

Nilce Barril Gama

Estudo Citogenético de Neoplasias Benignas
e Malignas Humanas



NILCE BARRIL GAMA

ESTUDO CITOGENETICO DE NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS HUMANAS

X546.3:575:616-006

G1842

não catalogado

Dissertação apresentada para obtenção do título de **Mestre em Genética** 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.



544/91

ORIENTADORA: Profa. Dra. Tâmara da Silva

São José do Rio Preto

1991





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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva



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

Dedico este trabalho
aos meus filhos.

Ana Carolina e Vitor Rafael,
com amor.

"São os fracassos suportados com
energia que dão direito ao êxito"

Heinrich

"Creio invencivelmente que a ciência e a paz triunfarão da ignorância e da guerra, que os povos chegarão a um acordo não para destruir, mas para construir, e que o futuro pertencerá aos que mais tiverem trabalhado para aliviar o sofrimento humano".

Pasteur

Dedico este trabalho

aos meus filhos,

Ana Carolina e Vitor Rafael,

com amor.

"São os fracassos suportados com
energia que dão direito ao êxito"

Meimoz



AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, agradeço a todos que incentivaram e colaboraram direta ou indiretamente para sua concretização.

A Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, orientadora e amiga, pela confiança, apoio, colaboração e compreensão que permitiu-me conciliar a vida pessoal com a realização deste trabalho e também por ter despertado em mim a paixão pelo estudo das doenças neoplásicas.

A Profa. Dra. Adeline Buzini da Costa Silva e ao Prof. "Creio invencivelmente que a ciência e a paz triunfarão da ignorância e da guerra, que os povos chegarão a um acordo não para destruir, mas para construir, e que o futuro pertencerá aos que mais tiverem trabalhado para aliviar o sofrimento humano".

Pasteur

Ao biólogo Sidnei Olívio e à Sra. Luiza Cirelli, pela dedicação com que mantiveram as boas condições de funcionamento do Centro de Microscopia deste Instituto.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Wladimir João Taddai, e aos demais docentes desse curso que sempre nos acompanharam com empenho e dedicação.

A Profa. Dra. Marileila Varela Garcia, pela colaboração e pelas valiosas sugestões na revisão deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca deste Instituto, pela prestação dos serviços de Consulta Bibliográfica.

As Profas. Eng. Maria Coloni Bertolotto, Agnes Cristina Fett Conto, Ana Elizabeth da Silva, Maria Tarcília Vilela de Azeredo Oliveira, Nivea Dulce Tedeschi Conforti Fróes, Eliana Moriele Versuti, Ana Maria Alves de Oliveira e ao Prof. Edson Guilherme

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, agradeço a todos que incentivaram e colaboraram direta ou indiretamente para sua concretização.

À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, orientadora e amiga, pela confiança, apoio, colaboração e compreensão que permitiu-me conciliar a vida pessoal com a realização deste trabalho e também por ter despertado em mim a paixão pelo estudo das doenças neoplásicas.

A Profa. Dra. Adelina Buzini da Costa Silva e ao Prof. Dr. Edmundo José de Lucca pela atenção e por todas as valiosas sugestões durante a análise da pro forma.

Ao amigo Josué Rodrigues dos Santos, pelo auxílio técnico durante a realização da parte experimental.

Ao biólogo Sidnei Olivio e à Sra. Luiza Cirelli pela dedicação com que mantiveram as boas condições de funcionamento do Centro de Microscopia deste Instituto.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação, Prof. Dr. Wladimir João Taddei, e aos demais docentes desse curso que sempre nos acompanharam com empenho e dedicação.

A Profa. Dra. Marileila Varella Garcia pela colaboração e pelas valiosas sugestões na revisão deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca deste Instituto, pela presteza nos serviços de Comutação Bibliográfica.

As Profas. Eny Maria Goloni Bertollo, Agnes Cristina Fett Conte, Ana Elizabeth da Silva, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, Nívea Dulce Tedeschi Conforti Frêes, Eliana Moriele Versuti, Ana Maria Alves de Oliveira e ao Prof. Edson Guilherme

Vieira pela amizade e apoio.

A minha amiga e companheira Rosa S. Kawasaki com quem dividi os sucessos e fracassos durante o período de implantação da técnica de cultivo de células tumorais deste laboratório.

Às minhas grandes amigas, Mônica Vannucci Nunes e Elza Midori Hashimoto, pelo carinho, compreensão e solidariedade.

Aos demais colegas do Curso de Pós-Graduação pelo ambiente fraterno e cordial.

Ao Pós-Graduando Marcelo Ferreira Lourenço, pela amizade, carinho e pela indiscutível disponibilidade nos serviços de digitação deste texto.

A Maria Tereza Alves Pereira Vidotti e Sebastião Vidotti Junior, pelo incentivo no meu ingresso no Curso de Pós-Graduação.

Às tias: Maria Tereza, Irani, Eliete, Rosana, Maria Eliane, Aidê e Sônia do Hotelzinho Tuti-Fruti pelo carinho e dedicação com a minha própria F1.

Ao meu esposo e companheiro, Reginaldo Gama, pelo apoio e incentivo e principalmente pela ajuda na coleta das amostras.

Aos meus filhos, Ana Carolina e Vitor Rafael, pela alegria de viver e pela força que me incentiva a continuar.

A minha mãe, Dirce, pela educação, carinho e esforço desempenhado para a minha formação profissional.

A minha irmã Nanci, minha melhor amiga, e ao meu cunhado Cláudio, pelo carinho e apoio.

A todos os amigos que fiz durante a realização deste Curso pela solidariedade e carinho que me permitiram suportar e conciliar os maus momentos da minha vida pessoal com a realização deste trabalho.

ÍNDICE

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

1. INTRODUÇÃO
A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

1.1. Neoplasias: definição e classificação 3
1.2. Citogenética e câncer 6
1.3. Biologia molecular e câncer 11

1.4. Condições de cultivo de células tumorais 16
1.5. Objetivos 22

II. MATERIAL E MÉTODOS 23

II.1. Material 23
II.2. Métodos 23

A. Métodos utilizados para ensaios sobre as condições de cultura 23

B. Métodos para a obtenção das preparações cromossômicas 26

III. RESULTADOS 32

III.1. Ensaios preliminares sobre condições de cultura 32

III.2. Análise citogenética 38

III.2.1. Cervicite crônica inespecífica com metaplasia endocervical 39

III.2.2. Carcinoma in situ de colo uterino 41

III.2.3. Adenocarcinoma ulcerado da parede curvada do estômago 42

III.2.4. Nódulo colóide multinodular de tireóide 43

III.2.5. Sarcoma sinovial pouco diferenciado 47

III.2.6. Carcinoma adenocístico de glândula salivar 47

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	01
I.1. Neoplasias: definição e classificação	1
I.2. Citogenética e câncer	6
I.3. Biologia molecular e câncer	11
I.4. Condições de cultivo de células tumorais	16
I.5. Objetivos	22
II. MATERIAL E MÉTODOS	23
II.1. Material	23
II.2. Métodos	23
A. Métodos utilizados para ensaios sobre as	23
condições de cultura	23
B. Métodos para a obtenção das preparações	26
cromossômicas	26
III. RESULTADOS	32
III.1. Ensaios preliminares sobre condições de	32
cultura	32
III.2. Análise citogenética	38
III.2.1. Cervicite crônica inespecífica com	39
metaplasia endocervical	39
III.2.2. Carcinoma in situ de colo uterino	41
III.2.3. Adenocarcinoma ulcerado da pequena	42
curvatura do estômago	42
III.2.4. Bócio colóide multinodular de tiróide	43
III.2.5. Sarcoma sinovial pouco diferenciado	47
III.2.6. Carcinoma adenocístico de glândula	47
salivar	47

I. INTRODUÇÃO

1.1. Neoplasias: definição e classificação

IV. DISCUSSÃO 61

IV.1. Ensaios preliminares sobre condições de cultura 62

IV.2. Constituição cromossômica dos tumores sólidos humanos 64

IV.3. Lesões benignas e malignas de colo uterino 71

IV.4. Tumores benignos e malignos de tireóide 76

IV.5. Adenocarcinoma de estômago 80

IV.6. Sarcoma sinovial 82

IV.7. Carcinoma adenocístico de glândula salivar 84

V. RESUMO 88

VI. SUMMARY 91

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 94

VIII. APÊNDICE 116

I. INTRODUÇÃO

I.1. Neoplasias: definição e classificação

O termo neoplasia significa literalmente "crescimento novo", e neoplasma é a massa de células resultante desse processo. De forma mais completa, um neoplasma pode ser definido como proliferações locais de clones celulares atípicos, que apresentam crescimento autônomo e progressivo em virtude de alterações induzidas por fatores de diferentes naturezas. Os neoplasmas são também conhecidos como tumores ou cânceres. O termo tumor indica uma inchação de qualquer etiologia, muito embora nem todos produzam inchaço ou sejam neoplásicos. Alguns deles são resultantes apenas de hemorragia ou edema, mas o uso corrente dessa palavra como sinônimo de neoplasma consagrou seu significado. O termo câncer é a denominação frequentemente usada para todos os tumores malignos (ROBBINS, 1975; LOPES *et al.*, 1987).

Vários esquemas de classificação dos neoplasmas têm sido usados (ROBBINS, 1975; HEIM & MITELMAN, 1987a). De modo geral, eles utilizam parâmetros como o comportamento, se benigno ou maligno, o aspecto histomorfológico ou, então, critérios histogenéticos (LOPES *et al.*, 1987).

Os tumores benignos são lesões que não põem a vida do hospedeiro em risco e as suas células não se infiltram nos tecidos circundantes, não se separam do clone primário e, portanto, não formam colônias secundárias ou metastáticas. Esses tumores tendem a crescer de forma ordenada ao longo de toda a sua superfície, salvo se houverem obstáculos opostos pelos tecidos ao seu redor, e, quando removidos, geralmente proporcionam a cura do paciente. Em contraste,

quase que a totalidade das células provenientes de lesões malignas possui a superfície de tal modo alterada que sua adesividade às células vizinhas fica reduzida. Isto permite sua infiltração entre os constituintes dos tecidos normais circundantes e a destruição dos mesmos, sua penetração nos vasos sanguíneos e linfáticos, e sua movimentação até locais distantes formando colônias secundárias. As células malignas apresentam uma atividade reprodutora intensa o que confere um crescimento rápido à massa tumoral, e podem levar o hospedeiro à morte (ROBBINS, 1975; LOPES **et al**, 1987).

A nomenclatura da maioria das neoplasias benignas é feita adicionando-se o sufixo "oma" ao tipo celular que as constitui. Assim, por exemplo, são designados de miomas aqueles originados de células musculares, de adenomas os originados de células glandulares e de lipomas os originados de células adiposas. Essa terminologia é útil para tumores benignos de origem mesenquimatosa, tais como os que crescem a partir de músculos, ossos, tendões, cartilagem, gordura, vasos, tecido linfático e fibroso, dado que suas células se assemelham às correspondentes normais. Entretanto, as lesões benignas de origem epitelial, citologicamente semelhantes entre si, são classificadas de modo variado, algumas com base na célula de origem, outras de acordo com o padrão histológico e outras, ainda, conforme as características macroscópicas. Por exemplo, o termo adenoma é aplicado tanto a neoplasias com arranjos glandulares quanto às que derivam de glândulas, embora estas não apresentem necessariamente tal arranjo. O termo papiloma ou pólipo se refere a neoplasmas epiteliais benignos que formam projeções em dedo de luva ou verrucosas, a partir do epitélio de superfície, visíveis macro ou microscopicamente. Os termos cistoma ou cistadenoma, por sua vez, indicam grandes



massas císticas como aquelas que ocorrem no ovário (ROBBINS, 1975).

No caso dos tumores malignos, a nomenclatura é feita de acordo com a origem do tecido afetado. Aqueles provenientes do tecido mesenquimal são geralmente denominados sarcomas, como o fibrossarcoma, que é composto por fibrócitos, e o condrossarcoma, formado por condrócitos. Todavia, há algumas exceções a esta regra, como é o caso das leucemias e linfomas, que envolvem células sanguíneas e afins. As neoplasias malignas que se originam de células epiteliais de qualquer uma das três camadas germinativas constituem os carcinomas. Este último grupo pode receber denominações mais detalhadas de acordo com suas características histológicas ou com o órgão envolvido, como por exemplo, o adenocarcinoma das células renais e o carcinoma broncogênico. Além desses dois grupos, os tumores malignos podem ser classificados em neurogênicos, quando se originam do tecido nervoso, em tumores embrionários, quando surgem de células germinativas displásicas e em tumores de origem incerta (ROBBINS, 1975; HEIM & MITELMAN, 1987a).

Classificações mais amplas usam os termos simples, mistos e compostos, de acordo com a semelhança e origem das células. Assim, são considerados tumores simples os formados por um só tipo celular e mistos os que apresentam mais de um tipo geralmente derivados de uma única camada germinativa, como os tumores mistos de glândula salivar e o de Wilms. Os tumores compostos contêm uma variedade de tipos celulares representativos de mais de uma camada germinativa. Exemplos desse grupo são o teratocarcinoma e o teratoma dermóide (ROBBINS, 1975).

A Tabela 1 resume a classificação das neoplasias benignas e malignas, segundo HEIM & MITELMAN (1987a) com modificações.



Tabela 1. Classificação das neoplasias benignas e malignas, segundo HEIM & MITELMAN (1987) com modificações.

Tecido de origem	Benigno	Maligno
I. Epitelial		Carcinomas
Local de origem		
Glândula salivar	- Adenoma pleomórfico - Cistadenoma papilar linfomatoso ou tumor de Warthin	- Adenoma pleomórfico maligno - Leucemia linfoblástica - Leucemia mieloblástica - Linfoma de Burkitt - Linfoma folicular - Carcinoma mucoepidermóide - Carcinoma adenocístico ou cilindroma - Adenocarcinoma de células aci- nosas
Muscular	- Leiomioma	
Sinovial		- Condrossarcoma sinóide
Tiróide	- Adenoma papilar, folicular e atípico	- Carcinoma papilar, folicular, medular e anaplásico
Dente	- Ameloblastoma benigno	- Ameloblastoma maligno
Estômago	- Polipose gástrica - Meningioma	- Adenocarcinoma - Glioma - Retinoblastoma
Fígado		- Hepatoblastoma
Intestino	- Polipose adenomatosa	- Carcinoma de colon
Útero	- Teratoma	- Carcinoma in situ - Carcinoma microinvasor - Carcinoma invasor
Ovário		- Carcinoma de ovário
Rim	- Nevo melanocítico adquirido	- Melanoma - Hipernefoma - Nefroblastoma (tumor de Wilms)
Bexiga		- Carcinoma das células transi- cionais
Pele		- Carcinoma basocelular - Carcinoma espinocelular
Mama	- Fibroadenoma	- Carcinoma de mama
Pulmão		- Carcinoma de pulmão

Tabela 1. (continuação).

Tecido de origem	Benigno	Maligno
II. Mesenquimal Tecido de origem		
Hematopoiético		- Leucemia mielóide - Leucemia linfoblastóide - Leucemia mieloblástica - Linfoma de Burkitt - Linfoma folicular
Muscular	- Leiomioma	- Leiomiossarcoma - Rabdomyossarcoma
Sinovial		- Sarcoma sinovial
Conjuntivo	- Lipoma	- Lipossarcoma - Fibrossarcoma - Condrossarcoma mixóide
III. Tumores neurogênicos		
	- Neurinoma - Meningioma	- Glioma - Neuroblastoma - Retinoblastoma
IV. Tumores embrionário e da célula germinativa		
	- Teratoma	- Teratocarcinoma
V. Tumores de histogênese incerta		
	- Nevo melanocítico adquirido	- Melanoma - Sarcoma de Ewing

I.2. Citogenética e câncer

As primeiras referências a uma possível relação entre aberrações cromossômicas e neoplasias datam do fim do século passado e foram discutidas pelo zoólogo alemão Theodor Boveri, em 1914, em seus estudos sobre a teoria da mutação somática do câncer. De acordo com Boveri, tais aberrações seriam as modificações celulares responsáveis pela transição entre a proliferação normal e a maligna. As dificuldades técnicas da época, entretanto, não permitiram que suas idéias fossem testadas, e as questões relacionadas com o papel das anomalias cromossômicas na gênese do câncer só puderam ser melhor investigadas aproximadamente 60 anos mais tarde. O desenvolvimento de técnicas de cultivo de células com o emprego de agentes capazes de estimular e de interromper a divisão celular, a aplicação de soluções hipotônicas que melhoravam a qualidade das preparações e o uso de técnicas especiais de coloração para bandamento cromossômico tornaram a análise cariotípica relativamente simples e acurada e possibilitaram, dessa forma, o desenvolvimento da citogenética do câncer (SANDBERG, 1980; HEIM & MITELMAN, 1987a).

A primeira anomalia cromossômica consistentemente observada em uma neoplasia humana, a leucemia mieloide crônica, consistiu em um cromossomo do grupo G deficiente (NOWELL & HUNGERFORD, 1960), denominado Philadelphia ou Ph1 por TOUGH **et al.** (1961) e reconhecido por ROWLEY (1973) como um cromossomo 22 que se apresentava envolvido em uma translocação, geralmente com o cromossomo 9. Desde então, muitas alterações cariotípicas foram detectadas em processos malignos, principalmente em leucemias, e os dados assim obtidos contribuíram grandemente para a definição e o diagnóstico dessas

doenças, assim como para o estabelecimento de subgrupos e para o seu prognóstico (HEEREMA *et al.*, 1985; LE BEAU & ROWLEY, 1986; NOWELL *et al.*, 1986; YUNIS & BRUNNING, 1986). Por exemplo, a presença do cromossomo Philadelphia no tipo M1 de leucemia mieloblástica aguda, e da translocação $t(8;14)(q24;q32)$ em leucemia linfoblástica aguda está relacionada com um mau prognóstico. No entanto, os portadores de leucemia mieloblástica aguda do tipo M2 com translocação $t(8;21)(q22;q22)$ e aqueles com leucemia mielóide crônica e cromossomo Philadelphia apresentam resposta satisfatória à terapia e, conseqüentemente, uma sobrevivência relativamente longa (SANDBERG, 1985; LE BEAU & ROWLEY, 1986). A monitorização citogenética da eficiência do tratamento usado, observando para isto o comportamento do clone leucêmico, também tem se mostrado útil nesses casos (HEIM & MITELMAN, 1987a).

Em relação aos linfomas, a correlação das anomalias cromossômicas com as categorias histológicas revela associações muito específicas. O exemplo melhor documentado consiste nas três translocações vistas no linfoma de Burkitt, a $t(8;14)(q24;q32)$, a $t(2;8)(p12;q24)$ e a $t(8;22)(q24;q11)$. Todos ou praticamente todos os pacientes portadores dessa doença apresentam um dos rearranjos citados, que por sua vez são muito raros em outras neoplasias (YUNIS, 1981). Uma outra associação importante é a que ocorre entre os linfomas foliculares e a $t(14;18)(q32;q21)$ (ROWLEY, 1988). Apesar da consistência dessas anomalias nos dois tipos de linfomas, o seu valor prognóstico ainda não foi esclarecido, provavelmente porque os dados ainda são limitados e não permitem uma avaliação correta dos vários fatores que interferem na sobrevivência do paciente (HEIM & MITELMAN, 1987a).



No caso dos tumores sólidos, embora na última década tenha sido publicada uma grande quantidade de informações sobre alterações cromossômicas em vários tipos diferentes de tumores, os dados citogenéticos encontrados ainda são relativamente escassos. Isto ocorre principalmente em consequência das dificuldades técnicas envolvidas. A complexidade cariotípica observada em amostras de algumas lesões, obtidas quase sempre em estágios tardios da progressão tumoral, o reduzido índice mitótico e a baixa qualidade das metáfases constituem alguns dos obstáculos enfrentados. Apesar disso, um número crescente de dados sobre anomalias cromossômicas em tumores sólidos benignos e malignos tem sido utilizado na caracterização e no prognóstico dessas doenças. Por exemplo, a presença de numerosos marcadores em carcinoma das células transicionais de bexiga está correlacionada com uma maior agressividade da lesão e pode ser valiosa na consideração do tratamento a ser seguido. Do mesmo modo, diferentes alterações cromossômicas observadas nesse tumor estão associadas aos seus subtipos histológicos (SANDBERG, 1986; ATKIN, 1989). Outro exemplo é a relação entre um mau prognóstico e a observação de regiões homogeneamente coradas (HSR), double-minutes (dm) e aberrações no braço curto do cromossomo 1 em células de neuroblastoma (CASARTELLI, 1982).

As aberrações cromossômicas também têm sido utilizadas na identificação de neoplasias diversas, de natureza indiferenciada e cujo diagnóstico é frequentemente difícil de ser atingido. Exemplos disso são o neuroblastoma, o sarcoma de Ewing, o rabdomiossarcoma e o linfoma ósseo. As alterações do braço curto do cromossomo 1 em neuroblastoma, dos cromossomos 2, 3 e 13 em rabdomiossarcoma, do

braço longo do cromossomo 14 em linfoma e a presença da translocação 11/22 em sarcoma de Ewing podem fazer o diagnóstico de tais neoplasias. Além disso, a análise citogenética de efusões pleurais tem se revelado de grande valor no diagnóstico diferencial de várias doenças (SANDBERG & TURC-CAREL, 1987).

Nos tumores benignos, embora os resultados ainda sejam muito limitados, é geralmente aceito que a presença de aberrações cromossômicas indica malignização (SANDBERG, 1980; TEYSSIER *et al.*, 1985). Entretanto, alguns estudos referem-se sobre a ocorrência de anomalias em células provenientes de lesões benignas, tais como a trissomia do cromossomo 8 e a translocação recíproca $t(6;15)$ em nevus (RICHMOND *et al.*, 1986), os rearranjos das bandas 12q13-q14 em lipomas (DAL CIN & SANDBERG, 1989; DAL CIN *et al.*, 1988; PAULIEN *et al.*, 1990), o envolvimento dos cromossomos 1, 2, 6, 7, 12, 14 e X, particularmente as regiões 6p12-21, 7q21-31, 12q14-15, 14q22-24 e a monossomia 22 em leiomiomas (BOCHOSIAN *et al.*, 1988; GIBAS *et al.*, 1988; MARK *et al.*, 1990; MUGNERET *et al.*, 1988; TURC-CAREL *et al.*, 1988; KIECHLE-SCHWARZ *et al.*, 1990a,b; NILBERT *et al.*, 1990; VANNI *et al.*, 1990), a monossomia total ou parcial do cromossomo 22 e a perda do Y em meningiomas (ROGATTO & CASARTELLI, 1988), os rearranjos das bandas 8q12 e 12q13-q15 e a deficiência do braço longo do cromossomo 3 nos tumores de glândula salivar (BULLERDIEK *et al.*, 1990; SANDROS *et al.*, 1990). Esses achados podem, em alguns casos, ser usados para fins diagnósticos, como um sinal do caráter benigno da lesão, ou então para o estabelecimento de subgrupos citogenéticos como as translocações $t(12;14)(q14-15;q23-24)$ e $t(1;2)(p36;p24)$, a deficiência intersticial $del(7)(q21.2q31.2)$, e a trissomia do cromossomo 12 que determinam quatro classes diferentes



1.3. Biologia molecular e câncer
de leiomiomas (KIECHLE-SCHWARZ *et al.*, 1990b).

Apesar dos problemas sem resposta ainda serem em grande número, as informações citogenéticas, já obtidas em pacientes com câncer, têm sido cada vez mais usadas como um valioso recurso clínico no diagnóstico, prognóstico e monitorização dessas doenças. Além disso, graças à associação dessas informações com as obtidas pela biologia molecular, alguns dos mecanismos patogênicos envolvidos na carcinogênese puderam ser recentemente identificados. Sem dúvida, essa área do conhecimento cresceu muito desde o seu início no século passado. Entretanto, muitos dados ainda são necessários (HEIM & MITELMAN, 1987a).

1987; HEIM & MITELMAN, 1987b; ATKIN, 1989). Os dados obtidos têm indicado que as anomalias cromossômicas modificam o funcionamento de genes críticos envolvidos no controle da proliferação ou da diferenciação celular, ou de ambos (GORDON, 1985; PINENTEL, 1985; ATKIN, 1989; COROMINAS *et al.*, 1989).

De modo geral, três grupos de genes relevantes ao desenvolvimento do câncer podem ser reconhecidos. O primeiro grupo é formado pelos oncogenes que são genes que mesmo em dose simples, induzem a transformação neoplásica em animais experimentais ou em linhagens celulares específicas. O segundo grupo é constituído pelos genes supressores de tumor ou anti-oncogenes, que são recessivos e presumivelmente inibem o crescimento celular. Sua inativação, em ambos os homólogos, deve ocorrer antes que determinado tumor se desenvolva. Finalmente, o terceiro grupo, que é bastante heterogêneo, consiste de genes moduladores capazes de modificar a interação entre as células neoplásicas e o organismo hospedeiro alterando, por exemplo, a resposta imune ao tumor (KLEIN & KLEIN, 1985).

I.3. Biologia molecular e câncer

O advento das técnicas de biologia molecular, particularmente durante os anos 80, combinado com o rápido progresso nas áreas da biologia celular e tumoral, tem ampliado dramaticamente o entendimento dos mecanismos implicados na iniciação e progressão neoplásica. A citogenética e a tecnologia do DNA recombinante têm convergido para produzir informações mais precisas sobre as alterações genéticas nas condições malignas, por exemplo através do uso da hibridização **in situ** com sondas para sequências localizadas nos pontos de quebras cromossômicas detectadas em células neoplásicas (WATSON **et al.**, 1987; HEIM & MITELMAN, 1987b; ATKIN, 1989). Os dados obtidos têm indicado que as anomalias cromossômicas modificam o funcionamento de genes críticos envolvidos no controle da proliferação ou da diferenciação celular, ou de ambos (GORDON, 1985; PIMENTEL, 1985; ATKIN, 1989; COROMINAS **et al.**, 1989).

De modo geral, três grupos de genes relevantes ao desenvolvimento do câncer podem ser reconhecidos. O primeiro grupo é formado pelos oncogenes que são genes que mesmo em dose simples, induzem a transformação neoplásica em animais experimentais ou em linhagens celulares específicas. O segundo grupo é constituído pelos genes supressores de tumor ou anti-oncogenes, que são recessivos e presumivelmente inibem o crescimento celular. Sua inativação, em ambos os homólogos, deve ocorrer antes que determinado tumor se desenvolva. Finalmente, o terceiro grupo, que é bastante heterogêneo, consiste de genes moduladores capazes de modificar a interação entre as células neoplásicas e o organismo hospedeiro alterando, por exemplo, a resposta imune ao tumor (KLEIN & KLEIN, 1985).

Os oncogenes foram inicialmente identificados em genomas de um grupo de vírus de RNA, os retrovírus, sendo por isso denominados oncogenes virais (**v-onc**). Eles são aparentemente derivados de sequências semelhantes presentes no genoma de animais, os proto-oncogenes ou oncogenes celulares (**c-onc**), os quais são incorporados no RNA viral por ocasião da infecção de células de vertebrados por retrovírus. Os oncogenes, atualmente em número superior a 50, são representados por três letras relacionadas com o nome do vírus onde originalmente foram detectados. É suposto que os proto-oncogenes foram rigorosamente conservados durante o processo evolutivo e que suas funções estejam relacionadas com o controle da divisão e proliferação celular, uma vez que seus produtos são fatores de crescimento, receptores da membrana plasmática ou moduladores da transmissão de sinais através da membrana, além de substâncias que parecem atuar no núcleo celular, agindo diretamente na duplicação ou transcrição do DNA (GORDON, 1985; KAHN & GRAF, 1988).

A proliferação celular normal é o resultado de uma série complexa de reações mediadas pelos fatores de crescimento. Tais substâncias reagem com os receptores presentes na membrana plasmática emitindo sinais que são transmitidos ao núcleo e resultam no aumento ou diminuição da divisão celular. Existem muitas indicações de que os oncogenes podem interferir no controle desse processo em quatro níveis: na produção aumentada de fatores de crescimento, na alteração de seus receptores de membrana, na transmissão intracelular anômala de mensagens da membrana celular para o núcleo, e finalmente na interação direta com as estruturas nucleares (WEINBERG, 1985).

Para que o potencial cancerígeno dos oncogenes seja atin-



gido é necessário, preliminarmente, que eles sejam ativados através de mudanças regulatórias ou estruturais. A melhor evidência de ativação por desregulação, resultando em expressão alterada, é derivada de estudos sobre rearranjos dos locus do oncogene **c-myc** e das imunoglobulinas em linfoma de Burkitt. Nesse caso específico, o **c-myc** é translocado para locais próximos às sequências reguladoras das imunoglobulinas sem sofrer, contudo, modificações importantes na sua estrutura codificadora. Essa mudança de posição faz com que o oncogene permaneça sob influência de mecanismos reguladores de transcrição, que normalmente mantêm altos níveis de imunoglobulina nos linfócitos B, e dessa forma acarreta a expressão elevada do **c-myc** (BOEHM & RABBITTS, 1989).

A amplificação de oncogenes também leva a quantidades aumentadas de seu produto, embora a atividade por cópia gênica seja normal. O exemplo melhor conhecido é o da amplificação do **N-myc** em neuroblastomas, que está significativamente correlacionada com um prognóstico desfavorável (BRODEUR & SEEGER, 1986).

A ativação de oncogenes por mudanças qualitativas do gene estrutural envolve mutações em ponto ou alterações de sequências importantes. As mutações em ponto parecem ser de particular importância no caso dos oncogenes **ras** (KUMAR et al., 1990). As alterações de sequências gênicas, causadas por translocações recíprocas, constituem o mecanismo mais frequente de ativação de alguns oncogenes e geralmente resulta na formação de um novo gene. O melhor exemplo é o do oncogene **c-abl**, que é translocado da banda 9q34 para a banda 22q11 em leucemia mielóide crônica. As investigações citogenéticas e moleculares, em muitos pacientes com essa doença, mostraram que os

pontos de quebra em 22q11 são restritos a uma pequena região contendo apenas 5,8 quilobases, que é chamada "breakpoint cluster region" (bcr). O gene bcr-**abl** quimérico codifica um polipeptídeo de 210 quilodaltons (Kd) nas células leucêmicas, ao contrário do produto **abl** normal de 145 Kd (GROFFEN *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 1988).

Embora os processos de ativação oncogênica sejam parcialmente conhecidos, pouco se sabe sobre as consequências dessa ativação. De qualquer modo, tal mecanismo é provavelmente insuficiente para causar câncer (LEDER *et al.*, 1986). Outras modificações genéticas devem ser necessárias para que o processo maligno ocorra, entre elas destacam-se as que afetam um outro grupo de genes, os antioncogenes.

A primeira indicação de que mutações recessivas em células somáticas poderiam causar o câncer surgiu de estudos sobre a supressão do fenótipo tumoral em células híbridas, formadas pela fusão de células normais e neoplásicas. Outras investigações, ao longo dos anos, sugeriram que locos normais eram capazes de controlar a expressão de proto-oncogenes e que a perda ou inativação de seus dois alelos teria um papel crucial na gênese de muitos tumores. Tais genes receberam o nome de antioncogenes, genes supressores ou emerogenes (HEIM & MITELMAN, 1987b; GREEN, 1988; SAGER, 1989). Os estudos de neoplasias hereditárias, tais como o retinoblastoma e o tumor de Wilms, trouxeram muitas evidências de que tal processo ocorre em duas etapas independentes no desenvolvimento dessas doenças. A primeira delas consiste na mutação de um antioncogene na linhagem germinativa, de modo que o alelo anormal pode ser encontrado em todas as células do organismo. O segundo passo compreende a perda ou inativação do outro alelo em uma célula somática. Somente

quando os dois antioncogenes estiverem alterados é que o processo de malignização ocorrerá (KNUDSON, 1985; CAVENEE, 1986).

Na sua forma mais simples, essa hipótese permite explicar apenas o desenvolvimento do retinoblastoma, já que o tumor de Wilms parece apresentar mais que um gene supressor (MANNENS *et al.*, 1988; SLATER *et al.*, 1990). Entretanto, em outras neoplasias, parece ocorrer um processo de múltiplos passos no qual genes promotores e supressores devem ter papéis fundamentais. Apesar disso, os antioncogenes continuam a ser desativados em apenas duas etapas, uma para cada um dos genes homólogos. Em função dessa idéia, os testes que investigam a perda de heterozigosidade nas células tumorais podem ser importantes na detecção e caracterização de genes supressores (SAGER, 1989). Esses testes utilizam os polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição como marcadores de ligação e permitem a investigação de perdas alélicas em células tumorais de um paciente. Tal pesquisa tem sido feita em DNA proveniente de diferentes tipos de neoplasias, e tem sido sugerida a influência de genes supressores no seu desenvolvimento nos casos em que essa perda é confirmada (MANNENS, *et al.*, 1988; DEVILLEE *et al.*, 1990; VAN der HOUT *et al.*, 1990; VORECHOVSKY *et al.*, 1990).

Apesar do grande número de investigações sobre genes recessivos em câncer, existem atualmente apenas dois antioncogenes bem estabelecidos no genoma humano, o do retinoblastoma no cromossomo 13 e o **p53** no cromossomo 17. Outro candidato, no cromossomo 11, parece estar envolvido com a manifestação do tumor de Wilms (HOFFMAN, 1989; MARX, 1989; SAGER, 1989).

I.4. Condições de cultivo de células tumorais

Um dos principais fatores limitantes do estudo citogenético de tumores sólidos é o baixo índice mitótico encontrado na maioria deles, o que torna seu cultivo necessário para obtenção de metáfases, e esse processo nem sempre é bem sucedido (SANDBERG **et al.**, 1988; ATKIN, 1989).

Uma cultura de células pode ser definida como sendo o crescimento ou manutenção **in vitro** de células, dispersas naturalmente ou, no caso dos tecidos sólidos, por desagregação mecânica, enzimática ou química (REY, 1984; FRESHNEY, 1987). Existem dois tipos básicos de culturas: as primárias e as linhagens. As culturas primárias são obtidas diretamente a partir do tecido original e as linhagens são subculturas **ad infinitum** dos cultivos primários. As culturas primárias, ao contrário das linhagens, tendem a ter o mesmo cariótipo que o tecido parental, ou seja, o número cromossômico é o mesmo e a cromatina sexual é conservada (BIRD & FORRESTER, 1981; LEIBOVITZ, 1986).

Alguns tipos celulares crescem em suspensão, mas outros necessitam de uma superfície de fixação. Nesse último caso, as células podem apresentar morfologia fibroblastóide com formato irregular ou alongado, ou epitelóide, e portanto serem poligonais e intimamente aderidas (BIRD & FORRESTER, 1981; FRESHNEY, 1987).

O ambiente para cultura implica primariamente no frasco de cultivo, no meio, na temperatura e na fase gasosa. O frasco deve apresentar as condições adequadas para que as células se fixem nas situações em que isso for exigido, e iniciem o crescimento. O meio mínimo é composto de aminoácidos e vitaminas, suplementado com

elementos essenciais ao metabolismo celular. A temperatura de cultura depende do animal a partir do qual a amostra foi retirada e oscilações de alguns graus acima ou abaixo do ótimo podem destruir todas as células. Finalmente, os constituintes importantes da fase gasosa compreendem o oxigênio e o gás carbônico, cujos níveis variam de acordo com o tipo celular e as condições utilizadas (FRESHNEY, 1987).

As culturas de células neoplásicas apresentam exigências similares às das células normais, entretanto, o sucesso nesses casos, principalmente nos tumores sólidos, é significativamente menos frequente.

A morfologia pobre dos cromossomos e a complexidade dos cariótipos constituem os principais problemas dos estudos cujos objetivos compreendem a análise citogenética (SANDBERG & TURC-CAREL, 1987). Porém, algumas inovações técnicas têm permitido a obtenção de figuras mitóticas em número e qualidade satisfatórios, em especial no que diz respeito a desagregação tecidual, suplementação do meio de cultura, sincronização da divisão celular e hipotonização adequada (REY, 1984; FRESHNEY, 1987). Apesar disso, nem sempre são obtidos bons resultados e as preparações diretas são algumas vezes utilizadas, pelo menos em alguns tumores como os de colo de útero (ATKIN *et al.*, 1990). Como nem sempre é possível a obtenção de metáfases da própria lesão por causa do baixo índice mitótico, usualmente são necessários os cultivos de curta duração. Esses, assim como as preparações diretas, refletem a constituição cromossômica do tecido, uma vez que somente um pequeno número de divisões celulares ocorre no período de incubação.

Os tumores sólidos geralmente apresentam áreas necróticas



que, juntamente com o tecido conjuntivo, a gordura e os coágulos, necessitam ser retirados antes de seu cultivo. O material também deve ser desagregado e o método mais simples para isso é o mecânico, embora somente 10 a 20% das células assim isoladas são viáveis, conforme revela o teste com azul de tripano. As células mortas, também presentes no material, costumam liberar enzimas poderosas que podem destruir os elementos vivos; devem ser, por isso, removidas ou neutralizadas (LEIBOVITZ, 1986). Um outro tipo de dissociação tecidual, a enzimática, é geralmente exigida quando é necessário um grande número de células e a collagenase é a enzima mais comumente usada por ser menos traumática (TRENT *et al.*, 1986).

Para iniciar o cultivo, alguns pesquisadores dispõem camadas celulares alimentadoras na base do frasco sobre a qual a amostra é semeada. É provável que tais camadas forneçam fatores de crescimento ou nutricionais imprescindíveis para determinados tumores (LEIBOVITZ, 1986). O número de células viáveis no início da cultura deve ser satisfatório de modo a compensar aquelas que não aderem ou que não se dividem. Concentrações de 5×10^5 a 6×10^5 células/ml têm sido sugeridas como adequadas, mas esses valores podem variar de acordo com o tipo celular considerado (BIRD & FORRESTER, 1981).

A solução utilizada no transporte do espécimen ou durante a dissociação precisa ajudar a manter vivas as células e a combater focos iniciais de contaminação. O meio de cultura, por sua vez, deve fornecer os componentes necessários para os processos vitais da célula além de fatores básicos adequados, como a pressão osmótica e a concentração hidrogeniônica. Os vários meios disponíveis contêm



aminoácidos essenciais, vitaminas, sais, carboidratos e outros compostos em diferentes proporções. Os aminoácidos são necessários para a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos e para o transporte iônico; sabe-se que dez aminoácidos são considerados essenciais **in vivo** e doze **in vitro**. Muitas células também requerem glutamina em altas concentrações, em especial as transformadas, ou seja, aquelas que adquiriram um fenótipo maligno sob determinadas condições de cultivo (BIRD & FORRESTER, 1981).

A glicose é a fonte de energia mais frequentemente usada. Na glicólise, ela é metabolizada em piruvato, lactato ou acetacetato e depois, no ciclo do ácido cítrico, é convertida em gás carbônico. O acúmulo de ácido láctico no meio de cultura de células transformadas sugere que o ciclo do ácido cítrico nesses casos não deve ser tão eficiente **in vitro** quanto **in vivo**, e outras fontes de carbono, provavelmente a glutamina, são utilizadas (FRESHNEY, 1987).

Pequenas quantidades de vitaminas do grupo B e outras, cujas necessidades variam de acordo com as concentrações de soro usadas, também são essenciais e muitas dessas substâncias constituem coenzimas envolvidas no metabolismo celular. Os sais são os componentes mais importantes para o controle da osmolalidade e do pH do meio, e participam das atividades enzimáticas e da adesão das células ao frasco. Além desses, outros componentes como os nucleosídeos, os intermediários do ciclo do ácido cítrico, os piruvatos e os lipídeos devem estar presentes no meio, principalmente quando as quantidades de soro são reduzidas (FRESHNEY, 1987).

O soro constitui a fonte de determinadas proteínas e hormônios, mas ao mesmo tempo pode conter substâncias que interferem no crescimento celular como, por exemplo, inibidores, toxinas, anti-



corpos ou agentes infecciosos (FISHER **et al.**, 1958; TOZER & PIRT, 1964; GUILBERT & ISCOVE, 1976; HARRINGTON & GOODMAN, 1980). As globulinas, a fetuina e a transferina são proteínas séricas importantes para a adesão das células ao frasco ou para a neutralização de íons como o ferro, tornando-os menos tóxicos e disponíveis para as reações metabólicas (FISHER **et al.**, 1958; TOZER & PIRT, 1964; GUILBERT & ISCOVE, 1976). Alguns polipeptídeos do soro também induzem a proliferação celular; são eles o fator de crescimento plaquetário (ANTONIADES **et al.**, 1979), o fator de crescimento de fibroblastos (GOSPODAROWICZ & MORAN, 1974), o fator de crescimento endotelial (FOLKMAN **et al.**, 1979), o fator de crescimento epidérmico, o fator com atividade de estimulação multiplicante e os fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2 (FRESHNEY, 1987). Estes dois últimos são polipeptídeos que apresentam grande homologia estrutural à insulina e ligam-se aos mesmos receptores desse hormônio que estão presentes na superfície celular. Podem, desse modo, promover a captação da glicose e aminoácidos pela célula, como faz a insulina e estimular o crescimento (WATSON **et al.**, 1987; SINCLAIR **et al.**, 1988).

A hidrocortisona está também presente no soro em quantidades variáveis e facilita a adesão e proliferação celulares (FREDIN **et al.**, 1979; McLEAN **et al.**, 1986). Os hormônios esteróides, por sua vez, interagem com receptores protéicos específicos localizados no citoplasma, e os complexos resultantes ligam-se a determinados sítios cromossômicos e ativam a síntese de RNA (PAYVAR **et al.**, 1981). Além desses, vários outros hormônios, nutrientes e metabólitos intermediários séricos são importantes para o metabolismo (FRESHNEY,

1987).

Muitas células cancerosas crescem em meio de cultura enriquecido com quantidades menores de soro que aquelas exigidas pelas células normais correspondentes. Este fato reflete as características de cada tipo celular e pode ser consequência da produção incontrolável de fatores de crescimento pela célula neoplásica (DELARCO & TODARO, 1978; CUTTITTA **et al.**, 1985). De qualquer modo, embora a necessidade para determinados componentes do soro seja menor nesse caso, isso pode não ser verdade para outros dos seus componentes que devem, então, ser adicionados ao meio de cultura para que as células sobrevivam.

As pequenas exigências séricas por parte das culturas de tumores têm sido usadas na seleção de células malignas em detrimento das normais. Outras condições também costumam ser adotadas para essa seleção, como meios e substratos seletivos, células alimentadoras e clonagem. Os meios seletivos disponíveis são poucos e, em geral, são desenvolvidos a partir de meios já conhecidos enriquecidos com hormônios e outros nutrientes, e usados com baixas concentrações séricas (CARNEY **et al.**, 1981). Os substratos com propriedades adesivas reduzidas também podem auxiliar na seleção de determinadas células tumorais pouco dependentes da ancoragem. A utilização de frascos com uma camada de células confluentes tratadas com mitomicina C ou irradiação impede geralmente o crescimento de fibroblastos (FRESHNEY, 1987). Do mesmo modo, a clonagem em agar seleciona as células neoplásicas, embora sua eficiência na formação de colônias seja muito baixa, frequentemente menor que 0,1% (TRENT, 1980; FRESHNEY, 1987).



I.5. Objetivos

Em vista do exposto, e considerando a escassez de dados citogenéticos em tumores sólidos, em especial nos benignos, propõe-se o presente trabalho que teve como objetivos:

a. Identificar condições favoráveis para o cultivo de células tumorais e para a obtenção de um número satisfatório de metáfases passíveis de análise na situação laboratorial disponível. Para tanto, foram feitos testes preliminares sobre diferentes fatores referidos na literatura como adequados ao crescimento e manutenção de células neoplásicas **in vitro**. Tais fatores incluíram hormônios, meios de cultura, L-glutamina, frascos de cultivo, densidade celular e concentração de soro variáveis.

b. Pesquisar a ocorrência de aberrações cromossômicas clonais e não clonais em amostras de tumores sólidos benignos e malignos.

c. Fornecer subsídios para diagnóstico e prognóstico nos casos em que isso fosse possível.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material

No presente trabalho foram estudadas amostras de 18 lesões de naturezas diversas, dez benignas e oito malignas, colhidas anteriormente a tratamentos radio e quimioterápicos. Destas, nove foram utilizadas para investigação de condições favoráveis ao crescimento de células tumorais (Tabela 2) e onze foram utilizadas para análise citogenética (Tabela 3). As amostras foram enviadas pelos Departamentos de Ginecologia e Cirurgia da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto e por clínicas particulares da cidade. Os tumores foram selecionados entre os mais frequentemente encaminhados à exérese nos serviços citados.

Os pacientes, nove do sexo feminino e apenas dois do sexo masculino e com idade variando de 25 a 66 anos, pertenciam à população rural e urbana de São José do Rio Preto e de municípios vizinhos, e eram da classe social baixa ou média.

II.2. Métodos

A. Métodos utilizados para ensaios sobre as condições de cultura

Com a finalidade de investigar condições favoráveis ao crescimento de células tumorais foram feitos ensaios preliminares sobre a influência da densidade celular no início do cultivo, tipos diferentes de frascos e meios de cultura, suplementação do meio com concentrações de 20, 10 e 5% de soro fetal bovino e suplementação do meio completo com L-glutamina, insulina, hidrocortisona e estrógeno.



Todos os experimentos foram feitos em teste cego, salvo aqueles que envolviam diferentes frascos, meios de cultivo e concentrações variáveis de soro, que permitiam ao observador reconhecer o fator em avaliação. Com exceção da variável em análise, as demais condições de cultivo foram mantidas constantes em cada caso.

Na avaliação do crescimento celular em diferentes tipos de meio de cultura, a suspensão de células obtida de um mesmo tecido, após desagregação enzimática, foi dividida em quatro frascos (I, II, III e IV). O frasco I recebeu 5 ml de meio RPMI 1640, o II recebeu igual quantidade de HAM F-10, o III de Eagle e o IV de Dulbecco MEM acrescido de RPMI na proporção 1:1. Os experimentos para a avaliação dos demais fatores empregaram o meio HAM F-10 que já havia demonstrado, em etapas anteriores, permitir um bom crescimento celular de vários tumores.

Para observação da influência da suplementação do meio de cultura com glutamina e hormônios, as concentrações usadas das drogas foram aquelas sugeridas por diferentes autores. No caso da insulina a concentração final foi de 4 U/100 ml (CASARTELLI, comunicação pessoal), no caso da glutamina foi de 2,92 g/ml (LEIBOVITZ, 1986), da hidrocortisona foi de 10^{-6} M, ou seja, 0,5 ug/ml (FRESHNEY, 1987) e do estrógeno foi de 1 ug/ml (CASARTELLI, comunicação pessoal). Estas substâncias entraram na composição do meio completo utilizado por ocasião da semeadura, e em todas as trocas de meio realizadas no decorrer do experimento.

Em relação aos tipos de recipientes usados para cultivo foram testados os frascos plásticos Descarplast de 25 ml (Rio de Janeiro, RJ) e Costar (Cambridge, MA), que são descartáveis, os de



vidro pyrex do tipo Leighton, e os de vidro comum utilizados comercialmente para venda de Leite de Colônia.

Para análise do efeito da densidade celular, a suspensão obtida após a desagregação do tecido foi centrifugada e o sedimento recebeu 1 ml de meio completo. Para cada 0,1 ml deste material foi acrescentado 0,1 ml de corante azul de tripano 0,4%, que agiu por um período de 5 a 15 minutos. A mistura assim preparada foi transferida para um hemocitômetro (câmara de Neubauer), em quantidade suficiente para que se formasse um filme entre a câmara e a lâmina. As células foram examinadas ao microscópio em campo escuro, com objetiva de 10 x. Como a solução de azul de tripano cora apenas células mortas, foi possível contar em cinco quadrados de 1 mm^2 do hemocitômetro tanto as células viáveis quanto as não viáveis, mas a análise foi feita apenas para as células vivas. O número de células por ml da suspensão original foi estimado através da fórmula abaixo, conforme BIRD & FORRESTER (1981), sendo o fator de diluição resultado do quociente da divisão da concentração inicial da suspensão (número de células viáveis/ml) pela concentração desejada (número de células/ml).

$$\frac{\text{Células viáveis contadas}}{\text{Quadrados Analisados}} \times \text{Fator de conversão da câmara} \times \text{Fator de diluição} = \text{No. de células/ml}$$

(10⁴)

A obtenção dos dados em cada um dos experimentos foi feita através da contagem diária de células aderidas ao frasco, no período compreendido entre o segundo e o sétimo dia de cultura, em campos de um microscópio invertido (aumento de 63x) com mais de três

células. Os campos microscópicos foram escolhidos, geralmente, em número de 10 por réplica e na proporção 3:4:3 nos três terços transversais do frasco. A pesquisa dos campos em cada uma destas áreas foi sempre iniciada no canto direito inferior do recipiente, tendo como referência a tampa do frasco posicionada à esquerda, e prosseguiu no sentido inferior-superior, e da direita para a esquerda. Foram considerados os 10 primeiros campos encontrados segundo a metodologia descrita acima.

O seguinte padrão foi utilizado para comparação das diferentes réplicas:

- + : campo com 3 a 9 células.
- ++ : campo com 10 a 49 células.
- +++ : campo com 50 a 99 células.
- ++++ : campo com mais de 100 células.

Na presente análise, os campos com menos de três células não foram considerados porque na primeira semana de cultivo as células em geral não se distribuem homogeneamente no fundo do frasco. Desse modo, podem ser encontrados muitos locais sem crescimento, o que nem sempre reflete a situação real de toda a cultura.

B. Métodos para a obtenção de preparações cromossômicas

As culturas de células foram desenvolvidas segundo técnica proposta por LIMON **et al.** (1986) com modificações, descrita a seguir. As fórmulas para preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas estão detalhadas no Apêndice.

B1. Colheita das amostras

Uma amostra do tecido (cerca de $0,5-1,0 \text{ cm}^3$) foi obtida assepticamente e transferida para um recipiente estéril com meio de cultura ou solução salina. O espécimen foi mantido à temperatura ambiente ou a 5°C e enviado ao laboratório devidamente identificado e, sempre que possível, acompanhado de informações sobre a idade do paciente, profissão, exposição a carcinógenos e mutagênicos, e presença de outros casos de neoplasia na família. A fim de assegurar a viabilidade das células, o período entre a coleta e o processamento do material não ultrapassou 24 horas.

B2. Processamento inicial do tecido

No laboratório, a amostra foi sempre manipulada em câmara asséptica (câmara de fluxo laminar vertical). Inicialmente, o tecido foi lavado em três banhos consecutivos de solução de Hanks com penicilina, estreptomicina, gentamicina e anfotericina e, em seguida, dissociado mecanicamente em pequenos fragmentos de $1-2 \text{ mm}^3$, com o auxílio de tesoura e bisturi. O material foi transferido para um frasco com $0,5 \text{ ml}$ de collagenase (concentração de 2.000 U/ml) e $4,5 \text{ ml}$ de meio completo, e permaneceu incubado a 37°C por 1 a 3 dias para desagregação enzimática. Após esse período, a suspensão celular foi centrifugada a 800 rpm e lavada uma vez com meio de cultura.

B3. Cultivo celular

O sedimento obtido foi distribuído em frascos plásticos descartáveis de 25 ml , Costar ou Descarplast, com 4 ml de meio de



cultura completo e incubado a 37 C por no mínimo três dias. Após 24 horas, o meio dos frascos com o material necrótico foi substituído e o crescimento celular e a atividade mitótica foram avaliados diariamente em microscópio invertido.

As culturas que mostraram número suficiente de metáfases até 7 dias após a semeadura sofreram interrupção de cultivo com a adição de colcemide (concentração final de 0,02 ug/ml) por uma hora e trinta minutos. Esse bloqueio foi, algumas vezes, realizado imediatamente após a sincronização da divisão celular através do uso de metotrexato (concentração final de 10^{-5} M) por 17 horas, seguido da adição de timidina (concentração final de 10^{-3} M) por 5 horas.

B4. Hipotonização, fixação e coloração do material da cultura

Após o bloqueio descrito, o sobrenadante foi substituído por 8 ml de solução hipotônica de citrato de sódio 0,8% pré-aquecida e o frasco foi reincubado por 30 minutos. As células foram, então, gentilmente destacadas com o auxílio de um raspador ("scraper") e a suspensão foi centrifugada por 8 minutos a 800 rpm. Posteriormente, o material foi fixado em solução de metanol-acético 3:1 e montado em lâminas geladas e úmidas, que foram envelhecidas em estufa a 90-92°C por 20 minutos, e submetidas à técnica de bandamento G, segundo GROUCHY & TURLEAU (1977) com modificações.

B5. Análise cromossômica

A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico marca Carl Zeiss Jena, modelo Jenamed 2. O material foi fotogra-



fado em microscópio Standard WL com equipamento fotográfico MC 63A (Carl Zeiss Oberkochen) com filme Panatomic X 32 ASA ou Kodalith Orthofilm 6556, type 3 (Kodak). O negativo foi revelado com revelador Kodak D-72, em diluição 1:1, por dois minutos à temperatura de 20° C, e as cópias foram feitas em papel Kodabromide F3 e Kodabrome Print RC F3. A identificação e classificação dos eventos citogenéticos foi feita de acordo com a Paris Conference (1971) e ISCN (1978).

As aberrações cromossômicas estruturais e as hiperdiploidias foram classificadas como clonais quando presentes em pelo menos duas metáfases provenientes de réplicas diferentes da mesma cultura. No caso das hipodiploidias, a clonalidade só foi considerada quando a alteração foi vista em células de três ou mais réplicas da cultura (MITELMAN, 1985; MERTENS *et al.*, 1989).

439

Mioma uterino

Adição de estrógeno

654

Bócio colóide multi-nodular de tireóide

Frascos de cultivo

659

Carcinoma basocelular

Adição de hidrocortisona

712

Nevus

Adição de L-glutamina

716

Carcinoma espinocelular de pele

Adição de insulina

723

Carcinoma basocelular de pele

Densidade celular

* Segundo designação do médico cirurgião

Tabela 2. Lesões utilizadas nos testes preliminares sobre o efeito de diferentes fatores no crescimento celular.

Caso	Idade	Sexo	Tipo de lesão*	Diagnóstico histopatológico	Fator estudado
553	35	F	Adenocarcinoma ulcerado de estômago	Cervicite crônica inespecífica com metaplasia escamosa endocervical.	Porcentagem de soro
598	28	F	Hepatoblastoma	Cervicite crônica inespecífica com metaplasia escamosa endocervical.	Meio de cultivo
622	62	F	Sarcoma sinovial	Adenocarcinoma ulcerado da pequena curvatura do estômago.	Porcentagem de soro
630	36	F	Mioma uterino	Bócio colóide multinodular de tireóide	Adição de estrógeno
654	66	F	Bócio colóide multinodular de tireóide	Bócio colóide multinodular de tireóide	Frascos de cultivo
659	28	F	Carcinoma basocelular	Sarcoma diferenciado	Adição de hidrocor- tisona
712	39	F	Nevo	Bócio colóide multinodular de tireóide	Adição de L-glutamina
716	24	F	Carcinoma espinocelular de pele	Bócio colóide multinodular de tireóide	Adição de insulina
723	32	M	Carcinoma basocelular de pele	Carcinoma adenocístico de glândula salivar	Densidade celular

* Segundo designação do médico cirurgião

III. RESULTADOS

Tabela 3. Idade e sexo dos pacientes e o diagnóstico histopatológico das 11 lesões estudadas.

Paciente RG	Idade	Sexo	Diagnóstico histopatológico
524	35	F	Cervicite crônica inespecífica com metaplasia escamosa endocervical.
541	37	F	Carcinoma in situ de colo de útero.
542	33	F	Cervicite crônica inespecífica com metaplasia escamosa endocervical.
551	25	F	Cervicite crônica inespecífica com metaplasia escamosa endocervical.
553	62	F	Adenocarcinoma ulcerado da pequena curvatura do estômago.
559	30	F	Bócio colbide multinodular de tirbide
601	66	F	Bócio colbide multinodular de tirbide
622	25	M	Sarcoma sinovial pouco diferenciado
628	39	F	Bócio colbide multinodular de tirbide
637	26	F	Bócio colbide multinodular de tirbide
664	32	M	Carcinoma adenocístico de glândula salivar

III. RESULTADOS

III.1. Ensaaios preliminares sobre condições de cultura

Com a finalidade de avaliar as condições favoráveis ao cultivo de células tumorais, foram feitos ensaios preliminares sobre a influência de diferentes fatores, tais como densidade celular no início do cultivo, tipos de frascos e meios de cultura, suplementação do meio com concentrações variáveis de soro fetal bovino, e suplementação do meio completo com L-glutamina, insulina, hidrocortisona e estrógeno. Os resultados são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Os casos 553 e 622 também foram estudados citogeneticamente enquanto os casos 630 e 654 mostraram crescimento celular que permitiu a realização dos testes, mas as metáfases obtidas não exibiram qualidade técnica satisfatória para a análise cromossômica. Os casos 659, 716, 723, 712 e 598 foram utilizados apenas para a avaliação das condições de cultivo, porém sua análise citogenética constituiu objetivo de estudo de outros projetos realizados no mesmo laboratório.

O crescimento celular foi observado 24 horas após a semeadura nos casos 622, 654, 659, 712, 716 e 723, 48 horas no caso 598 e 553, e 72 horas no caso 630. As células apresentaram morfologia fibroblastóide (lesões 598, 553, 622, 659, 712 e 630), epitelíóide (lesões 716 e 654), ou ambas (lesão 723), durante o desenvolvimento do experimento. Como as amostras também eram utilizadas para estudo citogenético, a análise das condições de cultivo foram suspensas assim que o índice mitótico atingiu níveis satisfatórios para que o bloqueio da divisão celular pudesse ser realizado. De qualquer

modo, esse período não ultrapassou o sétimo dia de cultura, época em que os fibroblastos normais passam a se tornar predominantes.

Os diferentes meios utilizados para cultura de um tumor de fígado diagnosticado como hepatoblastoma (caso 598) possibilitaram o crescimento celular em todas as réplicas, 48 horas após a semeadura. No entanto, a vantagem do meio Ham F-10 sobre os demais foi evidente como pode ser concluído do número de campos com mais de 50 células, e o menos adequado foi o Dulbecco/RPMI (1:1) (Tabela 4).

Em relação às diferentes concentrações de soro, os resultados obtidos em um tumor de estômago (caso 553) revelaram inicialmente aumento, e depois declínio do crescimento celular nas culturas com 5 e 10% de soro. A Tabela 4 mostra que, nessas situações, foram encontrados apenas 3 campos com bom crescimento celular nos três dias de análise. Na culturas com meio suplementado com 20% de soro, os campos com mais de 50 células estavam presentes em número maior durante esse mesmo período. Resultado semelhante foi observado no cultivo de um sarcoma sinovial (caso 622) em que foram testadas concentrações de 20 e 10% de soro. Ao longo dos quatro dias de cultura, nos dois frascos com 20% de soro foram contados 49 campos com mais de 100 células e nos frascos com 10% de soro apenas 25 campos desse tipo foram vistos.

Outros fatores avaliados foram a adição de L-glutamina, insulina e estrógeno ao meio utilizado para cultura de amostras de um nevo (caso 712), de um carcinoma espinocelular (caso 716) e de um mioma uterino (caso 630), respectivamente. Os frascos que receberam essas substâncias mostraram um número maior de campos microscópicos com mais de 50 células que aqueles sem tais substâncias (Tabela 5).



No teste com adição da hidrocortisona ao meio de cultivo, em um carcinoma basocelular (caso 659), os resultados não mostraram tal diferença. Aparentemente, esse hormônio não estimulou o crescimento celular nas condições utilizadas, conforme pode ser concluído dos números de diferentes campos microscópicos nos frascos teste e controle (Tabela 5).

Na avaliação da influência do tipo de recipiente sobre o cultivo, foram usados frascos plásticos Descarplast e Costar, e frascos de vidro do tipo Leighton e o usado como embalagem de leite de colônia, em uma amostra de bócio colóide multinodular (caso 654). Durante os quatro dias de cultivo, os frascos Descarplast e Leighton apresentaram maior número de campos com mais de 100 células, que os frascos Costar e leite de colônia (Tabela 6).

O efeito de semeadura em diferentes densidades celulares foi avaliado em um carcinoma basocelular (caso 723), tendo sido utilizadas suspensões com $2,02 \times 10^4$ células/ml e $1,01 \times 10^4$ células/ml. No frasco cujo cultivo foi iniciado com a maior densidade celular foram contados 42 campos com número de células superior a 100, enquanto que no frasco com a menor densidade nenhum campo desse tipo foi observado durante os sete dias de análise (Tabela 6).

622 Percentagem 20%
de soro

1	0	4	3	31	4
11	2	13	5	18	4

10%

1	0	10	17	11	4
11	0	7	17	14	4

* : culturas em que não foi possível contar 10 campos com crescimento celular;

+ : campo com 3 a 9 células ++ : campo com 10 a 49 células

+++ : campo com 50 a 99 células ++++ : campo com mais de 100 células

Tabela 4. Frequência dos tipos de campos microscópicos nos testes com meios de cultivo e concentrações de soro diferentes.

Caso	Condições de cultivo	Réplica	Campos microscópicos				Período de análise (dias)
			+	++	+++	++++	
598	RPMI 1640	I	4	38	8	0	5
	HAM F-10	II	0	4	19	27	5
	Eagle	III	2	39	9	0	5
	Dulbecco/RPMI (1:1)	IV	28	19	3	0	5
553	Porcentagem de soro	I	5	18	2	5	3
		II	7	15	3	5	
		III	3	24	0	3	
	10%	I	4	6	3	0	3*
		II	3	1	0	0	
		III	3	0	0	0	
659	Porcentagem de soro	I	18	2	0	0	3*
		II	19	1	0	0	
		III	8	3	0	0	
622	Porcentagem de soro	I	0	6	3	31	4
		II	2	15	5	18	4
	10%	I	0	10	19	11	4
		II	0	7	19	14	4

* : culturas em que não foi possível contar 10 campos com crescimento celular;

+ : campo com 3 a 9 células ++ : campo com 10 a 49 células

+++ : campo com 50 a 99 células ++++ : campo com mais de 100 células

Tabela 5. Frequência dos tipos de campos microscópicos nos testes com a adição de L-glutamina, insulina, hidrocortisona e estrógeno ao meio de cultivo.

Caso	Composto adicionado	Réplique	Campos microscópicos				Período de análise (dias)
			+	++	+++	++++	
712	L-glutamina	teste I II	8 5	12 19	36 38	14 8	7
		controle I II	25 31	32 29	13 10	0 0	7
716	Insulina	teste I II	17 20	24 19	25 25	4 6	7
		controle I II	30 33	34 35	6 2	0 0	7
659	Hidrocortisona	teste I	16	13	1	0	3
		controle I	18	8	4	0	3
630	Estrógeno	teste I II	10 10	19 16	11 14	10 10	5 5
		controle I II	28 25	11 13	7 9	4 3	5 5
+ : campo com 3 a 9 células ++ : campo com 10 a 49 células +++ : campo com 50 a 99 células ++++ : campo com mais de 100 células							

III.2. Análise citogenética

O presente estudo analisou citogeneticamente sete lesões benignas, sendo três cervicites crônicas de colo de útero e quatro nódulos multinodulares de fíbroides, e quatro lesões malignas, dos quais um carcinoma in situ de colo uterino, um adenocarcinoma de endométrio, um sarcoma alveolar e um carcinoma adenocístico de glândula.

Tabela 6. Frequências dos tipos de campos microscópicos nos testes com frascos de cultivo e densidade celular de semeadura diferentes.

Caso	Variável	Analisada	Campos microscópicos				Período de análise (dias)
			+	++	+++	++++	
654	Frascos de Cultivo	Descarplast	0	3	17	20	4
		Costar	0	21	16	3	4
		Leighton	0	2	15	23	4
		Leite de Colônia	0	14	13	13	4
723	Densidade celular	$2,02 \times 10^4$ cél/ml	0	13	15	42	7
		$1,01 \times 10^4$ cél/ml	10	26	34	0	7

+ : campo com 3 a 9 células ++ : campo com 10 a 49 células
+++ : campo com 50 a 99 células ++++ : campo com mais de 100 células

em coloração usual dos cromossomos. A análise parcial, que indica a identificação de pelo menos sete pares cromossômicos em uma metáfase, nem sempre permitiu conclusões a respeito do cariótipo presente. A Tabela 7 mostra os achados citogenéticos dos casos 524, 541, 542, 551, 553, 559, 601 e 637, e as Tabelas 8, 9 e 10 os achados dos

III.2. Análise citogenética

O presente estudo analisou citogeneticamente sete lesões benignas, sendo três cervicites crônicas de colo de útero e quatro bócios multinodulares de tireóide, e quatro lesões malignas, dos quais um carcinoma **in situ** de colo uterino, um adenocarcinoma de estômago, um sarcoma sinovial e um carcinoma adenocístico de glândula salivar (Tabela 3).

No processamento inicial da amostra, a desagregação enzimática do tecido teve duração de 24 horas nas lesões de colo uterino, e de 72 horas nas restantes. As culturas com crescimento sofreram bloqueio de divisão celular 3 a 7 dias após a semeadura, com o uso de colcemide apenas (casos 524, 551, 553, 559, 601, 622, 637, 664 e réplicas II e IV do caso 628) ou após processo de sincronização da divisão celular com metotrexato e timidina (casos 541, 542 e réplicas I e III do caso 628). As células mostraram morfologia fibroblastóide (casos 524, 541, 542, 551, 553 e 622), morfologia epitelióide (caso 559, 601, 628 e 637) ou ambas (caso 664) (Figura 1), e eram mono ou binucleadas.

Com exceção dos casos 622, 628 e 664 o número de metáfases obtidas foi pequeno e a morfologia dos cromossomos dificultou a análise completa das células. Além disso, a técnica de bandamento G não teve sucesso em todos os casos, e algumas vezes resultou apenas em coloração usual dos cromossomos. A análise parcial, que indica a identificação de pelo menos sete pares cromossômicos em uma metáfase, nem sempre permitiu conclusões a respeito do cariótipo presente. A Tabela 7 mostra os achados citogenéticos dos casos 524, 541, 542, 551, 553, 559, 601 e 637, e as Tabelas 8, 9 e 10 os achados dos



casos 628, 622 e 664, respectivamente, cujas características serão descritas a seguir.

III.2.1. Cervicite crônica inespecífica com metaplasia endocervical

Foram analisadas citogeneticamente três lesões benignas do colo uterino, todas histopatologicamente classificadas como cervicite crônica inespecífica com metaplasia endocervical.

Caso 524

A paciente, não-fumante e não exposta a carcinógenos conhecidos, relatou história de leucorréia intensa, dor abdominal e dismenorréia por seis meses. O resultado do exame colpocitológico foi Papanicolaou Classe II, negativo para células neoplásicas mas positivo para células metaplásicas atípicas. A biópsia de cone do colo resultou em um fragmento de tecido impregnado de muco, de consistência firme e coloração esbranquiçada, e com uma de suas faces envolta por epitélio espesso. O diagnóstico anatomopatológico foi cervicite crônica inespecífica intensa, com metaplasia escamosa endocervical.

Parte do material colhido na biópsia foi submetida à desagregação enzimática e mantida em cultura por sete dias, quando então sofreu bloqueio da divisão celular com o uso de colcemide. Foi observado crescimento celular dois dias depois da semeadura e as células eram fibroblastóides. Das três réplicas semeadas foi obtida apenas uma metáfase, que mostrou cariótipo normal em coloração usual.

Caso 542

A paciente, não-fumante e não exposta a carcinógenos conhecidos, procurou o serviço de Ginecologia com queixa de leucorréia intensa e dor no baixo ventre. O resultado do primeiro exame colpocitológico foi Papanicolaou Classe IV, fortemente suspeito para a presença de células neoplásicas. Os tecidos resultantes da biópsia realizada na época apresentaram coloração rósea-esbranquiçada e consistência elástica, e o diagnóstico anatomopatológico foi displasia acentuada do colo uterino. A paciente foi submetida a cirurgia de conização parcial e dois anos após retornou ao ambulatório apresentando as mesmas queixas da primeira consulta. O resultado do novo exame colpocitológico foi compatível com Papanicolaou Classe II, negativo para células neoplásicas. Os fragmentos de tecido obtidos na segunda biópsia apresentaram coloração branco-amarelada brilhante e consistência macia, e seu diagnóstico histopatológico foi de cervicite crônica inespecífica com metaplasia escamosa endocervical.

Parte da amostra colhida foi submetida à desagregação tecidual e cultivada por sete dias. Após esse período sofreu sincronização da divisão celular com metotrexato e timidina, seguida de tratamento com colcemide. O crescimento celular foi observado 24 horas após o início da cultura e as células mostraram morfologia fibroblastóide. Das três réplicas montadas, foram obtidas 21 metáfases, três analisadas parcialmente e duas completamente em coloração usual ou bandamento G. Os cariótipos observados em duas células foram compatíveis com 46, XX, duas possuíam números cromossômicos iguais a 41 e 47 e a outra mostrou tetraploidia e deficiência do



braço longo do cromossomo 4, del(4)(q22) (Figura 2). A repetição do exame no mesmo serviço mostrou um Papanicolaou Classe V, positivo para células neoplásicas. A biópsia de colo resultou em fragmentos

Caso 551

A paciente procurou o ambulatório de Ginecologia com queixa de ardência miccional e leucorréia intensa, e negou tabagismo ou exposição a carcinógenos. Foi submetida a biópsia de cone do colo uterino após exame colpocitológico, que teve como resultado Papanicolaou Classe III, com suspeita para células neoplásicas. Os fragmentos de tecido obtidos mostraram coloração branco-amarelada e consistência macia, e seu diagnóstico histopatológico foi cervicite crônica inespecífica com metaplasia escamosa endocervical.

Parte da amostra foi submetida à desagregação enzimática e mantida em cultura por 5 dias, após o que foi tratada com colcemide. Dois dias depois da sementeira foi observado crescimento celular e a morfologia das células era fibroblastóide. Das quatro réplicas montadas foram obtidas 17 metáfases, três analisadas parcialmente e uma completamente em coloração usual ou bandamento G. Uma célula apresentou endoreduplicação (Figura 3), duas tinham hipodiploidia, e a outra manifestou número cromossômico normal.

III.2.2. Carcinoma in situ de colo uterino

Caso 541

A paciente, fumante e sem história de exposição a outros carcinógenos, foi encaminhada ao serviço de Ginecologia com resultado de exame colpocitológico do tipo Papanicolaou Classe IV, forte-

mente sugestivo da presença de células neoplásicas. A repetição do exame no mesmo serviço mostrou um Papanicolaou Classe V, positivo para células neoplásicas. A biópsia de colo resultou em fragmentos de tecido amarelo-brilhantes, de consistência elástica, com epitélio esbranquiçado em uma de suas faces. O diagnóstico histopatológico foi carcinoma **in situ** do colo uterino.

O fragmento de tecido recebido pelo laboratório de citogenética foi desagregado e, em seguida, cultivado durante 7 dias. No segundo dia de cultura foram observadas células em crescimento com morfologia fibroblástica. O bloqueio da divisão celular foi realizado com o uso de colcemide, após processo de sincronização com metotrexato e timidina. Foram obtidas três metáfases, todas com cariótipo normal após a análise em coloração convencional.

III.2.3. Adenocarcinoma ulcerado da pequena curvatura do estômago

Caso 553

A paciente procurou o ambulatório de Cirurgia Geral do Hospital de Base com queixa de dor abdominal e cólicas irradiadas para o tórax, fraqueza, anorexia, emagrecimento e intolerância a alimentos gordurosos. Na ocasião, negou tabagismo e exposição a carcinógenos conhecidos. A gastroduodenoscopia realizada revelou neoplasia gástrica e a paciente foi submetida a gastrectomia subtotal radical. O tumor mostrou coloração amarelada, superfície irregular e granulosa, e consistência elástica. O exame histopatológico revelou adenocarcinoma ulcerado da pequena curvatura do estômago.

Parte da amostra foi encaminhada para análise citogenética e, depois de desagregada, foi cultivada durante sete dias quando então sofreu bloqueio da divisão celular com o uso de colcemide. O crescimento celular foi observado 24 horas após o início da cultura e as células mostraram morfologia fibroblastóide. Foram obtidas três metáfases, apenas duas analisadas em coloração convencional, uma com 45,-C e a outra com número cromossômico próximo à 92.

III.2.4. Bócio colóide multinodular de tiróide

Foram feitos estudos citogenéticos em quatro lesões benignas de tiróide, todas classificadas como bócio colóide multinodular.

Caso 559

A paciente, não-fumante e não exposta a carcinógenos, foi submetida a tireoidectomia subtotal após exame de captação e cintilografia de tiróide, que revelou presença de bócio nodular com nódulo frio. Ao exame macroscópico, a lesão apresentou forma grosseiramente piramidal, coloração pardo-amarelada brilhante, consistência macia e aspecto coloidal. O exame histopatológico confirmou o diagnóstico de bócio colóide multinodular.

O fragmento de tecido recebido foi submetido à desagregação enzimática e foi cultivado durante cinco dias, após os quais sofreu bloqueio da divisão celular com o uso de colcemide. Vinte e quatro horas após a semeadura foi observado crescimento celular e a morfologia das células era epitelióide. Dessa cultura foram obtidas

sete metáfases, três delas analisadas em coloração usual ou bandamento G, duas com 46 cromossomos e uma com perda de vários cromossomos.

Caso 601

A paciente, sem história de exposição a carcinógenos, foi encaminhada ao serviço de Cirurgia Geral com queixa de aumento da tireóide há aproximadamente 30 anos, dificuldade de deglutição, sudorese intensa e ganho de peso. O exame de captação e cintilografia da tireóide revelou presença de bócio nodular com nódulo frio. Após tireoidectomia subtotal, o espécimen apresentou, ao exame macroscópico, coloração pardo-amarela brilhante, consistência macia, aspecto coloidal e forma grosseiramente piramidal. O exame histopatológico evidenciou bócio colóide multinodular.

Uma parte do material retirado na cirurgia foi desagregada enzimaticamente, colocada em cultura por sete dias e, depois desse período, foi tratada com colcemide. No primeiro dia de cultura foram observadas células em crescimento, todas com morfologia epitelioide. Das 28 metáfases obtidas, 16 eram passíveis de análise, três das quais foram totalmente analisadas e 13 apenas parcialmente em coloração usual ou bandamento G. Uma célula mostrou poliploidia, outra apresentou uma translocação $t(5;6)$ e várias monossomias, trissomias e tetrassomias, duas tinham perdas cromossômicas casuais sendo uma delas trissômica para o cromossomo 10, e quatro eram normais.

Das três clones, 47,XX,+7, 48,XX,+7,+17 e 49,XX,+7,+10,+17

Caso 628

A paciente procurou o ambulatório de Cirurgia Geral com queixa de aumento da tireóide há cerca de 30 anos e dificuldade de deglutição. Na ocasião, negou exposição a carcinógenos e seu exame físico revelou presença de tireóide de tamanho anormal, móvel à deglutição e de consistência elástica. A cintilografia evidenciou presença de bócio nodular com nódulo frio e a paciente foi submetida a tireoidectomia subtotal. A lesão apresentou, ao exame macroscópico, forma grosseiramente piramidal, coloração pardo-amarelada brilhante e aspecto coloidal. O exame histopatológico revelou bócio multinodular com excessivo acúmulo de colóide.

A cultura iniciou o crescimento no primeiro dia após a semeadura e as células, com morfologia epitelióide sofreram bloqueio da divisão celular com o uso de colcemide nas réplicas II e IV, precedido por sincronização com metotrexato e timidina nas réplicas I e III. Foram observadas 138 metáfases, 20 das quais permitiram apenas a contagem do número cromossômico, 26 foram analisadas em coloração usual, 27 foram analisadas parcialmente e sete totalmente após bandamento G. O estudo citogenético desse caso revelou 11 células com um cromossomo extra do grupo C, em seis delas identificado como sendo um 7 (Figura 4), duas células mostraram trissomia de um C, identificado em uma como sendo um 7, associada à trissomia de um cromossomo 17 (Figura 5) e nove outras apresentaram cariótipo com três cromossomos extras, que em três delas consistiram nos cromossomos 7, 10 e 17 (Figura 6).

Os três clones, 47,XX,+7, 48,XX,+7,+17 e 49,XX,+7,+10,+17

foram vistos em pelo menos duas réplicas diferentes da cultura. Não foram observadas outras trissomias, exceto as do 2 e 16 em uma célula também portadora de algumas monossomias. Duas metáfases poliploides também foram encontradas, além de células aparentemente normais ou dos clones anômalos com perdas cromossômicas casuais. Os principais achados citogenéticos estão apresentados na Tabela 8.

Caso 637

A paciente, com queixa de aumento da tiróide por aproximadamente cinco anos e dificuldade de deglutição, foi submetida à tireoidectomia subtotal após exame de cintilografia, que revelou a presença de bócio nodular com nódulo frio. O exame histopatológico da lesão confirmou o diagnóstico de bócio colóide multinodular. A anamnese não revelou qualquer tipo de exposição a agentes cancerígenos.

Após remoção cirúrgica e desagregação enzimática, parte do material foi colocada em cultura durante seis dias, e o bloqueio da divisão celular foi realizado com o uso de colcemide. O crescimento celular foi observado 24 horas após o início da cultura e as células mostraram morfologia epitelióide. Foram detectadas 40 metáfases, quatro das quais analisadas totalmente em coloração usual e duas parcialmente em bandamento G. Duas células apresentaram cariótipo 45,-?C; uma 45,-?D e três eram normais.

III.2.5. Sarcoma sinovial pouco diferenciado

Caso 622

O paciente, não-fumante, sem exposição a carcinógenos e apresentando retardo mental, foi encaminhado ao serviço de Cirurgia Geral do Hospital de Base em virtude da presença de uma massa tumoral na coxa direita com aproximadamente dois anos de evolução e cerca de 30 cm de diâmetro, borrachosa e indolor à palpação. Após exérese, a lesão mostrou formato irregularmente ovóide, coloração amarelo-pardacenta e consistência extremamente macia. O exame histopatológico diagnosticou um sarcoma sinovial pouco diferenciado.

As células obtidas do tumor foram cultivadas durante sete dias e, em seguida, tratadas com colcemide. O crescimento celular iniciou-se, em todas as réplicas, 24 horas após a semeadura e as células apresentaram morfologia fibroblastóide durante todo o período de cultivo. Foram observadas 78 metáfases, 24 das quais analisadas em coloração usual e uma em bandamento G. A maioria delas mostrou hipodiploidia, com números cromossômicos variando de 31 a 45 (Figura 7), sete foram normais e uma poliplóide. A Tabela 9 apresenta os cariótipos observados nas células analisadas.

III.2.6. Carcinoma adenocístico de glândula salivar

Caso 664

O paciente, que era fumante, foi encaminhado ao ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital de Base para retirada de massa tumoral na hemi-mandíbula direita. O processo, de aproximadamente



quatro meses de evolução, foi detectado após trauma e diagnosticado histopatologicamente em outro serviço médico como ameloblastoma. Após exérese da lesão e de parte da mandíbula, o exame histopatológico revelou carcinoma adenocístico de glândula salivar com infiltrações na mucosa oral, segmento ósseo da mandíbula e partes moles circunjacentes.

Uma amostra do material foi colocada em cultura por sete dias e o bloqueio da divisão celular foi realizado com o uso de colcemide. Foi observado crescimento celular em todas as réplicas 24 horas após a semeadura, e as células apresentaram morfologia epitelíde e fibroblástíde, em proporções aproximadamente iguais, durante todo o período de análise (Figura 1). Das 44 metáfases obtidas, 13 foram analisadas em coloração usual, dez foram analisadas parcialmente e quatro totalmente após bandamento G. O estudo citogenético revelou dez células com cariótipo 46,XY; seis com 45,-G; quatro com 45,XY,-22,del(10)(p12) (Figura 8); quatro com perdas cromossômicas casuais e uma com poliploidia.

A monossomia 22 e a deficiência do braço curto do cromossomo 10 foram consideradas alterações clonais uma vez que estiveram presentes em células provenientes de frascos de cultivo diferentes. Os principais achados citogenéticos deste caso estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 7. Dados citogenéticos dos casos 524, 541, 542, 551, 553, 559, 601 e 637.

Caso	Número de me- táfases obti- das	Número de metáfases total ou parcial- mente analisadas	Resultados *
Cervicite crônica inespecífica de colo uterino			
524	1	1	46,XX/1
542	21	5	46,XX/2 41/1 47/1 92,XXXX,del(4)(q22)/1
551	17	4	46/1 45,XX,-15/1 744/1 792/1
Carcinoma in situ de colo uterino			
541	3	3	46,XX/3
Adenocarcinoma ulcerado da pequena curvatura do estômago			
553	3	2	45,-C/1 792/1
Bócio colóide multinodular de tireoide			
559	7	3	46,XX/2 40,-A,-B,-C,-F,-?,-?/1
601	28	16	46,XX/4 44,-C,-E/1 45,+10,-3,-13/1 43,t(5;6)/1 792/1
637	40	6	46,XX/3 45,-7C/2 45,-7D/1

* Achado citogenético/Número de células



Tabela 7. Achados citogenéticos de um Sarcoma Sinovial pouco diferenciado (caso 622).

Número de Réplica Achados citogenéticos

Tabela 8. Principais achados citogenéticos de um Bócio Colóide Multinodular de Tiróide (caso 628).

Número de Células		Réplica	Achados Citogenéticos
13	V	45, II, III e VI	46, XX
5	VI	45, -D, III	44-47, +C
6	V	44, -D, II e III	41-47, +7
1	IV	42, -C, -D, II, F, -D	48, +C, +17
1	IV	41, +2, -III, -C, -D, -E	45, -D, -19, -19, +7, +17
1	IV	41, -8, III, C, -F, -D	49, +C, +C, +E
3	IV	41, -7, II e III, F, -F	47-49, +C, +C, +17
2	VII	41, -9, III, C, -E, -E	49, +C, +7, +17
3	IV	39, -C, III e VI, C, -E, -F	48-49, +7, +10, +17
1	VII	39, -8, III, C, -C, -D, -E	68 cromossomos
1	IV	39, -2, -C, II, C, -C, -D, -E	92 cromossomos
1	VII	38, -1, -8, -C, -C, -E, -E, -F, -G	
1	IV	37, -1, -8, -C, -C, -C, -D, -E, -F, -F	
1	IV	34, -1, -2, -C, -C, -D, -D, -E, -E, -F, -F, -G, -G	
1	IV	31, -1, -8, -8, -8, -8, -C, -C, -C, -C, -C, -C, -D, -F, -G	

Tabela 9. Achados citogenéticos de um Sarcoma Sinovial pouco diferenciado (caso 622).

Número de Células Afetadas	Réplica	Achados citogenéticos
7	IV,V e VII	46,XY
1	IV	?92
1	V	45,-C
1	V	45,-G
1	VI	45,-G
1	V	44,-D,-E
1	IV	42,-C,-C,-F,-G
1	IV	41,+2,-C,-C,-C,-D,-D,-F
1	IV	41,-B,-C,-C,-F,-G
1	IV	41,-?B,-D,-E,-F,-F
1	VII	41,-B,-C,-C,-E,-?E
1	IV	39,-C,-D,-D,-E,-E,-F,-G
1	VII	39,-B,-B,-C,-C,-D,-E,-E
1	IV	39,-2,-C,-C,-C,-D,-E,-G
1	IV	38,-C,-C,-C,-C,-E,-F,-F,-G
1	VII	38,-1,-B,-C,-C,-E,-E,-F,-G
1	IV	37,-1,-B,-C,-C,-C,-D,-E,-F,-F
1	IV	34,-1,-2,-C,-C,-D,-D,-E,-E,-F,-F,-G,-G,
1	IV	31,-1,-B,-B,-B,-B,-C,-C,-C,-C,-C,-C,-C,-D,-F,-G

Tabela 10. Frequência de células com cariótipo normal e com aberrações cromossômicas numéricas e estruturais de um Carcinoma adenocístico de Glândula Salivar (caso 664).

Número de Células	Réplica	Achados Citogenéticos
10	II	46,XY
4	II e IV	45,XY,-22,del(10)(p12)
6	II	45,-6
1	IV	45,-16
1	II	45,-17
1	II	40,-C,-C,-D,-E,-E,-F
1	II	42,-2,-?8,-?9,-?17
1	II	?92

Figura 1. Polimerização de células obtidas da cultura 664 mostrando células com morfologia epitelial (a) e fibroblástica (b).

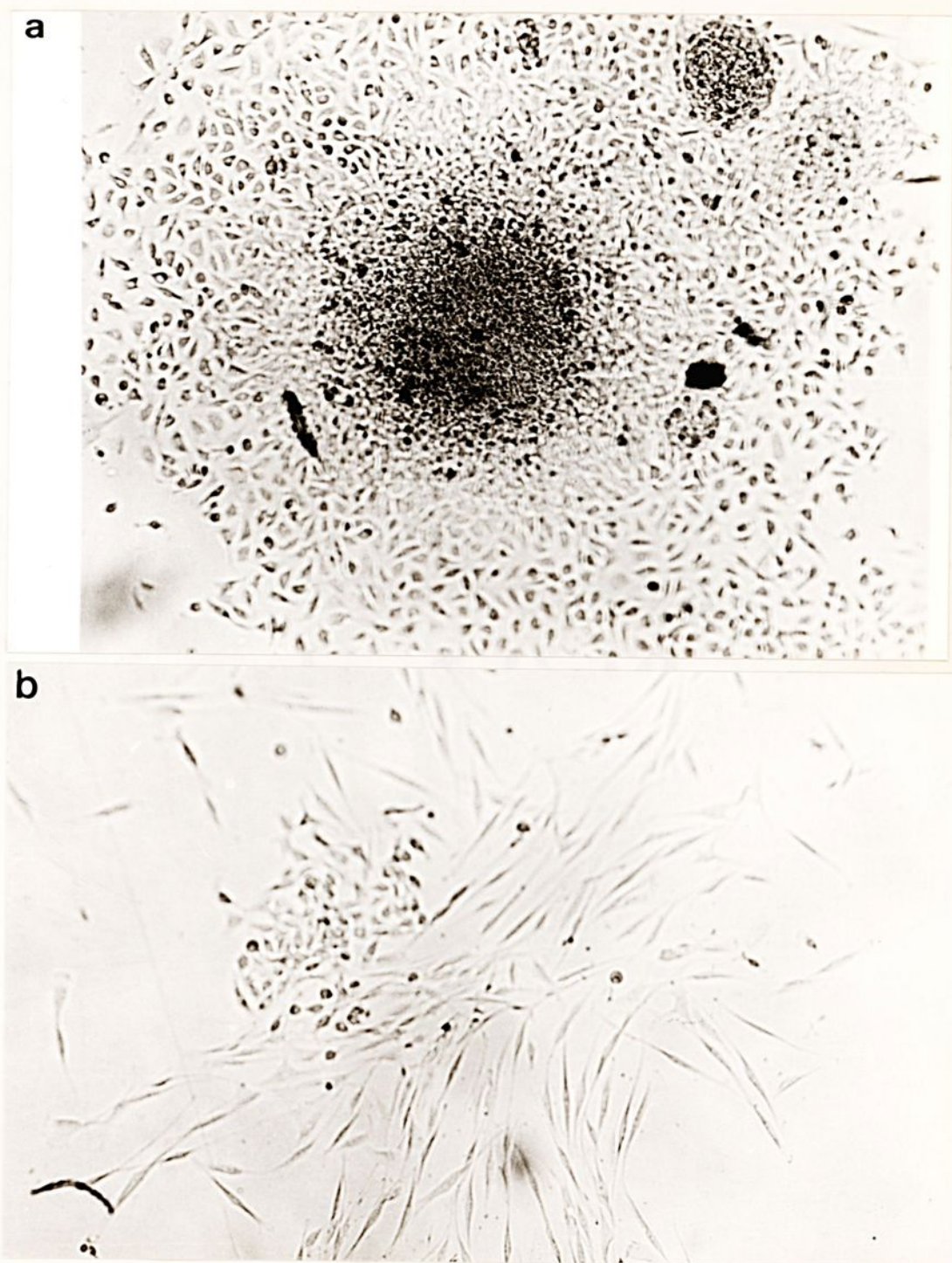


Figura 2. Neutrofilos tetraploides do caso 548 mostrando a deficiência de braço longo do cromossomo 4, del(4)(q22). As setas mostram os cromossomos 4.

Figura 1. Fotomicrografias obtidas da cultura 664 mostrando células com morfologia epitelióide (a) e fibroblastóide (b).



Figura 2. Metáfase tetraplóide do caso 542 mostrando a deficiência do braço longo do cromossomo 4, $\text{del}(4)(q22)$. As setas mostram os cromossomos 4.



Figura 3. Metáfase com endorreduplicação do caso 551.

Figura 4. Metáfase do caso 551 com endoreduplicação. (a) Cariograma
correspondente ao cariótipo 47,X,-Y; (b) visão geral
da mesma metáfase; (c) visão geral de uma célula com
cariótipo 48,X,-Y,-4,-7,-18,-19,-20. As setas indicam
o cromossomo Y.

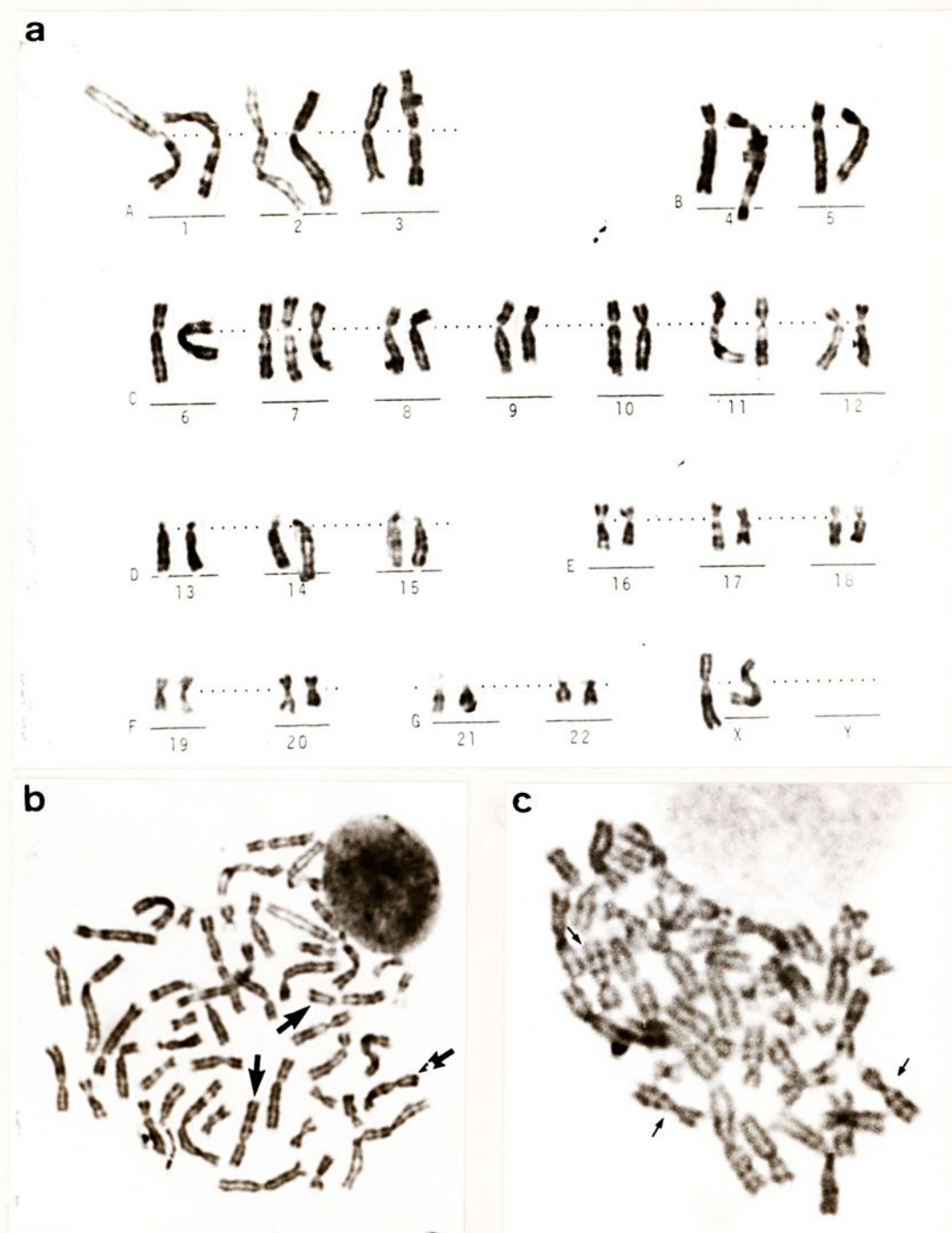


Figura 4. Metáfases do caso 628 com trissomia 7. (a) cariograma representativo do cariótipo 47,XX,+7; (b) visão geral da mesma metáfase; (c) visão geral de uma célula com cariótipo 42,XX,+7,-4,-7,-8,-18,-19,-20. As setas indicam o cromossomo 7.

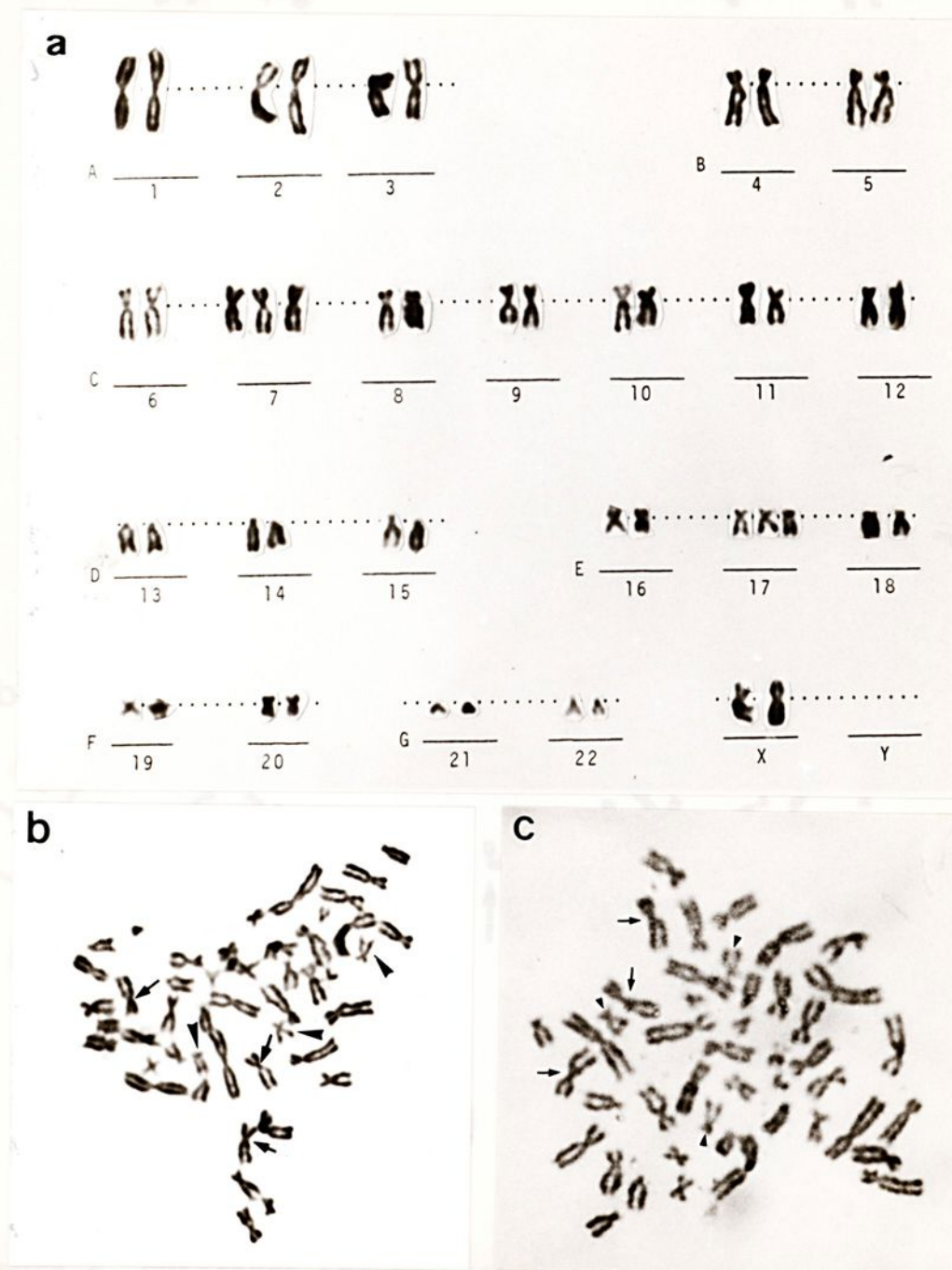


Figura 5. Metáfases do caso 628 com as trissomias 7 e 17. (a) cariograma representativo do cariótipo 48,XX,+7,+17; (b) visão geral da mesma metáfase; (c) visão geral de uma célula com cariótipo 45,XX,+7,+17,-D,-19,-19. As setas e pontas de seta indicam os cromossomos 7 e 17, respectivamente.



Figura 6. Metáfases com as trissomias 7, 10 e 17 do caso 628. (a) cariograma representativo do cariótipo 49,XX,+7,+10,+17; (b) visão geral da mesma metáfase; (c) visão geral de uma célula com cariótipo 48,XX,+7,+10,+17,-D. As setas, os asteriscos e as pontas de seta indicam os cromossomos 7, 10 e 17, respectivamente.

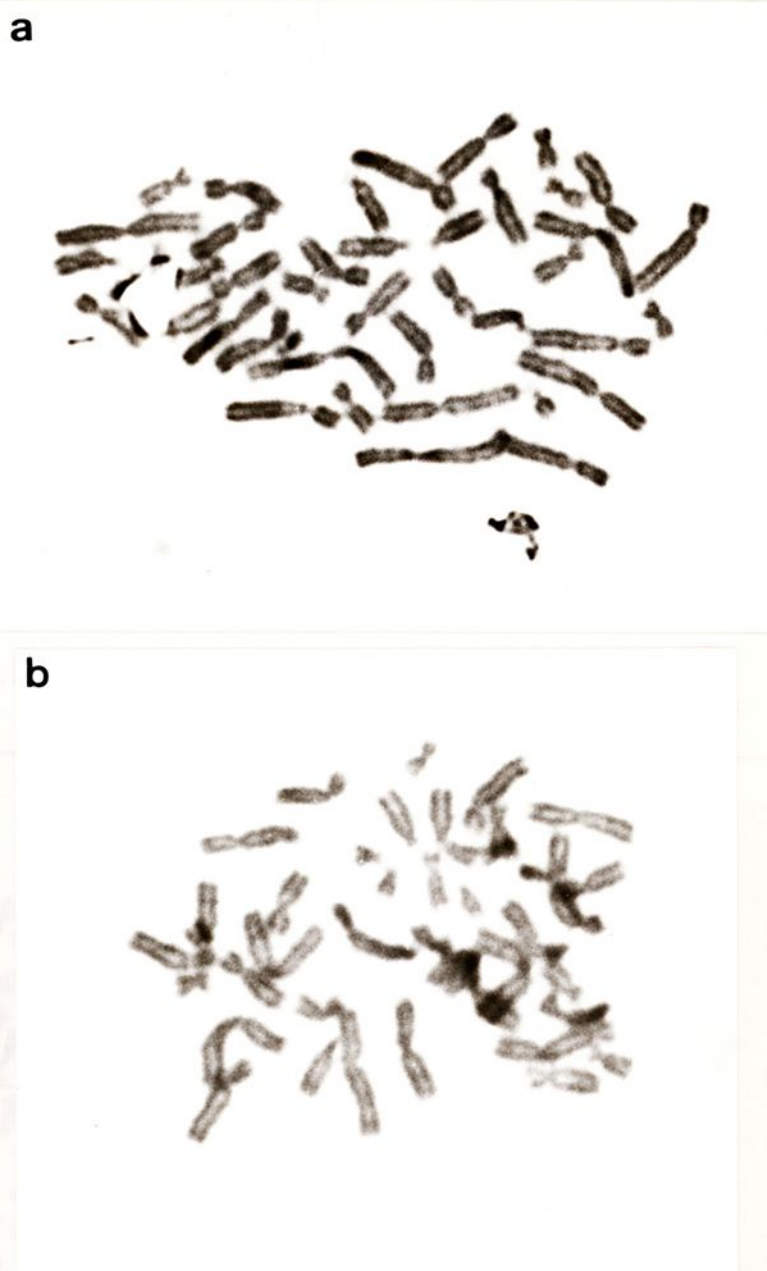
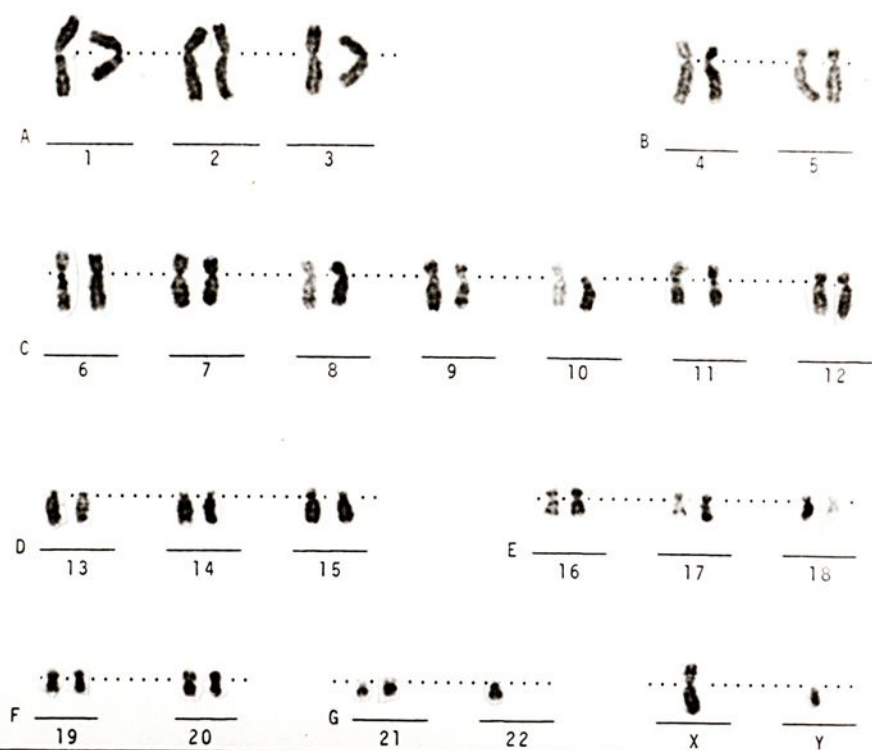


Figura 7. (a e b) Metáfases do caso 622 com 42 cromossomos.

Figura 8. (a) Cariograma representativo de uma célula do caso 622 com cariótipo 45,XY,-22,del(10)(p12); (b) visão geral da mesma metáfase; (c) metáfase parcial mostrando a deficiência del(10)(p12). As setas e pontos de seta indicam os cromossomos 10 e 22, respectivamente.

IV. Discussão

a



b



c



del(10) 10

Figura 8. (a) Cariograma representativo de uma célula do caso 664 com cariótipo 45,XY,-22,del(10)(p12); (b) visão geral da mesma metáfase; (c) metáfase parcial mostrando a deficiência del(10)(p12). As setas e pontas de seta indicam os cromossomos 10 e 22, respectivamente.

IV. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram realizados alguns ensaios preliminares com a finalidade de detectar a influência de fatores, tais como hormônios, L-glutamina, densidade celular, tipos de frascos e meios de cultura e concentrações variáveis de soro, sobre o crescimento de células tumorais **in vitro**. Além disso, foram analisadas citogeneticamente, após culturas de curta duração, sete lesões benignas e quatro malignas. Duas apresentaram aberrações cromossômicas clonais numéricas e/ou estruturais, uma mostrou uma população de células hipodiplóides e em oito foram observadas células normais, ou também metáfases com anomalias não-clonais.

Os principais problemas surgidos durante o desenvolvimento do trabalho foram os inerentes ao cultivo de células, como a contaminação de espécimens por ocasião da biópsia, transporte, semeadura ou manuseio, a adequação do meio de cultura e sua suplementação, e a eficiência ou validade dos reagentes utilizados.

Além dessas dificuldades, até certo ponto transponíveis, outras menos controláveis também existiram. Entre elas pode ser citado o próprio comportamento das células, nas condições de estudo, certamente consequente de sua constituição genética ou de influências humorais recebidas **in vivo** e levadas para a condição **in vitro**.

Serão feitas a seguir algumas considerações sobre as condições de cultivo celular, e os resultados obtidos nos testes realizados, assim como sobre a análise citogenética dos tumores sólidos humanos e as alterações encontradas nas lesões estudadas pelo presente trabalho.



IV.1. Ensaios preliminares sobre condições de cultura.

Alguns ensaios preliminares sobre condições de cultivo foram realizados pelo presente trabalho. Os resultados mostraram a influência positiva de vários fatores sobre o crescimento de células tumorais **in vitro**. Um dos efeitos mais evidentes foi aquele decorrente da presença de glutamina em culturas de células de um nevo. Tal efeito já havia sido observado por outros autores, que empregam esse aminoácido rotineiramente na composição do meio completo (TRENT **et al.**, 1986). A insulina e o estrógeno também estimularam o crescimento celular e, pelo menos a primeira dessas substâncias tem sido utilizada no cultivo de muitos tipos diferentes de tumores (FRESHNEY, 1987). A hidrocortisona, ao contrário do esperado, não mostrou qualquer efeito em um teste realizado com células de um carcinoma basocelular de pele. É provável que tal achado seja consequência da concentração usada da droga, uma vez que alguns trabalhos referem-se a utilização desse hormônio em níveis mais elevados. Por exemplo, LEIBOVITZ (1986) e MERTENS (comunicação pessoal) sugerem que a hidrocortisona deva ser usada em quantidades iguais a 3,61 ug/ml e 400 ug/ml, respectivamente, cerca de 10 a 1000 vezes maior que aquela empregada pelo presente trabalho (0,5 ug/ml).

Em relação aos meios de cultura, o bom resultado observado no caso do Ham F-10 foi presumivelmente consequência de sua constituição mais rica em alguns componentes, como alanina, asparagina, cisteína, vitamina B12, hipoxantina e timidina, quando comparada à constituição dos outros meios utilizados (FRESHNEY, 1987).

As quantidades variáveis de soro empregadas para o cultivo de um adenocarcinoma de estômago e de um sarcoma mostraram um



bom crescimento nos frascos com concentrações de 20%. De acordo com a literatura, essa situação não é recomendável para cultivo de células malignas. Entretanto, os testes foram realizados antes do sétimo dia de cultura quando os fibroblastos normais ainda não são predominantes sobre as células neoplásicas (CHEN & SHAW, 1973; MIYAMOTO *et al.*, 1988). Além disso, concentrações baixas de soro resultaram em parada de crescimento no caso da cultura de estômago, sugerindo que alguns fatores importantes estavam em quantidades insuficientes nos dias imediatamente pós-semeadura, ou então que as células presentes eram apenas fibroblastos e foram selecionadas negativamente.

No presente estudo foram avaliadas também as densidades celulares iniciais de $2,02 \times 10^4$ e $1,01 \times 10^4$ células/ml, em um carcinoma basocelular de pele. O sedimento obtido após a desagregação tecidual não permitiu o uso da densidade sugerida pela literatura, em torno de 5 a 6×10^5 células/ml, mas o teste mostrou que mesmo densidades celulares de $2,02 \times 10^4$ células/ml levam a bons resultados em determinadas situações.

Os resultados obtidos sobre a influências dos tipos de frascos de cultura no crescimento de células de um bôcio multinodular de tiróide mostrou a eficiência dos frascos de plástico Descarplast e de vidro do tipo Leighton. Os recipientes de vidro, como o de Leighton e o de leite de colônia, apresentam a vantagem de reutilização, contudo podem liberar substâncias tóxicas que variam de acordo com sua procedência. Além disso, necessitam ser corretamente lavados e esterilizados após o uso, de modo a garantir a viabilidade de culturas subsequentes. Os recipientes plásticos de

poliestireno, como o Descarplast e o Costar, apresentam vantagens práticas porque já vêm esterilizados, e essa esterilização, no caso obtida por radiação, garante até certo ponto a ausência de fatores tóxicos e de microorganismos. Tanto os frascos de vidro quanto os de plástico devem fornecer condições para que as células se fixem ao substrato. Os motivos pelos quais os frascos Descarplast e de Leighton permitiram melhor crescimento devem estar relacionados com a própria constituição do material do recipiente ou com outras de suas qualidades, e com as características do tipo celular utilizado.

Em resumo, os ensaios realizados no presente trabalho, concluíram que o meio Ham F-10 suplementado com 20% de soro, L-glutamina e insulina, e os frascos Descarplast e de Leighton, constituíram condições adequadas para o cultivo **in vitro** de determinadas células tumorais na situação laboratorial disponível. Além dos fatores acima citados, a adição de estrógeno ao meio de cultivo e uma densidade celular inicial da ordem de 2×10^4 células/ml também acarretaram um bom crescimento celular em certos casos. Deve ser enfatizado que os resultados obtidos não permitem generalizações, uma vez que o número de testes foi limitado, mas servem de base para que novos estudos sejam realizados.

IV.2. Constituição cromossômica dos tumores sólidos humanos

Um grande número de trabalhos tem sido publicado sobre alterações cariotípicas em tumores sólidos. O novo catálogo de aberrações cromossômicas em neoplasias, a ser publicado em 1991, deverá conter informações sobre aproximadamente 3000 dessas lesões, o que corresponde a apenas 20% dos dados disponíveis em câncer,

fração esta muito inferior à sua contribuição relativa à morbidade e mortalidade das doenças neoplásicas. Um dos grupos que ilustra bem essa situação é o dos tumores epiteliais, que causam quase 80% de todas as mortes por câncer no homem mas fornecem aproximadamente 10% dos dados (TRENT *et al.*, 1989; MITELMAN, 1990).

O conhecimento dos eventos citogenéticos nas etapas iniciais de desenvolvimento de um tumor sólido é muito limitado. Esta situação é provavelmente decorrente do fato da maioria das lesões ser estudada em estágios muito avançados, o que dificulta o reconhecimento da alteração primária entre as numerosas anomalias secundárias, em geral presentes por ocasião do estudo. Embora a alteração primária tenha um significado patogenético importante, as secundárias podem ser de interesse no entendimento da progressão tumoral, e a distinção entre as duas, na maior parte das vezes não é atingida (TRENT *et al.*, 1989).

As aberrações cromossômicas já detectadas em neoplasias, incluindo leucemias e linfomas bem como tumores sólidos, compreendem uma variedade de rearranjos estruturais e de aberrações numéricas. Na revisão feita por TRENT *et al.* (1989), um total de 149 anomalias estruturais foram identificadas em 43 tipos de doenças neoplásicas, e todos os cromossomos foram envolvidos, com exceção do Y. MITELMAN (1984, 1986) e HEIM & MITELMAN (1986b) também observaram que a distribuição dos pontos de quebra é restrita a um quarto das bandas de um cariótipo padrão, e que, de forma análoga, as trissomias e monossomias não são casuais. Presumivelmente, determinadas regiões cromossômicas contêm genes essenciais para o desenvolvimento do processo maligno. Indicações de que isto realmente deve ocorrer provêm de observações sobre a coincidência de localização de oncogenes e de



pontos de quebra em câncer, apresentada na Tabela 11 (TRENT **et al.**, 1989). Desse modo, não surpreende o fato de que muitas alterações cromossômicas sejam consistentemente associadas a essas doenças, o que é especialmente verificado nas leucemias e linfomas. No caso dos tumores sólidos, o número dessas correlações é pequeno, como pode ser observado na Tabela 12 que resume os dados estudados por TEYSSIER (1989), e é provavelmente decorrente da complexidade e instabilidade citogenética no grupo. Apesar disso, a análise de um grande número dessas lesões tem sugerido o envolvimento preferencial, ou não casual, de alguns cromossomos, em especial do 1, 3, 7 e 11 (ATKIN, 1989; OLÁH **et al.**, 1989; TEYSSIER, 1989). Esse achado sugere que a evolução clonal geralmente segue um padrão genético básico para diferentes neoplasias.

As alterações cromossômicas provavelmente levam a eventos moleculares que afetam não somente sequências de oncogenes ou de anti-oncogenes, mas também reguladores de diferenciação ou de padrões metabólicos específicos, e genes que codificam fatores envolvidos no crescimento ou nas interações celulares (DUTRILLAUX & MULERIS, 1986). Embora os dados obtidos em leucemias e linfomas indiquem que essa idéia seja correta, poucas são as evidências de tais modificações causadas por aberrações cromossômicas em tumores sólidos (TRENT **et al.**, 1989). Os casos mais citados referem-se à amplificação do oncogene **N-myc** em neuroblastomas que manifestam double minutes ou regiões homogeneamente coradas (BRODEUR & SEEGER, 1986), e da expressão aumentada do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico em lesões com alterações numéricas e estruturais do cromossomo 7 (BELL **et al.**, 1986).

Em relação às lesões benignas, existem poucos dados na literatura sobre as aberrações cariotípicas presentes e sobre o possível efeito dessas aberrações no comportamento ou na evolução do tumor e na proliferação celular (MITELMAN, 1985; SANDBERG, 1988). De modo geral, é aceito que tais lesões apresentam uma constituição cromossômica normal em virtude das observações de ausência de figuras mitóticas e de núcleos atípicos em preparações histológicas, ao contrário do que ocorre nas neoplasias malignas, e de conclusões baseadas em análises citogenéticas realizadas sem o auxílio de técnicas de bandamento cromossômico (SANDBERG, 1980). Entretanto, estudos recentes em várias condições consideradas benignas, com base no seu comportamento e dados histológicos, têm levado à sugestão de que as aberrações cromossômicas nem sempre estão ligadas ao estado maligno ou então que alguns tumores benignos devem ser considerados pré-malignos ou mesmo malignos (SANDBERG, 1988; TEYSSIER **et al.**, 1985). Por exemplo, tanto os leiomiomas quanto os seus correspondentes malignos, os leiomiossarcomas, apresentam rearranjos das regiões 7q22-q32, 10q22 e 12q14-15 (HAVER **et al.**, 1989; KIECHLE-SCHWARZ **et al.**, 1990a,b). Do mesmo modo, os lipomas mostram o envolvimento consistente das bandas 12q13-q14, o que também é descrito em lipossarcoma mixóide (DAL CIN & SANDBERG, 1989; FRIGERE **et al.**, 1990; SREEKANTIAH **et al.**, 1990).

A aparente coincidência de alterações em uma mesma região cromossômica, tanto em processos malignos quanto em seus equivalentes benignos, indicam um padrão citogenético semelhante no desenvolvimento dessas condições, embora a exata proximidade dos pontos de quebra e os genes afetados não sejam conhecidos. De qualquer modo, tais sistemas constituem um excelente material para investigação dos

eventos moleculares envolvidos no processo canceroso e poderão fornecer informações sobre o comportamento de diferentes doenças e suas interrelações com respeito à transformação neoplásica (SANDBERG et al., 1988).

Estas considerações são essenciais para o entendimento e a análise dos casos que passamos a discutir.

Tabela 11. Localização cromossômica de oncogenes humanos e os pontos de quebra relacionados em diferentes tipos de neoplasias, segundo TRENT et al. (1989) com modificações.

Oncogene	Localização cromossômica do oncogene	Neoplasia	Pontos de quebra
FGR	1p36.2-36.1	leucemia mielóide aguda-M3	1p36
JUN	1p32-p31	leucemia linfocítica aguda	1p32
MYCL-1	1p32	leucemia linfocítica aguda	1p32
NRAS	1p22 e/ou 1p13	melanoma maligno	1p22
SKI	1q21.1-q24	melanoma maligno	1q21
REL	2p13-cen	leucemia linfocítica crônica	2p13
PIM	6p21	doença linfoproliferativa crônica	6p21
ARAF2	7p14-q21	linfoma maligno	del(7)p13;p14
PVT1	8q24	linfoma de Burkitt	t(2;8)(p12;q24)
MYC1	8q24	leucemia linfocítica aguda	(t8;22)(q24;q11)
ABL	9q34	doença mieloproliferativa	t(8;9)(p11;q34)
HRAS1	11p15.5	leucemia mielóide aguda	t(11;20)(p15;q11)
INT2,SEA	11q13	linfoma maligno	t(11;14)(q13;q32)
ETS1	11q23.3	linfoma maligno	t(11;14)(q23;q32)
KRAS2	12p12.1	leucemia linfocítica aguda	t(9;12)(p11-12;p12)
INT1,GLI1	12q13	lipossarcoma mixóide	t(12;16)(q13;p11)
AKT1,ELK2	14q32.3	linfoma maligno	t(8;14)(q22;q32)
ERBB2-THRA	17q11-q12	leucemia mielóide aguda M-3	t(15;17)(q22;q11-q12)
INT4	17q21-q22	leucemia mielóide aguda	t(1;17)(p36;21)
ERBA2L	17q25	leucemia mielóide aguda-M4,M5	t(11;17)(q23;q25)
YES1	18q21.3	linfoma maligno	t(14;18)(q32;q21)
ETS2,ERG	21q22.3	leucemia mielóide crônica	t(3;21)(q26;q22)
YESP	22q11-q12	leucemia linfocítica aguda	t(14;22)(q32;q11)
HRAS2P	Xp11.4-p11.2	sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11)

Tabela 12. Alterações cromossômicas recorrentes em tumores sólidos segundo TEYSSIER (1989).

Tumor	Alterações cromossômicas
Carcinoma de Ovário	-X del(6)(q21) del(3)(p14p21)
Carcinoma de Mama	-8,-13
Carcinoma de Bexiga	del(11p) i(5p) +7,+13,-9
Carcinoma de Colon	-17(17p-), -18 alterações numéricas e estruturais dos cromossomos 1,8,7 e 13
Melanoma	alterações estruturais dos cromossomos 1, 6 e 7
Glioblastoma	rearranjos das bandas 9p24-pter +7,-10
Neuroblastoma	deficiência da banda 1p31 dup(17q) dmin/HSR
Retinoblastoma	dup(1q) dup(6p) -13
Nefroblastoma	rearranjos de 11p
Adenoma de Colon	alterações numéricas e estruturais dos cromossomos 1, 7, 8 e 13
Leiomioma Uterino	t(12;14)(q14-15;q22-24)

IV.3. Lesões benignas e malignas do colo uterino

As lesões benignas do colo uterino compreendem as cervicites crônicas e as metaplasias, entre outras. A cervicite é um processo inflamatório, geralmente causado por agentes infecciosos, que pode evoluir para uma metaplasia. A metaplasia é uma alteração reversível na qual as células adultas são substituídas por outras resultantes da diferenciação anormal de células primitivas indiferenciadas ou da divisão de células diferenciadas existentes. A permanência do fator que predispõe à metaplasia pode induzir a transformação maligna do epitélio metaplásico (LOPES *et al.*, 1987).

As displasias são lesões pré-cancerosas que podem originar-se das metaplasias e caracterizam-se por alterações do tamanho, aspecto e organização da célula adulta, e são consequentes de irritações crônicas ou inflamatórias. O comportamento dessas lesões é variável, a maioria regride enquanto uma pequena fração progride para uma condição maligna (ROBBINS, 1975; LOPES *et al.*, 1987).

O câncer de colo de útero é o tumor mais frequente em mulheres de vários grupos populacionais (LOPES *et al.*, 1987; MURTY *et al.*, 1988). O mais comum e típico é o carcinoma, enquanto os sarcomas representam apenas 1% do total. Os carcinomas são de três tipos principais: **in situ**, microinvasor e invasor. O carcinoma **in situ** é uma lesão restrita ao epitélio superficial e representa o grau extremo da lesão pré-cancerosa. É constituído por células morfológicamente idênticas às da maioria dos carcinomas da cérvix mas com adesividade diminuída, o que reduz sua capacidade de infiltração em outros tecidos. A definição do carcinoma microinvasor constitui um dos mais controvertidos assuntos na patologia do colo,

e o principal ponto de discussão refere-se à profundidade da invasão. Alguns admitem que havendo difusão no estroma em até 1 mm de espessura a neoplasia deve ser considerada microinvasiva, enquanto outros aceitam nesse grupo os carcinomas que alcançam até 5 mm de espessura. O câncer é considerado invasor ou clínico quando diagnosticável macroscopicamente. No início do processo, esse tipo atinge apenas o cêrvix mas, à medida que progride e suas dimensões tornam-se maiores, tende para a disseminação pelo organismo e formação de colônias metastáticas (LOPES **et al.**, 1987).

Dentre os diversos fatores envolvidos na etiologia do câncer cervical e de outros tumores genitais, as infecções por vírus do papiloma e por outros vírus como o **Herpes simplex** têm recebido atenção especial, isto porque a detecção de tipos específicos de alguns desses vírus em lesões pré-malignas está associada com o risco aumentado da neoplasia. Embora o papel desempenhado pelo genoma viral na gênese do câncer do colo não seja completamente conhecido, existem evidências de que suas sequências se integram no DNA em locais próximos a proto-oncogenes (POPESCU & DI PAOLO, 1989; COUTURIER **et al.**, 1990a) ou em regiões frequentemente rearranjadas em diferentes tipos de neoplasias (SASTRE-GARAN **et al.**, 1990). Alguns modelos experimentais têm mostrado que as sequências do vírus cooperam com o oncogene mutado **c-Ha-ras** na transformação maligna e que, em certas situações, podem promover a cis-ativação do proto-oncogene **c-myc**. É interessante citar que a amplificação ou expressão aumentada dos oncogenes **c-Ha-ras** e **c-myc** têm sido detectadas em estágios avançados dos carcinomas de colo (RIOU, 1988; SAGAE **et al.**, 1989).

Do ponto de vista citogenético, as lesões do colo de



útero oferecem um dos melhores sistemas para estudo de diferentes estágios do processo de malignização, desde uma displasia simples até o carcinoma invasor. Além disso, essas lesões apresentam a vantagem de serem frequentemente detectadas como resultado de investigações citológicas em campanhas de prevenção do câncer, e do material para estudo ser facilmente removido.

As análises cromossômicas nesse grupo de doenças, entretanto, apresentam alguns problemas. Um deles envolve as variações na nomenclatura usada para as várias condições, e a consequente dificuldade em comparar resultados de diferentes laboratórios, por exemplo em casos de carcinoma microinvasor e de carcinoma **in situ**, este último considerado às vezes uma alteração pré-neoplásica e outras vezes uma alteração maligna (SANDBERG, 1980). Outro problema decorre do fato do material derivado de tecido de colo normal ou de lesões iniciais apresentar número extremamente baixo de metáfases, de modo que os resultados obtidos até o presente são poucos e não permitem generalizações (SANDBERG, 1980; HEIM & MITELMAN, 1987a). Na verdade, o material cromossômico de lesões cervicais não possui geralmente boa qualidade técnica para análise, com algumas exceções no caso de preparações diretas (ATKIN & BAKER, 1982, 1984; 1989; BELLO & REY, 1988; SREEKANTIAH **et al.**, 1988; ATKIN **et al.**, 1990).

Os dados da literatura indicam que o epitélio cervical em seu estado normal e em condições inflamatórias tem constituição diplóide, embora evidências para isso sejam muito poucas. Contagens de 92 cromossomos ou próximas a 92 são comuns em displasias e carcinomas **in situ**, o que é confirmado pelas estimativas do conteúdo de DNA em suas células (HUGNÉS & CSERMELY, 1966; RASK-MADSEN & PHILIP,



1970; PAULETE-VANRELL, 1970). Em um terço dos carcinomas invasores o número modal é triplobide ou tetraplobide, mas as alterações são tantas e a qualidade das metáfases tão pobre que mesmo o número cromossômico nem sempre pode ser determinado (HEIM & MITELMAN, 1987b). SREEKANTIAH **et al.** (1987) sugeriram que a ocorrência de poliploidia em células provenientes de lesões malignas de cérvix pode ser consequência de processos de condensação prematura dos cromossomos (PCC) e endorreduplicação, pois a análise realizada em 150 neoplasias cervicais revelou PCC em frequências mais altas nos tumores que apresentavam hiperdiploidia.

Os estudos realizados por ATKIN & BAKER (1982, 1984) e ATKIN **et al.** (1990) em 43 carcinomas do colo revelaram números cromossômicos entre 41 e 100 além de várias anomalias estruturais. Os rearranjos envolveram principalmente os cromossomos 4 ou 5, 1, 17, 11, 3, 2, 6 e 9, respectivamente pela ordem de frequência. Aberrações estruturais e numéricas dos cromossomos 1 e 8 foram também observadas em lesões cervicais por BELLO & REY (1988) e por SREEKANTIAH **et al.** (1988).

O pequeno número de metáfases passíveis de análise parece realmente ser característico das células de tumores de colo. SREEKANTIAH **et al.** (1988) estudaram 150 espécimens, em 17 dos quais somente uma célula pôde ser analisada, em 3 deles apenas cariótipos parciais foram obtidos e em 11, o único dado foi a contagem do número cromossômico; dos 119 restantes, duas ou mais células foram estudadas. Deve ser citado que esse trabalho foi realizado em preparações diretas, aparentemente preferidas pelos autores que investigam tais lesões. ATKIN & BAKER (1982), em nove carcinomas também processados pelo método direto, obtiveram geralmente menos de dez

metáfases analisáveis, várias com apenas alguns cromossomos identificados, e relataram as dificuldades de análise.

Além das anomalias cromossômicas identificadas nas células de tecidos alterados do colo, já foram observadas frequências aumentadas de quebras cromossômicas, de trocas entre cromátides-irmãs, de heteromorfismo de banda C do cromossomo 1 e de decréscimo da atividade de genes ribossômicos na linhagem constitucional de mulheres portadoras de lesões displásicas do colo que evoluíram para neoplasia. Tais achados levaram à sugestão de que há uma íntima relação entre os fenótipos constitucionais e a evolução do câncer a partir de condições pré-malignas. Se tais observações forem confirmadas, essas alterações poderão representar um eficiente marcador biológico na definição de displasias do colo que apresentam risco aumentado para progressão neoplásica (MURTY *et al.*, 1985, 1988).

No presente trabalho, as culturas obtidas de 3 processos inflamatórios crônicos de colo (caso 524, 542 e 551) e um carcinoma *in situ* (caso 541) resultaram em um número pequeno de metáfases e cromossomos de qualidade não satisfatória após utilização de técnica de bandamento G. A maioria das células apresentou constituição diplóide e não foram observadas alterações numéricas ou estruturais semelhantes àsquelas descritas na literatura, com exceção de duas células poliplóides, uma delas com deficiência del(4)(q22).

Aberrações estruturais envolvendo cromossomos do grupo B, particularmente um pequeno isocromossomo, i(4p) ou i(5p), e células poliplóides foram descritas por ATKIN & BAKER (1982, 1984) e por ATKIN *et al.* (1990) em carcinomas de colo. O isocromossomo i(4p) ou i(5p) foi visto em 77% dos 43 tumores estudados, e geralmente esteve presente em duplicata e nos casos com números cromossômicos maiores

do que 46. Levando-se em conta o tamanho da amostra analisada por esses autores, tal rearranjo provavelmente constitui uma das alterações mais comuns em carcinoma cervical e, dado que foi observado como a única aberração em vários tumores, é possível que sua formação represente um evento precoce na transformação maligna. Nesse ponto, é interessante salientar que o presente trabalho detectou um cromossomo 4 com deficiência de braço longo em uma célula de lesão diagnosticada como processo inflamatório de um colo que já havia apresentado células pré-neoplásicas anteriormente (caso 542). Esse achado pode não ser representativo do material **in vivo**, dado que não foi clonal nas poucas células obtidas, entretanto pode também indicar o início do processo de transformação neoplásica. O acompanhamento clínico e citogenético do caso poderia esclarecer essa questão mas, infelizmente, a paciente mudou-se para uma cidade muito distante de São José do Rio Preto e não foi possível sua reavaliação.

IV.4. Tumores benignos e malignos de tireóide

Os tumores de tireóide constituem uma importante causa de morbidade na população geral. Os benignos ou adenomas são classificados, de acordo com o aspecto histológico que manifestam, em 3 tipos principais, o folicular, o papilar e o atípico, sendo os dois primeiros as formas mais frequentes. Todos eles compreendem lesões encapsuladas derivadas do epitélio da tireóide, histopatologicamente semelhantes ou idênticas aos nódulos observados no último estágio do bócio multinodular atóxico. O adenoma possui um pequeno potencial canceroso e, segundo alguns autores, o bócio apresenta a mesma característica (REGO, 1976; INGBAR & WOEBER, 1981; ROBBINS, 1975;

VAN den BERG **et al.**, 1990). Do ponto de vista clínico, os bócios multinodulares são importantes pelo fato de constituírem um diagnóstico diferencial das neoplasias pelo seu tamanho, localização e função anormal (ROBBINS, 1975).

Virtualmente, todos os tumores malignos de tireóide são de origem epitelial e, portanto, carcinomas. Embora esses tumores possam apresentar tipos diversos e variantes histológicas, a tendência é agrupá-los segundo critérios que consideram ao mesmo tempo os aspectos histológicos e o comportamento clínico. Dessa forma, eles são classificados em papilar, folicular, medular e anaplásico ou indiferenciado, sendo que os primeiros são considerados de baixa malignidade, o medular de malignidade média e o anaplásico de elevada malignidade (LOPES **et al.**, 1987). O carcinoma medular pode, algumas vezes, apresentar-se como manifestação de algumas síndromes geneticamente condicionadas como, por exemplo, o feocromocitoma familiar. A combinação deste último com o câncer de tireóide constitui a chamada síndrome de Sipple ou neoplasia endócrina múltipla (MEN), também referida como MEN IIa e IIb ou MEN II e MEN III para designar a combinação de síndromes sem e com neuromata de mucosa, respectivamente (FISHER, 1985).

As análises citogenéticas de lesões de tireóide têm mostrado geralmente constituição diplóide nos adenomas (BARTNIZKE **et al.**, 1989; OLAH **et al.**, 1990). Alguns estudos, entretanto, referem-se diferentes aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas nesses tumores, tais como o rearranjo da banda 10q22 e as trissomias 4, 5, 7, 9, 12 e 16 (BARTNIZKE **et al.**, 1989; BONDESON **et al.**, 1989; VAN den BERG **et al.**, 1990).

As análises fotométricas de DNA nas condições tiroideanas



benignas mostram que alguns adenomas e bócios multinodulares possuem picos compatíveis com constituição diplóide enquanto outros apresentam conteúdos aneuplóides. As únicas modificações histológicas dos tecidos analisados que poderiam explicar as medidas de aneuploidia em lesões benignas parecem ser a atipia celular e as áreas de hiperfunção (BENGTTSSON **et al.**, 1984; GREENEBAUM **et al.**, 1985; JOENSUU **et al.**, 1986; BRONNER **et al.**, 1988; HOSTETTER **et al.**, 1988).

Em relação aos tumores malignos, diferentes alterações numéricas ou estruturais foram vistas, nenhuma delas recorrente (WURSTER-HILL, 1986; MARK **et al.**, 1987; ANTONINI **et al.**, 1989; BONDESON **et al.**, 1989), com exceção dos rearranjos estruturais do 10q21 em carcinomas papilares estudados por ANTONINI **et al.** (1989), HERATH **et al.** (1989) e SOZZI **et al.** (1990) e da deficiência 11q em três carcinomas papilares descritos por OLAH **et al.** (1990).

COHN **et al.** (1984), BACKDAHL **et al.** (1985), ARPS **et al.** (1988), HOSTETTER **et al.** (1988) e SHRÖEDER **et al.** (1988) verificaram que a quantidade de DNA nuclear de tumores malignos está relacionada com a sobrevida média dos portadores. Os tumores euplóides parecem estar associados com uma sobrevivência relativamente maior que aqueles aneuplóides.

No presente trabalho, foram analisadas quatro lesões de tiróide (casos 559, 601, 628 e 637), duas das quais apresentaram células normais ou perdas cromossômicas casuais, outra exibiu uma translocação t(5;6) não clonal e poliploidia, e a quarta mostrou trissomia dos cromossomos 7, 10 e 17. Em consequência dessas últimas terem sido observadas em dois ou mais frascos de cultivo, as três alterações foram consideradas representativas de três clones: aquele com 47,XX,+7, um outro com 48,XX,+7,+17 e um terceiro que deve ter

se originado da não disjunção do cromossomo 10 no segundo clone.

O cromossomo 7 é considerado um dos mais frequentemente envolvidos em neoplasias (MITELMAN, 1985; TEYSSIER, 1989). Nesse cromossomo já foram mapeados o gene para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o oncogene **met** (SHIMIZU *et al.*, 1980; McKUSICK, 1986; SPURR *et al.*, 1984), ambos de grande relevância no processo da carcinogênese (KAHN & GRAF, 1988). O RFCE é encontrado na superfície de células epiteliais e sua ligação com o fator de crescimento epidérmico, um pequeno polipeptídeo de 53 aminoácidos, estimula a proliferação celular (KAHN & GRAF, 1988). O oncogene **met** está incluído na classe das proteínas quinases e também está relacionado com o fator de crescimento epidérmico (DEAN *et al.*, 1985).

Cópias extras do cromossomo 7 têm sido consistentemente correlacionadas com os níveis elevados de RFCE em diferentes tumores (KOPROWSKY *et al.*, 1985; BELL *et al.*, 1986), e o proto-oncogene **c-erb B**, que codifica uma porção desse receptor e é também mapeado no 7, não mostra qualquer alteração estrutural nessas neoplasias. Em virtude desses fatos, tem sido sugerido que a presença de cópias extras do gene normal para o RFCE e não sua alteração estrutural leva à proliferação celular (NOWELL, 1989; TEYSSIER, 1989).

No cromossomo 10 está localizado um oncogene designado **TST1**, sequência transformante de tiróide 1, cuja atividade parece estar relacionada com radiação acidental ou terapêutica (FUSCO *et al.*, 1987; SMITH *et al.*, 1989). É interessante citar que esse gene encontra-se na mesma região cromossômica que o locus da síndrome hereditária MEN IIa e b que, como já foi citado, manifesta carcinoma

medular de tireóide e feocromocitoma (KAZAZIAN & JUVIEN, 1987; MATHEW **et al.**, 1987; JACKSON **et al.**, 1988). Existem evidências de que outro gene relacionado com a função tiroideana, o do receptor 3 do hormônio estimulante da tireóide, também está localizado no cromossomo 10 (SMITH **et al.**, 1989).

Em relação ao cromossomo 17, MIYAGIMA **et al.** (1989) descreveram dois proto-oncogenes homólogos ao **c-erb A**, mapeados nesse cromossomo, que codificam proteínas com diferentes propriedades de ligação ao hormônio T3.

As trissomias 7, 10 e 17 presentes no bócio multinodular estudado podem estar relacionadas com genes envolvidos na proliferação celular ou na função tiroideana. Entretanto, cópias extras dos cromossomos 7 e 10 têm sido descritas também em células não-neoplásicas de rim (SZÜCS **et al.**, 1990), cérebro (HEIM **et al.**, 1990) e músculo (VANNI & LICHERI, 1990), entre outras. Em vista disso, as aberrações detectadas no presente trabalho podem refletir instabilidade genômica das células da lesão, mas não é possível descartar a possibilidade de que elas sejam apenas uma característica dos fibroblastos normais do estroma (BARDI **et al.**, 1990).

IV.5. Adenocarcinoma de estômago

Aproximadamente 95% dos tumores de estômago são adenocarcinomas, e frequentemente estão localizados na região antral ou na pequena curvatura do órgão. Existem pelo menos duas entidades clinicopatológicas distintas com o nome de carcinoma gástrico. Uma delas é o tipo intestinal, expansivo ou epidêmico, que apresenta alta incidência em população de alto risco e é precedida por um longo

processo pré-canceroso. A outra, geralmente chamada difusa ou infiltrante, é relativamente mais frequente em populações de baixo risco e não é precedida por estágios pré-cancerosos (MING, 1977; MOERTEL, 1982). O câncer gástrico pode evoluir a partir de certas condições clínicas como a gastrite crônica atrófica, a úlcera péptica e outras, nas quais frequentemente são encontradas alterações da mucosa gástrica consideradas prováveis precursoras de processos malignos. Tais alterações compreendem a displasia e a metaplasia intestinal, esta última caracterizada pela presença no estômago de células com fenótipo intestinal (LOPES, 1987).

Existem poucos estudos citogenéticos em carcinoma de estômago. OCHI **et al.** (1986) descreveram inúmeras alterações em cinco tumores e, as mais frequentes foram a trissomia 12, a perda do cromossomo Y e o envolvimento recorrente das bandas 1p22, 3p21 e 19p13 em rearranjos estruturais. FERTI-PASSANTONOPOULOU **et al.** (1987) analisaram 5 carcinomas gástricos, 3 com números cromossômicos próximos a 46 e 2 deles próximos a 69. As aberrações do cromossomo 9 foram as mais comuns. Números cromossômicos modais variando de 46 a 82 foram observados por CASTEDO **et al.** (1990), em seis adenocarcinomas gástricos, e os cromossomos 3, 7, 8 e 18 foram os mais frequentemente envolvidos em alterações numéricas e estruturais.

A correlação observada entre o padrão de distribuição do DNA nuclear nas células malignas e o comportamento biológico do tumor tem sido de grande valia no estabelecimento do prognóstico dessa doença. Assim, a incidência de metástases em nódulos linfóides está significativamente aumentada em portadores de tumores aneuplóides em relação aos de diplóides, e esse fato implica em uma sobrevi-

da relativamente curta no subgrupo aneuplóide de carcinomas (KORENAGA *et al.*, 1988; SOWA *et al.*, 1988; YONEMURA *et al.*, 1988; BABA *et al.*, 1989).

Recentemente, tem sido observada a expressão independente de estrógeno do gene **pS2** em células normais e neoplásicas do estômago. Esse gene é transcricionalmente controlado por estrógeno em carcinoma de mama hormônio-dependente e parece estar envolvido no controle da proliferação celular. Existem evidências de que a transcrição aberrante do **pS2** ocorre em alguns tumores gástricos (THEISINGER *et al.*, 1990).

No presente trabalho, a monossomia de um cromossomo C e a poliploidia foram as únicas alterações observadas em apenas 2 células de um adenocarcinoma da pequena curvatura do estômago.

IV.6. Sarcoma sinovial

Os sarcomas são lesões relativamente raras originadas do tecido mesenquimal e representam menos de 1% de todos os tumores malignos. São mais frequentemente encontrados em pacientes com menos de 25 anos de idade e podem ser derivados dos tecidos muscular, adiposo, conjuntivo, sinovial e de vasos sanguíneos. A maioria deles manifesta-se desde o início como maligno, embora alguns possam se desenvolver a partir de um correspondente benigno, como os angiossarcomas que surgem de angiomas após terapia por radiação. Sua classificação é feita de acordo com o tecido de origem como, por exemplo, os rabdomiossarcomas derivados de músculos estriados, os condrossarcomas que se desenvolvem a partir de ossos e cartilagens e o sarcoma sinovial que se origina do mesotélio sinovial. Este último

corresponde a cerca de 8% de todos os sarcomas, apresenta características histológicas do tecido sinovial e é encontrado em regiões em que esse tecido é predominante, como na bainha dos tendões e na bursa (MORTON & EILBER, 1982).

De modo geral, existem poucos dados na literatura sobre estudos citogenéticos em sarcoma sinovial. As investigações já realizadas relatam a translocação consistente $t(X;18)$ nesse tipo de lesão (TURC-CAREL **et al.**, 1987; NOGUEIRA **et al.**, 1988; LIMON **et al.**, 1990). Nos cinco tumores analisados por LIMON **et al.** (1990), além da translocação citada, foi detectada hiperdiploidia em três casos e hipodiploidia nos dois outros. EL-NAGGAR **et al.** (1990), por sua vez, demonstraram que 67% de 46 tumores apresentavam valores do conteúdo de DNA compatíveis com números cromossômicos diplóides e significativamente correlacionados com a sobrevida maior que os aneuplóides.

No presente trabalho, células hipodiplóides com 31 a 45 cromossomos foram observadas em um espécimen estudado. Em virtude da má qualidade das preparações, não foi possível caracterizar as alterações numéricas ou as possíveis alterações estruturais. De qualquer modo, a hipodiploidia pode ser significativa dado que já foi relatada por outros autores em sarcoma sinovial. Além disso, pode estar relacionada com o elevado grau de progressão da lesão analisada, uma vez que em alguns tumores sólidos, como por exemplo carcinomas de ovário e mama, a hipodiploidia tem sido observada em estágios mais avançados da doença e associada com a perda de genes supressores recessivos (NIELSEN **et al.**, 1990). A análise de outros tumores sinoviais poderá esclarecer se tal alteração realmente ocorre nesse grupo de lesões.

IV.7. Carcinoma adenocístico de glândula salivar

As glândulas salivares constituem a estrutura glandular com maior número de neoplasias sendo a parótida, a submandibular e a sublingual as mais frequentemente acometidas. As lesões benignas mais comuns são o adenoma pleomórfico e o cistadenoma papilar linfomatoso ou tumor de Warthin, enquanto que as malignas são o carcinoma mucoepidermóide, o adenoma pleomórfico maligno, o carcinoma adenocístico ou cilindroma, e o adenocarcinoma de células acinosas (ROBBINS, 1975; SHEDD, 1982).

O adenoma pleomórfico foi, durante muito tempo, conhecido como tumor misto de origem salivar em consequência do fato de apresentar uma grande variedade de componentes histológicos. Atualmente, a denominação mais utilizada é a de adenoma pleomórfico, pois sua histogênese sugere que seja derivado de células epiteliais e mioepiteliais dos ductos glandulares; pode apresentar um comportamento benigno ou maligno e geralmente afeta a glândula parótida (ROBBINS, 1975; SHEDD, 1982).

O cistadenoma papilar linfomatoso ou tumor de Warthin constitui uma neoplasia benigna relativamente rara que ocorre quase sempre na região inferior da parótida sobre o ângulo da mandíbula. A histogênese desse tumor ainda não é bem conhecida mas supõe-se que ele derive da proliferação de restos de glândulas salivares retidos entre os nódulos linfáticos adjacentes durante o desenvolvimento, ou situados dentro das próprias parótidas (ROBBINS, 1975; SHEDD, 1982).

Em relação aos tumores malignos, os mucoepidermóides são aqueles que se originam das células mucosas e basais dos ductos



salivares e constituem cerca de 10 a 15% de todas as neoplasias salivares. O carcinoma adenocístico corresponde a uma forma maligna do tumor misto de glândula salivar, é invasivo e costuma enviar metástases para gânglios linfáticos regionais ou para vísceras distantes. O adenocarcinoma de células acinares, por sua vez, provém de células de reserva dos ductos glandulares intercalares que se diferenciam em células acinares, e em geral afeta a parótida (ROBBINS, 1975; SHEDD, 1982).

Com exceção do adenoma pleomórfico, todos os demais neoplasmas salivares são raros ou comparativamente raros. Apesar disso, esses tumores têm recebido atenção especial por várias razões, dentre as quais podem ser citadas: a multiplicidade de tipos histopatológicos, as controvérsias em relação à histogênese de alguns tumores, os problemas envolvidos na classificação histopatológica e a ocorrência de vários tipos com comportamento biológico não previsível (SANDROS *et al.*, 1990).

O adenoma pleomórfico benigno é um dos tumores sólidos humanos melhor caracterizado citogeneticamente, com mais de 200 casos já descritos na literatura. As alterações cariotípicas constituem, em geral, rearranjos envolvendo preferencialmente regiões dos cromossomos 3, 8 e 12. Nas lesões malignas, o número de análises é bastante limitado, principalmente em consequência da raridade de ocorrência desses tumores. Nos últimos dez anos, foram cariotipadas apenas 33 dessas lesões, e os rearranjos mais frequentemente detectados em todos os subtipos histológicos, foram as deficiências ou raramente as translocações, envolvendo o braço longo do cromossomo 6. Outras alterações menos comuns foram a perda do Y e a trissomia 8 (STENMAN *et al.*, 1986a, SANDROS *et al.*, 1990). Esses achados são

consistentes com a idéia de que a progressão cromossômica em diferentes subtipos de tumores de glândula salivar segue níveis similares, muito embora algumas aberrações tenham sido mais observadas em certos tumores como, por exemplo, a deficiência 6q em cerca de 50% dos carcinomas adenocísticos e, a perda do Y em aproximadamente metade dos tumores de células acinosas (SANDROS **et al.**, 1990).

No presente trabalho, um carcinoma adenocístico de glândula salivar foi citogeneticamente analisado (caso 664) e mostrou células com cariótipo normal, células com perdas cromossômicas casuais ou poliploidia e, um clone portador de uma deficiência do braço curto do cromossomo 10 e monossomia 22. Apesar das anomalias cromossômicas detectadas nesse caso não se enquadrarem no padrão cariotípico observado em lesões de glândula salivar, elas são frequentes em outros tipos de neoplasias humanas. Por exemplo, a deficiência 10p- já foi descrita em linfomas e leucemias não linfocíticas agudas (MITELMAN, 1985).

A monossomia total ou parcial do cromossomo 22 tem sido descrita em diferentes tumores neurogênicos, como o meningioma e o neurinoma, e algumas vezes é também observada na linhagem constitucional dos portadores (WESTPHAL **et al.**, 1989; CASALONE **et al.**, 1990; COUTURIER **et al.**, 1990b). A explicação molecular para essa associação é ainda desconhecida, mas existem indicações de que anti-oncogenes presentes nesse cromossomo estejam envolvidos no processo de iniciação neoplásica. Recentemente, essa hipótese vem sendo testada através da análise da perda de heterozigosidade em DNAs constitucionais e tumorais de meningiomas e neurinomas com monossomia 22 (COUTURIER **et al.**, 1990b; DEPREZ **et al.**, 1990). Desse modo, é possí-



vel que o tumor analisado pelo presente trabalho também tenha evoluído a partir da perda de genes relevantes das regiões cromossômicas do 10p e do 22.

É interessante salientar que a alteração cariotípica vista no tumor de glândula salivar estudado nunca foi descrita em tumores desse tipo, sejam eles benignos ou malignos. É possível, portanto, que tais alterações definam um novo subgrupo entre as lesões de glândula salivar ou que, na verdade, a condição analisada pertença a uma entidade diversa. A favor desta idéia está o fato de que o tumor apresentado pelo paciente foi diagnosticado no primeiro exame histopatológico como ameloblastoma, uma neoplasia de lâmina dental considerada ser decorrente possivelmente de trauma e inflamação, fato este também referido na anamnese colhida. O ameloblastoma e os tumores malignos de glândula salivar são entidades histopatológicas muito semelhantes mas com prognóstico e tratamento diferentes. No primeiro caso, a lesão é radiorresistente com tratamento cirúrgico de resultado favorável quando a excisão é completa. No segundo caso, o tratamento também é cirúrgico seguido geralmente de radioterapia, e a sobrevida é de pelo menos cinco anos (BROOKE & FISCHMAN, 1982).

O único estudo citogenético em ameloblastoma detectado na bibliografia consultada foi o de STENMAN **et al.** (1986b), que relata a monossomia 22 em três células de um entre três ameloblastomas analisados. Desse modo, as informações citogenéticas e os dados clínicos e histológicos sugerem que o caso 664 não se trata de um tumor de glândula salivar e sim de um ameloblastoma, e reforçam a importância de análises desse tipo com finalidades de diagnóstico e prognóstico de tumores sólidos.



V. RESUMO

Muitas neoplasias humanas apresentam uma alteração cromossômica consistente, que tem sido usada na definição e no diagnóstico dessas doenças assim como no estabelecimento de subgrupos com aplicação no prognóstico e na sobrevivência dos pacientes. Entretanto, a maioria dos estudos citogenéticos já publicados em câncer deriva de neoplasias hematológicas. Isso ocorre principalmente em consequência das dificuldades metodológicas no cultivo de células provenientes de tumores sólidos. Apesar disso, o estudo deste último grupo de doenças representa uma área bastante promissora dentro da citogenética considerando-se que os resultados já obtidos têm sido cada vez mais utilizados como valioso recurso clínico no diagnóstico, prognóstico e monitorização destas doenças.

O presente trabalho investigou as condições favoráveis para o cultivo de células tumorais e a ocorrência de aberrações cromossômicas clonais ou não clonais em lesões benignas e malignas.

Os ensaios sobre condições de cultura realizados em três tumores benignos e seis malignos concluíram que o meio HAM F-10 suplementado com 20 % de soro, L-glutamina e insulina, e utilizado em frascos Descarplast, constitui uma forma adequada para o cultivo **in vitro** de determinadas células tumorais em condições específicas. Além desses fatores, a adição de estrógeno e uma densidade celular inicial de $2,02 \times 10^4$ células/ml também acarretam uma melhora no crescimento celular em certos casos.

Os estudos citogenéticos foram realizados em culturas de curta duração de sete lesões benignas e quatro malignas, anteriores a tratamentos radio e quimioterápicos. As benignas compreenderam

três cervicites crônicas de colo uterino e quatro bócios multinodulares de tiróide, e as malignas compreenderam um sarcoma sinovial, um carcinoma **in situ** de colo de útero, um adenocarcinoma de estômago e um carcinoma adenocístico de glândula salivar.

Duas lesões inflamatórias de colo de útero mostraram cariótipos normais nas poucas células analisadas, e dois carcinomas e três bócios multinodulares mostraram aberrações não clonais, principalmente numéricas. Uma célula poliplóide com $\text{del}(4)(q22)$ foi vista em uma outra cervicite. Esta anomalia foi considerada relevante tendo-se em conta que estudos anteriores indicaram o $\text{i}(4p)$ ou o $\text{i}(5p)$ como uma das aberrações mais comuns em carcinoma de colo de útero.

A análise citogenética de um sarcoma sinovial revelou números cromossômicos inferiores a 46. Esse achado pode estar correlacionado com estágios avançados da doença como tem sido visto em tumores de ovário e mama.

Três clones foram detectados em um bócio multinodular de tiróide, $47,XX,+7$, $48,XX,+7,+17$ e $49,XX,+7,+10,+17$. As trissomias 7, 10 e 17 são achados comuns em neoplasias hematológicas e em tumores sólidos e podem estar relacionadas com genes mapeados nesses cromossomos, envolvidos na proliferação celular ou na função tiroideana. Entretanto, as trissomias 7 e 10 têm sido detectadas em células normais de pacientes com câncer, de modo que tais achados podem representar uma instabilidade genômica do parênquima tumoral ou serem apenas uma característica dos fibroblastos normais do estroma.

Finalmente, um clone anormal foi encontrado em um carcinoma adenocístico de glândula salivar com cariótipo $45,XY,-22,\text{del}(10)(p12)$. As deficiências do $10p$ são encontradas em muitas



VI. SUMMARY

leucemias e linfomas e a monossomia 22 é frequentemente presente em pacientes com tumores neurogênicos, mas tais alterações nunca foram descritas em tumores de glândula salivar. Os dados clínicos e histológicos, além das informações citogenéticas obtidas na literatura sobre tumores odontogênicos, sugerem que o presente caso seja um ameloblastoma e não um carcinoma adenocístico. Tais resultados reforçam a importância de análises desse tipo com finalidades de diagnóstico e prognóstico de tumores sólidos.

low proliferative fraction of solid tumors and the inability to procure chromosomes morphologically suited for chromosome-banding analysis. All these difficulties notwithstanding, a growing number of consistent cytogenetic abnormalities in both malignant and benign solid tumors are now being revealed.

The present study investigated factors influencing *in vitro* cell proliferation and clonal and nonclonal chromosome abnormalities in short-term cultures initiated after collagenase digestion of tissues from 18 solid tumors.

The analyses on culture conditions were performed on three benign and six malignant lesions from the total sample and the results showed that the factors inducing good cellular growth of neoplastic cells were the plating of 2.5×10^4 cells/ml on petriplates or Leighton flasks with Ham F-10 medium supplemented with 20% fetal calf serum, glutamine, insulin, and estrogen.

The cytogenetic studies were performed on seven benign and four malignant tumors. There were three inflammatory lesions, one adenomatous hyperplasia, and three adenocarcinomas and four squamous carcinomas.

VI. SUMMARY

Much has been published on the chromosomal changes in human malignancies and on the use of such data in the definition and diagnosis of these diseases and establishment of subsets within apparently existing entities and their application in the prognosis and survival of patients. However, most of that information has been obtained from leukemias and lymphomas. The reasons for the paucity of published reports on solid tumor karyology reside in the usually low proliferative fraction of solid tumors and the inability to procure chromosomes morphologically suited for chromosome-banding analysis. All these difficulties notwithstanding, a growing number of consistent cytogenetic abnormalities in both malignant and benign solid tumors are now being revealed.

The present study investigated factors influencing **in vitro** cell proliferation and clonal and nonclonal chromosome abnormalities in short-term cultures initiated after collagenase disaggregation of biopsies from 18 solid tumors.

The analyses on culture conditions were performed on three benign and six malignant lesions from the total sample and the results showed that the factors inducing good cellular growth of specific cells were the plating of $2,02 \times 10^4$ cells/ml on Descarplast or Leighton flasks with Ham F-10 medium supplemented with 20% fetal calf serum, glutamine, insulin and estrogen.

The cytogenetic studies were performed on seven benign and four malignant tumors. They were three inflammatory lesions and one carcinoma **in situ** of uterine cervix, one stomach adenocarcinoma, four multinodular goiters of thyroid, one synovial sarcoma and one



cystic carcinoma of salivary gland.

Two inflammatory lesions of uterine cervix showed normal karyotypes in a very few cells, and two carcinomas and three goiters showed nonclonal aberrations, mostly numerical deviations, in particular, chromosome losses. Besides normal and hypodiploid metaphases, one variant cell with an abnormal constitution, 92,XXXX,del(4)(q22), was seen in one inflammatory lesion of uterine cervix. The abnormality was relevant with regard to observations in earlier studies which indicated i(4p) or i(5p) as one of the most common aberrations in carcinomas of uterine cervix.

Cytogenetic analysis of one synovial sarcoma revealed chromosome numbers less than 46. This finding may be correlated to increasing stage of the disease as seen in ovarian and breast tumors.

Three clones were detected in a multinodular goiter, 47,XX,+7, 48,XX,+7,+17 and 49,XX,+7,+10,+17. Trisomies 7, 10 and 17 are common findings in hematologic malignancies and in solid tumors and different genes located on those chromosomes are related to cell proliferation or thyroid function. However, trisomies 7 and 10 have been reported in short-term cultures of nonneoplastic cells from patients with cancer and so those findings may represent genomic instability in the tumor parenchyma but they also may characterize stromal fibroblasts.

Finally, one abnormal clone was found in one adenoid cystic carcinoma of salivary gland with karyotype 45,XY,-22,del(10)(p12). Deletion of 10p are found in a wide variety of leukemias and lymphomas and monosomy 22 is often present in patients with neurogenic tumors. However, both of them were never seen in



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

tumors of salivary gland. Clinical and histological details and data of previous cytogenetic studies suggest that the present case may represent an ameloblastoma and not a tumor of salivary gland. The results emphasize that cytogenetic analysis may provide valuable diagnosis and also prognostic information of benefit to patient management. ER, C.. A translocation (7;10)(q35;q21) is a

differentiated papillary carcinoma of the thyroid. *CANCER GENET CYTOGENET*, 41: 139-144, 1989.

ARPS, H.; SABLOTNY, B.; DIETEL, M; NIENDORF, A. & SCHRÖDER, B.. DNA cytophotometry in malignant thyroid tumors - use of different evaluation schemes for prognostic statements. *VIRCHOWS ARCHIV A PATHOL ANAT*, 413:319-323, 1988.

ATKIN, N.B.. Solid cytogenetics - Progress since 1979 - *CANCER GENET CYTOGENET*, 40:3-12, 1989.

ATKIN, N.B. & BAKER, M.C.. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uteri. I. Nine near-diploid tumours. *CANCER GENET CYTOGENET*, 7:209-222, 1982.

ATKIN, N.B. & BAKER, M.C.. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uteri. II. Ten tumours in the triploid-tetraploid range. *CANCER GENET CYTOGENET*, 13:197-207, 1984.

ATKIN, N.B. & BAKER, M.C.. Chromosome 17q loss in carcinoma of the cervix uteri. *CANCER GENET CYTOGENET*, 37:229-233, 1989.

ATKIN, N.B.; BAKER, M.C. & FOX, M.F.. Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. *CANCER GENET CYTOGENET*, 44:229-241, 1990.

LABA, H.; KORENAGA, D.; OKAMURA, T.; SAITO, A.; WATANABE, G. & SUSIMACHI, K.. Prognostic significance of DNA content with

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIADES, H.N.; SCHER, C.D. & STILES, C.D. Purification of human platelet-derived growth factor. **PROC NATL ACAD SCI**, **76**:1809-1812, 1979.
- ANTONINI, P.; VENNAT, A.M.; LINARES, G.; CAILLOU, B.; BERGER, R. & PARMENTIER, C.. A translocation (7;10)(q35;q21) in a differentiated papillary carcinoma of the thyroid. **CANCER GENET CYTOGENET**, **41**: 139-144, 1989.
- ARPS, H.; SABLITNY, B.; DIETEL, M.; NIENDORF, A. & SCHRÖDER, S.. DNA cytophotometry in malignant thyroid tumors - use of different evaluation schemes for prognostic statements. **VIRCHOWS ARCHIV A PATHOL ANAT**, **413**:319-323, 1988.
- ATKIN, N.B.. Solid cytogenetics - Progress since 1979 - **CANCER GENET CYTOGENET**, **40**:3-12, 1989.
- ATKIN, N.B. & BAKER, M.C.. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uteri. I. Nine near-diploid tumours. **CANCER GENET CYTOGENET**, **7**:209-222, 1982.
- ATKIN, N.B. & BAKER, M.C.. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uteri. II. Ten tumours in the triploid-tetraploid range. **CANCER GENET CYTOGENET**, **13**:189-207, 1984.
- ATKIN, N.B. & BAKER, M.C.. Chromosome 17q loss in carcinoma of the cervix uteri. **CANCER GENET CYTOGENET**, **37**:229-233, 1989.
- ATKIN, N.B.; BAKER, M.C. & FOX, M.F.. Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. **CANCER GENET CYTOGENET**, **44**:229-241, 1990.
- BABA, H.; KORENAGA, D.; OKAMURA, T.; SAITO, A.; WATANABE, A. & SUGIMACHI, K.. Prognostic significance of DNA content with



- special reference to age in gastric cancer. **CANCER**, **63**:1768-1772, 1989.
- BACKDAHL, M.; TALLROTH, E.; AUER, G.; FORSSLUND, G.; GRANBERG, P.O.; LUNDELL, G. & LÖWHAGEN, T.. Prognostic value of nuclear DNA content in medullary thyroid carcinoma. **WORLD J SURG**, **9**:980-987, 1985.
- BARDI, G.; JOHANSSON, B.; ORNDAL, C.; HEIM, S.; MANDAH, A. & MITELMAN, F.. Cytogenetic analysis of colon carcinoma. In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P22, 1990.
- BARTNIZKE, S.; HERRMANN, M.E.; ZUSCHNEID, W.; NEUHAUS, P. & BULLERDIEK, J. Cytogenetic findings on eight follicular thyroid adenomas including one with a t(10;19). **CANCER GENET CYTOGENET**, **39**:65-68, 1989.
- BELL, C.; HARSH, G.; ROSENBLUM, M.; METZER, P. & TRENT, J.. Numerical and structural alterations of chromosome 7 in human brain tumors. Correlation with expression of epidermal factor receptor. **PROC AM ASSOC CANCER RES**, **27**:37, 1986.
- BELLO, M.J. & REY, J.A.. A single chromosome rearrangement in one carcinoma of the cervix uteri. **CANCER GENET CYTOGENET**, **32**:295-296, 1988.
- BENGTSOON, A.; MALMAEUS, J.; GUMELIUS, L.; JOHANSSON, H.; PONTÉN, J.; RASTAD, J. & AKERSTRÖM, G.. Measurement of nuclear DNA content in thyroid diagnosis. **WORLD J SURG**, **8**:481-486, 1984.
- BIRD, B.R. & FORRESTER, F.T.. **BASIC LABORATORY TECHNIQUES IN CELL CULTURE**. U.S. Department of health and human services, 1981.
- BOCHOSIAN, L.; DAL CIN, P. & SANDBERG, A.A.. Letter to the editor:



- An interstitial deletion of chromosome 7 may characterize a subgroup of uterine leiomyoma. **CANCER GENET CYTOGENET**, **34**:207-208, 1988.
- BOEHM, T. & RABBITTS, T.H.. A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man. **EUR J BIOCHEM**, **185**:1-17, 1989.
- BONDESON, L.; BENGTSSON, A.; BONDESON, A.G.; DAHLENFORS, R.; GRIMELIUS, L.; WEDELL, B. & MARK, J.. Chromosome studies in thyroid neoplasia. **CANCER**, **64**:680-685, 1989.
- BRODEUR, G.M. & SEEGER, R.C.. Gene amplification in human neuroblastomas: Basic mechanisms and clinical implications. **CANCER GENET CYTOGENET**, **19**:101-111, 1986.
- BRONNER, M.P., CLEVENGEN, C.J.; EDMONDS, P.R.; LOWELL, D.M.; MCFARLAND, M.M. & LIVOLSI, V.A.. Flow cytometric analysis of DNA content in hürthle cell adenomas and carcinomas of the thyroid. **AM J CLIN PATHOL**, **89**:764-769, 1988.
- BROOKE, R.I. & FISCHMAN, S.L.. Odontogenic tumors. In: **Cancer Medicine**, 2a. Ed., Edt. Lea & Fabiger, Philadelphia, 1697-1707, 1982.
- BULLERDIEK, J.; BARTNITZKE, S.; WOBST, G. & MEYER-BOLTE, K.. The main cytogenetic groups to clinical data and histology in pleomorphic adenomas. In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P16, 1990.
- CARNEY, D.N.; BUNN, P.A.; GAZDAR, A.F.; PAGAN, S.A.; MINHA, J.D.. Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell

- carcinoma of lung. **PROC NATL ACAD SCI**, **78**:3185-3189, 1981.
- CASALONE, R.; SIMI, P.; GRANATA, P.; MINELLI, L.; GIUDICI, A.; BUTTI, G. & SOLERO, C.L.. Correlation between cytogenetic and histopathological findings in 65 human meningiomas. **CANCER GENET CYTOGENET**, **45**:237-243, 1990.
- CASARTELLI, C.. Cancer and chromosome - A review. **REV BRAS GENET**, **3**:395-618, 1982.
- CASTEDO, S.; SERUCA, R.; CORREIA, C.; GOMES, P. & SANSONETI, F.. Cytogenetic study of 6 gastric adenocarcinomas. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P27, 1990.
- CAVENEY, W.K.; KOUFOS, A. & HANSEN, M.F.. Recessive mutant genes predisposing to human cancer. **MUTAT RES**, **168**:3-14, 1986.
- CHEN, T.R. & SHAW, M.W.. Stable chromosome changes in a human malignant melanoma. **CANCER RES**, **33**:2042-2047, 1973.
- CHEN, S.J.; CHEN, Z.; GRAUSZ, J.D.; HILLION, J.; D'AUREOL, L.; FLANDIN, G.; LARSEN, C.J. & BERGER, R.. Molecular cloning of a 5' segment of the genomic **ph1** gene defines a new breakpoint cluster region (bcr2) in philadelphia-positive acute leukemias. **LEUKEMIA**, **2**: 634-641, 1988.
- COHN, K.; BÄCKDAHL, M.; FORSSLUND, G.; AUER, G.; LUNDELL, G.; LÖWHAGEN, T.; TALLROTH, E.; WILLEMS, J.S.; ZETTERBERG, A. & GRANBERG, P.O. Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thyroid carcinoma. **WORLD J SURG**, **8**:474-4780, 1984.
- COROMINAS, M.; KAMINO, H.; LEON, J. & PELLICER, A.. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): Is **HRAS** involved in differentiation as well as proliferation?

PROC NATL ACAD SCI, 86: 6372-6376, 1989.

COUTURIER, J.; SASTRE-GARAN, X.; SCHNEIDER-MAUNOURY & ORTH, G..

Integration of human papillomavirus DNA near proto-oncogenes of the myc family in genital carcinomas. **In:** 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A12, 1990a.

COUTURIER, J.; DELATTRE, O.; KUJAS, M.; PHILIPPON, J.; PETER, M.; ROULEAU, G.; AURIAS, A. & THOMAS, G.. Assessment of chromosome 22 anomalies in neurinomas by combined karyotype and RFLP analysis.

CANCER GENET CYTOGENET, 45: 55-62, 1990b.

CUTTITTA, F.; CARNEY, D.N.; MULSHINE, J.; MOODY, T.W.; FEDORKO, J.; FISCHLER, A. & MINNA, J.D.. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. **NATURE, 316:**823-826, 1985.

DAL CIN, P. & SANDBERG, A.A.. Chromosome changes in soft tissue tumors: Benign and Malignant. **CANCER INVEST, 7:**63-76, 1989.

DAL CIN, P.; TURC-CAREL, C. & SANDBERG, A.A.. Consistent involvement of band 12q14 in two different translocations in three lipomas from the same patient. **CANCER GENET CYTOGENET, 31:** 237-240, 1988.

DEAN, M.O.; PARK, M.; LE BEAU, M.M.; ROBINS, T-S.; DIAZ, M.O.; ROWLEY, J.D.; BLAIR, D.G. & WOUDE, G.F.V. The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. **NATURE, 318:**385-388, 1985.

DELARCO, J.E. & TODARO, G.J.. Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. **PROC NATL ACAD SCI, 75:**4001-4005, 1978.

DEPREZ, R.H.L.; GROEN, N.A.; VAN BIEZEN, N.A.; HAGEMEYER, A.; VAN

- DRUNEN, E.; KOPERT, J.-H.; AVEZAAT, C.J.J.; BOOTSMA, D. & ZWARTHOFF, E.C.. Localization of the meningioma tumor suppressor gene using a translocation. **In:** 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A19, 1990.
- DEVILLEE, P.; VAN VLIRET, M.; VAN SLOUN, P.; BARDEVEL, A.; KUIPERS-DIJKSHOORN, N. & CORNELISSE, C.J. Allelotype of human breast carcinoma: present status and deletion-mapping on chromosomes 3p, 6 and 18q. **In:** 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A6, 1990.
- DUTRILLAUX, B. & MULERIS, M.. Induction of increased salvage pathways of nucleotide synthesis by dosage effect due to chromosome unbalances may be fundamental in carcinogenesis: The example of colorectal carcinoma. **ANN GENET**, 29:11-15, 1986.
- EL-NAGGAR, A.K.; AYALA, A.G.; ABDUL-KARIN, F.W.; McLEMORE, D.; BALLANCE, W.W.; GARNSEY, L.; RO, J.Y. & BATSAKIS, J.. Sinovial sarcoma. A DNA flow cytometric study. **CANCER**, 65: 2295-2300, 1990.
- FERTI-PASSANTONOPOULOU, A.D.; PANANI, A.D.; VLACHOS, J.D. & RAPTIS, S.A.. Common cytogenetic findings in gastric cancer. **CANCER GENET CYTOGENET**, 24:63-73, 1987.
- FISHER, D.A.. Thyroid disorders. **In:** **Principles and practice of medical genetics**. Edt. Churchill Livingstone, New York, 1152-63 p., 1985.
- FISHER, H.W.; PUCK, T.T. & SATO, G.. Molecular growth requirements



- of mammalian cells: The action of fetuin in promoting cell attachment of glass. **PROC ACAD SCI**, **44**:4-10, 1958.
- FOLKMAN, J.; HAUDENSCHILD, C.C. & ZETTER, B.R. Long-term culture of capillary endothelial cells. **PROC NATL ACAD**, **76**:5217-5221, 1979.
- FOLKMAN, J.; HAUDENSCHILD, C.C. & ZETTER, B.R. Long-term culture of capillary endothelial cells. **PROC NATL ACAD**, **76**:5217-5221, 1979.
- FREDIN, B.L.; SEIFFERT, S.C. & GELEHRTER, T.D.. Dexamethasone induced adhesion in hepatoma cells: The role of plasminogen activator. **NATURE**, **27**:312-313, 1979.
- FRESHNEY, R.I.. **Culture of animal cells - A manual of basic technique**. Edt Alan R. Liss, Inc., New York, 253p., 1987.
- FRIGERE, M.F.; MARK-VENDEL, E.; HANS, O.; COINDRE, J.M.; TERRIER, P.; COLLIN, F.; MUGNERET, F. & TURC-CAREL, C.. Chromosomal studies in a series of 13 liposarcomas. Del(6)q14q24 as non random secondary change associated with mixoid subtype. In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P68, 1990.
- FUSCO, A.; GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERI, M.T.; PILOTTI, S.; PIEROTTI, M.A.; DELLA-PORTA, G. & VECCHIO, G.. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. **NATURE**, **328**: 170-172, 1987.
- GIBAS, Z.; GRIFFIN, C.A. & EMMANUEL, B.S.. Clonal chromosomes in uterine mioma. **CANCER GENET CYTOGENET**, **32**:19-24, 1988.
- GORDON, H.. Oncogenes. **CLIN PROC**, **60**:697-713, 1985.
- GOSPODAROWICZ, D. & MORAN, J.. Growth factors in mammalian cell cultures. **ANN REV BIOCHEM**, **45**:531-558, 1974.



- GREEN, A.R.. Recessive mechanisms of malignancy. **BR J CANCER**, **58**:115-121, 1988.
- GREENEBAUM, E.; KOSS, L.G.; ELEQUIN, F. & SILVER, C.E.. The diagnostic value of flow cytometric DNA measurements in follicular tumors of the thyroid gland. **CANCER**, **56**:2011-2018, 1985.
- GROFFEN, J.; STEPHENSON, J.R.; HEISTERKAMPS, N.; DE KLEIN, A.; BARTRAM, C.R. & GROSVELD, G.. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. **CELL**, **36**:93-99, 1984.
- GROUCHY, J.D.E. & TURLEAU, C.. **Atlas des maladies cromosomiques**. Paris, Expansion Scientifique Française, 1977.
- GUILBERT, L.J. & ISCOVE, N.N.. Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. **NATURE**, **263**:594-595, 1976.
- HARRINGTON, W.H. & GOODMAN, G.C.. A selective inhibitor of cell proliferation from normal serum. **PROC NATL ACAD SCI**, **77**:423-427, 1980.
- HAVEL, G.; DAHLENFORDS, R.; WEDELL, B. & MARK, J.. Similar chromosomal evolution in a uterine stromomyosarcoma and in one of two leiomyomas from same patient. **APHIS**, **97**:143-146, 1989.
- HEEREMA, N.A.; PALMER, C.G. & BAEHNER, R.L.. Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia. **CANCER GENET CYTOGENET**, **17**:165-179, 1985.
- HEIM, S. & MITELMAN, F.. Proliferation-specific breakpoints in human neoplasia - A unifying model. **HEREDITAS**, **104**: 307-312, 1986a.
- HEIM, S. & MITELMAN, F.. Numerical chromosome aberrations in human

- neoplasia. **CANCER GENET CYTOGENET**, 22:99-108, 1986b.
- HEIM, S. & MITELMAN, F.. **Cancer cytogenetics**. Edt Alan R. Liss, Inc, New York, 309 p., 1987a.
- HEIM, S. & MITELMAN, F.. Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized human genome map to one of the 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. **HUM GENET**, 75: 70-72, 1987b.
- HEIM, S.; LINDSTRÖM, E. & SALFORD, L.G.. Trisomy 7 and sex chromosome loss are not tumor-specific malignant gliomas. In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A18, 1990.
- HERATH, J.; JENKINS, R.; HAY, I. & DEWALD, G.. Cytogenetic studies on 12 thyroid carcinomas. In: 2nd INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 3, tucson, 26/02-1/03/1989. **Abstracts**. Tucson, Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute, p. 64, 1989.
- HOFFMAN, M.. One Wilm's tumor gene is cloned; are there more? **SCIENCE**, 246:1387, 1989.
- HOSTETTER, A.L.; HRAFNKELSSON, J.; WINGREN, S.O.; ENESTROM, S. & NORDENSKJOLD, B.. A comparative study of DNA cytometry. **AM J CLIN PATHOL**, 89:760-763, 1988.
- HUGNES, E.C. & CSERMELY, T.V.. Chromosome constitution of human endometrium. **NATURE**, 209:326, 1966.
- INGBAR, S.H. & WOEBER, K.A.. The thyroid gland. In: **Textbook of endocrinology**., Edt W.B. Saunders company-Tokio, 117-227 p., 1981.
- ISCN (1978).. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978). **CYTOGENET CELL GENET**, 21: 309-404, 1978.

- JACKSON, C.E.; NORUM, R.A.; O'NEAL, L.W.; NIKOLAI, R.F. & DELANEY, J.P.. Linkage between MEN2B and chromosome 10 markers linked to MEN2A. **AM J HUMAN GENET**, **43**:A147, 1988.
- JOENSUU, H.; KLEMI, P. & EEROLA, E.. DNA aneuploidy in follicular adenomas of the thyroid gland. **AM J PATHOL**, **124**:373-376, 1986.
- KAHN, P. & GRAF, T.. **ONCOGENES AND GROWTH CONTROL**. 2 Ed., Edt Springer-verlag, New York, 369 p., 1988.
- KAZAZIAN, H.H. & JUVIEN, C.. Report of the committee on the genetyic constiution dof chromosomes 10, 11 and 12. **CYTOGENET CELL GENET**, **46**:1-4, 1987.
- KIECHLE-SCHWARZ, M.; BERGER, C.S.; SURT, V. & SANDBERG, A.A.. Rearrangement of band 10q22 in leiomyoma of the uterus. **CANCER GENET CYTOGENET**, **47**:95-100, 1990a.
- KIECHLE-SCHWARZ, M.; SREEKENTIAH, C.; BERGER, C.S.; PEDRONE, S.; MEDCHILL, M.T.; SURTI, U. & SANDBERG, A.A.. Nonrandom Cytogenetic Changes in Leiomyomas of the Female Genitourinary tract. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P59, 1990b.
- KLEIN, G. & KLEIN, E.. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. **NATURE**, **315**:190-195, 1985.
- KNUDSON, A.G.G.. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **CANCER RES**, **45**:1437-1443, 1985.
- KOPROWSKY, H.; HERLYN, M.; BALABAN, G.; PARMITER, A.; ROS, A.; NOWELL, P.C.. Expression for the receptors for epidermal growth factor correlates with increased dosage of chromosome 7 in malignant melanoma. **SOM CELL**, **11**:297-302, 1985.

- KORENAGA, D.; OKAMURA, T.; SAITO, A.; BABA, H. & SUGIMACHI, K.. DNA ploidy is closely linked to tumor invasion, lymph node metastasis, and prognostic in clinical gastric cancer. **CANCER**, **62**:309-313, 1988.
- KUMAR, R.; SUKUMAR, S. & BARBACID, M.. Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. **SCIENCE**, **248**:1101-1104, 1990.
- LE BEAU, M.M. & ROWLEY, J.D.. Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma: Clinical and biological significance. **ADV IN HUMAN GENET**, **15**:1-54, 1986.
- LEDER, A.; PATTENGAL, P.K.; KUO, A.; STEWART, T.A. & LEDER, P. Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development. **CELL**, **45**:485-495, 1986.
- LEIBOVITZ, A.. Development of tumor cell lines. **CANCER GENET CYTOGENET**, **19**: 11-19, 1986.
- LIMON, J.; DAL CIN, P. & SANDBERG, A.A.. Amplification of long term collagenase disaggregation for cytogenetic analysis of human solid tumors. **CANCER GENET CYTOGENET**, **23**: 305-315, 1986.
- LIMON, J.; MRÓZEK, K.; NEDOSZYTKO, B.; BABINSKA, M.; RYS, J.; NIEZABITOWSKI, A.; NOSEK, H.; OCHALEK, T. & KOPACZ, A.. Presentation of five new synovial sarcomas with t(X;18). In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P64, 1990.
- LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P. & TAFURI, W.L.. **Bogliolo Patologia**. Ed 4a., Edt. Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro, 1141 p., 1987.
- MANNENS, M.; STALER, R.M.; HEGTING, C.; BLIEK, J.; KRAKER, J.;



- CROAD, N.; PAGTER-HOLTHUIZEN, P. & PEARSON, P.L.. Molecular nature of genetic changes resulting in loss heterozygosity of chromosome 11 in Wilm's tumours. **HUMAN GENET**, **81**:41-48, 1988.
- MARK, J.; EKEDAH, C.; DAHLENFORS, R. & WESTERMARK, B.. Cytogenetical observations in five human anaplastic thyroid carcinomas. **HEREDITAS**, **107**:163-174, 1987.
- MARK, J.; HAVEL, G.; GREPP, C.; DAHLENFORS, R. & WEDELL, B.. Chromosomal patterns in human benign uterine leiomyomas. **CANCER GENET CYTOGENET**, **44**:1-13, 1990.
- MARX, J.. Many gen changes found in cancer. **SCIENCE**, **246**: 1386-1388, 1989.
- MATHEW, C.G.P.; CHIN, K.S.; EASTON, D.F.; THORPE, K.; CARTER, C.; LIOU, G.I.; FONG, S-L.; BRIDGES, C.D.B.; HAAK, H.; KRUSEMAN, A.C.N.; SCHIFTER, S.; HANSEN, H.H.; TELENUS, H.; TELENUS-BERG, M. & PONDER, B.A.J.. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. **NATURE**, **328**: 527-528, 1987.
- McKUSICK, V.A.. **Mendelian inheritance in man**. Ed. 7a, Edt. The Johns Hopkins University Press, London, 1741 p., 1986.
- McLEAN, J.S.; FRAME, M.C.; FRESHNEY, R.I.; VAUGHAN, P.F.T. & MACKIE, A.E.. Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and others agents. **ANTICANCER RES**, **6**:1101-1106, 1986.
- MERTENS, F.; HEIM, S.; MANDAH, N.; JOHANSSON, B.; RIDHOLM, A.; BIÖRKLUND, A.; WENNERBERG, J.; JONSSON, N. & MITELMAN, F.. Clonal chromosome aberrations in a keratoacanthoma and a basal cell papilloma. **CANCER GENET CYTOGENET**, **39**: 227-232, 1989.

- MING, S.C.. Gastric carcinoma. A pathobiologic classification. **CANCER**, 39:2475-2485, 1977.
- MITELMAN, F.. Restricted number of chromosomal regions implicated in etiology of human cancer and leukemia. **NATURE**, 310:325-327, 1984.
- MITELMAN, F.. **Catalogue of chromosome aberrations in cancer**. Ed. 2a, Edt. Alan R. Liss Inc., New York, 1985.
- MITELMAN, F.. Clustering of chromosomal breakpoints in neoplasia. **CANCER GENET CYTOGENET**, 19: 67-71, 1986.
- MITELMAN, F.. The human cancer chromosome registry - an update. In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A22, 1990.
- MIYAGIMA, N.; HORIUCHI, R.; SHIBUYA, Y.; FUKUSHIGE, S.; MATSUBARA, K.; TOYOSHIMA, K. & YAMAMOTO, T.. Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. **CELL**, 57: 31-39, 1989.
- MIYAMOTO, M.; SUGAWA, H.; MORI, T.; HASE, T.; KUMA, K. & IMURA, H.. Epidermal growth factor receptors on cultured neoplastic human thyroid cells and effects of epidermal growth factor and thyroid stimulating hormone on their growth. **CANCER RES**, 48: 3652-3656, 1988.
- MOERTEL, C.G.. The stomach. In: **Cancer Medicine**, 2a. Ed., Edt Lea & Fabiger, Philadelphia, 1760-1781, 1982.
- MORTON, D.L. & EILBER, F.R. - Soft Tissue Sarcomas. In: **Cancer Medicine**, 2a. Ed., Edt Lea & Fabiger, Philadelphia, 2142-2157, 1982.
- MUGNERET, F.; LIZARD-NACOL, S.; VOLK, C.; CUISENIR, V.; COLIN, F. &

- TURC-CAREL, C.. The breakpoint 14q23 is associated with uterine leiomyoma. **CANCER GENET CYTOGENET**, **34**: 201-206, 1988.
- MURTY, V.V.V.S.; MITRA, A.B.; SHARMA, J.K. & LUTHRA, U.K.. Nucleolar organizer regions in patients with precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. **CANCER GENET CYTOGENET**, **18**: 275-279, 1985.
- MURTY, V.V.V.S.; MITRA, A.B.; DAS, B.C.; MURTHY, N.S. & LUTHRA, U.K.. Chromosomal phenotypes in patients with precancerous lesions of the uterine cervix progressed to cancer during follow-up. **ONCOLOGY**, **45**:348-388, 1988.
- NIELSEN, K.V.; BERTELSEN, K. & ANDERSEN, J.. Chromosome loss during solid tumor progression. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A18, 1990.
- NILBERT, M.; HEIM, S.; MANDAH, N. & MITELMAN, F.. Karyotypic characteristics of uterine leiomyoma. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A35, 1990.
- NOGUEIRA, R.; GINÉS-LAPEZ, C.; GIL, R.; CARDA, C.; PELLIN, A. & BOSCH-LOMBAT, A.. Letter to the Editor: Translocation (x;18) in a Synovial Sarcoma: A new case. **CANCER GENET CYTOGENET**, **33**:311-312, 1988.
- NOWELL, P.C.. Chromosomal and molecular clues to tumor progression. **SEMINARS ONCOL**, **16**:116-127, 1989.
- NOWELL, P.C. & HUNGERFORD, D.A.. Chromosome studies on normal and



- leukemia human leukocytis. **J NATL CANCER INST**, 25:85-109, 1960.
- NOWELL, P.C.; VONDERLEID, E.C.; BESA, R.; HOXIE, J.A.; MOREAU, L.. & FINAN, J.B.. The most common chromosome change in 86 chronic B cell or T cell tumours: A 14q32 translocation. **CANCER GENET CYTOGENET**, 19:219-227, 1986.
- OCHI, H.; DOUGLASS, H.O. JR. & SANDBERG, A.A.. Cytogenetic studies in primary gastric cancer. **CANCER GENET CYTOGENET**, 22:295-307, 1986.
- OLAH, E.; BALOGH, E.; KOVACS, I. & KISS, A.. Abnormalities of chromosome 1 in relation to human malignant diseases. **CANCER GENET CYTOGENET**, 43:179-194, 1989.
- OLAH, E.; BALOGH, E.; BOJAN, F.; JUHASZ, F.; STENSZKY, V. & FARID, N.R.. Cytogenetic analyses of three papillary carcinomas and a follicular adenoma of the thyroid. **CANCER GENET CYTOGENET**, 44:119-129, 1990.
- PAULETE, J. & VANRELL. DNA content and chromosome number in twenty-five human carcinomas. **ONCOL**, 24:48-57, 1970.
- PAULIEN, S.; TURC-CAREL, C.; DAL CIN, P.; SANDBERG, A.A. & GEMMILL, R.. Mapping studies around the 12q13-q14 region in adipose tissue tumors. **In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS**, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A28, 1990.
- PAYVAR, F.; WRANGRE, O.; CARLSTEDT; DUKE, J.; OKREDT, S.; GUSTAFSSON, A. & YAMAMOTO, K.R.. Purified glucocorticoid receptors bind seletively **in vitro** to a cloned DNA frgment whose transcription is reguled by glucocorticoids **in vivo**. **PROC NATL ACAD SCI**, 78:6628-32, 1981.



- PIMENTEL, E.. Oncogenes and human cancer. **CANCER GENET CYTOGENET**, **14**:347-368, 1985.
- POPESCU, N.C. & DI PAOLO, J.A. Preferential sites for integration on mammalian genome. **CANCER GENET CYTOGENET**, **42**:157-171, 1989.
- RASK-MADSEN, J. & PHILIP, J.. The chromosome complement of human endometrium. **CYTOGENET**, **9**:24-41, 1970.
- REGO, M.. **Tumores do pescoço**. Edt. Atheneu-MEC, Rio de Janeiro, 244 p., 1976.
- REY, J.A.. Citogenetica de tumores del sistema nervioso. **LIBRO ACT XII CONG NAC GEN HUMANA (OVIEDO)**: 37-46 p., 1984.
- RICHMOND, A.; FINE, R.; MURRAY, D.; LAWSON, D.A. & PRIEST, J.H.. Growth factor and cytogenetic abnormalities in cultured nevi and malignant melanomas. **J INVEST DERMATOL**, **3**:295-302, 1986.
- RIOU, G.F.. Proto-oncogenes and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. **CANCER SURVEYS**, **7**:441-455, 1988.
- ROBBINS, S.L.. **Patologia Estrutural e Funcional**. Edt. Interamericana LTDA, Rio de Janeiro, 1422 p., 1975.
- ROGATTO, S.R. & CASARTELLI, C.. Cytogenetic analysis of human meningiomas. **REV BRASIL GENET**, **11**:729-744, 1988.
- ROWLEY, J.D.. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identifies by quinacrine fluorescence and giemsa staining. **NATURE**, **243**:290-292, 1973.
- ROWLEY, J.D.. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: The role of the 14;18 translocation. **J CLIN ONCOL**, **6**:919-925, 1988.
- SAGAE, S.; KUZUMAKI, N.; HISADA, R.; MUGIKURA, Y.; KUDO, R. & HASHIMOTO, M.. ras oncogene expression and prognostic of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. **CANCER**, **63**:1577-

1582, 1989.

SAGER, R.. Tumor supressor genes: the puzzle and the promise.

SCIENCE, 246:1406-1412, 1989.

SANDBERG, A.A.. **The chromosomes in human cancer and leukemia.** Edt.

Eselsvier, New York, 1980.

SANDBERG, A.A.. Aplication of cytogenetics in neoplastis diseases.

CRC CRIT REV LAB SCI, 22:219-274, 1985.

SANDBERG, A.A.. Chromosome changes in bladder cancer: clinical and

other correlations. **CANCER GENET CYTOGENET, 19: 163-175, 1986.**

SANDBERG, A.A.. Editorial: The cytogenetic route of benign tumours.

CANCER GENET CYTOGENET, 32:11-12, 1988.

SANDBERG, A.A. & TURC-CAREL, C.. The cytogenetics of solid tumors.

CANCER, 59:387-395, 1987.

SANDBERG, A.A.; TURC-CAREL, C. & GEMMIL, R.M.. Chromosomes in solid

tumors and beyond. **CANCER RES, 48:1049-1059, 1988.**

SANDBERG, A.A.; GEMMILL, R.M.; HECHI, B.K. & HECHT, F.. The

philadelphia chromosome: A model of cancer and molecular
cytogenetics. **CANCER GENET CYTOGENET, 21:129-146, 1986.**

SANDROS, J.; STENMAN, G. & MARK, J.. Cytogenetic and molecular

observations in human and experimental gland tumors. **CYTOGENET
CEL GENET, 44:153-167, 1990.**

SASTRE-GARAN, X.; SCHNEIDER-MAUNOURY, S.; COUTURIER, J. & ORTH, G..

Human papillomavirus type 16 DNA is integrated into chromosome
region 12q14q15 in a cell line derived from a vulvar
intraepithelial neoplasia. **CANCER GENET CYTOGENET, 44:243-251,
1990.**

SHEDD, D.P.. Cancer of head and neck. In: **Cancer Medicine**, 2a. Ed.,

Edt. Lea & Fabiger, Philadelphia, 1671-1697, 1982.

- SHIMIZU, N.; BEHZADIAN, M.A. SHIMIZU, Y.. Genetics of cell surface receptors for bioactive polypeptides: Binding of epidermal growth factor is associated chromosome 7 in human-mouse cell hybrids. **PROC NATL ACAD SCI**, 77:3600-3604, 1980.
- SCHRÖDER, S.; BÖCKER, W.; BAISCH, H.; BÜRK, C.G.; ARPS, H.; MEINERS, I.; KASTENDIECK, H.; HEITZ, P.U. & KLÖPPEL, G. Prognostic Factors in Medullary Thyroid Carcinomas. **CANCER**, 61:806-816, 1988.
- SINCLAIR, J.; Mc CLAIN, D. & TAETLE, R.. Effects of insulin and insulin-like growth factor I on growth of human leukemia cells in serum-free and protein-free medium. **BLOOD**, 72:66-72, 1988.
- SLATER, R.M.; MANNENS, M. & WESTERVLD, A.. Searching for other genes involved in Wilm's tumor. **In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS**, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A30, 1990.
- SMITH, M. & SIMPSON, N.E.. Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 9 and 10. **CYTOGENET CELL GENET**, 51: 202-225, 1989.
- SOWA, M.; YOSHINO, H.; KATO, Y. NISHIMURA, M.; KAMINO, K. & UMEYAMA, K.. An analysis of the DNA ploidy patterns of gastric cancer. **CANCER**, 62:1325-1330, 1988.
- SPURR, N.K.; GOODFELLOW, P.N.; SALOMON, E.; PARKAR, M.; VENNSTRON, B. & BODMER, W.F.. Mapping of cellular oncogenes; erb B on chromosome 7. **CYTOGENET AND CELL GENET**, 37:590, 1984.
- SREEKANTIAH, C.; BHARGAVA, M.B. & SHETTY, N.J.. Premature chromosome condensation in human cervical carcinoma. **CANCER GENET CYTOGENET**, 24: 263-269, 1987.

- SREEKANTIAH, C.; BHARGAVA, M.B. & SHETTY, N.J.. Chromosome 1 abnormalities in cervical carcinoma. **CANCER**, 62:1317-1324, 1988.
- SREEKANTIAH, C.; LEONG, S. & SANDBERG, A.A.. Complex cytogenetic changes in benign neoplasms. Report of six lipomas. **CANCER GENET CYTOGENET**, 47:113-130, 1990.
- STENMAN, G.; SANDROS, J.; DAHLENFORS, R.; JUBERG-ODE, M. & MARK, J.. 6q- and loss of the Y chromosome - two common deviations in malignant human salivary gland tumors. **CANCER GENET CYTOGENET**, 22:283-293, 1986a.
- STENMAN, G.; SANDROS, J.; MARK, J. & HAPPONEN, R.P.. Observations by G-banding in benign odontogenic tumors. **CANCER GENET CYTOGENET**, 19:253-259, 1986b.
- SOZZI, G.; MIOZZO, M.; RADIC, P.; BONGARZONE, I.; DE BENEDETTI, V.; CALDERONE, C.; PILOTTI, S.; PIEROTTI, M.A. & DELLA PORTA, G.. Cytogenetic analysis and chromosomal localization of activated oncogenes in papillary thyroid carcinoma. **In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS**, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A4, 1990.
- SZÜCS, S.; EMANUEL, A. & KOVACS, G.. Clonal aberrations of chromosomes X, Y, 7, and 10 in normal kidney tissue of patients with renal cell cancers. **In: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS**, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P40, 1990.
- TEYSSIER, J.R.. The chromosomal analysis of human solid tumors. **CANCER GENET CYTOGENET**, 37:103-125, 1989.
- TEYSSIER, J.R.; SADRIN, R.; NOV, J.R.; BURGAU, G.; ADNET, J.J.;



- BAJOLLE, F. & PIGEON, F.. Trisomy 7 in a Lung Carcinoid Tumor: Precocious Index of Malignant Transformation? **CANCER GENET CYTOGENET**, **15**: 277-282, 1985.
- THEISINGER, B.; WELTER, C.; SEITZ, G.; RIO, M.C.; CHAMBON, P. & BLIN, N.. Correlated activity of the PS2 gene and its domain-duplicated homolog (hsp) in human stomach carcinoma. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P30, 1990.
- TOUGH, I.M.; BAIKIE, A.G.; HARNDEN, D.G.; KING, M.J.; BROWN, W.W.C.; BUCKTON, K.E.; JACOBS, P.A. & MACBRIDE, J.A.. Cytogenetic studies in chronic myeloid leukaemia and acute leukaemia associated with mongolism. **LANCET**, **1**:411-417, 1961.
- TOZER, B.T. & PIRT, S.J.. Suspension culture of mammalian cells and macromolecular growth promoting fractions of calf serum. **NATURE**, **201**:375-378, 1964.
- TRENT, J.M.. Cytogenetic analysis of human tumour cells cloned in agar. **PROG CLIN BIOL RES**, **48**:165-177, 1980.
- TRENT, J.M.; KANEKO, Y. & MITELMAN, F.. Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia. **CYTOGENET CELL GENET**, **51**:533-562, 1989.
- TRENT, J.M.; 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**, **19**:57-66, 1986.
- TURC-CAREL, C.; DAL CIN, P.D.; BOGHOSIAN, L.; TERK-ZAKARIAN, J. & SANDBERG, A.A.. Consistent breakpoint in region 14q22-q24 in

uterine leiomyoma. **CANCER GENET CYTOGENET**, **32**:25-31, 1988.

TURC-CAREL, C.; DAL CIN, P.; LIMON, J.; RAO, U.; LI, F.P.; CORSON, J.M.; ZIMMERMA, R.; PARRY, D.M.; COWAN, J.M. & SANDBERG, A.A.. Involvement of X chromosome in primary cytogenetic change in human neoplasia: Non-random translocation in synovial sarcoma. **PROC NATL ACAD SCI**, **84**:1981-1985, 1987.

VAN DEN BERG, E.; OOSTERHUIS, W.; JONG, B.; BUIST, J.; VOS, A.; DAM, A. & VERMEIJ, B.. Cytogenetics of thyroid follicular adenomas. **CANCER GENET CYTOGENET**, **44**:217-222, 1990.

VAN DER HOUT, A.; VAN DER VLIES, P.; HAVE, J.; LI, F.P.; KOVACS, G. & BUYS, C.H.C.M.. Molecular analysis of renal cell carcinoma. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P41, 1990.

VANNI, R.; LECCA, V. & FAA, G.. Cytogenetic heterogeneity in uterine leiomyoma. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P58, 1990.

VANNI, R. & LICHERI, S.. Cytogenetic findings in atherosclerotic plaques. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, A26, 1990.

VORECHOVSKY, I.; WHITE, G.R.M. & SANTIBANEZ-KOREF, M.. Distribution of losses of constitutional heterozigosity at 17p13 in breast carcinoma. **In**: 2nd EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Leuven, 30/07-

VIII. APENDICE

01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, P11, 1990.

WATSON, J.D.; HOPKINS, N.H.; ROBERTS, J.W.; STEITZ, J.A. WEINER, A.M. **Molecular biology of the gene**, Ed. 4a, Edt. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc, California, 1987.

WEINBERG, R.A.. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **SCIENCE**, **230**:770-776, 1985.

WESTPHAL, M.; HÄNSEL, M.; KUNZMANN, R.; HÖLZEL, F. & HERRMANN, H-D.. Spectrum of karyotypic aberrations in cultured human meningiomas. **CYTOGENET CELL GENET**, **52**:45-49, 1989.

WURSTER-HILL, D.H.; NOLL, W.W.; BIRCHER, L.Y.; PETTENGILL, O.S. & GUZZLE, W.A.. Cytogenetics of medullary carcinoma of thyroid. **CANCER GENET CYTOGENET**, **20**:247-253, 1986.

YONEMURA, Y.; SUGIYAMA, K.; FUJIMURA, J.; ARETXABALA, X.; KAMATA, J.; YAMAGUCHI, A.; MIWA, K. & MIYAZAKI, I.. Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer. **CANCER**, **62**:1497-1502, 1988.

YUNIS, J.J.. Chromosomes and cancer: New nomenclature and future directions. **HUMAN PATHOL**, **12**:494-503, 1981.

YUNIS, J.J. & BRUNNING, R.D.. Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukemias and myelodysplastic syndromes. **CLINICS IN HEMATOL**, **15**:597-620, 1986.



VIII. APÊNDICE

VIII.1. Meios de Cultura e Soluções

a. Meios de cultura completos

Os meios de cultura utilizados foram de diferentes tipos e procedências e suplementados da seguinte maneira:

-100 ml de meio Ham F-10 (CULTILAB), RPMI1640 (CULTILAB), Dulbecco MEM (DIFCO) ou Eagle (CULTILAB) com penicilina/estreptomicina em concentrações finais de 125 U/ml: 125 ug/ml.

-20, 10 ou 5 ml de soro fetal bovino (CULTILAB).

-1 ml de glutamina em solução de 200 mM.

-0,1 ml de solução de insulina.

Sua estocagem foi feita a 5° C por um período de até 15 dias.

b. Solução de Hanks

A solução de Hanks recebeu diferentes antibióticos dependendo de sua finalidade, se para transporte da amostra, do hospital ao laboratório, ou se para lavagem do tecido. Como pode ser observado na descrição abaixo, a anfotericina foi utilizada apenas na solução de lavagem, em virtude de sua grande toxicidade. Ambos os tipos foram estocados a 5° C por períodos de até 6 meses.

b.1. Para transporte

-100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (CULTILAB).



-2 ml de solução de penicilina/estreptomicina, concentração final de 250 U/ml:250ug/ml.

-0,2 ml de gentamicina, concentração final de 0,04 mg/ml.

b.2. Para lavagem do tecido

-100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (CULTILAB).

-2 ml de solução de penicilina/estreptomicina, concentração final de 250 U/ml:250 ug/ml.

-0,2 ml de gentamicina, concentração final de 0,04 mg/ml.

-50 ul de anfotericina, concentração final de 2,5 ul/ml.

c. Solução de collagenase - (GIBCO-tipo II) (2.000 U/ml).

A solução de collagenase foi obtida dissolvendo-se esta substância em meio de cultura incompleto, ou seja, sem soro e demais suplementos, numa concentração de 2.000 U/ml. Após seu preparo, a solução foi mantida em banho-maria a 37° C por 2 horas e, em seguida, a 4° C por 12 a 14 horas. A solução foi então esterilizada por filtração e guardada em alíquotas de 0,5 ml a -20° C por dois a três meses.

d. Solução hipotônica

A solução hipotônica compreendeu uma solução aquosa de citrato de sódio 0,8%, estocada em temperatura ambiente ou a 5° C por dois a três meses.



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

-100 ug de colcemide em 10 ml de solução de Hanks (solução mãe 10 ug/ml estocada a -20° C após filtração).

-2 ml da solução mãe de colcemide em 10 ml de solução de Hanks (solução de uso 2 ug/ml estocada a 5° C).

f. Solução de L-glutamina (200 mM)

-2,92 g L-glutamina.

-100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg.

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

g. Solução de insulina (BIOBRÁS U-40)

A solução comercial possui concentração de 40 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada em alíquotas de 1 ml a 5° C.

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

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

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

-38,5 ml de solução de Hanks.

As soluções mãe e de uso foram estocadas a -20° C.



i. Solução de gentamicina (SCHERING) (20 U/ml)

A solução comercial possui concentração de 20 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada a 5° C.

j. Solução de anfotericina (SQUIBB) (5 mg/ml)

-50 mg de anfotericina.

-10 ml de água desionizada estéril.

Sua estocagem foi feita a 5° C.

l. Fixador

-3 partes de metanol.

-1 parte de ácido acético.

O fixador foi feito minutos antes de seu uso.

m. Solução de metotrexato (LEDERLE) (10^{-5} M)

-0,954 mg de metotrexato em 20 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução mãe 10^{-4} M estocada em alíquotas de 1 ml a -20° C após filtragem).

-1 ml da solução mãe em 9 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução de uso 10^{-5} M estocada em alíquotas de 0,5 ml a -20° C).

n. Solução de timidina (SIGMA) (10^{-3} M)

-5 mg de timidina.



-20 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg ou água desionizada.

Sua estocagem após filtração foi feita em alíquotas de 0,5 ml a -20° C.

o. Solução de succinato sódico de hidro cortisona (SOLU-CORTEF, UP JOHN) (10^{-6} M)

-100 mg do sal de hidro cortisona em 200 ml de água desionizada estéril (solução mãe 10^{-3} M estocada a -20° C no escuro após filtração).

-50 ul da solução mãe em 50 ml de meio completo (solução de uso 10^{-6} M ou 0,5 ug/ml estocada a -20° C no escuro).

p. Solução de estrogênios conjugados (Premarin, AYERST) (1 ug/ml)

-20 mg de estrogênios conjugados em 40 ml de meio incompleto (solução mãe 500 ug/ml estocada a -20° C no escuro após esterilização por filtração).

-100 ul da solução mãe em 50 ml de meio completo (solução de uso 1 ug/ml estocada a -20° C no escuro).

q. Corante azul de tripano a 0,4%

- 400 mg de azul de tripano.

- 100 ml de solução salina.

A solução é estocada a 5° C.

