305-315, 1986.
- LIMON, J., DAL CIN, P., SAIT, S.N.J., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A. Chromosome changes in metastatic human melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 30, p. 201-211, 1988.
- LIMON, J., MRÓZEK, K., HEIM, S., ELFVING, P., NEDOSZYTKO, B., BABIŃSKA, M., MANDAH, N., LUNDGREN, R., MITELMAN, F. On the significance of trisomy 7 and sex chromosome loss in renal cell carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, n. 2, p. 259-264, 1990.
- LIST, A.F., SHAMDas, G.J., VEDMETT, I., SPIER, C., MORGAN, R., SANDBERG, A.A. Predominance of chromosome 5 deletions in myeloid neoplasia associated with solid tumors managed by surgical excision. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 125-129, 1992.
- LITTLE, M., THOMSON, D.B., HAYWARD, D.N.K., SMITH, P.H. Loss of alleles on the short arm of chromosome 11 in a hepatoblastoma from a child with Beckwith-Wiedemann syndrome. **Hum. Genet.**, v. 79, p. 186-189, 1988.
- LITTLEFIELD, L.G., JOINER, E.E. Analysis of chromosome aberrations in lymphocytes of long-term heavy smokers. **Mutat. Res.**, v. 170, p. 145-150, 1986.
- LÓPEZ-LARRAZA, D., DE LUCA, J.C., BIANCHI, N.O. The kinetics of DNA damage by bleomycin in mammalian cells. **Mutat. Res.**, v. 232, p. 57-61, 1990.
- LIU, E., HJELLE, B., MORGAN, R. Mutations of the kirten-ras proto-oncogene in human preleukaemia. **Nature**, v. 300, p. 186-188, 1987.



- LIU, C., WANG, G., LI, P. The expression frequency of common fragile sites and genetic susceptibility to lung cancers. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 42, n. 1, p. 107-114, 1989.
- LUKUSA, T., MEULEPAS, E., FRYNS, J.-P., VAN DEN BERGHE, H., CASSIMAN, J.-J. No significance increase in spontaneous and ethyl methane sulfonate-induced sister chromatid exchanges at the Xq27.3 fragile site. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, p. 87-94, 1990.
- LUNDGREN, R., BERGER, R., KRISTOFFERSSON, U. Constitutive heterochromatin C-band polymorphism in prostatic cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 51, p. 57-62, 1991.
- MANDAHL, N., HEIM, S., KRISTOFFERSSON, U., MITELMAN, F., RØØSER, B., RYDHOLM, A., WILLEN, H. Telomeric association in a malignant fibrous histiocytoma. **Hum. Genet.**, v. 71, p. 321-324, 1985.
- MANDHAL, N., HEIM, S., ARHEDEN, K., RYDHOLM, A., WILLEN, H., MITELMAN, F. Three major cytogenetic subgroups can be identified among chromosomally abnormal solitary lipomas. **Hum. Genet.**, v. 79, n. 3, p. 203-208, 1988.
- MANNENS, M., DEVILEE, P., BLIEK, J., MANDJES, I., KRAKER, J., HEYTING, C., SLATER, R.M., WESTERVELD, A. Loss of heterozygosity in Wilms' tumors, studied for six putative tumor suppressor regions, is limited to chromosome 11. **Cancer Res.**, v. 50, p. 3279-3283, 1990.
- MARKKANEN, A., RUUTU, T., RASI, V., FRANSSILA, K., KNUUTILA, S., DE LA CHAPELLE, A. Constitutional translocation t(3;6)(p14;p11) in a family with hematologic malignancies. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 25, p. 87-95, 1987.
- MARX, J. Oncogenes evoke new cancer therapies. **Science**, v. 249, p.



1376-1378, 1990.

MASERATI, E., CASALI, M., PASQUALI, F., LOCATELLI, F., GIANI, S., PRETE, L., ZECCA, M., INVERNIZZI, R., BASSAN, R. Translocation (8;21) in two cases of refractory anemia with excess of blasts in transformation. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 76-78, 1992.

McALPINE, P.J., STRANC, L.C., BOUCHEIX, C., SHOWS, T.B. The 1990 catalog of mapped genes and report of the nomenclature committee. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 55, p. 5-76, 1990.

McCLAIN, K. Expression of oncogenes in human leukemias. **Cancer Res.**, v. 44, n. 11, p. 5382-5389, 1984.

MERTENS, F., JOHANSSON, B. No increased chromosome breakage in skin fibroblasts from patients with musculoskeletal sarcoma. **Clin. Genet.**, v. 34, p. 20-25, 1988a.

MERTENS, F., JOHANSSON, B. Frequency and distribution of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) - induced structural chromosome aberrations in fibroblasts from sarcoma and non-Hodking's lymphoma patients. **Mutat. Res.**, v. 210, p. 63-70, 1988b.

MERTENS, F., JOHANSSON, B., HEIM, S., MANDAH, N., RYDHOLM, A., MITELMAN, F. Normal frequency of chromosome breakage in lymphocytes from patients with musculoskeletal sarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 33, p. 299-304, 1988.

MERTENS, F., HEIM, S., JIN, Y.-S., JOHANSSON, B., MANDAH, N., BLORKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Basosquamous papilloma. A benign epithelial skin tumor with multiple cytogenetic clones. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 37, p. 235-239, 1989a.

- MERTENS, F., HEIM, S., MANDAH, N., JOHANSSON, B., RYDHOLM, A., BIORKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Clonal chromosome aberrations in a keratoacanthoma and a basal cell papilloma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 39, p. 227-232, 1989b.
- MERTENS, M., JIN, Y., HEIM, S., MANDAH, N., JONSSON, N., MERTENS, O., PERSSON, B., SELEMARK, L., WENNERBERG, J., MITELMAN, F. Clonal structural chromosome aberrations in nonneoplastic cells of the skin and upper aerodigestive tract. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 4., p. 235-240, 1992.
- MICHALOVÁ, K., MUSILOVÁ, J., ZEMANOVÁ, Z., Cytogenetic study of 130 patients with acute nonlymphocytic leukemia. **Neoplasma**, v. 37, n. 3, p. 283-291, 1990.
- MILLER, R.W. Neoplasias and Down's syndrome. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 171, p. 637-644, 1970.
- MILLER, R.W., FRAUMENI, J.R.Jr., MANNING, M.D. Association of Wilms' tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. **N. Engl. J. Med.**, v. 270, p. 922-927, 1964.
- MITELMAN, F. **Catalogue of Chromosome Aberrations in Cancer**. Alan R. Liss, New York, Vol. 5, 2a. ed., p. 1-707, 1985.
- MITELMAN, F. The Cancer Chromosome Registry - Solid Tumors. In **International Workshop on Chromosomes in Solid Tumors 4** Tucson, 24-26/02. Abstracts, 15, 1991.
- MITELMAN, F., HEIM, S. Consistent involvement of only 71 of the 329 chromosomal bands of the human genome in primary neoplasia-associated rearrangements. **Cancer Res.**, v. 48, p. 7115-7119, 1988.
- MITELMAN, F., HEIM, S., ROWLEY, J.D., LE BEAU, M.M. Genes, chromosomes & Cancer: a new forum for research in cancer genetics. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 1, p. 1-2, 1989.



- MITELMAN, F., KANEKO, Y., TRENT, J.M. Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. **Cytogenet. Cell Genet.**, v 55, p. 358-386, 1990.
- MIYAMOTO, M., SUGAWA, H., MORI, T., HASE, K., KUMA, K., IMURA, H. Epidermal growth factor receptor on cultured neoplastic human thyroid cells effects of epidermal growth factor and thyroid stimulating hormone on their growth. **Cancer Res.**, v. 48, p. 3652-3656, 1988.
- MOORHEAD, P.S. Virus Effects on Host Chromosomes. **In: Genetics concepts and neoplasia**, The Williams and Wilkins Company, p. 282-306, 1970.
- MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exptl. Cell Res.**, v. 20, p. 613-616, 1960.
- MORGAN, R., HECHT, F. Deletion of chromosome band 13q14: a primary event in preleukemia and leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 18, p. 243-249, 1985.
- MORGAN, R., JARZABEK, V., JAFFE, J.P., HECHT, B., HECHT, F., SANDBERG, A.A. Telomeric fusion in pre-T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Hum. Genet.**, v. 73, n. 3, p. 260-263, 1986.
- MOYZIS, R.K. The human telomere. **Sci. Am.**, v. 265, n. 2, p. 34-41, 1991.
- MULERIS, M., DUTRILLAUX, A.M., LOMBARD, M., DUTRILLAUX, B. Noninvolvement of a constitutional heritable fragile site at 10q24.2 in rearranged chromosomes from rectal carcinoma cells. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 25, p. 7-13, 1987.



- MURTY, V.V.V.S., MITRA, A.B., SINGH, I.P., LUTHRA, U.K.
Heteromorphisms of C-bands in patients with precancerous and cancerous lesions of the cervix uteri. **Oncology**, v. 44, p. 164-168, 1987.
- NAKAYAMA, T., KANEKO, M., KODAMA, M., NAGATA, C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. **Nature**, v. 314, p. 462-464, 1985.
- NARAHARA, K., KIKKAWA, K., KIMURA, S., KIMOTO, H., OGATA, M., KASAI, M., MATSUOKA, K. Regional mapping of catalase and Wilms' tumor-aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation triad loci to the chromosome segment 11p1305-p1306. **Hum. Genet.** v. 66, p. 181-185, 1984.
- NATARAJAN, A.T., CSUKAS, I., DEGRASSI, F., ZEELAND, A.A. Influence of Inhibition of Repair Enzymes on the Induction of Chromosomal Aberrations by Physical and Chemical Agents. **Prog. Mutat. Res.** v. 4, p. 47-59, 1982.
- NEDOSZYTKO, B., MRÓZEK, K., LIMON, J. Absence of structural rearrangements of chromosome 11 in human primary malignant melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 196-197, 1992.
- NORDENSON, I., BECKMAN, L., LIDÉN, S., STJERNBERG, N. Chromosomal aberrations and cancer risk. **Hum. Hered.**, v. 34, p. 76-81, 1984.
- NOWELL, P.C. Chromosomal and molecular clues to tumor progression. **Semin. Oncol.**, v. 16, n. 2, p. 116-127, 1989.
- NOWELL, P.C., CROCE, C.M. Chromosomes, genes, and cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 125, n. 1, p. 8-15, 1986.
- OCHI, H., WAKE, N., RAO, U., TAKEUCHI, I., SLOCUM, H.K., RUSTUM, Y.M., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A. Serial cytogenetic analysis of a recurrent malignant melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.

- 11, p. 175-183, 1984.
- OCHI, H., DOUGLASS, H.O.Jr., SANDBERG, A.A. Cytogenetic studies in primary gastric cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 22, p. 295-307, 1986.
- OGISO, Y., OIKAWA, T., KONDO, N., KUZUMAKI, N., SUGIHARA, T., OHURA, T. Expression of proto-oncogenes in normal and tumor tissues of human skin. **J. Invest. Dermat.**, v. 90, n. 6, p. 841-844, 1988.
- ORAZI, A., SOZZI, G., CATTORETTI, G., BRAUD, F.D., DELIA, D. Acute leukemia with the (4;11) chromosome translocation following treatment for Hodgkin's disease: a case study. **Haematologica**, v. 73, p. 279-283, 1988.
- ORKIN, S.H., GOLDMAN, D.S., SALLAN, S.E. Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. **Nature**, v. 309, p. 172-174, 1984.
- OYAMA, R.S.K. Estudo Citogenético em Tumores de Pele. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 1991.
- PANANI, A.D., FERTI, A., MALLIAROS, S., RAPTIS, S. Gastric cancer with an i(8q) and long survival. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 214-215, 1992.
- PARIS CONFERENCE (1971): Standardization in human cytogenetics. **Birth Defects**, v. 8, 1972.
- PARIS CONFERENCE (1971), SUPPLEMENT (1975): Standardization in human cytogenetics. **Birth Defects**, v. 11, 1975.
- PARMITER, A.H., BALABAN, G., CLARK, W.H., NOWELL, P.C. Possible involvement of the chromosome region 10q24→q26 in early stages of melanocytic neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 30, p. 11-17, 1986.



313, 317, 1988.

PATHAK, S. Cytogenetics of Solid Tumors. In: LUDERER, A.A., WEETALL, H.W. (eds.). **The Human Oncogenic Viruses**, The Human Press, New Jersey, p. 43-87, 1986.

PATHAK, S. Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity. **Cancer and Metastasis Reviews** v. 8, p. 299-318, 1989/1990.

PATHAK, S., GOODACRE, A. Specific chromosome anomalies and predisposition to human breast, renal cell, and colorectal carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19, p. 29-36, 1986.

PATHAK, S., WANG, Z., DHALIWAL, M.K., SACKS, P.C. Telomeric association: another characteristic of cancer chromosomes? **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 47, p. 227-229, 1988.

PATIL, S.R., LUBS, H.A. Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9, and 16 by C-banding. **Hum. Genet.**, v. 38, p. 35-38, 1977.

PAUL, J. Tumor suppressor genes: oncogenesis update. **Histopathology** v. 15, p. 1-9, 1989.

PEARSON, M., ROWLEY, J.D. The relation of oncogenesis and cytogenetics in leukemia and lymphoma. **Ann. Rev. Med.**, v. 36, p. 471-483, 1985.

PEDERSEN-BJERGAARD, J., OLESEN-LARSEN, S., STRUCK, J., HANSEN, H.H., SPECHT, L., ERSBOLL, H., HANSEN, M.M., NISSEN, N.I. Risk of therapy-related leukaemia and preleukaemia after Hodgkin's disease. **Lancet**, v. 11, p. 83-88, 1987.

PEDERSEN, M.I., BENNETT, J.W., WANG, N. Nonrandom chromosome structural aberrations and oncogene loci in human malignant melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 20, p. 11-27, 1986.

- PENAU, P., LAI, J.L., MOREL, P., NELKEN, B., BAUTERS, F.
Cytogenetics and their prognostic value in childhood and adult
acute lymphoblastic leukemia (ALL) excluding L3. **Hematol. Oncol.**
v. 7, p. 307-317, 1989.
- PETEIN, M., VERHEST, A. Numerous telomeric fusions in a case of
giant cell tumor of bone. In: **3rd European Workshop on
Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**
Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session IV, 1992.
- PETKOVIĆ, I. Constitutive heterochromatin of chromosomes No. 1, 9
and 16 in 90 patients with malignant disease and 91 controls.
Cancer Genet. Cytogenet., v. 10, p. 151-158, 1983.
- PETKOVIC, I., NAKIC, M., CEPULIC, M. Cytogenetic analysis of
hepatoblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 15, p. 369-371,
1985a.
- PETKOVIC, I., NAKIC, M., CEPULI, C.M., TIEFENBACH, A., KONJA, J.
Variability of chromosomes 1, 9, and 16 in children with
malignant diseases. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 16, p. 169-173,
1985b.
- PETKOVIĆ, I., NAKIĆ, M., TIEFENBACH, A., CEPULIĆ, M., KONJA, J.,
KES-FEMINIĆ, R., RAJIĆ, L. Heterochromatic segment length of Y
chromosome in 55 boys with malignant diseases. **Cancer Genet.
Cytogenet.**, v. 25, p. 351-353, 1987.
- PETKOVIĆ, I., NAKIĆ, M., KONJA, J. Heterochromatic variability in
children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet.
Cytogenet.**, v. 54, p. 67-69, 1991.
- PIEROTTI, M.A., SOZZI, G., VONGARZONE, I., GRECO, A., DELLA PORTA,
G. Chromosome rearrangements and oncogene activation in thyroid



- tumors. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session V, 1992.
- PIMENTEL, E. Oncogenes and human cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 14, p. 347-368, 1985.
- PONDER, B.A.J. Prospects for genetic diagnosis in inherited predisposition to cancer. **Tibtech**, v. 8, p. 98-104, 1990.
- POPESCU, N.C., ZIMONJIC, D., DIPADLO, J.A. Viral integration, fragile sites and proto-oncogenes in human neoplasia. **Hum. Genet.**, v. 84, p. 383-386, 1990.
- PORFIRIO, B., PALADINI, P., MACCHERINI, M., GOTTI, G., CINTORINO, M., DE MARCHI, M. Patients with different lung cancers show normal expression of fra(3)(p14.2) in aphidicolin-treated lymphocyte cultures. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 43, n. 1, p. 95-104, 1989.
- PRITCHARD-JONES, K., FLEMING, S., DAVIDSON, D., BICKMORE, W., PORTEOUS, D., GOSDEN, C., BARD, J., BUCKLER, A., PELLETIER, J., HOUSMAN, D., VAN HEYNINGEN, V., HASTIE, N. The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. **Nature**, v. 346, n. 6280, p. 194-196, 1990.
- RANNI, N.S.M., LABAL DE VINUESA, M., MUDRY DE PARGAMENT, M., SLAVUTSKY, I., LARRIPA, I. Heterochromatic variants and their association with neoplasias. III. Multiple myeloma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 28, p. 101-105, 1987.
- REES, M., LEIGH, S., BOWLES, L., TSIOPRA, K., SEN-GUPTA, S., GUNN, A., BRADBURN, M., DELHANTY, J. Analysis of familial and sporadic colorectal tumorigenesis. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**

Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session III, 1992.

REEVE, A.E., HOUSIAUX, P.J., GARDNER, R.J.M., CHEWINGS, W.E., GRINDLEY, R.M., MILLOW, L.J. Loss of a harvey ras allele in sporadic Wilms' tumour. **Nature**, v. 309, p. 174-176, 1984.

REGE-CAMBRIN, G., KERIM, S., SCARAVAGLIO, P., MICHAUX, J.L., VAN DEN BERGHE, H., SAGLIO, G. Chromosome abnormalities involving heterochromatic regions in monocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 46, p. 99-106, 1990.

REY, J.A., BELLO, M.J., DE CAMPOS, J.M., BENITEZ, J., VALCARCEL, E., CASTRO, P.M. C-band studies in lymphocytes from patients with tumors of the nervous system. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 15, p. 129-136, 1985.

RICHMOND, A., FINE, R., MURRAY, D., LANSON, D.H., PRIEST, J.H. Growth factor and cytogenetic abnormalities in cultured nevi and malignant melanomas. **J. Invest. Dermatol.**, v. 86, n. 3, p. 295-302, 1986.

ROBBINS, S.L., RAMZI, S.C., KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**, Ed. Interamericana, Rio de Janeiro, 3a. ed., p. 207-266, 1986.

ROGATTO, S.R., CASARTELLI, C. Cytogenetic analysis of human meningiomas. **Rev. Brasil Genet.**, v. 11, p. 729-744, 1988.

ROQUE, L., SOARES, P., GOMES, P., CORREIA, C., CARRELO, C., CLODE, A., CASTEDO, S., SOARES, J. Multinodular goiters: a cytogenetic study of 14 cases. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**. Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session V, 1992.

ROSENBERG, S.A., BERARD, C.W., BROWN, B.W., BURKE, J., DORFMAN,

- R.F., GLATSTEIN, E., HOPPE, R.T., SIMON, R. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. **Cancer**, v. 49, p. 2112-2135, 1982.
- ROSENDORFF, J., BERNSTEIN, R. Fanconi's anemia - chromosome breakage studies in homozygotes and heterozygotes. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 33, p. 175-183, 1988.
- ROSER, M., FRENZER, S., PREUS-SCHMIDT, U., REIMERS, U., WEICHENTHAL, M., BREITBART, E.W., RUDIGER, H.W. Chromosomale instabilität bei patienten mit malignen melanom der haut. **Onkologie**, v. 12, p. 286-290, 1989.
- ROULEAU, G.A., WERTELECKI, W., HAINES, J.L. Genetic linkage of bilateral accoustic neurofibromatosis to a DNA marker on chromosome 22. **Nature**, v. 329, p. 246-248, 1987.
- ROWLEY, J.D. Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. **Cancer Res.**, v. 44, p. 3159-3168, 1984.
- ROWLEY, J.D. Chromosome Abnormalities in Human Leukemia as Indicators of Mutagenic Exposure. In: HEBERMAN, E., BARR, S.H. (eds.). **Carcinogenesis**, Raven Press, New York, p. 409-418, 1985.
- ROWLEY, J.D. Chromosome abnormalities in leukemia. **J. Clin. Oncol.** v. 6, p. 194-202, 1988.
- ROWLEY, J.D. Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma. **Semin. Hematology**, v. 27, n.n1, p. 122-136, 1990a.
- ROWLEY, J.D. Molecular cytogenetics: rosetta stone for understanding cancer-twenty-minth G.H.A. Clowes Memorial award lecture. **Cancer Res**, v. 50, p. 3816-3825, 1990b.
- ROWLEY, J.D. The philadelphia chromosome translocation. **Cancer**, v. 65, n. 10, p. 2178-2184, 1990c.

- RUBIN, E., FARBER, J.L. **Patologia**, Editora Interlivros Edições, Rio de Janeiro, 1a. ed., p. 128-163, 1990.
- RÖMMELEIN, B., DRIESCHNER, O., EHLERT, U., WEICHENTHAL, M., BRITBART, E.W., RÖDIGER, H.W. Increased mutagen sensitivity in human cultured fibroblasts with constitutively high micronucleus levels. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, n. 2, p. 186-190, 1992.
- SALTMAN, D., ROSS, F.M., FANTES, J.A., ALLSHIRE, R., TURNER, G.E., EVANS, H.J. Telomeric associations in a lymphoblastoid cell line from a patient with B-cell follicular lymphoma. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 50, p. 230-233, 1989.
- SAMPAIO, D.A. **Avaliação Quantitativa da Variação de Heterocromatina Constitutiva em Leucemias e Condições Afins**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1983.
- SAMPAIO, D.A., MATTEVI, M.S., CAVALLI, I.J., ERDTMANN, B. Densitometric measurements of C bands of chromosomes 1, 9, 16 and Y in leukemic and preleukemic disorders. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 41, n. 1, p. 71-78, 1989.
- SANADA, I., ASOU, N., KOJIMA, S., KAWANO, F., SHIDO, T., TAKATSUKI, K. Acute myelogenous leukemia (FAB M1) associated with t(5;16) and eosinophilia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 43, p. 139-141, 1989.
- SANDBERG, A.A. The X Chromosome in Human Neoplasia Including Sex Chromatin and Congenital Conditions With X Chromosome Anomalies. **In: Cytogenetic of the Mammalian Chromosome**, Part B: X Chromosome Anomalies and Their Clinical Manifestations. Alan R. Liss Inc., New York, p. 459-498, 1983.



- SANDBERG, A.A. Application of cytogenetics in neoplastic diseases. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 22, n. 3, p. 219-274, 1985.
- SANDBERG, A.A. Chromosomal lesions and solid tumors. **Hosp. Pract.** v. 23, n. 10, p. 93-106, 1988a.
- SANDBERG, A.A. The cytogenetic route of benign tumours. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 32, p. 11-12, 1988b.
- SANDBERG, A.A. **The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia**, New York, Elsevier, 2a. ed., 1315 p., 1990.
- SANDBERG, A.A. The chromosome changes in benign tumors and the multistep process of carcinogenesis. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors** Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session I, 1992.2
- SANDBERG, A.A., TURC-CAREL, C. The cytogenetic of solid tumors. **Cancer**, v. 59, n. 3, p. 387-395, 1987.
- SANDROS, J., STENMAN, G., MARK, J. Cytogenetic and molecular observations in human and experimental gland tumors. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 44, p. 153-167, 1990.
- SCAPPATICCI, S., LAMBIASE, S., FRACCARD, M., ORECCHIA, G. A clonal t(9;12)(q32;q21) in cultured fibroblasts from a case of Bowen's disease. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 43, p. 249-250, 1989.
- SCHMID, M., HUNGERFORD, D.A., POPPEN, A., ENGEL, W. The use of distamycin A in lymphocyte cultures. **Hum. Genet.**, v. 65, n. 4, p. 377-384, 1984.
- SCHROEDER, T.M. Genetically determined chromosome instability syndromes. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 33, p. 119-132, 1982.
- SCHULZE, B., GOLINSKI, C., FONATSCH, C. Heterochromatin and nucleolus organizer regions in cells of patients with malignant and premalignant lymphatic diseases. **Hum. Genet.**, v. 67, p. 391-



395, 1984.

SCHWAB, M. Genes and chromosomes in cancer. **Interdisc. Sci. Rev.**, v. 14, p. 216-220, 1989.

SCHWAB, M., ALITALO, K., KLEMPNAUER, K.H., VARMUS, H.G., BISHOP, J.M., GILBERT, F., BRODEUR, G., GOLDSTEIN, M., TRENT, J. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. **Nature**, v. 305, n. 15, p. 245-248, 1983.

SCHWARTZ, H.S., BUTLER, M.G., JENKINS, R.B., MILLER, D.A., MOSES, H.L. Telomeric associations and consistent growth factor overexpression detected in giant cell tumor of bone. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 56, p. 263-276, 1991.

SECKER-WALKER, L.M. Prognostic and biological importance of chromosome findings in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1990.

SECKER-WALKER, L.M., ALIMENA, G., BLOOMFIELD, C.D., KANEKO, Y., WHANG-PENG, J., ARTUR, D.C., DE LA CHAPELLE, A., REEVES, B.R., ROWLEY, J.D., LAWLER, S.D., MITELMAN, F. Cytogenetic studies of 21 patients with acute lymphoblastic leukemia in relapse. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 40, p. 163-169, 1989.

SEAWRIGHT, A., FLETCHER, J.M., FANTES, J.A., MORRISON, H., PORTEOUS, D.J., LI, S.S.-L., HASTIE, N.D., VAN HEYNINGEN, V. Analysis of WAGR deletions and related translocations with gene-specific DNA probes, using FACS-selected cell hybrids. **Somatic Cell Mol. Genet.**, v. 14, n. 1, p. 21-30, 1988.

SHABTAI, F., HALBRECHT, I. Risk of malignancy and chromosomal polymorphism: a possible mechanism of association. **Clin. Genet.**



v. 15, p. 73-77, 1979.

- SHABTAI, F., ANTEVI, E., KLAR, D., KIMCHI, D., HART, J., HALBRECHT, I. Cytogenetic study of patients with carcinoma of the colon and rectum: particular C-band variants as possible markers for cancer proneness. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 14, p. 235-245, 1985.
- SIMMERS, R.N., SUTHERLAND, G.R., WEST, A., RICHARDS, R.I. Fragile sites at 16q22 are not at the breakpoint of the chromosomal rearrangement in AMMoL. **Science**, v. 236, p. 92-94, 1987.
- SKUSE, G.R., ROWLEY, P.T. Tumor suppressor genes and inherited predisposition to malignancy. **Semin. Oncol.**, v. 16, p. 128-137, 1989.
- SLAUGHTER, D.P., SOUTHWICK, H.W., SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. **Cancer**, v. 6, p. 963-968, 1953.
- SOBEL, M.E. Metastasis suppressor genes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 4, p. 267-276, 1990.
- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. **Biometry: The Principle and Practice of Statistics in Biological Research**, Freeman and Company, San Francisco, 776 p., 1969.
- SOKOVA, O.I., KIRICHENKO, O.P., MUKERIA, A.F., DUMIDOV, L.V., CHEBOTAREV, A.N., KOPNIN, B.P. Enhanced expression of 1p32 and 1p22 fragile sites in lymphocytes in cutaneous malignant melanomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, n. 1, p. 24-28, 1992.
- SOZZI, G., MIOZZO, M., CALDERONE, C., FOSSATI, G., PIEROTTI, M.A., CALCINELLI, N., PORTA, G.D. Chromosome abnormalities and fragile sites in human melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 44, p. 61-67, 1990.
- SOZZI, G., MIOZZO, M., CARIANI, C.T., PASTORINO, U., PILOTTI, S.,



- SUNDARASEN, V., RABBITS, P.H., PIEROTTI, M.A., DELLA PORTA, G. Characterization of genetic lesions in non malignant bronchial epithelium preneoplastic lesions and lung cancer. **In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors.** Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session X, 1992.
- SPANDIDOS, D.A. Oncogene activation in malignant transformation: a study of H-ras in human breast cancer. **Anticancer Res.**, v. 7, p. 991-996, 1987.
- SPANDIDOS, D.A., ANDERSON, M.L.M. Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. **J. Pathol.**, v. 157, p. 1-10, 1989.
- SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and onco-suppressor genes as prognostic indicators in the development of human tumors. **In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors.** Porto/Espinho, 26-29/04. Abstracts Session II, 1992.
- SQUIRE, J., GALLIE, B.L., PHILLIPS, R.A. A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. **Hum. Genet.**, v. 70, n. 4, p. 291-301, 1985.
- SREEKANTIAH, C., BHARGAVA, M.K. Double minute chromatin bodies in carcinoma of the human cervix uteri. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 134-140, 1992.
- SREEKANTIAH, C., LEONG, S.P.L., SANDBERG, A.A. Complex cytogenetic changes in benign neoplasmas. Report of six lipomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 47, p. 113-130, 1990a.
- SREEKANTIAH, C., LEONG, S.P.L., CHU, D., SANDBERG, A.A. Translocation (X;12)(q27;q14) in a lipoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, p. 235-239, 1990b.



- SREEKANTIAH, C., SANDBERG, A.A. Clustering of aberrations to specific chromosome regions in benign neoplasms. **Int. J. Cancer** v. 48, p. 194-198, 1991.
- SUCIU, S. Constitutive heterochromatin studies in patients with solid tumors. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 111, p. 291-294, 1986.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, v. 75, p. 304-306, 1972.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes. I. Factors affecting expression in lymphocytes culture. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 31, p. 125-135, 1979.
- SUTHERLAND, G.R., SIMMERS, R.N. No statistical association between common fragile sites and nonrandom chromosome breakpoint in cancer cells. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 31, p. 9-15, 1988.
- SVENDSEN, L.B., LARSEN, J.K., CRISTENSEN, I.J. Human skin fibroblast *in vitro* tetraploidy. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 39, p. 245-251, 1989.
- TAKEMIYA, M., SHIRAISHI, S., TERAMOTO, T., MIKI, Y. Bloom's syndrome with porokeratosis of Mibelli and multiple cancers of the skin, lung and colon. **Clin. Genet.**, v. 31, n. 1, p. 35-44, 1987.
- TAYLOR, S.R., LOCKER, J. A comparative analysis of nuclear DNA content and N-myc gene amplification in neuroblastoma. **Cancer**, v. 65, n. 6, p. 12-15, 1990.
- TEDESCHI, B., PORFIRIO, B., VERNOLE, P., CAPOROSSO, D., DALLAPICCOLA, B., NICOLETTI, B. Common fragile sites: their prevalence in subjects with constitutional and acquired chromosomal instability. **Am. J. Med. Genet.**, v. 27, p. 471-482, 1987.

- TEYSSIER, J.R. The chromosomal analysis of human solid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 37, p. 103-125, 1989.
- TEYSSIER, J.R., FERRE, D. Frequent clonal chromosomal changes in human non-malignant tumors. **Int. J. Cancer**, v. 44, p. 828-832, 1989.
- TOUGH, I.M., BAIKIE, A.G., HARNDEN, D.G., KING, M.J., BROWN, N.W.C., BUCKTON, K.E., JACOBS, P.A., McBRIDE, J.A. Cytogenetic studies in chronic myeloid leukaemia and acute leukaemia associated with mongolism. **The Lancet**, v. 1, p. 411-417, 1961.
- TRENT, J., CRICKARD, K., GIBAS, Z., GOODACRE, A., PATHAK, S., SANDBERG, A.A., THOMPSON, F., WHANG-PENG, J., WOLMAN, S. Methodologic advances in the cytogenetic analysis of human solid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19, p. 57-66, 1986.
- TRENT, J.M., LEONG, S.P.L., MEYSKENS, F.L. Chromosome alterations in human malignant melanoma. In: CONTI, C.J. (ed.) **Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects**, Raven Press, New York, p. 165-186, 1989.
- TRENT, J.M., MEYSKENS, F.L., SALMON, S.E., RYSCHON, K., LEONG, S.P.L., DAVIS, J.R., McGEE, D.L. Relation of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. **N. Eng. J. Med.**, v. 322, p. 1508-1511, 1990.
- TSUCHIYA, H., MATSUDA, I., KANEKO, Y. Why does childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperdiploidy show a favorable prognosis. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 50, n. 2, p. 273-275, 1990.
- TURC-CAREL, C., AURIAS, A., MUGNERET, F., LIZARD, S., SIDANER, I., VOLK, C., THIERY, J.P., OLSCHWANG, S., PHILIP, I., BERGER, M.P., PHILIP, T., LENOIR, G.M., MAZABRAUD, A. Chromosomes in Ewing's

- sarcoma. I. An evaluation of 85 cases and remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 32, p. 229-238, 1988. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 57-63, 1990.
- VAN DEN BERGHE, H. Chromosome Changes in Human Malignant Diseases. In: **Biology of cancer**, Alan R. Liss Inc., New York, p. 279-290, 1983. **Cytogenet.**, v. 51, p. 249-272, 1991.
- VAN DER SCHROEFF, J.G., EVERS, L.M., BOOT, H.J.M., BOS, J.L. Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. **J. Invest. Dermatology**, v. 94, n. 4, p. 423-425, 1990. H., BUCKLE, P., YEDHANS, E., PRITCHARD, J.
- VARELLA-GARCIA, M. Heteromorfismos Cromossômicos em Oligofrênicos com Anomalias Congênitas e Cariótipo Normal. Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 1982. polymorphise of chromosomes 9;
- VEKEMANS, M., DE BRAEKELEER, M., DE CHADAREVIAN, J.P. Cytogenetic analysis of Wilms' tumor: evidence of a multistep process. **Oncology**, v. 46, p. 306-309, 1989. **Cancer Res.**, v. 50, p.
- VERMA, R.S., DOSIK, H. Human chromosomal heteromorphism: nature and clinical significance. **Inst. Rev. Cytol.**, v. 62, p. 361-383, 1980. H.P., ANYLON, H., BEHN, F.G. t(2;14)(p13;q32): a recurring
- VERNOLE, P., TEDESCHI, B., NICOLETTI, B. Fragile site induction by aphidicolin may be increased in parents of neuroblastoma patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 50, n. 1, p. 35-44, 1990.
- VERP, M.S., SIMPSON, J.L. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 25, p. 191-218, 1987.
- VIG, B.K., STERNES, K.L., PAWELETZ, N. Centromere structure and function in neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 43, p. 151-178, 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of



- VIG, B.K., SCHROETER, D., PAWELETZ, N. Centromere separation. Early replication of repetitive DNA associated with inactive centromeres. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 50, p. 57-65, 1990.
- VIG, B.K., STERNES, K.L. Centromeres without kinetochore proteins. Another mechanism for origin of aneuploidy in neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 51, p. 269-272, 1991.
- VOLPE, J.P.G. Genetic instability of cancer. Why a metastatic tumor is unstable and a benign tumor is stable. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 34, n. 1, p. 125-134, 1988.
- WADEY, R.B., PAL, N., BUCKLE, B., YEOMANS, E., PRITCHARD, J., COWELL, J.K. Loss of heterozygosity in Wilms' tumour involves two distinct regions of chromosome 11. **Oncogene**, v. 5., p. 901-907, 1990.
- WAHEDI, K., PAWLOWITZKI, I.W. C-band polymorphism of chromosome 9: quantification by C-bands. **Human. Genet.**, v. 77, p. 1-5, 1987.
- WANG-WUU, S., SOUKUP, S., BOVE, K., GOTWALS, B., LAMPKIN, B. Chromosome analysis of 31 Wilm's tumors. **Cancer Res.**, v. 50, p. 1786-1793, 1990.
- WATSON, M.S., LAND, V.J., CARROLL, A.J., PULLEN, J., BOROWITZ, M.J., LINK, M.P., AMYLOM, M., BEHN, F.G. t(2;14)(p13;q32): a recurring abnormality in lymphocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 121-124, 1992.
- WEBB, T., HEATH, D. Fragile 3p14 in patients with Von Hippel-Lindau syndrome compared to controls. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 56, n. 2, p. 157-162, 1991.
- WEBER, J., McCLURE, M. Oncogenes and cancer. **British Medical Journal**, v. 294, p. 1246-1248, 1987.
- WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of



VIII. APENDICE

- multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 49, p. 3713-3721, 1989.
- WINTROBE, M.M. **Clinical Hematology**. Philadelphia, Ed. Lea & Fabiger, 1991.
- WOLMAN, S.R. Cytogenetic heterogeneity: its role in tumor evolution. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19, p. 129-140, 1986.
- WOLMAN, S.R., CAMUTO, P.M., EISENBERG, A.J., FEINER, H.D., GRECO, M.A. Wilms' tumor: a search for the critical lesion. **Hum. Pathol.**, v. 11, n. 7, p. 715-721, 1990.
- XIAO, S., GENG, J.-S., FENG, X.-L., LIU, X.-Q., LIU, Q.-Z., LI, P. Cytogenetic studies of light primary gastric cancers. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 58, p. 79-84, 1992.
- YUNIS, J.J. **Genes and chromosomes in human cancer**. Prog. Med. Viro, v. 32, p. 58-71, 1985.
- YUNIS, J.J., BRUNNING, R.D. Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukaemias and myelodysplastic syndromes. **Clin. Haematol.**, v. 15, n. 3, p. 597-620, 1986.
- YUNIS, J.J., SORENG, A.L. Constitutive fragile sites and cancer. **Science**, v. 226, p. 1199-1204, 1984.
- YUNIS, J.J., LOBELL, M., ARNESEN, M.A., OKEN, M.M., MAYER, M.G., RYDELL, R.E., BRUNNING, R.D. Refined chromosome study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 68, p. 189-194, 1988.
- WU, S.-Q., CHRISTIAN, B.J., REZNIKOFF, C.A., MEISNER, L.F. Marker chromosome stability associated with neoplastic transformation of huma uroepithelial cells. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 36, p. 77-87, 1988.

VIII. APÊNDICE

VIII.1. Meios de cultura e soluções

a. Meios de cultura

a1. Meio de cultura completo para linfócitos e blastos do sangue periférico

- 100ml de meio RPMI 1640 (CULTILAB)
- 20ml de soro fetal bovino (CULTILAB)
- 0,15ml de solução de penicilina/estreptomicina (CEME), concentração final de 125U/ml:125ug/ml)

Sua estocagem foi feita a 4 C por cerca de 30 dias.

a.2. Meio de cultura completo para células de tumores sólidos

- 100ml de meio HAM F-10 (CULTILAB)
- 1ml de solução de penicilina/estreptomicina, concentração final de 125U/ml:125ug/ml)
- 5, 10 ou 20ml de soro fetal bovino (CULTILAB)
- 1ml de solução de glutamina 200mM
- 2ul de solução de insulina

Sua estocagem foi feita a 4 C por um período aproximado de 30 dias.

b. Solução de Hanks sem Ca e Mg

- 1000 ml de água desionizada
- 8,0g de NaCl
- 0,4g de KCl
- 1,0g de glicose



- 60mg de KH PO₂
- 47,5ml de Na HPO₂
- 17mg de vermelho de fenol

A solução foi distribuída em volumes de 100ml e estocada a -20 °C.

Foram adicionados diferentes antibióticos à solução de Hanks, de acordo com sua finalidade, se para transporte ou lavagem da amostra. A anfotericina B só foi utilizada na solução de lavagem, em função da sua toxicidade. Os dois tipos de soluções foram estocadas a 4 °C por um período de até seis meses.

b.1. Para transporte de amostras

- 100ml de solução de Hanks sem Ca e Mg
- 2ml de solução de penicilina/estreptomicina, concentração final de 250U/ml:250ug/ml
- 0,2ml de sulfato de gentamicina, concentração final de 0,04mg/ml

A solução foi estocada a 5 °C por até 6 meses.

b.2. Para lavagem das amostras de tecidos

- 100ml de solução de Hanks sem Ca e Mg
- 2ml de solução de penicilina/estreptomicina, concentração final de 250U/ml:250ug/ml
- 0,2ml de sulfato de gentamicina, concentração final de 0,04mg/ml
- 50ul de anfotericina, concentração final de 2,5ug/ml

c. Solução de penicilina/estreptomicina (12.500U/ml:12.500ug/ml)

A solução de uso foi obtida a partir de:



- 0,5ml de solução mãe de penicilina com concentração de 1.000.000U/ml, preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril

- 1ml de solução mãe de estreptomicina com concentração de 500.000ug/ml, preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril

- 38,5ml de solução de Hanks sem Ca e Mg.

As soluções mãe e de uso foram estocadas a -20°C por um período de um ano e seis meses.

d. Solução de sulfato de gentamicina (Garamicina - SCHERING)
(20U/ml)

A solução comercial, que possui concentração de 20U/ml, está pronta para uso. Foi estocada a 4°C por um ano e meio.

e. Solução de anfotericina B (Fungizon -SQUIBB) (5ml/ml)

- 50ml de anfotericina B

- 10ml de água desionizada estéril

A solução foi estocada a -20°C .

f. Solução de L-glutamina (PUREX) (200mM)

- 2,92g de L-glutamina

- 100ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

Após esterilização por filtração, foi estocada em alíquotas de 1ml a -20°C por um ano.

g. Solução de insulina (BIOBRAS U-40) (40U/ml)

A solução comercial possui concentração de 40U/ml e por-



tanto, está pronta para uso. Foi mantida a 4 C em alíquotas de 1ml.

h. Solução de collagenase (GIBCO - TIPO ii) (200u/ML)

A collagenase foi dissolvida em meio Ham F-10 incompleto para obtenção de solução com concentração final de 200U/ml. Em seguida, foi mantida em banho-maria a 37 C por duas horas e, a 4 C por 12 a 14 horas. Após esse período, a solução foi esterilizada por filtração e estocada em alíquotas de 0,5ml a -20 C por dois a três meses.

i. Solução de colquicina (HOUDÉ) (16,7ug/ml)

- 1,0mg de colquicina (uma pérola)
- 60ml de água desionizada autoclavada

A solução foi distribuída em alíquotas de 5ml em frascos escuros que foram autoclavados por 30 minutos e estocados a 4 C por até seis meses.

j. Solução de colcemide (SIGMA) (2ug/ml)

A solução de uso foi obtida a partir de:

- 100ug de colcemide em 10ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução mãe 10ug/ml). Foi estocada a -20 C após filtração.
- 2ml de solução mãe de colcemide em 10ml de solução Hanks sem Ca e Mg (solução de uso 2ug/ml). Foi estocada a 4 C.

k. Solução hipotônica de citrato de sódio (1%)

- solução aquosa de citrato de sódio 1%, estocada à temperatura ambiente ou a 4 C por dois a três meses.

1. Solução hipotônica de cloreto de potássio (0,075M)

- 5,59g de KCl em 1000ml de água desionizada

Foi estocada à temperatura ambiente ou a 4 C, por dois a

três meses.

m. Fixador

- 3 partes de metanol
- 1 parte de ácido acético glacial

Foi preparado minutos antes do uso.

n. Tampão Sorensen, pH 6,8

- 49ml de solução A
- 51ml de solução B
- 200ml de água destilada

Foi mantido a 5 C por no máximo seis meses.

n.1. Solução A

- 14,196g de difosfato de sódio (NaPO₂)
- 500ml de água destilada

n.2. Solução B

- 13,61g de monofosfato de potássio (KH₂PO₄)
- 500ml de água destilada

o. Solução de tripsina (SIGMA) (0,2%)

- 0,120g de tripsina dissolvidas em 60ml de solução de

PBS

A solução foi preparada minutos antes do uso.

p. Solução salina de PBS

- 8,0g de NaCl
- 0,2g de KCl
- 1,15g de difosfato de sódio (Na HPO_2)
- 0,2g de monofosfato de potássio (KH_2PO_4)
- 1000ml de água destilada

A solução foi mantida a 4 °C por no máximo seis meses.

q. Solução salina 2 x SSC

- 8,765g de NaCl
- 4,41g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7$
- 500ml de água destilada

A solução foi mantida a 4 °C por no máximo seis meses.

r. Solução de hidróxido de bário (5%)

- 3,0g de $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
- 60ml de água desionizada na temperatura de 50-60 °C

Foi filtrada em papel de filtro e estocada a 4 °C por cerca de quatro meses.

s. Solução reveladora

- 2,0g de gelatina Merck
- 1,0ml de ácido fórmico puro
- 100ml de água desionizada

A solução foi agitada por 10 minutos e mantida à 4 °C.



t. Solução aquosa de nitrato de prata (50%)

- 1,0g de nitrato de prata (AgNO_3)
- 2,0ml de água desionizada

A solução foi armazenada em frasco escuro, bem fechado e envolto em papel alumínio, e mantida a 4 °C.

u. Corante Giemsa (MERCK) (2%)

A solução mãe foi obtida dissolvendo-se 0,5g de Giemsa em 33ml de glicerina durante aproximadamente duas horas, a 60 °C, em banho maria. Após o esfriamento, foram adicionados 33ml de metanol e a solução foi mantida em vidro escuro por cerca de uma semana. Após esse período, a solução foi filtrada e estocada à temperatura ambiente.

A solução de uso foi preparada diluindo-se 0,5ml da solução mãe em 24,5ml de tampão Sørensen, imediatamente antes do uso.

VIII.2. Ficha padronizada para realização de exame citogenético

Laboratório de Citogenética Humana - Departamento de Biologia
IBILCE - UNESP - Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jdim. Nazareth
CEP 15054-000 - São José do Rio Preto - SP
Fone (0172) 24-4966, ramais 57 e 72

PACIENTE

Nome Sexo Data Nascimento
Endereço Fone
Hospital No. Registro

MEDICO

Nome Fone

MATERIAL

Sangue () Medula Ossea () Nódulo linfático () Pele () Tecido Tumoral ()
Tipo Outros!..... Data Colheita Hora

DIAGNOSTICO CONSIDERADO

Leucemia tipo D.mieloproliferativa tipo Preleucemia ...
Linfoma tipo D. de cél. plasmática Tumor sólido tipo ..
Primário Outro:

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

1. Em caso de retardo mental e/ou malformações, descreva os principais sinais clínicos:
2. Em caso de doença hematológica:
 - a) Medula: % Blastos corpos de Auer () celularidade
relação L/E
setor eritróide
setor mielóide
setor megacariocítico
 - b) Sangue periférico: % de blastos na periferia
contagem de: gl.brancos gl.vermelhos... plaquetas.....
 - c) Diferencial: promielo... mielo... segment... eosino... baso...
3. Cronologia da doença: data do diagnóstico.....
presente condição: estável () ativa () relapso () desconhecida ()
4. Terapia: Químio - início em duração
Radio - início em duração
Outras: início em duração tipo
5. Outras informações: Ocupação do paciente
Exposição a carcinógenos: tipo duração
História familiar de neoplasia () tipo
Radiografia recente () tipo
Fumante () Cigarros/dia Tempo
- Comentários

