

Sheila Adami Vayego

Estudo Cromossômico de Lesões Osseas
Proliferativas



1910000717



Sheila Adami Vayego

ESTUDO CROMOSSOMICO DE LESÕES OSSEAS PROLIFERATIVAS

Dissertação apresentada para a
obtenção do Grau de Mestre em
Genética junto ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Bio-
lógicas, Área de Concentração
em Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Esta-
dual Paulista, UNESP.



717/96

São José do Rio Preto

1993



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

Orientadora: Profa. Dra. Marileila Varella Garcia



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



À memória de meu avô Raimundo,
amigo e companheiro,
dedico este trabalho.

O ponto, que ontem era invisível,
é hoje o ponto de chegada.
Amanhã, será o de partida...

Macaulay

SUMARIO

I. INTRODUÇÃO	
I.1. As Neoplasias e Outras Lesões Osseas	1
I.2. Marcadores Cromossômicos em Lesões Neoplásicas e Alterações Cromossômicas em Células Aparentemente Normais	8
I.3. Aspectos Moleculares do Câncer	12
I.4. Objetivos	17
II. MATERIAL E METODOS	18
II.1. Amostras	18
II.2. Métodos	21
A. Colheita e Assepsia das amostras	21
B. Processamento inicial do material	21
C. Lançamento das Culturas	22
D. Hipotonização, Fixação e Coloração do Material	22
E. Análise Cromossômica	23
III. RESULTADOS	25
A. Osteocondromas	25
B. Tumor Osseo de Células Gigantes	34
C. Cisto Osseo Solitário	34
IV. DISCUSSÃO	43
V. CONCLUSÕES	62
VI. RESUMO	63
VII. ABSTRACT	65
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
IX. APENDICE	80
X. AGRADECIMENTOS	86



SUMÁRIO

carcinomas = derivados de células epiteliais

sarcomas = " tecido mesenquimal

* Existem alguns tumores que se comportam como benignos, porém apresentam características de lesões malignas e vice-versa. O exemplo mais conhecido é o carcinoma basocelular da pele, que histologicamente é maligno, invade progressivamente, mas nunca metastatiza. Da mesma forma, o crescimento de alguns adenomas de glândula salivar, que são classificados como benignos, pode ser tão agressivo que desafia mesmo uma cura cirúrgica.

I. INTRODUÇÃO

I.1. As Neoplasias e Outras Lesões Ósseas

Os tumores ósseos primários são raros, com exceção das neoplasias de origem medular como os mielomas e leucemias. Sua manifestação ocorre em extensa variação etária, segundo Cotran et al. (1991), mas com destaque para faixas etárias jovens. Murray et al. (1982) referem que os tumores ósseos constituem 5% de todos os tumores malignos na faixa etária abaixo dos quinze anos e cerca de 8% na faixa entre os quinze e dezenove anos de idade.

As neoplasias ósseas podem ser subdivididas, de acordo com vários enfoques. Considerando o tecido de origem e seu comportamento biológico, Cotran et al. (1991) propuseram classificá-las em três grupos: os tumores condromatosos, que são formadores de cartilagem, os osteoblásticos, que produzem matriz óssea e os de origem desconhecida. Um resumo dessa classificação segundo a origem e característica benigna ou maligna dos tumores é apresentada na Tabela 1.

a. Neoplasmas Condromatosos

Os tumores condromatosos representam aproximadamente 50% dos tumores ósseos mesenquimais, que incluem os com origem óssea, muscular, tendinosa, cartilaginosa, adiposa, vascular, linfática e fibrosa. Nesses tumores são comuns discrepâncias entre os achados histológicos e o comportamento biológico, sendo que tais fatores variam em dependência da idade do paciente, dos sintomas clínicos e do sítio anatômico da lesão (Schajowicz & McGuire, 1989; Mandahl et al., 1990).

As lesões ósseas benignas mais comuns são os osteocondromas, também denominados exostoses osteocartilaginosas solitárias ou múltiplas. Em geral, esses tumores são assintomáticos, mas podem produzir deformidades ósseas externas ou, mais raramente, comprimir vasos sanguíneos ou nervos (Murray et al., 1982; Cotran et al., 1991). Esses tumores só acometem ossos que se originam a partir de cartilagem, mais frequentemente os ossos longos tubulares (Junqueira & Carneiro, 1985) e raramente ocorrem nos ossos pélvicos, escapulares e nas costelas. Por razões ainda não determinadas, afetam três

vezes mais os homens do que as mulheres (Cotran et al., 1991).

Alguns osteocondromas permanecem benignos apesar de poderem ser destrutivos no local em que se alojam. Contudo, resultados histopatológicos duvidosos em relação ao caráter benigno ou maligno do tumor também são frequentes (Mandahl et al., 1990), e muitos casos progridem à malignidade. Na maioria das vezes, originam os condrossarcomas (Garrison et al., 1982; Matsuno et al., 1988), e mais raramente podem dar origem a outros tipos histológicos de

Tabela 1. Classificação dos tumores ósseos, segundo origem e características benigna ou maligna (modificada de Cotran et al., 1991).

Os osteocondromas podem ser solitários ou múltiplos, com padrão de herança autossômico dominante. As formas múltiplas são geralmente condrossarcomas, embora possam ser osteossarcomas.		
Tipo histológico	Benigno	Maligno
Condromatoso	Osteocondroma	Condrossarcoma
	Encondroma	
	Condroblastoma	
	Fibroma condromixóide	
Osteoblástico	Osteoma	Osteossarcoma
	Osteoma osteóide	
	Osteoblastoma	
Desconhecido	De células gigantes	Sarcoma de células gigantes
		Sarcoma de Ewing

A evolução de encondromas esporádicos para tumores malignos, geralmente condrossarcomas, é rara (Unni & Dahlin, 1979; Bridge et al., 1992b), enquanto que nas formas hereditárias a incidência de transformação maligna é de aproximadamente 30% a 50%. A maioria das lesões esporádicas surge nos pequenos ossos das mãos e, com menor frequência nos ossos dos pés. Muitas dessas lesões são assintomáticas, entretanto algumas podem causar dor, comumente atribuída a uma fratura óssea (Cotran et al., 1991).

Outro tipo de tumor benigno condromatoso é o condroblastoma que surge numa faixa etária entre dez e vinte anos, com incidência duas vezes maior nas mulheres do que nos homens. Na grande maioria dos casos, as lesões aparecem dentro da região epifisária dos ossos longos tubulares próximos ao joelho, porém podem localizar-se ainda nos ossos da pelve, do crânio, das costelas, das

vezes mais os homens do que as mulheres (Cotran *et al.*, 1991).

Alguns osteocondromas permanecem benignos apesar de poderem ser destrutivos no local em que se alojam. Contudo, resultados histopatológicos duvidosos em relação ao caráter benigno ou maligno do tumor também são frequentes (Mandahl *et al.*, 1990), e muitos casos progridem à malignidade. Na maioria das vezes, originam os condrossarcomas (Garrison *et al.*, 1982; Matsuno *et al.*, 1988), e mais raramente podem dar origem a outros tipos histológicos de tumores, como o osteossarcoma (Malawer *et al.*, 1985; Matsuno *et al.*, 1988) ou o fibrossarcoma (Anderson *et al.*, 1969).

Os osteocondromas podem ser solitários ou múltiplos, esses últimos com padrão de herança autossômico dominante. As formas múltiplas hereditárias de osteocondromas, conforme referido por Tieppo *et al.* (1992), apresentam maior risco de malignização (de 20% a 50%) do que as formas solitárias esporádicas (de 1% a 4%).

Um outro tipo de tumor condromatoso benigno é o encondroma, constituído por cartilagem hialina madura, que se desenvolve na cavidade medular do osso. Ele representa 10% de todos os tumores ósseos benignos e ocorre em qualquer idade e em ambos os sexos (Bridge *et al.*, 1992b). Em geral, o encondroma surge na segunda infância, como um distúrbio não hereditário conhecido por encondromatose ou doença de Ollier, ou como parte de um conjunto de lesões hereditárias que fazem parte do quadro da síndrome de Maffucci (Cotran *et al.*, 1991).

A evolução de encondromas esporádicos para tumores malignos, geralmente condrossarcomas, é rara (Unni & Dahlin, 1979; Bridge *et al.*, 1992b), enquanto que nas formas hereditárias a frequência de transformação maligna é de aproximadamente 30% a 50%. A maioria das lesões esporádicas surge nos pequenos ossos das mãos e, com menor frequência nos ossos dos pés. Muitas dessas lesões são assintomáticas, entretanto algumas podem causar dor, comumente atribuída a uma fratura óssea (Cotran *et al.*, 1991).

Outro tipo de tumor benigno condromatoso é o condroblastoma que surge numa faixa etária entre dez e vinte anos, com incidência duas vezes maior nas mulheres do que nos homens. Na grande maioria dos casos, as lesões aparecem dentro da região epifisária dos ossos longos tubulares próximas ao joelho, porém podem localizar-se ainda nos ossos da pelve, do crânio, das costelas, das



vértebras e nos ossos pequenos dos pés. Algumas vezes, essas lesões produzem uma massa óssea extra assintomática e altamente destrutiva, que pode ser interpretada erroneamente como uma neoplasia maligna (Cotran et al., 1991). Os condroblastomas podem malignizar para condrossarcoma altamente maligno (Sirsat & Doctor, 1970). Metástases derivadas de condroblastomas foram documentadas no fígado, diafragma e tecidos subcutâneos por Kahn et al. (1969) assim como nos pulmões, por Kahn et al. (1969) e Cotran et al. (1991).

Os fibromas condromixóides também são tumores benignos do tipo condromatoso. São raros e apresentam em sua constituição tecido condróide, fibroso e mixóide, em proporções variáveis, podendo até ser confundidos com sarcomas. Em geral, ocorrem na metáfise inferior do fêmur e na metáfise superior da tíbia e, menos comumente, na metáfise superior do fêmur. Surgem por volta da segunda e terceira décadas de vida, podendo contudo aparecer mais tarde. A incidência dos fibromas é predominante nos homens. As lesões menores são quase sempre assintomáticas, porém as grandes são sintomáticas, apresentando dor. Tais tumores raramente sofrem transformação maligna, sendo facilmente tratados por remoção cirúrgica (Cotran et al., 1991).

Os condrossarcomas são os tumores malignos condromatosos mais comuns, que em frequência apenas perdem para os osteossarcomas, que são duas vezes mais comuns. Apresentam evolução lenta e metastizam tardiamente, o que lhes confere um bom prognóstico (Cotran et al., 1991; Hirabayashi et al., 1992).

De acordo com Malawer et al. (1985), há inúmeras variantes de condrossarcomas, tais como o condrossarcoma de célula clara, o condrossarcoma mesenquimal e o condrossarcoma desdiferenciado, todos raros e altamente malignos. Cerca de 75% dos condrossarcomas são primários e o restante é constituído por tumores secundários que evoluíram de tumores cartilaginosos benignos pré-existentes, como da encondromatose múltipla, das exostoses solitárias ou múltiplas e, mais raramente, dos condroblastomas. Os condrossarcomas primários surgem principalmente a partir da meia idade, com incidência pouco maior nos homens. Geralmente manifestam-se nos ossos das costelas, cinturas escapular e pélvica e próximos ao joelho, sendo a grande maioria das lesões assintomática, mas altamente maligna (Cotran et al., 1991).

b. Tumores Osteoblásticos

Os tumores ósseos osteoblásticos agrupam lesões caracterizadas pela síntese de matriz óssea. Entre os benignos, destacam-se os osteomas, que são tumores sésseis constituídos por ossos densamente escleróticos. Surgem em todas as idades e são pouco mais frequentes nos homens do que nas mulheres. A grande maioria localiza-se nos ossos do crânio e da face e, por não terem significado clínico, não necessitam de remoção cirúrgica, a não ser quando comprimem o cérebro ou provocam problemas estéticos. Segundo Cotran et al. (1991), essas lesões não sofrem transformação maligna.

Outro tipo de tumor osteoblástico sem qualquer potencial maligno é o osteoma osteóide, constituído por tecidos ósseos do tipo imaturo e osteóide altamente vascularizados. Esses tumores são histologicamente indistinguíveis dos osteoblastomas, representantes de outro tipo de tumor osteoblástico benigno, que contudo são menos vascularizados e se caracterizam pela formação de tecido ósseo e osteóide e por seu potencial maligno. Por isso, Schajowicz & McGuire (1989) consideraram as origens dos osteomas osteóides e dos osteoblastomas como processos intimamente relacionados. Os osteoblastomas são assintomáticos e localizam-se frequentemente nas vértebras e nos ossos longos. Apesar de serem benignos, cerca de 10% apresentam recidivas após remoção e alguns transformam-se em osteossarcoma. Em 90% dos casos, os osteomas osteóides surgem entre cinco e vinte e cinco anos e são duas vezes mais frequentes nos homens do que nas mulheres (Murray et al., 1982; Cotran et al., 1991).

Com relação aos tumores osteoblásticos malignos, o representante mais significativo é o osteossarcoma, um tumor de células mesenquimais caracterizado pela formação direta de tecido osteóide ou ósseo pelas células tumorais, que constituem 40% dos casos de neoplasmas ósseos malignos. Esses tumores podem ser primários ou secundários. Os primários surgem repentinamente, geralmente em jovens com menos de vinte anos, afetando mais frequentemente os ossos longos das pernas e menos comumente os ossos longos dos braços, antes do fechamento das epífises, tendo frequência maior nos homens do que nas mulheres (1,5:1,0). Raramente alcançam o esqueleto axial, podendo ainda metastizar para os pulmões e outros ossos (Rosen et

al., 1990; Cotran et al., 1991; Parkin et al., 1993). Por outro lado, os tumores secundários surgem a partir de uma patologia óssea pré-existente ou uma exposição prévia a alguma substância potencialmente carcinogênica. São mais frequentes em indivíduos com idade avançada, sendo responsáveis por cerca de 6% a 10% de todos os casos (Cotran et al., 1991).

A incidência populacional mais elevada de osteossarcoma na faixa etária abaixo de vinte anos, segundo Parkin et al. (1993), é encontrada no Brasil, em São Paulo, com 3,9 afetados por milhão. Segue-se a região de Turin na Itália com 3,8, os negros americanos com 3,7 e a Finlândia com 3,2 afetados por milhão de habitantes. As menores taxas são observadas no Japão, com 1,8 indivíduos afetados por milhão de habitantes, em Bombay na Índia com 1,6, e na Hungria e em Cuba com 1,5 habitantes, respectivamente (Parkin et al., 1993).

De acordo com Schajowicz & McGuire (1989), existem variantes histológicas de osteossarcomas, tais como os osteossarcomas medulares e os periféricos. Dentro da categoria medular há os osteossarcomas convencionais, telangiectásicos, os bem diferenciados e os mesenquimais, enquanto que os periféricos consistem de subtipos como o parosteal, periosteal e convencional. As variantes medulares são extremamente malignas, enquanto as variantes periféricas apresentam variabilidade de prognóstico e tratamento. Os osteossarcomas medulares convencionais podem, ainda, enquadrar-se dentro das categorias osteoblástica, condromatosa e fibroblástica e apresentam maior importância quanto ao prognóstico e tratamento. As exceções referem-se aos osteossarcomas telangiectásicos, os bem diferenciados e os mesenquimais, os quais são raros e apresentam dificuldades de diagnóstico.

Além das neoplasias, existem também lesões de outras

c. Tumores de Origem Desconhecida

Esse grupo compreende os tumores de células gigantes e os sarcomas de Ewing. Os primeiros caracterizam-se por uma grande profusão de células gigantes multinucleadas espalhadas por todo o estroma de células mononucleadas. São os tumores ósseos benignos mais frequentes após os osteocondromas, em geral manifestam-se entre os vinte e quarenta anos e são mais comuns no sexo feminino. Na maioria das vezes surgem dentro das epífises, podendo penetrar nas



metáfises. Cerca de 50% dessas lesões ocorrem próximas ao joelho, mais especificamente no fêmur distal e na tibia proximal, ou na fibula proximal. Tais lesões provocam dores e hipersensibilidade, entretanto em alguns casos são assintomáticas. Cerca de 80% dos casos ocorrem em ossos longos e 75% se desenvolvem próximos à articulação do joelho. A grande maioria dos casos é benigna e pode ser ressecada cirurgicamente. Podem ocorrer recidivas benignas e ocasionalmente metástases nos pulmões (Hall et al., 1976), sendo que cerca de 10% das recidivas progridem a sarcomas de células gigantes (Cotran et al., 1991).

Os sarcomas de Ewing constituem cerca de 12% dos casos de neoplasmas ósseos malignos e suas maiores incidências são encontradas na Austrália e no Brasil (São Paulo), com 2,7 e 2,5 afetados por 1 milhão de habitantes, respectivamente (Parkin et al., 1993).

O sarcoma de Ewing é formado por pequenas células arredondadas, sem características específicas. É relativamente comum na segunda década de vida, porém raro antes e após esse período. Afeta duas vezes mais homens do que mulheres e é extremamente raro na população negra (Rosen et al., 1990; Cotran et al., 1991).

O sarcoma de Ewing localiza-se com maior frequência nos ossos tubulares longos e na pelve, mas pode ocorrer em qualquer osso do corpo. Em geral, manifesta-se por dores, tumefação, hipersensibilidade da região afetada e dilatação de veias. No início da evolução, o sarcoma de Ewing pode confundir-se com osteomielite, por apresentar os mesmos sintomas dessa condição (Rosen et al., 1990; Cotran et al., 1991). Os locais mais frequentes de ocorrência de metástases são os pulmões, seguidos por crânio, pelve e outros ossos (Rosen et al., 1990).

Além das neoplasias, existem também lesões de outras origens que podem acometer o osso, como os cistos ósseos solitários e os cistos aneurismáticos. Os cistos ósseos solitários têm natureza fibrosa e benigna e caracterizam-se pela presença somente de tecido fibroso. Ocorrem com certa frequência nos ossos longos, como fêmur e úmero, geralmente na região da epífise, em crianças em fase de crescimento. São extremamente raros após os vinte anos de idade, porém quando surgem em idades mais avançadas afetam mais comumente a região das metáfises. Cerca de 35% a 70% dos cistos, conforme Malawer et al. (1985), apresentam recidiva após ressecção cirúrgica.



Não há confirmação de transformação maligna, porém há referências de casos de osteossarcomas que parecem ter tido origem a partir de um cisto ósseo (Murray et al., 1982). Grabias & Mankin (1974) também descreveram um caso de cisto ósseo que após várias recidivas e fraturas evoluiu para diagnóstico de condrossarcoma. Os cistos ósseos aneurismáticos, segundo Lichtenstein (1965) e Pfeifer et al. (1991), são mais raros, desenvolvem-se nos ossos chatos e nos ossos das vértebras, bem como nos ossos longos. Esses cistos apresentam simplicidade de tratamento, são bastante vascularizados, mas quando não tratados podem atingir grandes extensões. De acordo com Pfeifer et al. (1991), os cistos ósseos aneurismáticos microscopicamente são muito semelhantes a osteossarcomas telangiectásicos, hemangiomas e tumores ósseos de células gigantes. Sua etiologia permanece desconhecida, apesar de haver três hipóteses que explicam sua origem, conforme Pfeifer et al. (1991). Acredita-se que tais cistos podem se originar em resposta a um processo traumático ou à presença de uma lesão benigna ou maligna pré-existente, podem resultar de uma anomalia na circulação sanguínea ou ter uma origem "de novo".

I.2. Marcadores Cromossômicos em Lesões Neoplásicas e Alterações Cromossômicas em Células Aparentemente Normais

As alterações citogenéticas encontradas consistentemente em um certo tipo de um tumor, como resultado de uma derivação clonal, são consideradas marcadores cromossômicos primários. Essas alterações produzem uma instabilidade genética que pode favorecer a ocorrência de outras alterações adicionais, ditas secundárias. As alterações primárias podem caracterizar determinados tipos de tumores e, provavelmente, relacionam-se ao início do processo tumoral. As anomalias secundárias estão associadas com o crescimento do tumor, a sua heterogeneidade e o desenvolvimento de metástases (Pathak, 1992). Segundo Mitelman (1990), os tumores podem apresentar ainda inúmeras alterações não-clonais e casualmente distribuídas no genoma, que evidenciam instabilidade cromossômica. Tais anomalias podem dificultar a detecção das alterações verdadeiramente relacionadas com a patogênese do tumor. A identificação das aberrações cromossômicas primárias, que são características de muitos tipos de tumores, tem contribuído para o diagnóstico, o prognóstico e a

escolha da terapia mais adequada nessas doenças.

Nas leucemias e linfomas, são numerosas as situações em que foram encontradas alterações cromossômicas específicas associadas à transformação maligna, como é o caso da translocação $t(9;22)$ na leucemia mielóide crônica e das translocações $t(8;14)$, $t(2;8)$ e $t(8;22)$ e no linfoma de Burkitt (Sandberg, 1985).

Nos tumores sólidos, no entanto, as informações citogenéticas têm tido um papel consideravelmente menor, pelo fato de que os estudos ainda não alcançaram a abrangência necessária. Nesses tumores é também difícil a identificação da alteração primária, porque a maioria das investigações tem sido realizada em estágios avançados da doença, ou seja, em lesões primárias que já apresentavam alterações secundárias responsáveis pela progressão maligna, ou em lesões metastáticas. Entretanto, em alguns tipos de cânceres que afetam tecidos sólidos, já foi possível correlacionar alterações cromossômicas específicas e secundárias com o prognóstico.

Sandberg et al. (1988) exemplificaram situações nas quais a citogenética têm fornecido informações valiosas. Uma delas é na definição de subtipos de tumores dentro de um tipo histologicamente homogêneo, como o carcinoma transicional de bexiga, onde as lesões podem apresentar $i(5p)$, ou $del(5q)$, $+7,-9$ ou ainda $del(9p)$. Outras aplicações são o esclarecimento do órgão primário, em situações nas quais a anomalia específica é observada em uma metástase ou na medula óssea, e a identificação de mesma origem para tumores histologicamente diferentes que apresentam uma mesma alteração cromossômica consistente, caso dos tumores de células germinativas de testículo, como os teratomas e os seminomas.

Um dos tumores sólidos melhor estudado do ponto de vista citogenético é o neuroblastoma. Conforme Bown (1992), as alterações mais frequentes nesse tipo de tumor são deficiências ou rearranjos em $1p$ distal. As hiperdiploidias e a presença de cromossomos 1 normais representam um bom prognóstico da doença. Entretanto, células hipo ou pseudodiplóides com rearranjos envolvendo $1p$ definem um prognóstico ruim nessas neoplasias. Outro dado significativo no prognóstico de neuroblastoma é a análise da amplificação do oncogene MYCN (nomenclatura cf. Human Gene Mapping 11, 1991), localizado em $2p23-24$. Quanto maior o número de cópias amplificadas do gene, pior

instável

o prognóstico e, conseqüentemente, menor a sobrevida. Contudo, a ocorrência de rearranjos em 1p oferece ainda um prognóstico mais grave do que a amplificação gênica.

Outro tipo de tumor sólido que tem um ^{marcador} cromossomo ^{comum} marcador relacionado com seu prognóstico é o histiocitoma fibroso maligno. Buys (1991) referiu que a presença de rearranjos em 19p13 ou de cromossomos em anel está relacionada com o mau prognóstico da doença, enquanto que sua ausência oferece melhor prognóstico. Similarmente em câncer de bexiga, a poliploidia ou a presença de cromossomos marcadores não identificados, segundo Teyssier (1989) está associada com um risco maior de recorrência e um mau prognóstico.

Em tumores ósseos, o único marcador cromossômico conhecido refere-se à translocação $t(11;22)(q24;q12)$ em sarcoma de Ewing (Aurias et al., 1984). Contudo, este marcador citogenético não foi relacionado com o prognóstico.

Até há algum tempo atrás acreditava-se que os tumores benignos eram isentos de anomalias cromossômicas, ou seja, eram cariotipicamente normais, o que hoje já se sabe não ser verdadeiro. Os achados de alterações cariotípicas em várias condições, consideradas benignas com base em seu comportamento e dados histológicos, sugerem que as aberrações cromossômicas nem sempre estão ligadas ao estado maligno, mas também têm servido de suporte para a suposição de que esses tumores possam ser pré-malignos ou, em certos casos, até mesmo malignos (Sandberg, 1988).

Exemplos de tumores benignos com marcadores cromossômicos são os meningiomas, que se caracterizam por monossomia do cromossomo 22, ou ocasionalmente por deficiência parcial do 22q (Rogatto & Casartelli, 1988; Mitelman, 1990). Contudo, também são referidos cariótipos complexos em meningiomas invasivos, que estão relacionados com um mau prognóstico (Casartelli et al., 1989).

Um outro exemplo de neoplasma benigno bem estudado é o adenoma pleomórfico de glândula salivar, no qual as alterações citogenéticas caracterizam três subtipos, que envolvem rearranjos em 3p21, 8q12 e 12q13-15. Os dois primeiros pontos de quebras estão frequentemente envolvidos na $t(3;8)(p21;q12)$, levando a um prognóstico ruim (Teyssier, 1989; Teyssier & Ferre, 1989; Mitelman, 1990). Outro caso interessante, conforme Bown (1992), é a progressão dos pólipos colônicos a carcinoma de cólon, que é marcada por quatro



tumores benignos - prognóstico (22q - o prognóstico de outros anomalias) - anomalias estágio inicial da malignidade

lesões genéticas sucessivas, que são uma mutação no oncogene **RAS**, a deficiência parcial de 5q, a monossomia do cromossomo 17 e a perda do cromossomo 18. Portanto, tais alterações indicam uma evolução maligna desses pólipos.

Como referido, as alterações cromossômicas em células de tumores benignos podem representar um estágio inicial da transformação maligna, manifestando, por exemplo, um potencial mais agressivo. Entretanto, a presença de uma anormalidade cromossômica em tumores benignos não é necessariamente indicativa de transformação celular. Segundo Teyssier & Ferre (1989), as alterações cromossômicas nesses tumores podem representar um passo à malignidade se produzirem instabilidade cromossômica e, frequentemente, em tumores benignos têm sido encontradas translocações recíprocas, que não alteram a estabilidade cromossômica. Os tumores malignos, por outro lado, usualmente apresentam translocações não-balanceadas ou outras alterações, como deficiências e isocromossomos, que levam a instabilidade cromossômica (Sandberg, 1990).

Portanto, os marcadores cromossômicos e a instabilidade cromossômica podem servir como parâmetros de distinção entre tumores benignos e malignos e contribuir para o esclarecimento do significado desses eventos cromossômicos em nível celular, assim como para a identificação do papel que desempenham em relação à natureza benigna ou maligna na origem das neoplasias. (proliferação) e transformação

Um achado interessante é que as anomalias cromossômicas não estão restritas às células de tumores benignos ou malignos. De acordo com revisões recentemente realizadas por Buys (1991) e Bown (1992), tecidos aparentemente normais também podem apresentar alterações cromossômicas, como é o caso de tecidos normais de cérebro de pacientes que apresentavam tumores cerebrais malignos que exibiram clones com trissomia do cromossomo 7 (Heim et al., 1989) ou alterações cromossômicas clonais como monossomia do cromossomo X e perda do cromossomo Y. Resultados similares foram encontrados em tecido renal normal de pacientes com carcinoma renal, que apresentavam perda do cromossomo Y e trissomia dos cromossomos X, 7 e 10 (Kovacs & Brusa, 1989). A trissomia do cromossomo 7 também foi encontrada em epitélio bronquial normal de pacientes com câncer de pulmão (Lee et al., 1987), o que sugere que tal alteração cromossômica pode estar

relacionada com o início da transformação celular nesses tecidos e constituir, portanto, uma das alterações primárias responsáveis pela patogênese da doença.

Alterações cromossômicas numéricas e estruturais não-clonais em lesões não-tumorais também foram relatadas por Fett-Conte (1992) em um caso de cicatriz hipertrófica e em um caso de cisto primordial.

Uma possível explicação para esses achados, de acordo com Buys (1991), é que alguns indivíduos sejam geneticamente mais susceptíveis ao câncer do que outros, e que essa susceptibilidade se expresse através da instabilidade cromossômica. Nesse caso, poder-se-ia esperar que os indivíduos mais susceptíveis, que se tornam portadores da condição, expressem um número maior de alterações cromossômicas em seu tecido normal do que os indivíduos menos susceptíveis. Os proto-oncogenes são altamente conservados ao longo da evolução. A trissomia do cromossomo 7 foi igualmente referida por Bardi et al. (1992) em lesão não-tumoral hepática. Com base nesses resultados, e nos publicados por Lee et al. (1987), Heim et al. (1989) e Kovacs & Brusa (1989), os autores sugeriram que a trissomia do cromossomo 7 possa ocorrer em células dispersas no organismo ou representar células do sistema imune, pois havia sido observada uma infiltração acentuada de células inflamatórias na lesão. Essa última hipótese tem também como suporte resultados de outros estudos realizados por esses autores, nos quais a trissomia do cromossomo 7 foi mais comum em carcinomas de cólon que tinham infiltração linfocítica acentuada (Bardi et al., 1993). Outra possibilidade aventada por Bardi et al. (1992) é que as células com trissomia do cromossomo 7 representem parte do tecido intersticial, ou seja, sejam células endoteliais ou fibroblastos, que foram observados com tal anomalia em placas ateroscleróticas por Vanni et al. (1990).

I.3. Aspectos Moleculares do Câncer

Simultaneamente com as informações citogenéticas, os avanços nas técnicas de análise de DNA têm propiciado a identificação e o mapeamento de genes frequentemente envolvidos com os mecanismos de iniciação, progressão e transformação celular.

Bishop (1983), Knudson (1985, 1991), Sobel (1990) e

Pathak (1992) apresentaram interessantes revisões sobre os dois grupos de genes envolvidos no desenvolvimento do câncer. O primeiro é constituído pelos oncogenes, que mesmo estando em dose simples induzem a transformação neoplásica em condições naturais ou experimentais e são resultantes de alterações de genes normais denominados proto-oncogenes. O segundo é constituído pelos genes supressores de tumor ou anti-oncogenes, que são recessivos e inibem a proliferação celular.

A descoberta dos oncogenes derivou de extensos trabalhos realizados com retrovirus causadores de câncer em galinhas. O vírus do Sarcoma de Rous de galinhas foi o primeiro no qual foi identificada a presença de um oncogene, o SRC1 (Bishop, 1983). Há cerca de 60 oncogenes identificados no genoma humano (Human Gene Mapping 11, 1991), muitos dos quais já foram mapeados.

Os proto-oncogenes são altamente conservados ao longo da evolução, o que demonstra seu importante papel na função celular. Os produtos codificados pelos proto-oncogenes atuam no controle do crescimento e na diferenciação celular e, entre eles, estão os fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, proteínas que se ligam ao GTP e quinases, fatores transcricionais e moduladores de transmissão de sinais através da membrana plasmática (cf. Hunter, 1991).

De acordo com Mitelman & Heim (1988), cerca de 38% das bandas cromossômicas envolvidas em aberrações primárias de diferentes tipos de tumores coincidem com a localização de oncogenes, o que sugere que tal associação não é casual. Fenômenos que ativam os proto-oncogenes, tais como mutações gênicas e os rearranjos cromossômicos estruturais, principalmente as duplicações e translocações, são responsáveis por alterações moleculares que dão início à transformação celular.

O gene humano HRAS1, isolado de linhagem celular de carcinoma de bexiga, foi o primeiro cuja ativação ficou demonstrada como resultado de uma substituição de um aminoácido glicina por uma valina no códon 12 da proteína p21 (cf. Bishop, 1991). Mutações nos genes da família RAS têm sido identificadas em vários outros tumores, como dos genes HRAS e KRAS1 em neoplasias de pâncreas (Höfler et al., 1988), do HRAS em tumores de pele (Ogiso et al., 1988; Corominas et al., 1989), do gene NRAS e KRAS em carcinoma de



estômago e dos três genes em tumores de cólon (Nagata *et al.*, 1990). Esses achados têm permitido a utilização desses e de outros oncogenes como indicadores de grande significado no prognóstico das neoplasias (Spandidos, 1992).

A amplificação gênica é um outro mecanismo que ativa proto-oncogenes. A amplificação pode resultar de duplicações sucessivas, que originam várias cópias ativas de um mesmo gene em uma célula, e podem ser visualizadas em nível citogenético como regiões homogeneamente coradas (HSR) ou como material extra-cromossômico denominado "double minutes" (DM) (Bown, 1992). Os DM são fragmentos cromossômicos acêntricos de 0,3-0,5 μ m de tamanho e as HSRs são integradas aos cromossomos como blocos de genes amplificados.

O processo de amplificação gênica é raro em células normais, mas parece ser comum em células que progridem à malignidade. Além disso, células que apresentam amplificação gênica têm maior propensão a sofrer amplificações adicionais e mutações em ponto, ressaltando a instabilidade genética de células cancerosas (Bishop, 1991). A amplificação do oncogene **MYCN**, por exemplo, é frequente em neuroblastomas e tumores relacionados (Bown, 1992) e em melanomas (Bauer *et al.*, 1990), bem como a do oncogene **ERBB2** é frequente em câncer de mama e ovário (Slamon *et al.*, 1989). Esses fenômenos estão associados com a progressão e a capacidade metastática (Bernards, 1992; Spandidos, 1992), e com o mau prognóstico desses tumores (Solomon *et al.*, 1991; Bown, 1992; Spandidos, 1992).

Além do **MYCN** e do **ERBB2**, vários outros proto-oncogenes devem ser ativados por amplificação em tumores. Shiloh *et al.* (1992), por exemplo, identificaram o gene **KSAM**, que foi mapeado em 10q26, dentro de domínios especificamente amplificados em câncer gástrico. O produto do gene **KSAM** é um receptor de tirosina quinase. Entretanto, muitos dos genes amplificados nas HSRs e nos DMs não foram ainda identificados e têm localização desconhecida no genoma. A identificação dos genes contidos nessas sequências amplificadas deverá ser útil no diagnóstico dos tumores e na correlação dos aspectos clínico-patológicos da condição.

As translocações cromossômicas são os mecanismos mais comuns para a ativação dos proto-oncogenes, alterando sua estrutura ou os mecanismos que controlam sua expressão (Mitelman & Heim,



1988). Por exemplo, a translocação $t(9;22)$ é característica da leucemia mieloide crônica e faz com que o proto-oncogene **ABL1**, localizado em 9q34, seja translocado para o gene **BCR** em 22q11, originando o cromossomo Philadelphia. A justaposição desses dois genes resulta em uma proteína quimérica (abl/bcr) de 210kD, que leva à malignidade (Sandberg, 1990).

Fenômeno semelhante é também conhecido nas células do linfoma de Burkitt, onde o proto-oncogene **MYC**, localizado em 8q14, é translocado próximo ao gene da cadeia pesada das imunoglobulinas, em 14q32. Os pontos de quebra envolvidos em translocações variantes desse tumor ocorrem nas bandas 2p12 e 22q11 (Heim & Mitelman, 1989), onde foram mapeados os genes **kappa** (**IGKC**) e **lambda** (**IGLC**), respectivamente, das cadeias leves das imunoglobulinas (Emanuel et al., 1986; Nowel & Croce, 1986).

Entre os tumores sólidos, podem ser encontrados outros exemplos de alterações cromossômicas que envolvem oncogenes, como é o caso dos carcinomas papilares de tiróide, cujos pontos de quebras na inversão $inv(10)(q11.2-q21)$ coincidem com as regiões onde o proto-oncogene **RET** e a sequência **H4** estão localizados, fornecendo a base estrutural para a fusão **RET-H4**, responsável pela proteína quimérica **ptc** que leva ao processo de malignização (Pierotti et al., 1992; Roque et al., 1992; Soares et al., 1992).

Em relação à outra classe de genes relacionados com o processo de transformação maligna, os genes supressores de tumor, seus representantes têm sido isolados somente de tumores sólidos (Solomon et al., 1991). Sua função é contribuir com os proto-oncogenes no controle da proliferação celular (Knudson, 1985, 1991; Pathak, 1992). Os genes supressores parecem suprimir a atividade de oncogenes e mutações que os inativam, com perda do seu papel regulador, levam ao processo de transformação maligna (Bishop, 1983; Knudson, 1985; Weinberg, 1989, 1991).

As primeiras evidências da existência de genes supressores de tumor resultaram de estudos de tumores pediátricos familiares com deficiências cromossômicas, como o retinoblastoma (cf. Paul, 1989; Marshall, 1991; Weinberg, 1991), de tumores de *Drosophila melanogaster* causados por mutações recessivas (Paul, 1989), de experimentos de hibridização de células tumorais com células normais que resultaram em híbridos normais (Paul, 1989; Marshall, 1991;

em 17q, associado com neurofibromatose tipo 1 (cf. Seizinger et al., Weinberg, 1991), da reversão do potencial oncogênico em células transfectadas com um oncogene após sua inativação (Paul, 1989) e da perda de heterozigosidade em tumores (cf. Marshall, 1991).

O retinoblastoma é um tumor maligno de retina que ocorre quase exclusivamente em crianças e tem sido usado como modelo para o estudo dos genes supressores. As alterações cromossômicas mais frequentemente encontradas no gene **RB1** foram pequenas deficiências da banda 13q14, observadas citogeneticamente, ou deficiências submicroscópicas que levaram a um produto proteico alterado. Foram ainda observadas aberrações cromossômicas do tipo inserção e translocação (cf. Horsthemke, 1992).

O gene **RB1** tem sido também implicado na tumorigênese de outros tumores. Frequentemente tem sido detectada deficiência desse gene em cânceres de mama e de bexiga (cf. Marshall, 1991; cf. Cowell & Hogg, 1992), de pulmão (cf. Marshall, 1991; Weinberg, 1991), de esôfago, hepatocarcinoma, pineoblastoma (cf. Cowell & Hogg, 1992), de próstata (Bookstein et al., 1990), de cólon (Lothe et al., 1992) e em determinadas leucemias (cf. Cowell & Hogg, 1992). Isto sugere que anormalidades no gene **RB1** contribuem para a transformação maligna nesses tumores e, ainda, segundo Scheffer et al. (1991) e Wunder et al. (1991), que ele apresenta efeitos pleiotrópicos nos diferentes tecidos.

Um outro gene supressor bastante estudado é o designado **TP53**, que está envolvido na origem de vários tumores diferentes e se localiza em 17p13. Cerca de 70% dos cânceres de cólon contém mutações que inativam o gene **TP53** e essas mutações também estão frequentemente presentes em câncer de mama e de pulmão (Levine, 1992). Alterações no gene **TP53** também foram descritas em câncer de bexiga, sistema nervoso, fígado e de órgãos hematopoiéticos (Weinberg, 1991), em adenocarcinoma de ovário (Stevenson et al., 1992), em tumores de tireóide (Herrmann et al., 1992), em carcinomas gástricos (Seruca et al., 1992) e em tumores mais raros, como rabdomyossarcoma (Weinberg, 1991; Kovar & Pillwien, 1992) e carcinomas cervicais primários (Helland et al., 1992).

Outros genes supressores de tumor já identificados são o **WT1** localizado em 11p, relacionado com tumor de Wilms, o **APC** mapeado em 5q, alterado em polipose adenomatosa familiar, e o **NF1** localizado

em 17q, associado com neurofibromatose tipo 1 (cf. Seizinger et al., 1991).

Além disso, outros prováveis genes supressores de tumor tem sido detectados através da análise de perda de heterozigosidade. Por exemplo, Sato et al. (1991) observaram perda alélica nas regiões cromossômicas 3p13-14.3, 16q22-23, 17p13 (em loco diferente do TP53) e 17q21, que são candidatas a conterem genes supressores de tumor, nas formas esporádicas e familiar do câncer de mama. Nesses tumores, a perda alélica no cromossomo 17 está associada com a amplificação do oncogene ERBB2, também responsável pelo desenvolvimento dos tumores de mama.

Similarmente, pela análise de perda de heterozigosidade, em tumores do sistema nervoso central, James & Collins (1992) sugeriram que haja pelo menos seis genes supressores de tumor, cujas perdas estariam associadas com o desenvolvimento desses tumores.

O esclarecimento dos eventos moleculares associados com as alterações cromossômicas em células neoplásicas, tanto as específicas ou primárias como as adicionais ou secundárias, consiste em um excitante desafio, pois tais eventos já têm um grande valor no diagnóstico, na classificação e no prognóstico de condições leucêmicas e, mais recentemente, dos tumores sólidos (Sandberg, 1991).

I.4. Objetivos

Com o objetivo de contribuir para o esclarecimento das relações entre as alterações cromossômicas e o processo de transformação celular, o presente trabalho visou investigar a ocorrência de anomalias cromossômicas presentes em células cultivadas de tumores e outras lesões de tecido ósseo de natureza benigna.

Os casos 840, 929, 1068, 1071 e 1103 apresentaram um grande número de metáfases em condições de análise, nos demais foi encontrado um pequeno número de células em metáfase e, na maioria delas, os cromossomos não tinham boa morfologia, dificultando a análise completa das células após a utilização de bandamento G.

II. MATERIAL E METODOS

II.1. Amostras

Formulada a hipótese diagnóstica de tumor ósseo, as amostras foram colhidas, por biopsia após remoção cirúrgica da lesão, por médicos vinculados ao Departamento de Cirurgia da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME), sob supervisão do médico ortopedista Oswaldo José De Conti.

O estudo foi iniciado com amostras de 14 pacientes. Contudo, não se conseguiu resultados de 5 pacientes, quatro devido ao não crescimento das culturas e um devido a ausência de metáfases nas preparações. Dos 9 pacientes submetidos à análise citogenética, quatro eram do sexo masculino e cinco do sexo feminino, todos eram caucasóides e com idades variando de 10 a 63 anos. De cada paciente foi preenchida uma ficha de registro, contendo informações sobre sexo, idade, cor da pele e histórico de neoplasia familiar. Nessa ficha também foram colhidos dados sobre o material, como o osso biopsiado e o tipo de lesão. Esses dados dos pacientes são resumidos na Tabela 2.

Todas as amostras foram colhidas de tumores primários ou lesão diagnosticada histopatologicamente como de natureza benigna. As amostras provieram de um tumor ósseo de células gigantes, um cisto ósseo, e sete osteocondromas, conforme também mostrado na Tabela 2.

A Tabela 3 resume as informações sobre o número de amostras e réplicas semeadas de cada caso e sobre a evolução das culturas. Das 18 amostras semeadas, duas apresentaram contaminação logo após a semeadura, uma por fungo e outra por bactéria, quatro também não apresentaram crescimento celular mesmo após 30 dias de incubação e em uma houve ausência de cromossomos metafásicos. Onze amostras restantes, pertencente a 9 pacientes, apresentaram metáfases em condição de análise.

Os casos 840, 929, 1068, 1071 e 1103 apresentaram um grande número de metáfases em condições de análise, nos demais foi encontrado um pequeno número de células em metáfase e, na maioria delas, os cromossomos não tinham boa morfologia, dificultando a análise completa das células após a utilização de bandamento G.



Tabela 3. Informações sobre o número de amostras e células analisadas de cada caso e sobre a evolução das culturas.

Tipos de lesão	Amostras de células	Tipos de lesão	Tipos de lesão	Tipos de lesão	Tipos de lesão	Tipos de lesão	Tipos de lesão	Tipos de lesão	Tipos de lesão
	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais
	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais	iniciais

Tabela 2. Informações sobre os pacientes cujas amostras foram estudadas citogeneticamente.

Caso	Tipo de lesão	Local biopsia	Histórico de neoplasia familiar	Idade (a)	Sexo
828	tumor de células gigantes	fêmur	não	35	F
840	osteochondroma	tíbia	não	27	M
929	osteochondroma	fêmur	não	10	F
932	osteochondroma	tíbia	sim	21	F
974	osteochondroma	tíbia	sim	12	F
1068	osteochondroma	úmero	não	59	M
1069	osteochondroma	fíbula	não	63	M
1071	osteochondroma	tíbia	não	10	F
1103	cisto ósseo solitário	fêmur	não	11	M

Todos os pacientes foram submetidos a exposição prévia a

Tabela 3. Informações sobre o número de amostras e réplicas semeadas de cada caso e sobre a evolução das culturas.

Caso	Tipo de tumor ou lesão	Amostras	No. de réplicas iniciadas	Tempo de incubação (dias)	Tempo de colcemide (horas)	Número de frascos sem crescimento		Número de frascos com crescimento	
						c/ contaminação	s/ contaminação	s/ metáfases	c/ metáfases
828	ósseo de céls. gigantes	A	1	60	1:30		1		
		B	1						1
		C	1				1		
840	ostecondroma	A	3	30	1:30		1		2
		B	3				1		2
		C	2						2
929	ostecondroma		4	30	16		1		3
932	ostecondroma		6	60	16	4			2
935	ostecondroma		6	30	2			6	
974	ostecondroma		6	30	16		2		4
980	ostecondroma		6	3		6			
984	ostecondroma		6	30			6		
1051	ostecondroma		6	3		6			
1055	ostecondroma		6	30			6		
1068	ostecondroma		6	30	2	2		1	3
1069	ostecondroma		6	30	2			4	2
1071	ostecondroma		6	30	2	3			3
1103	cisto ósseo solitário		4	14	1:40				4

Todos os pacientes foram submetidos a exposição prévia a raios X para diagnóstico da lesão.

II.2. Métodos

As culturas de células foram desenvolvidas segundo técnica de explante primário proposta por Freshney (1987), com modificações detalhadas a seguir. Os reagentes e soluções são apresentados no apêndice.

A. Colheita e Assepsia das Amostras

As amostras foram colhidas no Centro Cirúrgico e transferidas para um tubo de centrifuga estéril devidamente etiquetado, contendo solução salina balanceada de Hanks para lavagem. Cada amostra consistia em fragmento de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm³, transportado em tubo estéril contendo solução de Hanks para o transporte e encaminhado ao Laboratório de Citogenética. Até o processamento, a amostra foi mantida a 5 °C, mas o período entre a colheita e o processamento do tecido não ultrapassou 24 horas.

B. Processamento Inicial do Material

No laboratório, as amostras foram manuseadas em câmara de fluxo laminar horizontal, previamente esterilizada com o uso de solução germicida. Inicialmente, os tecidos foram lavados quatro vezes em solução salina de Hanks suplementada com solução de penicilina:estreptomicina ou penicilina:quemisetina, sulfato de gentamicina e anfotericina B.

Em todos os casos, as amostras foram submetidas ao método de explante primário, com desagregação exclusivamente mecânica. Em seguida, foram dissociadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 a 2 mm³, com auxílio de uma tesoura de ponta fina e uma pinça. O material foi processado em placas de Petri de vidro contendo cerca de 4 ml de meio de cultura Ham F-10 completo, suplementado com soro fetal bovino a 20%, L-glutamina a 20mM, insulina, solução de penicilina:estreptomicina ou penicilina:quemisetina. No final deste período o meio de cultura contendo a amostra desagregada foi introduzido em frascos plásticos descartáveis, aos quais foi acrescentado



aproximadamente 2 ml de meio de cultura completo, para posterior fixação.

C. Lançamento das culturas

Os explantes foram então lançados em frascos plásticos descartáveis de 25 ml, marca Descarplast, contendo aproximadamente 2 ml de meio de cultura Ham-F10 suplementado, e incubados a 37°C. Decorridas 48 horas, após boa fixação dos explantes, o meio de cultura dos frascos que poderia conter material necrótico foi removido e substituído por meio de cultura novo. Os frascos foram examinados diariamente para avaliação do crescimento celular, em microscópio invertido e o meio de cultura trocado a cada 4 ou 5 dias, em câmara de fluxo laminar vertical, dependendo do crescimento celular observado.

O bloqueio da divisão celular foi realizado após 14 a 60 x dias de incubação, com adição de 50 ul de colcemide com concentração final de 0,02 ug/ml por 1:30h a 2:00h, quando as culturas apresentaram um bom número de metáfases, ou de 15 ul de colcemide em concentração de 0,01 ug/ml por 16 horas, quando não era visualizado um bom número de células em metáfase. 25

D. Hipotonização, Fixação e Coloração do Material

Completado o tempo de ação do inibidor mitótico, o meio de cultura do frasco foi substituído por 8 ml de solução hipotônica de citrato de sódio a 1% pré-aquecida a 37°C e o frasco reincubado por 30 a 40 minutos. As células foram destacadas delicadamente do fundo do recipiente com adição de mais 2 ml de solução hipotônica totalizando assim, 10 ml e com auxílio de um raspador sendo a suspensão celular posteriormente centrifugada por 8 minutos a 800 rpm. O material foi fixado em solução de metanol-ácido acético na proporção de 3:1 em duas etapas de 20 e 10 minutos, alternadas por trocas de fixador e centrifugações a 800 rpm, gotejado em lâminas geladas e úmidas e em seguida flambado para uma secagem mais rápida. Em seguida, o material foi aquecido em estufa a 90-92°C por 20 minutos e após o período de 4 a 5 dias foi submetido à técnica de bandamento G (GTG), segundo Grouchy & Turleau (1977) com



modificações, ou segundo Selden et al. (1975). De acordo com a primeira técnica, a lâmina foi inicialmente mergulhada em álcool metílico 50% e após em tampão fosfato com pH 6,8. Em seguida, a lâmina foi submetida à tripsinização, por tempo variável de 3 a 5 segundos, dependendo do tempo decorrido desde o preparo das lâminas, lavada em tampão PBS e corada em solução de Giemsa a 2%. De acordo com a segunda técnica, as lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina/EDTA com solução salina balanceada de Hanks, por tempo variável de 20 a 90 segundos, dependendo do período decorrido pós-fixação, em seguida lavada em solução de soro fetal bovino a 20% para inativação da tripsina e corada com Giemsa a 2%.

E. Análise Cromossômica

o nº modal é óbvio - 46

Foram analisadas metáfases provenientes de ^{uma} duas ou mais réplicas e anotadas as anomalias numéricas e estruturais encontradas. De acordo com critérios propostos por Mitelman (1985), Mertens et al. (1989) e pelo International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1991 suppl), devem ser consideradas clonais as anomalias estruturais que aparecerem em pelo menos duas células de diferentes réplicas e as anomalias numéricas que aparecerem em pelo menos três células de duas réplicas diferentes. A identificação e classificação de anomalias cromossômicas foi feita conforme ISCN (1985 e 1991, suppl).

A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico Carl Zeiss Jena, modelo Jenaval ou Jenamed 2 e, para documentação ou esclarecimento de dúvidas, o material foi fotografado em microscópio modelo standard WL (Carl Zeiss Oberkochen) com filme Agfa Copex Pan A. H. U. ou Ilford PanF, 50 ASA. O negativo foi revelado com revelador Kodak D-72, em diluição de 1:1 à temperatura de 20 °C e as fotos foram feitas em papel Kodabrome Print RC F2 e F3 ou Kodabromide F3.

De cada uma das réplicas foi analisado o maior número de metáfases possível. O número de metáfases analisadas por paciente variou de 6 a 164. A análise foi considerada completa quando todos os cromossomos puderam ser identificados em bandamento G, e parcial quando pelo menos sete pares cromossômicos puderam ser identificados por bandamento G, enquanto os demais cromossomos foram classificados

nos grupos propostos pelas Conferências de Denver, realizada em 1960 e de Londres, realizada em 1963. Algumas metáfases que não apresentaram bandas cromossômicas visíveis foram analisadas em coloração clássica, sendo os cromossomos também classificados em grupos. células gigantes na Tabela 6 e os do cisto ósseo solitário nas Tabelas 7 e 8.

A. Osteocondromas

CASO 846

O nº modal cromossômico foi 46

O paciente, não tabagista, apresentou um tumor ósseo no terço proximal da tibia diagnosticado como osteocondroma, com evolução de dois anos.

Trinta e sete metáfases foram analisadas, trinta parcialmente após bandamento G e sete em coloração usual e são resumidos na Tabela 4. Vinte metáfases eram normais, três apresentaram uma translocação entre o cromossomo 2 e 4, $t(2;4)(q12;q33)$ (Figura 1). Essas três metáfases foram encontradas em células provenientes de um mesmo frasco, e não foi possível confirmar se a anomalia cromossômica era clonal devido a má qualidade das metáfases encontradas nas outras duas réplicas. Uma célula tinha perda do cromossomo Y, duas apresentaram perda de um cromossomo do grupo C e uma tinha perda do cromossomo 19. Duas células apresentaram perdas de cromossomos do grupo C e uma apresentou monossomia do cromossomo 17 e de um cromossomo do grupo G. Cinco células apresentaram números cromossômicos iguais ou inferior a 41. Duas células eram poliploides, com números cromossômicos próximos a 80.

CASO 929

A paciente, não fumante, manifestou massa anômala na região inguinal diagnosticada como um osteocondroma no fêmur direito, com evolução de dois anos.

Foram analisadas cinquenta e cinco metáfases, cinquenta e uma parcialmente após bandamento G e quatro em coloração usual. Vinte e cinco metáfases apresentaram cariótipo normal, uma apresentou monossomia do cromossomo 22, trissomia do cromossomo 15 e uma translocação $(13;22)(p11;q11)$ ou $(21;11)(p11;p11)$ (Figura 2a), e outra

III. RESULTADOS

Os achados citogenéticos dos sete casos de osteocondroma analisados estão descritos nas Tabelas 4 e 5, os do tumor de células gigantes na Tabela 6 e os do cisto ósseo solitário nas Tabelas 7 e 8.

A. Osteocondromas

CASO 840

O paciente, não tabagista, apresentou um tumor ósseo no terço proximal da tíbia diagnosticado como osteocondroma, com evolução de aproximadamente 10 anos.

Trinta e sete metáfases foram analisadas, trinta parcialmente após bandamento G e sete em coloração usual e os resultados são resumidos na Tabela 4. Vinte metáfases eram normais, três apresentaram uma translocação entre o cromossomo 2 e 4, $t(2;4)(q12;q33)$ (Figura 1). Essas três metáfases foram encontradas em células provenientes de um mesmo frasco, e não foi possível confirmar se a anomalia cromossômica era clonal devido a má qualidade das metáfases encontradas nas outras duas réplicas. Uma célula tinha perda do cromossomo Y, duas apresentaram perda de um cromossomo do grupo C e uma tinha perda do cromossomo 19. Duas células apresentaram perdas de cromossomos do grupo C e uma apresentou monossomia do cromossomo 17 e de um cromossomo do grupo G. Cinco células apresentaram números cromossômicos iguais ou inferior a 41. Duas células eram poliplóides, com números cromossômicos próximos a 80.

CASO 929

A paciente, não fumante, manifestou massa anômala na região inguinal diagnosticada como um osteocondroma no fêmur direito, com evolução de dois anos.

Foram analisadas cinquenta e cinco metáfases, cinquenta e uma parcialmente após bandamento G e quatro em coloração usual. Vinte e cinco metáfases apresentaram cariótipo normal, uma apresentou monossomia do cromossomo 22, trissomia do cromossomo 15 e uma translocação $(13;22)(p11;q11)$ ou $(q11;p11)$ (Figura 2a), e outra

*é importante
o problema
das anomalias,
no caso do
TCG - 32%
polipl. e
no caso do
cisto ósseo
como
tumores.*

*fonte, poderiam
associar as anomalias a este
tumor.*

No modal é obvio 46

Tabela 4. Dados citogenéticos em casos de osteocondroma.

=====

Caso	No. de metáfases total ou parcialmente analisadas	Achado citogenético [no. de células]
------	---	--------------------------------------

=====

840 37 46,XY[20]
46,XY,t(2;4)(q12;q33)[3]
45,X,-Y[1]
45,XY,-C[2]
45,XY,-19[1]
44,XY,-C,-C[2]
44,XY,-17,-G[1]
41,XY,-C,-C,-C,-C,-G[1]
no. cromossômico < 40[4]
poliploidia[2]

929 55 46,XX[25]
46,XX,t(13;22)(p11;q11) ou (q11;p11)
+15,-22[1]
46,XX,del(8)(q12-q13)[1]
45,XX,-8[2]
45,XX,-C[1]
45,XX,-F[1]
44,XX,-1,-3,+8,-11,t(13;22)(p11;q11)
ou (q11;p11)[1]
44,XX,-C,-C[1]
43,XX,-8,-17-19[1]
43,XX,-C,-C,-C[1]
43,XX,-C,-C,-G[1]
no. cromossômico < 40[5]
hiperdiploidia[2]
poliploidia[12]

932 16 46,XX[5]
45,XX,-C[1]
no. cromossômico < 40[5]
poliploidia[5]

974 22 46,XX[16]
no. cromossômico < 40[2]
hipotriploidia[1]
poliploidia[3]

metáfase tinha uma deficiência do cromossomo 8, del 8(q12-q13). Duas células apresentaram monossomia do cromossomo 8, uma de um cromossomo C não identificado e uma de um cromossomo do grupo F. Uma célula apresentou cariótipo 44,XX;-1,-3,+8,-11,t(13;22)(p11;q11) ou (q11;p11) (Figura 3), quatro células tinham perdas cromossômicas casuais e cinco delas apresentaram número cromossômico igual ou inferior a 40. Duas células eram hiperdiplóides, com 54 e 56 cromossomos e doze células eram poliplóides, com números cromossômicos variando entre 74 a 102. Uma das células poliplóides é ilustrada na Figura 4. x

CASO 932

Essa paciente notou a presença de uma massa óssea no terço proximal da tíbia direita há seis anos, que apresentou aumento gradual em seu tamanho. Como dois irmãos da paciente tiveram osteocondromas bilaterais, os quais haviam sido ressecados, o diagnóstico foi de osteocondromatose múltipla familiar.

Dezesseis metáfases foram analisadas parcialmente após bandamento G e os resultados constam da Tabela 4. Cinco células apresentaram cariótipo normal, uma apresentou cariótipo 45,XX,-C e cinco células tinham os seguintes números cromossômicos: 40, 39, 37, 33 e 28, com perdas casuais. Cinco células eram poliplóides, com números cromossômicos variando entre 80 e 92.

CASO 974

Uma massa tumoral com evolução de aproximadamente 6 anos foi diagnosticada como osteocondroma no terço proximal de tíbia em paciente não fumante.

Vinte e duas metáfases foram analisadas em coloração usual, sendo os resultados apresentados na Tabela 4. Dezesseis delas eram normais, duas apresentaram número cromossômico inferior a 40, uma era hipotriplóide com 60 cromossomos e três eram poliplóides, com números cromossômicos entre 78 e 90.

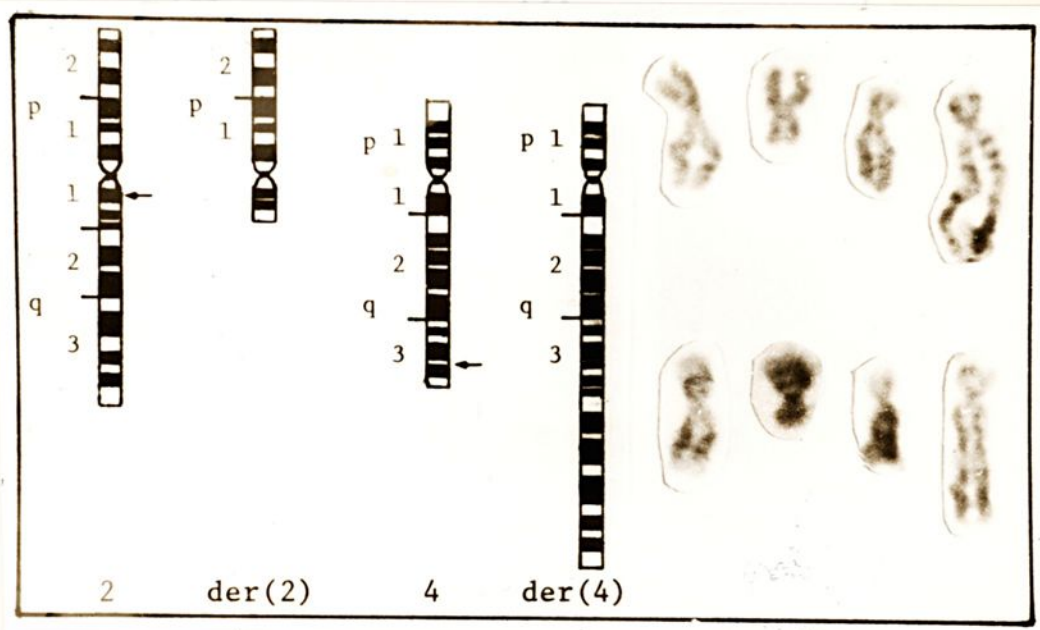


Figura 1. Cariogramas parciais mostrando a translocação $t(2;4)(q12;q33)$ e os homólogos normais em células do caso 840. As setas assinalam os pontos de quebra.

x 22 não foi identificado porque estava em usual

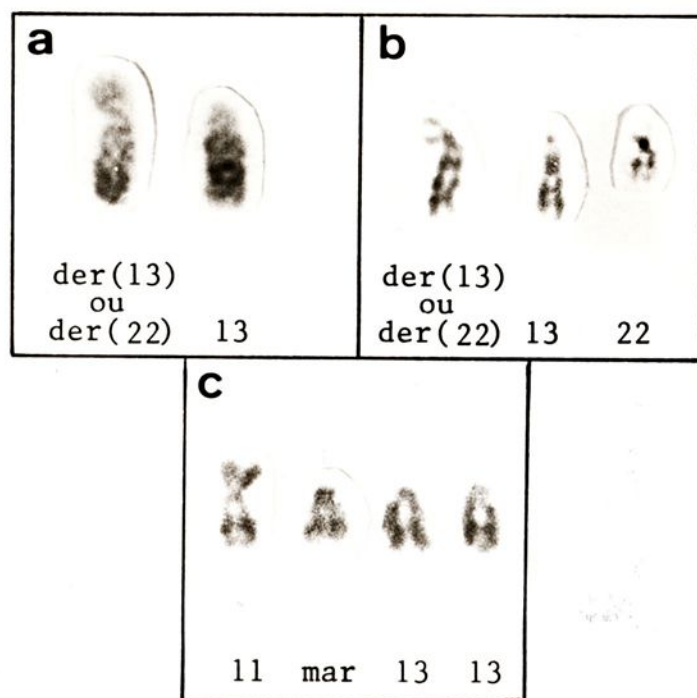


Figura 2. Ilustração da translocação (13;22)(p11;q11) ou (q11;p11) em células do paciente 929 (a) e do paciente 1068 (b) e de cromossomo marcador em célula do paciente 1071, comparado com cromossomos normais (c).

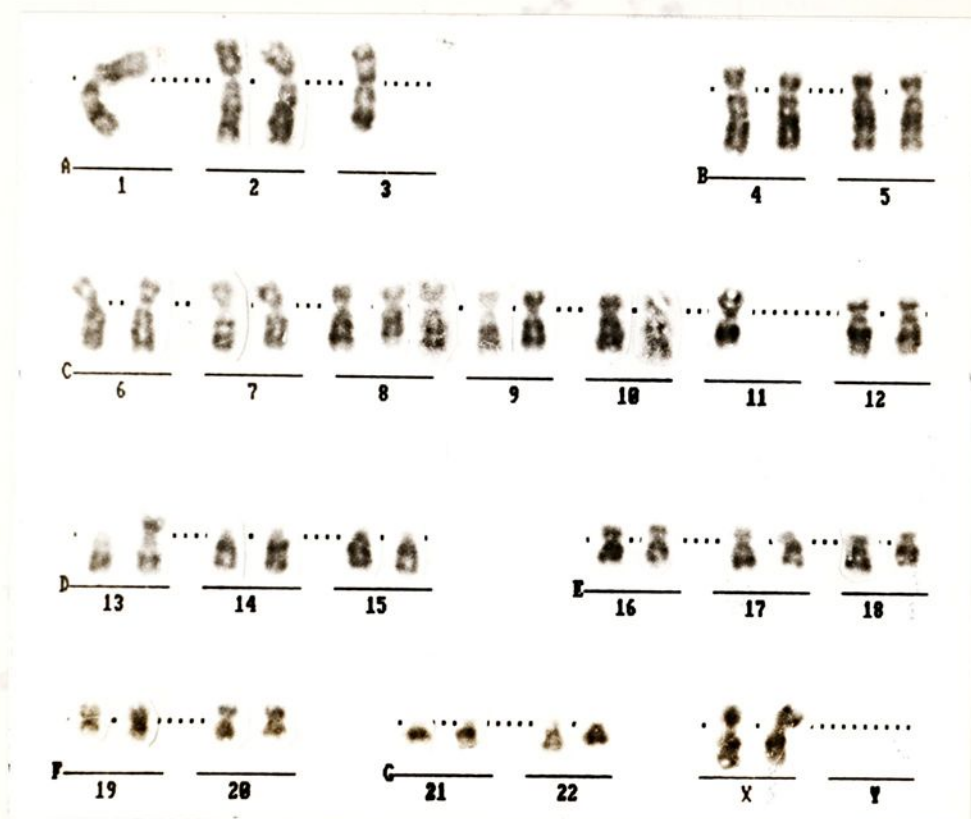


Figura 3. Célula do caso 929 com o cariótipo 44,XX,-1,-3,+8,-11, t(13;22)(p11;q11) ou (q11;p11).

Figura 4. Metáfase hipodiploide do caso 929 contendo 182 cromossomos.

CASO 1068

O paciente, não tabagista, apresentou uma massa anômala no úmero direito com evolução de dois meses. O diagnóstico revelou a presença de um osteocondroma de úmero direito.

Das 155 metáfases encontradas, cento e uma foram analisadas, das quais uma metáfase teve análise total, 64 foram analisadas parcialmente após bandamento G e 36 metáfases foram analisadas em coloração usual. Os resultados são resumidos na Tabela 5. Quarenta e seis eram normais, uma apresentou $t(13;22)(p11;q11)$ ou $(q11;p11)$ (Figura 2b). Trinta e sete células mostraram perdas cromossômicas casuais. Entre estas, uma apresentou cariótipo $44,X,-Y,-9,-17,-18,-19,+3mar$, dezesseis tinham número cromossômico igual ou inferior a 40 e uma metáfase apresentou cariótipo $47,XY,+15$. Dezesseis metáfases eram poliplóides, com números cromossômicos que variavam de 79 a 92.

CASO 1069

O paciente, não tabagista, apresentou uma lesão na fíbula direita que foi diagnosticada como um osteocondroma na região próxima ao joelho.

Seis metáfases foram analisadas em coloração usual, sendo os resultados apresentados na Tabela 5. Três células apresentaram cariótipos com 45, 43 e 41 cromossomos, com perdas casuais e três revelaram cariótipo normal.

CASO 1071

A paciente, não tabagista, apresentou um osteocondroma de tibia.

Das 297 metáfases encontradas, foram analisadas 147, sendo 2 totalmente e 75 parcialmente após bandamento G, e 70 metáfases em coloração usual. Os resultados são mostrados na Tabela 5. Setenta e duas metáfases apresentaram cariótipo normal, uma tinha $46,XX,ace$ e uma $46,XX,-C,+mar$ (Figura 2c). Três metáfases revelaram perda de um cromossomo do grupo B, onze tinham perda de um cromossomo do grupo C, quatro mostraram perda de um cromossomo D, e três tinham perda de um cromossomo do grupo E. Dezesseis células mostra-

ram múltiplas perdas cromossômicas aparentemente casuais, sendo que duas tinham números cromossômicos inferiores a 40. Vinte e oito eram poliplóides, com números cromossômicos variando entre 75 e 95, e oito células eram hiperdiplóides, com trissomias de cromossomos dos grupos C, D ou G.

B. Tumor Osseo de Células Gigantes

CASO 828

A paciente apresentou uma massa tumoral recidiva de um tumor ósseo de células gigantes de fêmur, que havia sido ressecado há 4 anos.

Na Tabela 6 constam os resultados das vinte e cinco metáfases estudadas, das quais treze foram parcialmente analisadas após bandamento G e doze foram analisadas em coloração usual. Treze metáfases tinham cariótipo normal, e três mostraram 45, 44 e 43 cromossomos com perdas envolvendo os grupos C e E. Uma metáfase apresentou 47 cromossomos com ganho de um cromossomo do grupo F, Oito metáfases eram poliplóides, com números cromossômicos variando de 80 a 83.

C. Cisto Osseo Solitário

CASO 1103

A criança apresentou dores no fêmur, próximo à região do joelho, tendo sido diagnosticado um cisto ósseo solitário no terço mediano do fêmur direito, local que coincidia com região onde há aproximadamente 60 dias o paciente havia sofrido um trauma físico em um jogo de futebol.

Foram obtidas trezentas e seis metáfases, sendo que os resultados das cento e sessenta e quatro metáfases analisadas estão resumidos na Tabela 7. Dessas, cinco foram completamente analisadas, cento e vinte e cinco parcialmente analisadas após bandamento G e trinta e quatro analisadas somente em coloração usual.

Cento e onze metáfases apresentaram cariótipo normal e algumas expressavam sítios frágeis. Em 2,4% das células foi observado a expressão do fra(1)(p22) e em 3,6% das células foi detectada a



Tabela 7. Dados citogenéticos observados em 164 metáfases total ou parcialmente analisadas do caso 1193.

Característica	Achado citogenético [no. de células]
Normal	46,XY ou 46,XY, fra(1)(p22) ou 46,XY, fra(1)(q12)[111]

Com rearranjo complexo	46,XY, der(4), der(6), der(8), der(12), der(12), der(16), der(21)[17] 45,XY, der(4), der(6), der(8), der(12), -C,
------------------------	--

Tabela 6. Dados citogenéticos do caso de tumor ósseo de células gigantes (caso 828).

Com outras alterações estruturais	No. de metáfases total ou parcialmente analisadas	Achado citogenético [no. de células]
		46,XY, t(15;21)(p11;q11)[1]

25

46,XY, -16, +mar[1]
46,XY 46,XX[13]
46,XY, -C, -21, +mar, +mar[1]
45,XX, -C[1]

Com alterações numéricas

45,XY 44,XX-C, -C[1]
45,XY, -19[1]
45,XY 43,XX, -C, -E, -19[1]
45,XY, -C[5]
45,XY 47,XX, +F[1]
45,XY, -F[2]
45,XY poliploidia[8]
44,XY, -13, -22[1]

God.

1:308 clon.

nas conseguiu visualizar
bom n.º de metáf. p/ colheita
hipermitótica nas
nas dava pico

Tabela 7. Dados citogenéticos observados em 164 metáfases total ou parcialmente analisadas do caso 1103.

Característica	Achado citogenético[no. de células]
Normal	46,XY ou 46,XY,fra(1)(p22) ou 46,XY,fra(1)(q12)[111]
Com rearranjo complexo	46,XY,der(4),der(6),der(8),der(12),der(12),der(16),der(21)[17] 45,XY,der(4),der(6),der(8),der(12),-C,der(16),der(21)[1] 45,XY,der(4),der(6),der(8),der(12),der(12),-16,der(21)[1]
Com outras alterações estruturais	46,XY,ace[1] 46,XY,del(7)(q11-qter)[1] 46,XY,t(15;21)(p11;q11)[1] 46,XY,-8,+mar[1] 46,XY,-16,+mar[1] 46,XY,-18,+mar[1] 46,XY,-C,-21,+mar,+mar[1]
Com alterações numéricas	45,XY,-12[1] 45,XY,-15[1] 45,XY,-16[1] 45,XY,-C[5] 45,XY,-D[1] 45,XY,-F[2] 45,XY,-G[1] 44,XY,-13,-22[1] 44,XY,-C,-C[1] 43,XY,-C,-C,-21[1] 42,XY,-3,-C,-C,-C[1] 42,XY,-C,-D,-F,-F[1] 41,XY,-C,-D,-D,-18,-19[1] 41,XY,-C,-C,-C,-C,-16[1] no. cromossômico < 40[2] endorreduplicação[2] poliploidia[3]
Com alteração numérica e estrutural	end46,XY,t(1;15)(q12;q22)[1]

14d.
1:40 colomide.



expressão do $\text{fra}(1)(q22)$, ilustrados na Figura (5a,b). Contudo, em algumas células com cariótipo normal houve a manifestação de um ou de ambos os sítios frágeis e, em células que apresentavam eventos cromossômicos anômalos, foi observada a ocorrência independente de um sítio frágil. *(se referiu ao rearranjo e sítio constitucional e não aos)*

Dezessete metáfases apresentaram um rearranjo estrutural complexo envolvendo sete cromossomos: o 4, o 6, o 8, os dois 12, o 16 e o 21 (Figuras 6 e 7). Esse rearranjo foi encontrado nos quatro frascos, sendo por isso considerado clonal. Uma metáfase continha 45 cromossomos, incluindo os cromossomos derivados com exceção do $\text{der}(16)$, porém a célula apresentou perda de um dos cromossomos 16. Situação semelhante ocorreu em outra célula, que continha seis dos marcadores e não apresentava um dos derivados do cromossomo 12, porém a célula também apresentava perda de um cromossomo C. *do outro sítio frágil e rearranjo do 12 e del(11)*

Não foi possível descrever o rearranjo ocorrido de acordo com a fórmula resumida proposta pelo ISCN (1991, suppl), devido à sua complexidade. Por isso, ilustra-se na Figura 6 os esquemas de cada cromossomo derivado e dos segmentos do cariótipo dos quais provavelmente se originaram, e apresenta-se na Figura 7 fotos ilustrativas de cada derivado retiradas de diferentes metáfases. A especificação proposta dos sete cromossomos derivados, de acordo com as normas de nomenclatura da ISCN (1991, suppl) é apresentada na Tabela 8. *(b), de anomalias não clonais, como $t(15;21)(p11;q11)$ em*

Diversas outras anomalias cromossômicas não-clonais foram encontradas neste caso. Uma célula com endorreduplicação mostrou uma translocação $(1;15)(q12;q22)$ (Figura 8) e outras com 46 cromossomos tinham a $t(15;21)(p11;q11)$ (Figura 5c) e a $\text{del}(7)(q11 \rightarrow \text{qter})$ (Figura 5d). Quatro metáfases apresentaram cromossomos marcadores com cariótipo $46,XY,-16,+mar$, $46,XY,-8,+mar$, $46,XY,-C,-21,+mar,+mar$ (Figura 5e-h) e $46,XY,-18,+mar$. Foi também encontrada célula com 46 cromossomos que continha um fragmento acêntrico. Vinte e uma metáfases apresentaram perdas cromossômicas aparentemente casuais, duas manifestaram só endorreduplicação e três eram poliplóides, com números cromossômicos que variaram de 89 a 92.

Não está na prancha

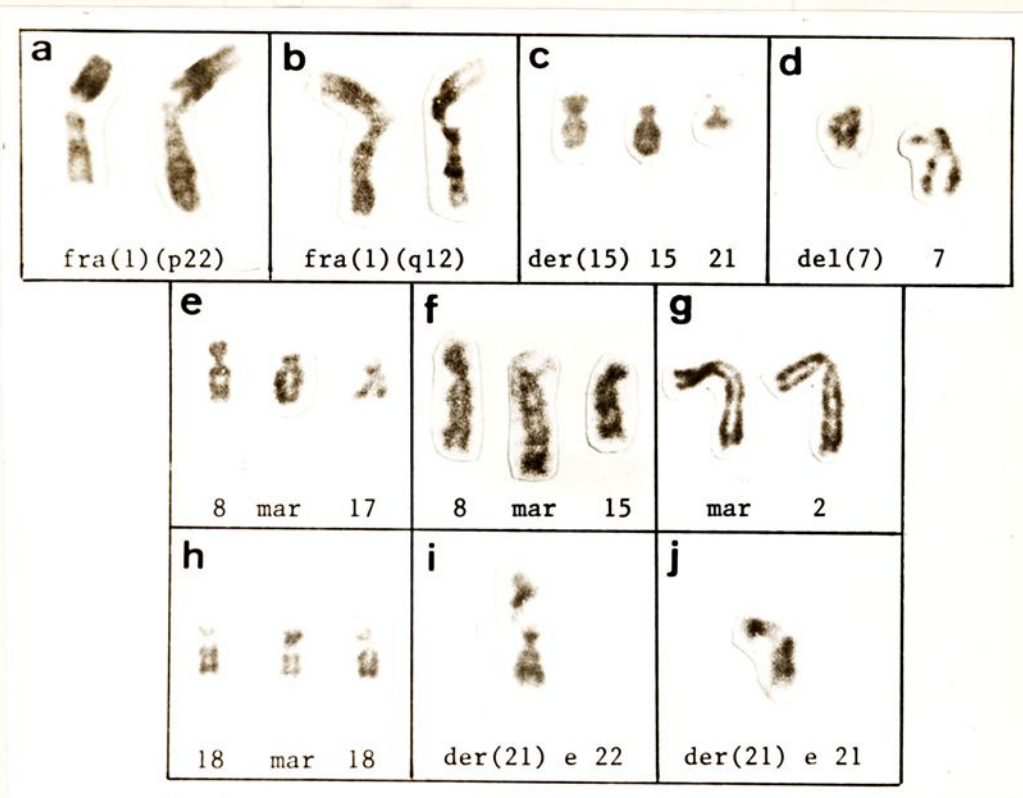


Figura 5. Ilustrações do fra(1)(p22) em (a), do fra(1)(q12) em (b), de anomalias não clonais, como t(15;21)(p11;q11) em (c), del(7)(q11→qter) (d), cromossomo marcador em (e-h) e der(21) participando de associação de satélites com o cromossomo 22 em (i) e com o cromossomo 21 em (j). Alguns cromossomos normais da metáfase foram incluídos nas fotos (d-h) para comparação com o cromossomo alterado.

Figura 6. Esquemas ilustrando as derivações dos cromossomos 4, 6, 8, 12a, 12b, 16 e 21 do caso 1143.

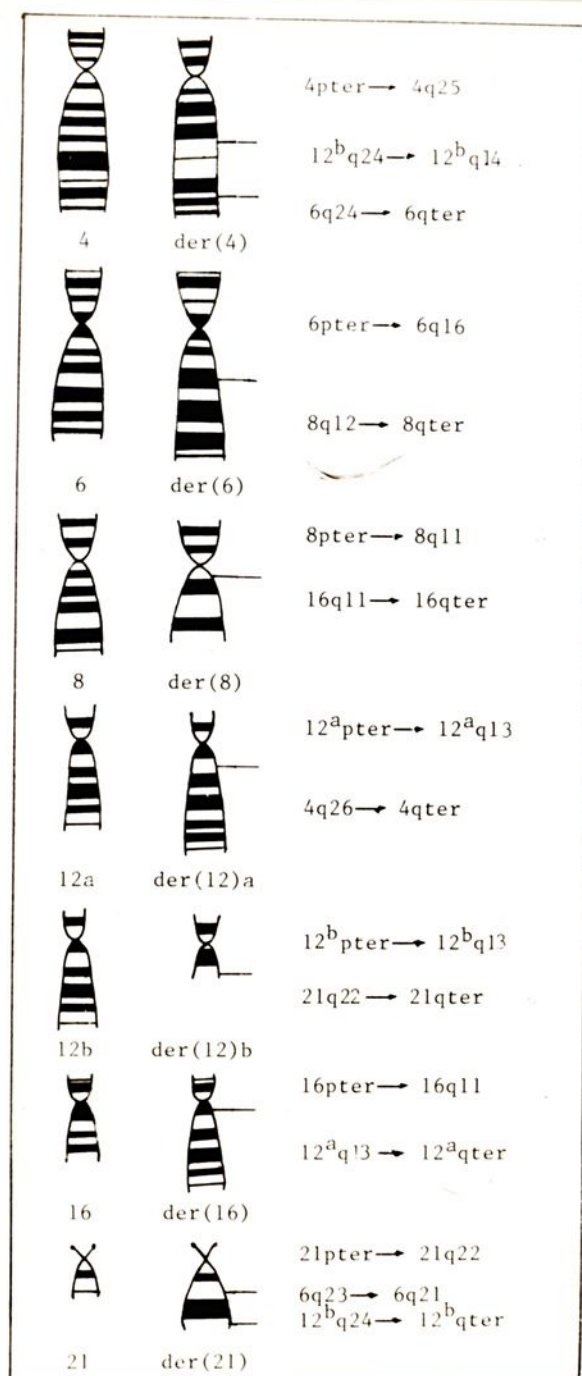


Figura 6. Esquemas ilustrativos dos derivados dos cromossomos 4, 6, 8, 12a, 12b, 16 e 21 do caso 1103.

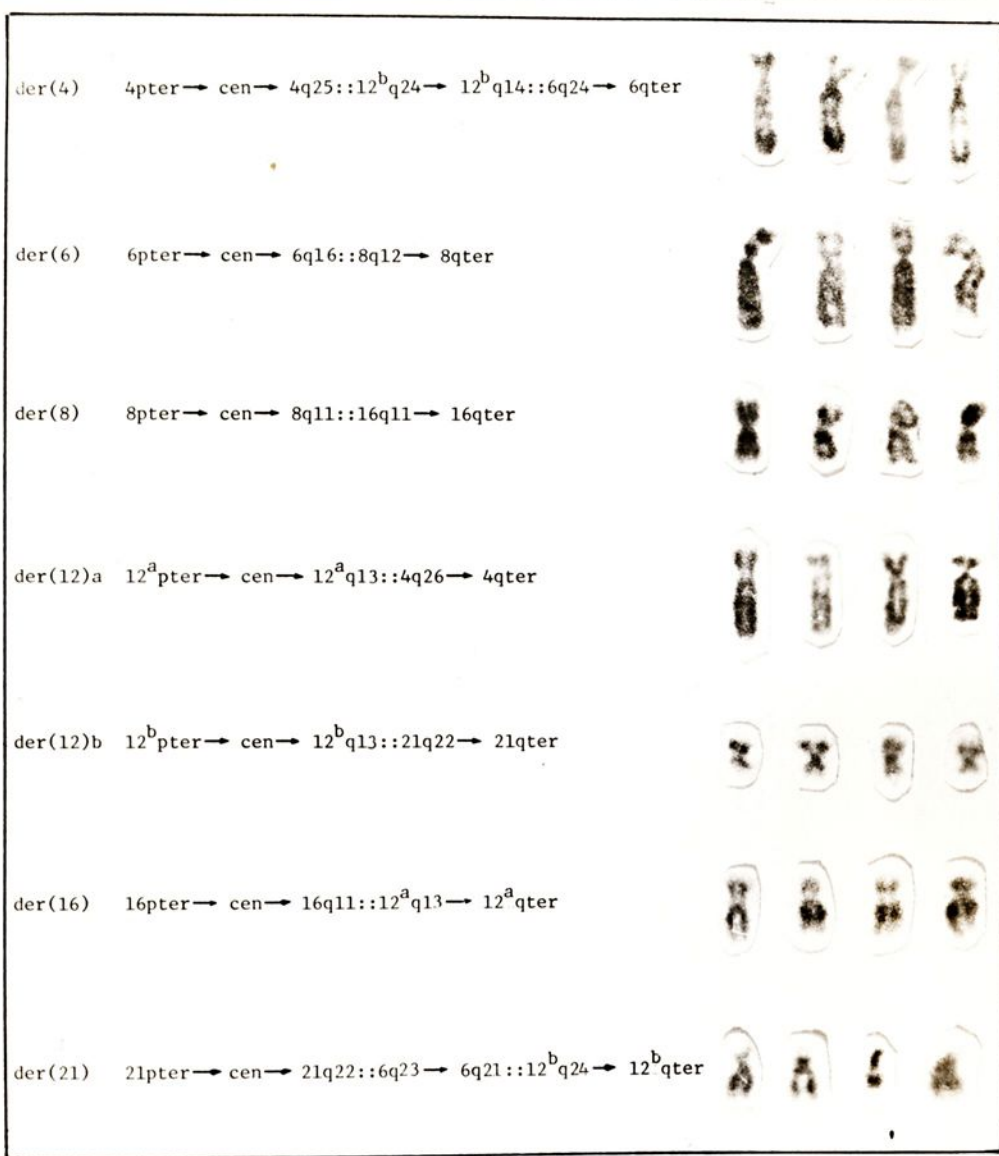


Figura 7. Composição proposta e fotos representativas dos cromossomos derivados do caso 1103.

Tabela 8. Identificação dos sete cromossomos derivados de rearranjo múltiplo complexo, no caso 1103.

Composição Proposta	Especificação Proposta
der(4)t(4;12)(q25;q24)t(12;6)(q14;q24)	4pter->cen->4q25::12q24->12q14::6q24->6qter
der(6)t(6;8)(q16;q12)	6pter->cen->6q16-::8q12->8qter
der(8)t(8;16)(q11;q11)	8pter->cen->8q11::16q11->16qter
der(12)t(12;4)(q13;q26)*	12pter->cen->12q13::4q26->qter
der(12)t(12;21)(q13;q22)**	12pter->cen->12q13::21q22->qter
der(16)t(16;12)(q11;q13)	16pter->cen->16q11::12q13->qter
der(21)t(21;6)(q22;q23)t(6;12)(q21;q24)	21pter->cen->21q22::6q23->6q21::12q24->qter

* der(12)a, ** der(12)b

Figura 8. Cariograma de metáfase do caso 1103 com endorredução

IV. DISCUSSÃO

Estudos realizados com as células de tumores benignos ainda são escassos, mas os resultados são interessantes. Essa raridade provavelmente decorre do fato de que se supõe que as lesões benignas eram cromossomalmente normais, embora estudos que vem sendo

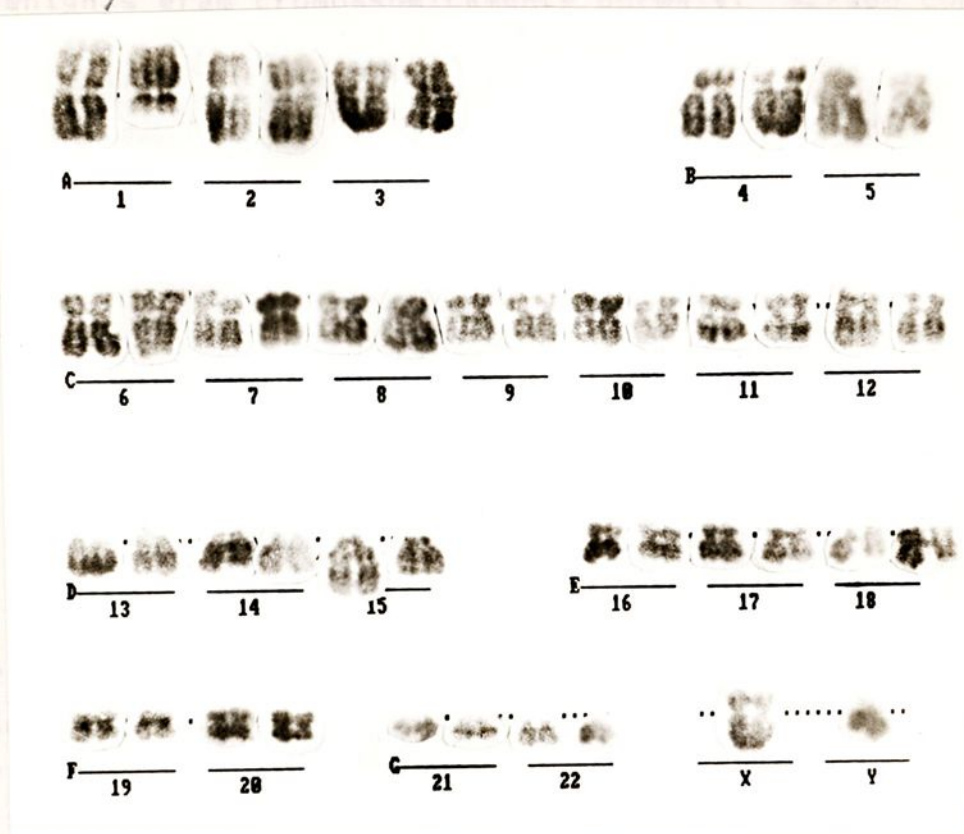


Figura 8. Cariograma de metáfase do caso 1103 com endorreduplicação apresentando uma translocação $t(1;15)(q12;q22)$.

Os rearranjos encontrados em lipomas e lipossarcomas incluem pontos de quebras nos cromossomos 1 e 2. Análises moleculares têm concluído que os oncogenes BLYM, MYCL1 e JUN, localizados no cromossomo 1, e MYC localizado no cromossomo 2 e os oncogenes ERG e ETS2 localizados no cromossomo 21, que estão próximos aos pontos de quebras recorrentes envolvidos nos rearranjos encontrados em lipomas, não exercem influência no estabelecimento dos mesmos. O estudo dos genes WNT1 e 21, mapeados em 12p13, revelou que esses genes não

IV. DISCUSSÃO

Estudos citogenéticos em células de tumores benignos ainda são escassos, mas já há resultados muito interessantes. Essa raridade provavelmente decorreu do fato de que se supunha que as lesões benignas eram cromossomicamente normais, achado contudo que vem sendo há algum tempo identificado como inconstante.

Segundo Sandberg (1991), a complexidade das alterações cariotípicas nas lesões benignas pode indicar o envolvimento de genes que estão relacionados com a proliferação celular, mas não com a transformação maligna. Algumas neoplasias de natureza benigna, como os lipomas, e de natureza maligna, como os lipossarcomas, ofereceram oportunidade especial para expandir o conhecimento sobre o papel das alterações cromossômicas na proliferação celular e sua possível relação no processo de transformação maligna. Dos lipomas existem, segundo Mrózek et al. (1993) seis subtipos citogenéticos: os com cariótipo normal, os com hiperdiploidia e cromossomos em anel, os com pseudodiploidia e com rearranjos do tipo $t(3;12)(q28;q13-q15)$, $t(1;12)(p32-33;q13-15)$, $t(2;12)(p21-22;q13-14)$ e $t(12;21)(q13;q21-22)$, os com $del(13)(q12-q22)$, os com aberrações envolvendo a banda 11q13 e os com rearranjos em 6p21-23. Fato importante é que o subgrupo que apresenta a $t(3;12)(q28;q13-15)$ tem um prognóstico alarmante, pois rearranjos que incluem esses pontos de quebras são também encontrados em lipossarcomas, segundo Teyssier (1989) e Teyssier & Ferre (1989). Entretanto, segundo Mrózek et al. (1993), os pontos de quebras em lipomas são consistentes em 12q15, enquanto que nos lipossarcomas os pontos de quebras são comumente encontrados em 12q13. Portanto, esses autores puderam esclarecer uma controvérsia existente anteriormente, mostrando que as regiões afetadas em ambos os tumores são diferentes.

Os rearranjos encontrados em lipomas e lipossarcomas incluem pontos de quebras nos cromossomos 1 e 2. Análises moleculares têm concluído que os oncogenes **BLYM**, **MYCL1** e **JUN**, localizados no cromossomo 1, o **MYCN** localizado no cromossomo 2 e os oncogenes **ERG** e **ETS2** localizados no cromossomo 21, que estão próximos aos pontos de quebras recorrentes envolvidos nos rearranjos encontrados em lipomas, não exercem influência no estabelecimento dos mesmos. O estudo dos genes **WNT1** e **GLI**, mapeados em 12q13, revelou que esses genes não

se encontram alterados em lipomas nem em lipossarcomas. Entretanto, a análise molecular dessa região mostrou padrões de metilação diferentes em GLI em ^{lipomas e} lipossarcomas (Paulien et al., 1991; Sreekantaiah ^{li-po} et al., 1991b) ^{mb}.

Em relação ao tumores ósseos benignos, foram localizadas informações citogenéticas em onze publicações, que estão resumidas nas Tabelas 9 e 10, para facilitar a discussão. Os tumores mais frequentemente analisados no presente estudo foram osteocondromas (casos 840, 929, 932, 974, 1068, 1069 e 1071) e os achados são de grande valia, pois até o momento as únicas referências sobre estudo citogenético em osteocondroma haviam sido feitas por Fletcher et al. (1989), que afirmaram serem frequentes alterações estruturais não-clonais nestes tumores, e por Bridge et al. (1992c) (Tabela 9).

Nos sete casos ora analisados não foram encontradas alterações estruturais clonais, mas chama a atenção a $t(2;4)(q12;q33)$, do caso 840, cuja clonalidade não pode ser confirmada por razões técnicas. Além disso, conforme já destacado por Mertens et al. (1989), as anomalias consideradas não-clonais podem refletir pequenos clones celulares, que não se confirmaram em função do estudo de número insuficiente de células. Portanto, apesar da $t(2;4)$ detectada em repetição em três células não ter sido considerada clonal, em função dos critérios adotados, não se pode descartar totalmente a hipótese de clonalidade.

Essa translocação não foi referida em qualquer das publicações sobre tumores ósseos benignos e até o momento nenhum oncogene foi mapeado naquelas bandas cromossômicas. Na banda 2q12 foi mapeado o gene codificador do receptor da interleucina 1, IL1R, e nessa mesma banda ou entre as bandas 2q12-q21 está o gene da interleucina 1, IL1A, que é uma citocina plurifuncional com papel importante na regulação do sistema imune e em processos inflamatórios, segundo Gowen et al. (1983) e Saklatvala (1986). Além dos efeitos citostáticos e citotóxicos exercidos em células neoplásicas, a interleucina atua também na diferenciação e crescimento das células hematopoiéticas, ativação dos osteoclastos e reabsorção óssea e cartilaginosa, atividade mitogênica e inibição do crescimento das células tumorais (Raitano & Korc, 1993). Entre as citocinas

Tabela 9. Anomalias cromossômicas encontradas em condroblastomas, encondromas, osteocondromas e fibromas condromixóides.

Tipo do tumor	Referência	No. de casos	No. modal	Anomalias cromossômicas	
				clonais	não-clonais
Condroblastoma	Mark et al. (1992)	1	46	t(1;15;17;22)(q42;p32;p13;q12-q21;q12-q13)	hipodiplóides
Encondroma	Teyssier (1987) *	1	46		+11
	Bridge et al. (1989)	1	46	t(2;13)(p14;q33)+5	
	Mandahl et al. (1990)	2	46	t(X;12;8;13)(q24;q15;q11;q14), del der(8)(p22)	
			46		9q+
					t(9;?), -18, +mar
	Bridge et al. (1992b)	2	46	t(12;15)(q13;q26) i(6p) i(6p), +20	fusões teloméricas
	Mandahl et al. (1993a)	1	45	der(7)t(7;12)(q32;q13), dic(12;12)(q13;q13) der(16)t(12;16)(q13;q22) idem, add(5)(q13)	
Osteocondroma	Fletcher et al. (1989)	não informativo			alterações estruturais diversas
Encondroma, Condroblastoma, Fibroma condromixóide e Osteocondroma	Bridge et al. (1992c)	37	46	+5, +7, +8	alterações em 15p11 e 15p22

cf. Mandahl et al. (1990)

Tabela 10. Anomalias cromossômicas encontradas em tumores ósseos benignos de células gigantes.

Referência	No. de casos	No. modal	Anomalias cromossômicas	
			clonais	não-clonais
Schwartz et al. (1991)	2	46		
	13	46	t(5;10)(p13;q22)	fusões teloméricas outras (t, del, der)
		46		fusões teloméricas outras (t)
		46	der(20)t(13;20)(q12;qter13) -X,-8,-15,-20 -9 +16 -19	fusões teloméricas outras (del, der)
		46	-22	fusões teloméricas outras (del, der)
		46		fusões teloméricas outras (t, del)
		46		fusões teloméricas outras (der)
		46		fusões teloméricas outras (der)
		46	dic(11;19)(p15;q13)	fusões teloméricas
		46	der(19)t(19;?)(q13;?) -X,t(1;3)(p32;q21)	outras (der)
		46		fusões teloméricas outras (del)
		46	r(17)	fusões teloméricas
		46		fusões teloméricas mar,-22
		46		dim,mar
Holenaar et al. (1992)	4	46	t(13;22)(p11;p11)	
		46	-22	der(19)t(19;?)(q13;?)
		46		der(22)t(17;22)(q12;p12)
		46	t(14;22)(q11;p11), del(4)(q23;q27)	t(19;?)(q13;?) dic(7;19)(?;q13)

Tabela 10. Continuação.

Referência	No. de casos	No. modal	Anomalias cromossômicas	
			clonais	não-clonais
Bridge et al. (1992a)	7	46		
	25	?		+10 t(17;18)(p11;q11.3)
		?		-19,t(2;4)(p13;q35)
		46	+7	t(2;7)(p23;?) +mar
		46	fus(19p;20q), fus(8p;20q)	t(12;18)(p11;p11.3)
		46	fus(2p;15p) fus(8p;22q) fus(2p;20p), t(10;?)(p15;?)	del(1)(q22),t(7;?)(p22;?), +21,del(6)(23),t(2;?)(p25;?) t(3;8)(p21;p23),del(2)(p21;?), t(9;?)(p24;?),+r(15)
		46		del(4)(p13)
		?	+3 +19,+21	t(7;?)(q36;?),+dmin,+0, +2mar,+17,+mar
		?		t(5;?)(q35;?),+18,+22,+22
		46	t(11;18)(p15;p11) fus(11p;18p) t(11;18)(p11;p11) t(11;11)(p15;q13)	r(11),t(11;18)(p12;p11.3) t(6;?)(q27;?) t(11;18)(p15;p11),del(1)(q11),del(5)(p14)
		46		+13,+16,+mar,tetraploide
		46	fus(15p;21q)	-Y,-1,-6,-10,-19,+3mar
		46	fus(10p;19q)	t(12;14)(p13;q11)
		?	fus(2q;19q)	
		?	t(10;?)(q26;?),t(11;?)(15;?), fus(10q;11p), -19,fus(14p;21p),r(11)	-10 r(10) dic(11;19)(p11;q13),+mar, t(10;?)(q26;?) cxdel(8)(p11),+2mar t(11;17)(p11;q11)
		?	r(12),fus(Xp;9p)	-13
		46		r(?) -9
		?	-1,-11,+der(1),t(11;11;21)(p32;q13;q22),del(2)(p22) t(7;7)(p22;q32),t(8;?)(p11;?),t(8;?)(p11;?),t(17;?)(p13;?),t(19;?)(q13;?),+22	+dmin
		46		-7,-19,-X,-1,-11
		46		t(1;?)(p32;?),-17
		46		del(1)(p21),-8,der(5), t(5;?)(p15;?)
		?	t(17;?)(p13;?)	
		46	fus(14p;21),fus(15p;21p)	del(1)(q21)
		46	t(11;?)(p15;?)	-18,+i(18q),+20,+mar
		46		-1,-8,-16,-17,-22
		46		-20

existentes, a interleucina 1 tem sido considerada potencialmente a mais importante como mediadora em processos inflamatórios e está sempre presente em doenças inflamatórias que têm como característica a reabsorção óssea, caso da artrite reumatóide e da osteoartrose (Gowen *et al.*, 1983; Saklatvala, 1986). Com base no exposto, seria esperado que nos osteocondromas, que são tumores formadores de cartilagem, a interleucina 1 atuasse no processo de reabsorção óssea. Não se pode afirmar que a alteração vista ao nível citogenético neste ponto de quebra tenha exatamente afetado tais genes, porém se isso aconteceu é possível que ambos os produtos tenham sido funcionalmente alterados, perdendo nessas células sua atividade anti-tumor e de reabsorção óssea e resultando em uma lesão neoplásica.

Em três células de amostras de osteocondromas foi observada a translocação $t(13;22)(p11;q11)$ ou $(q11;p11)$, sendo que duas delas foram encontradas em um mesmo paciente e uma em células de outro paciente. A translocação $t(13;22)(p11;p11)$ já foi descrita por Molenaar *et al.* (1992) como um evento clonal em um tumor ósseo de células gigantes (Tabela 10).

Outra alteração cromossômica encontrada em dois osteocondromas benignos ora estudados foi a trissomia do cromossomo 15, que é sabidamente envolvida em condrossarcomas (Mandahl *et al.*, 1990, Tabela 12). Esse achado poderia associar os osteocondromas com os condrossarcomas. Contudo, anomalias no cromossomo 15 têm sido também descritas em outros tumores, como carcinoma de cólon, neuroblastoma, retinoblastoma e meningioma (Mitelman, 1991).

Um dos eventos mais frequentemente encontrados na análise dos sete casos de osteocondroma foi a poliploidia, que ocorreu com frequência relativamente alta em seis dos casos estudados: em cerca de 6% das células no caso 840, 22% no caso 929, 31% no caso 932, 14% no caso 974, 16% no caso 1068 e 19% no caso 1071. O único caso em que não foram encontradas células poliplóides foi o 1069, do qual só foram analisadas seis células. O fenômeno da poliploidia, segundo Williams & Daly (1990), tem sido pouco estudado em tumores ósseos, porém segundo esses autores parece indicar malignidade ou instabilidade cromossômica e, portanto, está relacionado com predisposição à progressão maligna.

De acordo com os estudos de quantificação de DNA por



citometria de fluxo, realizados por Bauer (1988), Chen (1989), Williams & Daly (1990) e Mandahl et al. (1993b), a poliploidia indica um mau prognóstico em lesões benignas e malignas, principalmente condrossarcomas e osteossarcomas, e também em tumores de pele, de bexiga, de mama e de intestino. Segundo Williams & Daly (1990), pacientes com tumores ósseos diplóides apresentam uma sobrevida de 81%, quando comparados aos pacientes com tumores aneuplóides, que apresentam sobrevida de 29%. Lesões diplóides estão associadas com um melhor prognóstico, enquanto que as lesões hiperdiplóides têm um curso clínico desfavorável, apresentando alta frequência de recorrência do tumor após ressecção e surgimento de metástases em outros órgãos. Portanto, a análise quantitativa de DNA pode auxiliar no prognóstico dos tumores e também no diagnóstico dos tumores ósseos que apresentam discrepâncias entre o comportamento biológico e o histopatológico.

Poder-se-ia considerar a hipótese de que a poliploidia observada nos pacientes deste estudo refletisse efeito de condições *in vitro*, mais especificamente do bloqueador mitótico colcemide. Contudo, apesar de em três casos (929, 932 e 974) ter havido exposição prolongada (16h) a esse agente, nos outros três casos (840, 1068 e 1071) as células não foram expostas ao colcemide por mais de 2 horas e, portanto, não se poderia atribuir a taxa elevada de poliploidia ao bloqueador mitótico.

Os tumores podem apresentar, além de alterações cromossômicas clonais primárias e secundárias, outras anomalias não-clonais que são casualmente distribuídas no cariótipo. Quando a instabilidade nas células tumorais é pronunciada, essas alterações dificultam a detecção das anomalias verdadeiramente relacionadas com a patogênese do tumor, conforme já destacado por Mitelman (1990). As demais anomalias cromossômicas encontradas nos casos de osteocondromas estudados no presente trabalho, como a del(8)(q12-13) devem enquadrar-se na categoria das alterações casuais.

Outros tumores ósseos benignos sobre os quais dispõe-se de informações citogenéticas são os condroblastomas, os encondromas e os fibromas condromixóides, cujos achados citogenéticos constam da Tabela 9. A análise citogenética de seis encondromas estudados por Teyssier (1987), Mandahl et al. (1990, 1993a) e Bridge et al.



(1992b) revelou alterações cromossômicas estruturais clonais nos cromossomos X, 6, 7, 8, 9, 12, 15 e 16, incluindo as associações teloméricas em um dos casos, enquanto a única alteração numérica, trissomia do cromossomo 20, foi encontrada por Bridge *et al.* (1992b). Em um caso de condroblastoma, Mark *et al.* (1992) identificaram um rearranjo complexo que envolvia os cromossomos 1, 5, 17 e 22.

Bridge *et al.* (1989) apresentaram um caso de fibroma condromixóide que mostrou alterações estruturais nos cromossomos 2 e 13 e trissomia do cromossomo 5.

Bridge *et al.* (1992c) apresentaram resumo dos achados citogenéticos em 12 condroblastomas, 11 osteocondromas, 12 encondromas e 2 fibromas condromixóides. As aberrações numéricas, geralmente do tipo trissomia, envolveram os cromossomos 5, 7 e 8 e os eventos estruturais envolveram com maior frequência o cromossomo 15 nas bandas 15p11 e 15q22. Essas alterações também foram observadas em neoplasias ósseas cartilaginosas benignas, caso dos tumores ósseos de células gigantes (Schwartz *et al.*, 1991, Tabela 10), mas nenhum dos pontos de quebras descritos coincide com os encontrados no presente trabalho.

Entre as alterações cromossômicas não-clonais encontradas no presente estudo, coincidem com as descritas na literatura a trissomia do cromossomo 8, que também foi referida por Bridge *et al.* (1992a,c, Tabelas 9 e 10) em tumores ósseos benignos, assim como a monossomia do cromossomo 17 e a translocação (13;22), que também foram encontradas em tumores ósseos de células gigantes, respectivamente por Bridge *et al.* (1992a) e Molenaar *et al.* (1992, Tabela 10).

Embora os achados ora apresentados não tenham sido consistentes, não pode ser descartada a hipótese de que as alterações observadas possam estar relacionadas com a iniciação do osteocondroma ou até com a progressão maligna à condrossarcoma ou à osteossarcoma. Portanto, ainda são necessários estudos para que essas lesões sejam melhor caracterizadas citogeneticamente e para esclarecer o significado de tais alterações cromossômicas no desenvolvimento desse tipo de tumor.

Os tumores ósseos de células gigantes já foram mais estudados, e na literatura foram localizadas informações citogenéticas sobre 51 pacientes (Tabela 10), em três estudos desenvolvidos



por Schwartz **et al.** (1991), Bridge **et al.** (1992a) e Molenaar **et al.** (1992). As principais alterações cromossômicas estruturais foram fusões teloméricas, que envolveram os cromossomos 2, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22 e X, mas os telômeros mais comumente afetados foram os de 9q, 11p, 13p, 15p, 16p, 18p, 19q, 20q e 21p. Esses tumores são caracterizados não só pela associação telomérica, mas também por outras anormalidades cromossômicas estruturais múltiplas que incluíram inúmeros cromossomos, e as anomalias numéricas detectadas envolviam todos os cromossomos, com exceção do 2, 4, 5, 12 e 14. No caso do tumor ósseo de células gigantes analisado no presente estudo não se obteve resultados similares aos resumidos na Tabela 10. O único achado a ser destacado neste caso é a elevada frequência de poliploidia (cerca de 32% das células), que pode estar relacionada com o aspecto mais agressivo desses tumores. *é tb por tratar de uma neoplasia*

As alterações cromossômicas verificadas nos tumores ora analisados coincidem parcialmente com as encontradas em tumores ósseos malignos. Um resumo dos achados citogenéticos em tumores desse tipo é apresentado nas Tabelas 11, 12 e 13, sendo que a primeira refere-se aos condrossarcomas, a segunda aos osteossarcomas e a terceira aos sarcomas de Ewing.

Com base no estudo de quatorze casos de condrossarcomas, relatados por Fletcher **et al.** (1989), Mandahl **et al.** (1990), Sreekantaiah **et al.** (1991a) e Hirabayashi **et al.** (1992), pode-se observar a multiplicidade de cromossomos afetados por alterações estruturais (cromossomos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20) e numéricas (todos os cromossomos), incluindo trissomias, tetrassomias e perdas cromossômicas.

De acordo com os estudos realizados por Mandahl **et al.** (1986), Castedo **et al.** (1988), Biegel **et al.** (1989), Noguera **et al.** (1990) e Sinovic **et al.** (1992), resumidos na Tabela 12, as anormalidades citogenéticas estruturais frequentes em osteossarcomas também afetaram praticamente todos os cromossomos, com exceção do 2, 4, 16, 20, X e Y, enquanto que as anomalias numéricas envolveram todos os cromossomos, com exceção do Y.

Biegel **et al.** (1989, Tabela 12) analisaram citogeneticamente oito casos de pacientes com osteossarcomas pediátricos, que apresentavam cariótipo constitucional normal. A constituição cromos-



Tabela 11. Anomalias cromossômicas encontradas em tumores malignos do tipo condrossarcomas.

Referência	No. de casos	No. modal	Anomalias cromossômicas	
			clonais	não-clonais
Fletcher et al. (1989)	1	46	der(3)(3;?)(q;?)	diversos der e del
Mandahl et al. (1990)	2	46		
	8	79-85	+X,+Y,+1,+1,+2,+3,+4,+6,+7,+7, +8,+8,+9,+10,+10,+11,+11,+13, +14,+15,+16,+17,+17,+18,+18,+19, +20,+21,+22,del(6)(q22),i(12q), del(12)(p11q12),der(15)t(1;5) (q21;p11),+4-7mar	
		38-40	-X,-6,-10,-11,-13,-14,-18,-22, del(5)(q13),t(19;?)(q13;?),+1-2mar t(19;?)(q13;?)	
		46	-2,-18,del(3)(p23),i(6p),t(7;?) (q22;?)	diversas
		46	+2,-4,+7,+7,+8,+19,-20,del(1) (p22p31),t(6;?)(p25;?),t(9;?) (p24;?),del(15)(q23),t(16;?) (p12;?),der(20)(20pter-)cen- 20q13::1q21-1qter),+6-8mar	diversas
		43-44	-1,-6,-12,del(1)(p11p22), der(1)t(1;12)(p36;q13),i(9q) idem,-22	diversas
		95-112	+X,+Y,+1,+1,+2,+3,+3,+5,+6, +7,+7,+8,+9,+9,+11,+12,+12, +13,+14,+14,+15,+16,+16,+16, +17,+17,+17,+19,+19,+19,+19, +20,+21,+21,+22,+22,+22, t(10;?)(p11;?),t(10;?)(p12;?), 2t(1;?)(q21;?),2t(4;?)(p16;?), del(11)(p11),2t(15;?)(p11;?), 2t(20;?)(q13;?),+9-6mar	diversas
		46	-Y,-6,+7,-10,-11,-13,-22, t(4;?)(q35;?),del(5)(q13), +2mar	diversas
		46		diversas
Sreekantaiah et al. (1991a)	1	46	+5,+7,+12,+19,+20,+21,+22 +5,+7,+7,+12,+12,+19,+19, +20,+21,+21,+22,+22	
Hirabayashi et al. (1992)	2	52	t(6;12)(q25;q13),+7,+8,+11, +17,+19,+20,+21	diversas
		42	der(19)t(12;19)(q13;q13)	diversas

Tabela 12. Estudo citogenético em osteossarcomas.

Referência	No. de casos	No. modal	Anomalias cromossômicas	
			clonais	não-clonais
Mandahl et al. (1986)	1	39-41	t(12;18)(q24;q12), der(X)t(X;9)(q11;p24),-4,-5,-13,-21 der(9)t(X;9)(q11;p24),-4,-5,-13,-21 der(10)t(10;19)(p13;q13),-4,-5,-13,-21 der(19)t(10;19)(p13;q13) i(7q)	diversas
Aurias et al. (1984)	4	42-48		
Castedo et al. (1988)	1	88-99	+der(3)t(3;8)(q11;q11),+der(5)t(5;7)(p12;q11),+der(5)t(5;7)(p12;q?), der(7)t(7;7)(p22;?),der(8)t(1;8)(p12;p11),der(9)t(9;13)(p11;p11),+der(12)t(12;?)(q13;?),+der(14)t(14;?)(q31;?), der(17)t(17;?)(p13;?),mar1,5	diversas
Biegel et al. (1989)	2	46		
	6	44	-3,-10,-13,-15,-19	anomalias estruturais múltiplas
		46	-X,-3,-6,-8,-9,-13,-15,-19,-20,-20,-21,-22	anomalias estruturais múltiplas
		113	+X,-2,+4,+5,-13,-14,-15,-17,-18,-21,-22	anomalias estruturais múltiplas
		61	-2,-6,-10,-13,-15,-15,-16,-18,-18,-21	anomalias estruturais múltiplas
Turc-Carel et al. (1988)	19	45-57		diversas
		46		
		54	-3,-4,+21,-6,-8,-9,-13,-14,-14,-16	anomalias estruturais múltiplas
		32	-2,-4,-5,-6,-7,-9,-10,-11,-12,-13,-15,-16,-17,-20,+21,-22	anomalias estruturais múltiplas
Noguera et al. (1990)	1	48	+8,i(1q),t(11;22)(q24;q12)	
Sinovic et al. (1992)	1	47	+r ou +mar	

sômica das células tumorais foi complexa, e o frequente envolvimento do cromossomo 13 confirma, ao nível citogenético, a perda de heterozigossidade no loco RB1 do cromossomo 13 vista nesses tumores. Entretanto, o achado de anormalidades cromossômicas na grande maioria dos cromossomos — forneceu evidências de que a perda de heterozigossidade não é restrita ao cromossomo 13, podendo haver o envolvimento de

Tabela 13. Estudo citogenético em sarcomas de Ewing.

Referência	No. de casos	No. modal	Anomalias cromossômicas	
			clonais	não-clonais
Aurias et al. (1984)	4	47-48	+8,der(2)(2;22)(p22;q12) der(11)(2;11)(p22;q12) der(22)	
Aurias et al. (1984)	46	46	idem,add21	
Aurias et al. (1984)	46	46	der(9)t(9;22)(q34;q12), der(20)t(9;20)(q34;q12), p(12),der(22)t(20;22)(p12;q12)	
Aurias et al. (1984)	46	46	der(11)t(11;22)(q24;q12), der(22)t(1;22)(q24;q12)	
Aurias et al. (1984)	46-47	46-47	der(11)t(11;22)(q24;q12), der(22)t(1;22)(q24;q12)	
Aurias et al. (1984)	46	46	der(11)t(11;22)(q24;q12), der(22)t(1;22)(q24;q12), der(1)t(1;22)(p21;q12), der(22)t(1;22)(p21;q12),i(1q)	
Turc-Carel et al. (1988)	19	45-57	t(11;22)(q24;q12)	diversas
Turc-Carel et al. (1988)	46	46	t(11;22;14)(q24;q12;q11)	
Turc-Carel et al. (1988)	48	48	t(11;22)(q24;q12),inv(der(11)) t(q24;q12)	
Turc-Carel et al. (1988)	53-54	53-54	der(22)t(11;22)(q24;q12)	
Turc-Carel et al. (1988)	46	46	t(11;22)(q24;q12),+der(22) t(11;22)(q24;q12)	

sômica das células tumorais foi complexa, e o frequente envolvimento do cromossomo 13 confirma, ao nível citogenético, a perda de heterozigossidade no loco **RB1** do cromossomo 13 vista nesses tumores. Entretanto, o achado de anormalidades cromossômicas na grande maioria dos cromossomos forneceu evidências de que a perda de heterozigossidade não é restrita ao cromossomo 13, podendo haver o envolvimento de outros locos no desenvolvimento ou na progressão do osteossarcoma (Sandberg, 1990).

Dois estudos citogenéticos em sarcomas de Ewing (Aurias et al., 1984; Turc-Carel et al., 1988, Tabela 13) referiram os cromossomos 1, 2, 9, 11, 14, 16, 20, 21 e 22 como os mais frequentemente afetados nas aberrações cromossômicas estruturais, e a trissomia do cromossomo 8 como a anomalia numérica mais consistente.

Aurias et al. (1984) e Turc-Carel et al. (1984) haviam descrito a ocorrência nesses tumores de uma translocação consistente, a $t(11;22)$, que foi confirmada como um marcador citogenético por Douglas et al. (1986) e Wang-Peng et al. (1987). Alterações idênticas têm sido encontradas em outros tipos de tumores neuroectodérmicos, como por exemplo em osteossarcomas de células pequenas (Mandahl et al., 1990), em tumor de Askin e em neuroepitelioma periférico (Sandberg, 1990), o que sugere que tais tumores sejam de origem relacionada.

Cromossomos 13 derivados de $t(13;22)$, já foram referidos em osteossarcoma, por Biegel et al. (1989), e em retinoblastoma (cf. Mitelman, 1991), e esses achados adquirem significado pois parece haver uma associação dos genes envolvidos no desenvolvimento de retinoblastoma e osteossarcoma.

Já foi verificado que indivíduos que carregam uma mutação constitucional no gene **RB1**, mapeado em 13q14, têm um risco cerca de 500 vezes mais elevado do que a população em geral de desenvolver tumores secundários não-oculares, especialmente osteossarcomas (Hansen, 1991; Hovig et al., 1991). Toguchida et al. (1988), Horowitz et al. (1990), Araki et al. (1991), Hansen (1991) e Wunder et al. (1991) descreveram a ocorrência de rearranjos estruturais no gene **RB1** em osteossarcomas e Reissmann et al. (1989) e Wunder et al. (1991) os descreveram em sarcomas de tecidos moles, sugerindo a participação do gene **RB1** no desenvolvimento desses tumores. Araki et al. (1991) isolaram fragmentos de DNA da banda 13q14 e confirmaram a

deficiência desse gene em alguns casos de osteossarcoma. Além disso, estudos quantitativos de RNA demonstraram que o gene não é expresso em alguns osteossarcomas, o que sugere que o gene **RB1** ou um outro gene qualquer localizado em 13q pode ser responsável pela origem de osteossarcoma. Gilman et al. (1985) descreveram casos de osteossarcomas associados com anormalidades constitucionais em 13q12, nos quais o paciente não apresentava retinoblastoma, sugerindo que genes encontrados nessa banda possam estar relacionados com o desenvolvimento de osteossarcomas.

Não foi possível determinar com precisão os pontos de quebras da translocação, que pode ter ocorrido em 13p11 e 22q11 ou 13q11 e 22p11, onde não há oncogenes mapeados. Além disso, os prováveis pontos de quebras nas alterações que envolveram o cromossomo 13 e 22 não afetaram o gene **RB1**. Contudo, é interessante destacar a importância da $t(13;22)$ encontrada neste trabalho, pois genes dessas bandas podem ter sido alterados, de forma a serem responsáveis pela transformação maligna em osteossarcoma. *osteosarcoma.*

Entre as alterações cromossômicas numéricas referidas neste estudo merecem destaque a trissomia do cromossomo 8, a qual estava presente em uma célula que apresentou também a $t(13;22)$, e a monossomia do cromossomo 17. A trissomia do cromossomo 8 já foi encontrada em condrossarcoma (Hirabayashi et al., 1992, Tabela 11), em osteossarcoma (Noguera et al., 1990, Tabela 12), e em sarcoma de Ewing (Turc-Carel et al., 1988). Esses achados são interessantes porque os osteocondromas podem dar origem à condrossarcomas e osteossarcomas. Outro fator de grande valia para o esclarecimento do significado da trissomia 8 nesses tumores é a presença neste cromossomo do oncogene **MYC**, responsável pela malignidade em alguns tumores. Alterações nesse oncogene, como a provocada pela $t(8;22)(q24;q11)$, são responsáveis por sua ativação, ele passa a ser expresso em altas taxas e é, então, responsável pelo processo maligno no linfoma de Burkitt. Heim & Mitelman (1987), considerando esses achados e também a confirmação da amplificação do **MYC** em cerca de 10% a 20% dos tumores em geral, que era mais frequente em metástases do que em tumores primários, propuseram a amplificação gênica provavelmente não é uma característica de tumores primários, mas sim de lesões em estágios mais avançados estando relacionada com um mau

prognóstico. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que a trissomia do cromossomo 8, em tumores benignos, possa estar relacionada a processos iniciais de transformação maligna de osteocondromas para condrossarcomas ou osteossarcomas.

Com relação a perda do cromossomo 17, encontrada em nove células de quatro casos de osteocondroma, já foi relatada em tumores ósseos malignos como condrossarcoma (Hirabayashi et al., 1992), osteossarcoma (Biegel et al., 1989) e sarcoma de Ewing (Turc-Carel et al., 1988; Mitelman, 1991), além de ser frequente em uma variedade de outros tumores, principalmente em carcinoma de cólon.

A perda do cromossomo 17 está associada com a deficiência do gene TP53, um dos possíveis genes supressores de tumor. Alterações nesse gene em famílias com alta incidência de câncer foram descritas por Malkin et al. (1992) e Toguchida et al. (1992), nas quais o osteossarcoma foi bastante comum. Dockhorn-Dworniczak et al. (1992) encontraram perda de alelos no loco TP53 em 75% dos casos estudados de osteossarcomas e esses resultados, em adição aos demais já referidos na Introdução deste trabalho, sugerem que perdas alélicas no gene TP53 podem constituir-se em eventos fundamentais na origem de osteossarcomas.

Perdas alélicas no gene TP53 também são frequentes em outros tumores, como é o caso do câncer de mama (Matsumura et al., 1992) e parecem estar envolvidas em sua progressão. Além disso, de acordo com estes autores, é provável que haja um outro gene supressor de tumor em 17p, localizado distalmente ao TP53, e que também esteja relacionado com o desenvolvimento de neoplasias de mama.

Em relação às lesões ósseas não-tumorais, há poucas informações citogenéticas disponíveis na literatura. O caso 1103 era uma lesão óssea benigna diagnosticada como cisto ósseo solitário. Sua etiologia permanece incerta, mas ele pode ter se formado em resposta a um processo traumático. Segundo Malawer et al. (1985), esses cistos raramente são confundidos com tumores benignos ou malignos.

Sobre cistos ósseos solitários não foram encontradas informações citogenéticas. Outro tipo de cisto ósseo, o aneurismático, teve 10 casos analisados citogeneticamente por Pfeifer et al. (1991), sendo que oito mostraram cariótipos normais e dois apresentaram anomalias cromossômicas. Foram encontradas fusões teloméricas

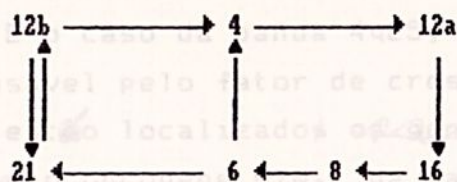
perfeitamente enquadradas no clone com o rearranjo complexo. O em um dos casos, que acabou sendo associado com um tumor de células gigantes pré-existente. Segundo os autores, os cistos ósseos aneuplóides podem originar-se em resposta a um tumor benigno pré-existente, caso em que podem apresentar as características histológicas e citogenéticas desse tumor. Nesse caso, o cisto apresentou fusões teloméricas que envolviam os cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 21, 22 e X e que são características de tumor ósseo de células gigantes. Em outro paciente foram encontradas anomalias cromossômicas grosseiras, como cromossomos extremamente longos formados por associações teloméricas, o que levou a uma reavaliação. A nova análise radiológica e histológica do cisto acabou revelando que a lesão era, na realidade, um osteossarcoma telangiectásico. Esses achados evidenciaram a importância da citogenética no diagnóstico diferencial dessas condições.

As células do cisto ósseo solitário analisado no presente estudo mostravam quebras e falhas preferenciais nas regiões 1p22 e 1q12, que coincidiram com a localização dos sítios frágeis fra(1)(p22) e fra(1)(q12) (Bruns & Dracopoli, 1991). Os sítios frágeis constituem um fenômeno citogenético relacionado com instabilidade cromossômica, porém seu significado biológico em câncer não está completamente esclarecido. Sua distribuição não é casual no genoma, e existem sítios frágeis que têm sido associados com pontos de quebra de rearranjos nas células tumorais, tais como translocações, deficiências, e inversões (Watanabe et al., 1990). A própria t(1;15)(q12;q22), encontrada neste trabalho em uma célula do cisto ósseo, tem pontos de quebras coincidentes com dois sítios frágeis, o fra(1)(q12) e o fra(15)(q22) (Donlon & Malcom, 1991).

Contudo, o achado citogenético mais importante encontrado no estudo deste caso foi o rearranjo estrutural complexo balanceado (Tabela 8, Figuras 6 e 7), que envolveu sete cromossomos (cromossomos 4, 6, 8, os dois cromossomos 12, o cromossomo 16 e o 21) e foi observado em 11,6% das células. Em duas células foram encontrados seis cromossomos derivados, estando ausente em uma um dos derivados do cromossomo 12 e um outro, o der(16), porém como nessas células havia perda de um cromossomo do grupo C e de um cromossomo 16, respectivamente, pode-se supor que os cromossomos perdidos nessas células fossem os derivados der(12)a e der(16), e que elas fossem

perfeitamente enquadradas no clone com o rearranjo complexo. O rearranjo distribuiu-se pelas quatro réplicas estudadas constituindo, portanto, uma anomalia clonal.

As alterações dos cromossomos envolvidos no rearranjo complexo podem ser simplificadaamente esquematizadas como segue:



O rearranjo é formado por dois blocos de alterações. Um deles envolve os cromossomos 4, 6, 12b e 21, sendo que os cromossomos 6 e 12b apresentaram dois pontos de quebras no braço longo, enquanto o 4 e 21 tiveram apenas uma quebra cromossômica. Os derivados 12b e 21 participaram de trocas cromossômicas recíprocas entre si. O outro rearranjo envolveu cinco cromossomos, incluindo o 4 e 6. Neste, houve apenas trocas cromossômicas simples, com exceção do cromossomo 6 que doou regiões cromossômicas para o 4 e para o 21.

Em resumo, o derivado do cromossomo 4 recebeu segmentos dos cromossomos 6 e 12b, tendo recebido o fragmento do cromossomo 12b invertido. O cromossomo derivado do 6 recebeu um segmento do cromossomo 8 e este, por sua vez, recebeu um segmento do cromossomo 16. Em relação ao derivado do cromossomo 12a, este recebeu uma parte do braço longo do cromossomo 4, o derivado do cromossomo 12b recebeu um segmento do cromossomo 21, o der(16) do cromossomo 12a e o der(21) recebeu um segmento do cromossomo 6 invertido e o telômero do cromossomo 12b.

Essa alteração não foi descrita anteriormente em anomalias ósseas, porém outros rearranjos cromossômicos estruturais complexos têm sido descritos em tumores ósseos benignos, como a $t(1;1;5;17;22)$ em condroblastoma (Mark et al., 1992), a $t(X,8,12;13)$ em encondroma (Mandahl et al., 1990) e a $t(1;11;21)$ em tumor ósseo de células gigantes (Bridge et al., 1992a). Além disso, Castedo et al. (1988) também referiram rearranjo cromossômico altamente complexo em osteossarcoma, que envolveu os cromossomos 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 17 e 18, sendo que seis células tinham os

derivados do 1, 3, 5, 7, 8, 9, 12, 14 e 17 e duas os derivados do 3, 5, 11 e 18. Contudo, deve ser ressaltado que a análise citogenética desse tumor foi feita após o paciente ter sido submetido à quimioterapia.

Alguns pontos de quebras do rearranjo complexo encontrado coincidem com a localização de oncogenes referidos no Human Gene Mapping 11 (1991). É o caso da banda 4q25, local este onde está mapeado o gene responsável pelo fator de crescimento epidérmico **EGF**, da banda 6q21 onde estão localizados ~~os genes do fator de necrose tumoral TNF α e TNF β~~ e o oncogene **FYN**, da banda 6q23 onde pode se localizar o oncogene **MYB**, da banda 8q11 onde está localizado o oncogene **MOS**, e da banda 12q13 onde está mapeado o oncogene **ERBB3**. Além disso, três pontos de quebras deste rearranjo coincidem com sítios frágeis. É o caso da banda 6q21, onde está localizado o fra(6)(21) (Ziegler et al., 1991), da banda 12q13, local onde está mapeado o fra(12)(q13) e da banda 12q24, que contem o fra(12)(q24) (Craig & McBridge, 1991).

Vários pontos de quebras envolvidos no rearranjo complexo coincidem com bandas afetadas em anomalias descritas em tumores ósseos, apesar de não serem consistentes. A banda 4q25 foi observada participando em rearranjos em histiocitoma fibroso maligno, um tumor ósseo de partes moles (Mitelman, 1991), a 6q22 foi observada alterada em condrossarcoma (Mandahl et al., 1990), a 8q11 em encondroma (Mandahl et al., 1990), tumor ósseo de células gigantes (Schwartz et al., 1991), condrossarcoma, osteossarcoma e sarcoma sinovial (Mitelman, 1991), a 12q24 em lipoma, histiocitoma fibroso maligno, osteossarcoma e sarcoma de Ewing (Mandahl et al., 1986; Mitelman, 1991), a 16q11 foi encontrada rearranjada em histiocitoma fibroso maligno, em rabdomiossarcoma, sarcoma de Ewing e sarcoma sinovial (Turc-Carel et al., 1988; Mitelman, 1991) e a 21q22 foi observada alterada em lipoma, leiomioma e leiomiossarcoma, histiocitoma fibroso maligno e lipossarcoma (Mitelman, 1991). Não foram encontradas referências sobre tumores ósseos com alterações cromossômicas que afetaram o ponto de quebra 12q11, mas uma região próxima a esta, a banda 12q13 tem sido frequentemente envolvida em alterações em tumores ósseos como encondroma, condrossarcoma e osteossarcoma, segundo Mrózek et al. (1993).



V. CONCLUSÃO Uma outra translocação envolvendo o cromossomo 15, t(15;21)(p11;q11), encontrada neste cisto ósseo também já foi descrita em tumor ósseo de células gigantes (Schwartz et al., 1991).

Os achados nessas células de cisto ósseo solitário, levantaram questões em relação ao caso. Segundo Teyssier & Ferre (1989) e Sandberg (1990), as alterações cromossômicas encontradas em lesões benignas tendem a ser translocações recíprocas balanceadas que mantêm a estabilidade cromossômica, concordante com o encontrado na situação em discussão. Todavia, vale ressaltar que cariótipos com rearranjos altamente complexos são característicos de lesões malignas em estágios avançados e relacionados com a progressão maligna. Poderiam, então, essas anomalias cromossômicas representar um estágio pré-maligno da lesão óssea? Por outro lado, Pfeifer et al. (1991) descreveram uma lesão como cisto ósseo aneurismático, mas que posteriormente verificou-se ser um osteossarcoma, evidenciando um erro de diagnóstico pela similaridade histológica das condições. Poderia o diagnóstico deste caso estar incorreto e a lesão constituir-se em um tumor maligno ou um tumor benigno em um estágio pré-maligno? O ortopedista reavaliou o paciente clinicamente e confirmou o diagnóstico. Foi solicitada também a reavaliação das lâminas e o diagnóstico histológico foi confirmado.

Outra interessante questão que pode ser levantada, considerando a provável origem da lesão a partir de um trauma físico é se seria possível suspeitar que regiões ósseas traumatizadas, em indivíduos com predisposição ao desenvolvimento de tumores, poderiam passar a apresentar aberrações cromossômicas.

Não foi possível identificar alterações citogenéticas consistentes nos tumores ósseos benignos ora analisados, mas os aspectos discutidos deixam clara a possibilidade de contribuição da análise citogenética ao diagnóstico e também ao prognóstico das lesões ósseas. Fica evidenciada, também, a importância de se analisar maior número de cistos ósseos e de outras lesões consideradas não-tumorais, para se confirmar se alterações cromossômicas são comuns nessas condições, e qual o seu significado.

A análise de um único caso de cisto ósseo impede que se faça qualquer generalização. Todavia, os interessantes achados obtidos suportam o planejamento de outros estudos em lesões não-tumorais.

V. CONCLUSÕES

A técnica de explante primário, com desagregação exclusivamente mecânica mostrou-se adequada para o cultivo celular dos tumores ósseos benignos, bem como para o cultivo de um cisto ósseo solitário.

Nos osteocondromas não foram encontradas alterações cromossômicas estruturais ou numéricas que se categorizassem como clonais, de acordo com os critérios utilizados, porém foi frequente o achado de células poliplóides. Ressalve-se, contudo, o pequeno número de tumores analisados. Entre as alterações cromossômicas estruturais encontradas nos osteocondromas, destacam-se a $t(2;4)(q12;q33)$ e a $t(13;22)(p11;q11)$ ou $(q11;p11)$. A primeira foi encontrada em três células de um paciente e a segunda em células de dois pacientes, e é possível que a clonalidade não tenha sido evidenciada por razões técnicas. Entre as alterações cromossômicas numéricas destacam-se a trissomia do cromossomo 15, encontrada em dois pacientes, e a trissomia do cromossomo 8 e a monossomia do cromossomo 17, que já foram descritas em outros tumores ósseos.

No tumor de células gigantes, foram verificadas perdas cromossômicas provavelmente casuais e elevada incidência de células poliplóides.

Em 12% das células de um cisto ósseo solitário foi identificado um rearranjo estrutural clonal complexo, envolvendo sete cromossomos: o 4, o 6, o 8, os dois 12, o 16 e o 21. As trocas de segmentos processaram-se em dois conjuntos integrados: um envolvendo os cromossomos 4, 6, 12b e 21, e outro envolvendo os cromossomos 4, 6, 8, 12a e 16. As células cariotipicamente normais do cisto ósseo solitário expressaram o sítio frágil $fra(1)(p22)$ na frequência 2,4% e o sítio frágil $fra(1)(q12)$ na frequência de 3,6%. Algumas células com anomalias também expressaram esses sítios frágeis.

Não foram detectadas anomalias citogenéticas consistentes nos tumores ósseos benignos ora analisados. Contudo, os dados sugerem a conveniência de análise mais detalhada, com maior número de casos.

A análise de um único caso de cisto ósseo impede que se faça qualquer generalização. Todavia, os interessantes achados obtidos suportam o planejamento de outros estudos em lesões não-tumorais.



VI. RESUMO

Os tumores ósseos primários são relativamente raros, com exceção das neoplasias de origem medular, como mielomas e leucemias, e a importância da análise citogenética no seu diagnóstico e no prognóstico ainda não é significativa, pois não há resultados citogenéticos consistentes disponíveis. Além das neoplasias, existem também outras lesões de origem não-neoplásica que podem acometer o osso, caso dos cistos ósseos, dos quais há poucas informações citogenéticas acessíveis.

No presente estudo pretendeu-se investigar as anomalias cromossômicas presentes em células cultivadas de tumores ou outras lesões do tecido ósseo de natureza benigna. Os estudos foram realizados em culturas de curta duração de células provenientes de oito tumores ósseos benignos, sendo sete osteocondromas e um de células gigantes, e de uma lesão não-tumoral diagnosticada como cisto ósseo solitário.

As anomalias cromossômicas estruturais não-clonais encontradas nos osteocondromas foram a $t(2;4)(q12;q33)$, que se repetiu em três células da mesma réplica de cultura em um dos pacientes, a $t(13;22)(p11;q11)$ ou $(q11;p11)$, encontrada em duas células também da mesma réplica de um mesmo paciente e em uma célula de outro paciente, e a $del(8)(q12-13)$. Além dessas, foram encontradas alterações cromossômicas numéricas classificadas como casuais, caso das trissomia do cromossomo 8, de cromossomos do grupos C, D e G, e de diversas monossomias, como a do cromossomo 17. Em seis dos casos foi frequente a poliploidia, que ocorreu em aproximadamente 18% das metáfases encontradas. As alterações cromossômicas observadas nestes tumores coincidem com algumas das anomalias já descritas em outros tumores ósseos.

No tumor de células gigantes foram encontradas perdas cromossômicas provavelmente casuais e alta frequência de poliploidia (32%), que pode estar relacionada com estágios mais avançados da doença.

Finalmente, a análise de um cisto ósseo solitário mostrou um rearranjo estrutural clonal complexo que envolveu sete cromossomos: o 4, o 6, o 8, os dois doze, o 16 e o 21. Foram observadas outras anomalias não-clonais, as quais incluíram a $t(1;15)$, a

t(15;21), e metáfases com marcadores. O paciente apresentou dois sítios frágeis, o fra(1)(p22) e o fra(1)(q12), provavelmente constitucionais. O achado de uma alteração cromossômica clonal tão complexa, que é característica de lesões tumorais em estágios avançados, levantou discussões sobre a etiologia e o diagnóstico da lesão.

Em conclusão, não foi possível identificar alterações citogenéticas consistentes nos tumores ósseos e nas lesões não-tumorais ora analisados, mas os aspectos discutidos revelam a possibilidade de contribuição da análise citogenética ao diagnóstico e ao prognóstico das lesões ósseas. Em relação aos tumores ósseos benignos, são necessários mais estudos para que se possa detectar anomalias citogenéticas consistentes e, então, relacioná-las com o processo de iniciação e progressão maligna. Os resultados relativos ao cisto ósseo também evidenciam a importância de novos estudos deste tipo de lesão e em outras lesões não-tumorais, para que se possa confirmar ^{a frequência e significado} se a ocorrência de alterações cromossômicas é frequente nessas anomalias ósseas e qual o seu significado.

Chromosomal losses, probably random, were observed in the giant cell tumor, in which a high frequency of polyploid cells (32%) could be related to an advanced stage of the disease.

Cells from the simple bone cyst showed a clonal and very complex structural rearrangement involving seven chromosomes: #4, #6, #8, both #12, #16, and #21. Non-clonal anomalies including t(1;15), t(15;21) and marker chromosomes were also detected. The patient exhibited two fragile sites, fra(1)(p22) and fra(1)(q12), probably as constitutional characteristics of his karyotype. Such complex and clonal chromosome alterations are usually found in latter stages of tumoral lesions, thus the cytogenetic findings in this bone cyst give rise to questions as to the etiology and the diagnosis of the lesion.

VII. ABSTRACT

Primary bone tumors are rare, excepting the medullary neoplasias like myelomas and leukemias. Cytogenetic analysis is not yet a significant tool in their diagnosis and prognosis, since there is no consistent cytogenetic data available. Bones can also be affected by non-neoplastic lesions, such as bone cysts, on which there is almost no cytogenetic information available.

The aim of the present study was the identification of the chromosomal anomalies in cultivated cells of tumors or other bone lesions of benign nature. Short-term cultures from eight benign bone tumors (seven osteocondromas and one giant cell tumor) and one simple bone cyst, a non-neoplastic lesion, were established and their cells analysed chromosomically.

The non-clonal structural anomalies found in osteocondromas were a $t(2;4)$, that appeared in three cells in one flask of patient 840, a $t(13;22)$ exhibited by two cells in a flask of patient 929 and one cell in patient 1068, and a $del(8)$. Several numerical alterations in the karyotype, like trisomy 8 and trisomy of chromosomes of the C, D and G groups were also found, as well a monosomy of several chromosomes, including #17. None was clonal and all are considered as random gains or losses. Polyploidy was present in about 18% of the analysed cells. The abnormalities observed in these tumors are coincident with some previously described in other types of bone tumors.

Chromosomal losses, probably random, were observed in the giant cell tumor, in which a high frequency of polyploid cells (32%) could be related to an advanced stage of the disease.

Cells from the simple bone cyst showed a clonal and very complex structural rearrangement involving seven chromosomes: #4, #6, #8, both #12, #16, and #21. Non-clonal anomalies including $t(1;15)$, $t(15;21)$ and marker chromosomes were also detected. The patient exhibited two fragile sites, $fra(1)(p22)$ and $fra(1)(q12)$, probably as constitutional characteristics of his karyotype. Such complex and clonal chromosome alterations are usually found in latter stages of tumoral lesions, thus the cytogenetic findings in this bone cyst give rise to questions as to the etiology and the diagnosis of the lesion.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

In conclusion, consistent cytogenetic abnormalities were not identified in the bone diseases herein analysed. However, the contribution of cytogenetic findings to the diagnosis and prognosis of bone diseases are pointed out. More chromosome studies in benign bone tumors are still necessary to make possible the detection of consistent abnormalities that can be related to the initiation and progression of the malignant process.

Regarding the bone cyst, the results also pointed out the need for more numerous studies in this and in other types of benign and non-neoplastic lesions, in order to clarify whether chromosomal aberrations are frequent in those conditions and what they might mean.

- G., JOHANSSON, B., PANDIS, N., HEIM, S., HANSEN, N., HADERTHANG, J., HOLM, T., SANDBERG, A.A., MITELMAN, F. Trisomy 7 in non-neoplastic focal steatosis of the liver. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.43, p.125-129, 1992.
- BARDI, B., JOHANSSON, B., PANDIS, N., SAK-JENSEN, E., ORNDAL, C., HEIM, S., HANSEN, N., ANDERSEN-SANDBERG, A., MITELMAN, F. Cytogenetic abnormalities in colorectal adenocarcinomas and their correlation to clinicopathologic features. *Cancer*, v.71, p.300-314, 1993.
- BAUER, H.C.F. DNA reprofiling of osteosarcoma. *Acta Orthop. Scand.*, v.59, p.2-39, 1990.
- BAUER, J., SOKOL, L., SIRISHNA, J., KREHEN, M., BRAJSOVA, I., HAUSNER, P., HELLMER, P. Amplification of N-myc oncogene in human melanoma cells. *Melanoma*, v.37, p.233-238, 1990.
- BERNARDS, R., RUSSET, A.X., van t'VEER, L., HATEBOER, G., BEIJERSBERGEN, R., ZILMER, H. Regulation of cellular gene expression by N-myc in neuroblastoma. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. Programme and Abstracts. Porto/Espinho, 1992. p.9.
- BIEGEL, J.A., WOHNER, R.S., FARMER, B.S. Complex karyotypes in a series of pediatric osteosarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.38, p.89-100, 1989.
- BISHOP, J.H. Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.*, v.52, p.301-354, 1983.
- BISHOP, J.H. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, v.64, p.235-248,



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS *

- ANDERSON Jr., R.L., POPOWITZ, L., LI, J.K.H. An unusual sarcoma arising in a solitary osteochondroma. **J. Bone Joint Surg. (AM)**, v. 51A, p.1199-1204, 1969.
- ARAKI, N., UCHIDA, A., KIMURA, T., YOSHIKAWA, H., AOKI, Y., UEDA, T., TAKAI, S-T., MIKI, T., ONO, K. Involvement of the retinoblastoma gene in primary osteosarcomas and other bone and soft-tissue tumors. **Clinical Orthop.**, v.270, p.271-277, 1991.
- AURIAS, A., RIMBAUT, C., BUFFE, D., ZUCKER, J-M., MAZABRAUD, A. Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.12, p.21-25, 1984.
- BARDI, G., JOHANSSON, B., PANDIS, N., HEIM, S., MANDAHN, N., HAGERTRAND, I., HOLMIN, T., SANDBERG, A.A., MITELMAN, F. Trisomy 7 in non neoplastic focal steatosis of the liver. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.22-24, 1992.
- BARDI, G., JOHANSSON, B., PANDIS, N., BAK-JENSEN, E., ORNDAL, C., HEIM, S., MANDAHN, N., ANDREN-SANDBERG, A., MITELMAN, F. Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation to clinicopathologic features. **Cancer**, v.71, p.306-314, 1993.
- BAUER, H.C.F. DNA cytometry of osteosarcoma. **Acta Orthop. Scand.**, v.59, p.2-39, 1988.
- BAUER, J., SOKOL, L., STRIBRNA, J., KREMEN, M., DRAJSOVA, I., HAUSNER, P., HEJNAR, P. Amplification of N-myc oncogene in human melanoma cells. **Neoplasma**, v.37, p.233-238, 1990.
- BERNARDS, R., RUSTGI, A.K., van t'VEER, L., HATEBOER, G., BEIJERSBERGEN, R., BILLAUD, M. Regulation of cellular gene expression by N-myc in neuroblastoma. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.9.
- BIEGEL, J.A., WOMER, R.B., EMANUEL, B.S. Complex karyotypes in a series of pediatric osteosarcomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.38, p.89-100, 1989.
- BISHOP, J.M. Cellular oncogenes and retroviruses. **Annu. Rev. Biochem.**, v.52, p.301-354, 1983.
- BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenes. **Cell**, v.64, p.235-248, 1989.



1991.

- BOOKSTEIN, R., RIO, P., MADREPERLA, S.A., HONG, F., ALLRED, C., GRIZZLE, W.E., LEE, W.-H. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.7762-7766, 1990.
- BOWN, N.P. Chromosome studies of solid tumors. **J. Clin. Pathol.**, v.45, p.556-560, 1992.
- BRIDGE, J.A., SANGER, W.G., NEFF, J.R. Translocation involving chromosomes 2 and 13 in benign and malignant cartilaginous neoplasms. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.38, p.83-88, 1989.
- BRIDGE, J.A., NEFF, J.R., MOURON, B.J. Giant cell tumor of bone. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.58, p.2-13, 1992a.
- BRIDGE, J.A., PERSONS, D.L., NEFF, J.R., BHATIA, P. Clonal karyotypic aberrations in enchondromas. **Cancer Detection Prev.**, v.16, p.215-220, 1992b.
- BRIDGE, J.A., NEFF, J.R., De BOER, J.M., SINOVIC, J. Cytogenetic findings in 100 cartilaginous neoplasms: biological & clinical significance. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992c, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992c. p.24.
- BRUNS, G.A., DRACOPOLI, N.C. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 1. **Human Gene Mapping 11** (1991). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, p.115-117, 1991.
- BUYS, C.H.C.M. Overview and prospects. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.52, p.207-213, 1991.
- CASARTELLI, C., ROGATTO, S.R., BARBIERI NETO, J. Karyotypic evolution of human meningioma. Progression through malignancy. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.40, p.33-45, 1989.
- CASTEDO, S.M.M.J., SERUCA, R., OOSTERHUIS, J.W., de JONG, B., KOOPS, H.S., LEEUW, J.A. Cytogenetics of a case of osteosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.32, p.149-151, 1988.
- CHEN, R.-B. Flow cytometric analysis of benign and malignant tumors of the oral and maxillofacial region. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v.47, p.596-606, 1989.
- 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. USA**, v.86, p.6372-6376, 1989.

- COTRAN, R.S., ROBBINS, S.L., KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 4.ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1991. 1231p.
- COWELL, J.K., HOGG, A. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.64, p.1-11, 1992.
- CRAIG, I.W., McBRIDE, O.W. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 12. **Human Gene Mapping 11** (1991). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, p.555-579, 1991.
- DOCKHORN-DWORNICZAK, B., WEDEMEYER, N., WEIDNER, J., WIEDORN, K., UEDA, Y., BLASIUS, S., WUISMANN, P., BOCKER, W., ROESSNER, A. Identification of an intronic point mutation of the p53 gene leading to aberrant mRNA splicing in a human osteosarcoma. In: **EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS**, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.12.
- DONLON, T.A., MALCOLM, S. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 15. **Human Gene Mapping 11** (1991). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, p.624-642, 1991.
- DOUGLAS, E.C., VALENTINE, M., GREEN, A.A., HAYES, F.A., THOMPSON, E.I. t(11;22) and other chromosomal rearrangements in Ewing's sarcoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.77, p.1211-1215, 1986.
- EMANUEL, B.S., NOWELL, P.C., McKEON, C., CROCE, C.M., ISRAEL, M.A. Translocation breakpoint mapping: molecular and cytogenetic studies of chromosome 22. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.19, p.81-92, 1986.
- FETT-CONTE, A.C. **Estudo citogenético em pacientes jovens portadores de neoplasias**. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1992. 177p. Tese (Doutorado em Ciências - Área de Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1992.
- FLETCHER, F.A., LIPINSKI, K.K., WEIDNER, M., MORTON, C.C. Complex cytogenetic aberrations in a well-differentiated chondrosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.41, p.115-121, 1989.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. New York: Alan R. Liss, 1987. 253p.
- GARRISON, R.C., UNNI, K.K., McLEOD, R.A., PRITCHARD, D.J., DAHLIN, D.C. Chondrosarcoma arising in osteochondroma. **Cancer**, v.49, p.1890-1897, 1982.



- GILMAN, P.A., WANG, N., FAN, S-F., REEDE, J., KHAN, A., LEVENTHAL, B.G. Familial osteosarcoma associated with 13;14 chromosomal rearrangement. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.17, p.123-132, 1985.
- GOWEN, M., WOOD, D.D., IHRIE, E.J., McGUIRE, M.K.B., RUSSELL, G.G. An inteleukin 1 like factor stimulates bone resorption *in vitro*. **Nature**, v.306, p.378-380, 1983.
- GRABIAS, S., MANKIN, H.J. Chondrosarcoma arising in histologically proved unicameral bone cyst. **J. Bone Joint Surg. (AM)**, v.56A, p.1501-1509, 1974.
- GROUCHY, J.D.E., TURLEAU, D.P. **Atlas des maladies cromosomiques**. Paris: Espansion Scientifique Française, 1977.
- HALL, F.M., FRANK, H.A., COHEN, R.B., EZPELETA, M.L. Ossified pulmonary metastases from giant cell tumor of bone. **Am. J. Roentgenol.** v.127, p.1046-1047, 1976.
- HANSEN, M.F. Molecular genetic considerations in osteosarcoma. **Clinical Orthop.**, v.270, p.237-246, 1991.
- HEIM, S., MITELMAN, F. **Cancer cytogenetics**. New York: Alan R. Liss, 1987, 309p.
- HEIM, S., MITELMAN, F. Primary chromosome abnormalities in human neoplasia. **Advances in Cancer Res.**, v.52, p.1-43, 1989.
- HEIM, S., MANDAH, N., JIN, Y., STRÖMBLAD, S., LINDSTRÖN, E., SALFORD, L.G., MITELMAN, S. Trisomy 7 and sex chromosome loss in human brain tissue. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.52, p.136-138, 1989.
- HELLAND, A., HOLM, R., KAERN, J., KARISEN, F., TROPE, C., NESLAND, J., BORRESEN, A.L. tp53 mutation and HPV-infection in primary cervical carcinomas. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.13.
- HERRMANN, M.E., LINDEN, M., LATIF, N.A., LALLEY, P.A., LANE, M.A. Expression of mutant p53 in thyroid tumors. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.11.
- HIRABAYASHI, Y., YOSHIDA, M.A., IKEUCHI, T., ISHIDA, T., KOJIMA, T., HIGAKI, S., MACHINAMI, R., TONOMURA, A. Chromosome rearrangements at 12q13 in two cases of chondrosarcomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.60, p.35-40, 1992.
- HÖFFLER, H., RUHRI, C., PÜTZ, B., WIRNSBERGER, G., HAUSER, H.

- Oncogene expression in endocrine pancreatic tumors. **Virchows Arch.**, v.55, p.355-361, 1988.
- HORDWITZ, J.M., PARK, S.-H., BOGENMANN, E., CHENG, J.-C., YANDELL, D.W., KAYE, F.J., MENNA, J.D., DRYJA, T.P. WEINBERG, R.A. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.2775-2779, 1990.
- HORSTHEMKE, B. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.1-7, 1992.
- HOVIG, E., LOTHE, R., FARRANTS, G., BROGGER, A., FODSTAD, O., BORRESEN, A.-L. Chromosome 13 alterations in osteosarcoma cell lines derived from a patient with previous retinoblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.57, p.31-41, 1991.
- HUMAN GENE MAPPING 11 (1991). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, 2200p., 1991.
- HUNTER, T. Cooperation between oncogenes. **Cell**, v.64, p.249-270, 1991.
- ISCN - An international system of human cytogenetic nomenclature. HARDEN, D.C., PATH, F.R.C., KLINGER, H.P. (Ed.). Karger, Basel, 1985. 117p.
- ISCN - Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an international system of human cytogenetic nomenclature. MITELMAN, F. (Ed.). Karger: Basel, 1991. 96p.
- JAMES, C.D., COLLINS, V.P. Molecular genetic characterization of CNS tumor oncogenesis. **Advances in Cancer Res.**, v.58, p.121-142, 1992.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Tecido Osseo. In: ---, (Ed.). **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p.137-161.
- KAHN, L.B., WOOD, F.D., ACKERMAN, L.V. Malignant chondroblastoma: Report of two cases and review of the literature. **Arch. Path.**, v.88, p.371-376, 1969.
- KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res.**, v.45, p.1437-1443, 1985.
- KNUDSON, A.G. Genes that predispose to cancer. **Mutation Res.**, v.247, p.185-190, 1991.
- KOVACS, C., BRUSA, P. Clonal chromosome aberrations in normal kidney tissue from patients with renal cell carcinoma. **Cancer Genet.**



Cytogenet., v.37, p.289-290, 1989.

- KOVAR, H., PILLWEIN, K. Identification of a germline p53 gene mutation at a hotspot outside exon 7 in siblings suffering from brain tumor and rhabdomyosarcoma. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.11.
- LEE, J.S., PATHAK, S., HOPWOOD, V., TOMASOVI, B., MULLINS, T.D., BAKER, F.L., SPITZER, G., NEIDHART, J.A. Involvement of chromosome 7 in primary lung tissue. **Cancer Res.**, v.47, p.6349-6352, 1987.
- LEVINE, A.J. The p53 tumor-suppressor gene. **The N. Engl. J. Med.**, v.326, p.1350-1352, 1992.
- LICHTENSTEIN, L. **Bone tumors**. 3.ed., Saint Louis: C.V.Mosby, 1965. p.362-383.
- LOTHE, R.A., FOSSLI, T., DANIELSEN, H.E., STENWIG, A.E., NESLAND, J.M., GALLIE, B., BORRESEN, A.L. Colorectal tumours examined for genetic changes at chromosomes 13 and 17, with special reference to the Rb1 and tp53 genes. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.20.
- MALAWER, M.M., ABELSON, H.T., SUIT, H.D. Sarcomas of bone. In: DE VITTA Jr., V.T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S.A. (Ed.). **Principles & practice of oncology**. Philadelphia: J.B.Lippincott, 1985, p.1293-1342.
- MALKIN, D., JOLLEY, K.W., BARBIER, N., LOOK, A.T., FRIEND, S.H., GEBHARDT, M.C., ANDERSEN, T.I., BORRESEN, A.-L., LI, F.P., GARBER, J., STRONG, L.C. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. **The N. Eng. J. Med.**, v.326, p.1309-1315, 1992.
- MANDAHL, N., HEIM, S., KRISTOFFERSSON, U., MITELMAN, F., RYDHOLM, A., ROOSER, B., WILLEN, H. Multiple cytogenetic abnormalities in a case of osteosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.23, p.257-260, 1986.
- MANDAHL, N., HEIM, S., ARHEDEN, K., RYDHOLM, A., WILLEN, H., MITELMAN, F. Chromosomal rearrangements in chondromatous tumors. **Cancer**, v.65, p.242-248, 1990.
- MANDAHL, N., WILLEN, H., RYDHOLM, A., HEIM, S., MITELMAN, F.

- Rarrangement of band q13 on both chromosomes 12 in a periosteal chondroma. **Gene. Chromosome Cancer**, v.6, p.121-123, 1993a.
- MANDAHL, N., BALDETORP, B., FERNO, M., AKERMAN, M., RYDHOLM, A., HEIM, S., WILLEN, H., KILLANDER, D., MITELMAN, F. Comparative cytogenetic and DNA flow cytometric analysis of 150 bone and soft-tissue tumors. **Int. J. Cancer**, v.53, p.358-364, 1993b.
- MARK, J., WEDELL, B., DAHLENFORS, R., GREPP, C. BURIAN, P. Human benign chondroblastoma with a pseudodiploid stemline characterized by a complex and balanced translocation. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.58, p.14-17, 1992.
- MARSHALL, C.J. Tumor supressor genes. **Cell**, v.64, p.313-326, 1991.
- MATSUMURA, K., KALLIONIEMI, A., KALLIONIEMI, O., CHEN, L., SMITH, H.S., PINKEL, D., GRAY, J., WALDMAN, F.M. Deletion of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in Situ Hybridization. **Cancer Res.**, v.52, p.3474-3477, 1992.
- MATSUNO, T., ICHIOKA, Y., YAGI, T., ISHII, S. Spindle-cell sarcoma in patients who have osteochondromatosis. **J. Bone Joint Surg. (AM)**, v.70, p.137-141, 1988.
- MERTENS, F., HEIM, S., MANDAHL, N., JOHANSSON, B., RYDHOLM, A., BIORKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Clonal chromosome aberrations in a keratoacanthoma and a basal cell papilloma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.39, p.227-232, 1989.
- MITELMAN, F. **Catalogue of chromosome aberrations in cancer**. New York: Alan R. Liss, 1985. 701p.
- . Patterns of chromosome variation in neoplasia. In: OBE, G., NATARAJAN, A.T. (ed.). **Chromosomal aberrations**. New York: Springer-Verlag, 1990. p.86-100.
- . **Catalogue of chromosome aberrations in cancer**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 2v., 1991. 1987p.
- MITELMAN, F., HEIM, S. Consistent involvement of only 71 of the 329 chromosomal bands of the human genome in primary neoplasia-associated rearrangements. **Cancer Res.**, v.48, p.7115-7119, 1988.
- MOLENAAR, W.M., BERG, E., OOSTERHUIS, J.W., de JONG, B., DAM, A., WIERSEMA, J., DIJKHUIZEN, T., ECHTEN, J. Cytogenetic findings in giant cell tumors of bone (GCTBs). In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**.

Porto/Espinho. 1992. p.26.

- MROZEK, K., KARAKOUSIS, C.P., BLOOMFIELD, C.D. Chromosome 12 breakpoints are cytogenetically different in benign and malignant lipogenic tumors: localization of breakpoints in lipoma to 12q15 and in myxoid liposarcoma to 12q13.3. **Cancer Res.**, v.53, p.1670-1675, 1993.
- MURRAY, J.A., SUTOW, W.W., MARTIN, R.G., FERNANDEZ, C., HOLLAND, J.F. Bone and cartilage tumors. In: Holland J.F., Frei, III, E. (Ed.). **Cancer medicine**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. p.2159-2180.
- NAGATA, Y., ABE, M., KOBAYASHI, K., YOSHIDA, K., ISHIBASHI, T., NAOE, T., NAKAYAMA, E., SHIKU, H. Glycine to aspartic acid mutations at codon 13 of the c-Ki-ras gene in human gastrointestinal cancers. **Cancer Res.**, v.50, p.480-482, 1990.
- NOGUERA, R, NARARRO, S, TRICHE, T.J. Translocation (11;22) in small cell osteosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.45, p.121-124, 1990.
- NOWEL, P.C., CROCE, C.M. Chromosomes, genes, and cancer. **Am. J. Pathol.**, v.125, p.8-15, 1986.
- OGISO, Y., OIKAWA, T., KONDO, N., KUZUMAKI, N., SUGIHARA, T., OHURA, T. Expression of proto-oncogenes in normal and tumor tissues of human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.90, p.841-844, 1988.
- PARKIN, D.M., STILLER, C.A., NECTOUX, J. International variations in the incidence of childhood bone tumours. **Int. J. Cancer**, v.53, p.371-376, 1993.
- PATHAK, S. Cytogenetics of epithelial malignant lesions. **Cancer**, v.70, p.1660-1670, 1992.
- PAUL, J. Tumor suppressor genes: oncogenes update. **Histopathology**, v.15, p.1-9, 1989.
- PAULIEN, S., TURC-CAREL, C., DAL CIN, P., SANDBERG, A.A., GEMMIL, R. Mapping studies around the 12q13-q14 region in adipose tissue tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.52, p.262, 1991 (Abstracts).
- PFEIFER, F.M., BRIDGE, J.A., NEFF, J.R., MOURON, B.J. Cytogenetic findings in aneurysmal bone cysts. **Gene. Chromosome. Cancer**, v.3, p.416-419, 1991.
- PIEROTTI, M.A., SOZZI, G., BONGARZONE, I., GRECO, A., DELLA PORTA, G. Chromosome rearrangements and oncogene activation in thyroid tumors. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR



- GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.31.
- RAITANO, A.B., KORC, M. Growth inhibition of a human colorectal carcinoma cell line by Interleukin 1 is associated with enhanced expression of γ -Interferon receptors. **Cancer Res.**, v.53, p.636-640, 1993.
- REISSMANN, P.T., SIMON, M.A., LEE, W.-H., SLAMON, D.J. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. **Oncogene**, v.4, p.839-843, 1989.
- ROGATTO, S.R., CASARTELLI, C. Cytogenetic analysis of human meningiomas. **Rev. Bras. Genet.**, v.11, p.729-744, 1988.
- ROQUE, L., SOARES, P., GOMES, P., CORREIA, C., CARRELO, C., CLODE, A., CASTEDO, S., SOARES, J. Multinodular goiters: a cytogenetic study of 14 cases. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.33.
- ROSEN, G., EILBER, F.R., ECKARDT, J., MIRRA, J. Ewing's sarcoma. In: HASKELL, C.M. (Ed.) **Cancer treatment**. 3.ed. Philadelphia: W.S.Sauders, 1990. p.547-557.
- SAKLATVALA, J. Tumor necrosis factor- α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. **Nature**, v.322, p.547-549, 1986.
- SANDBERG, A.A. Application of cytogenetics in neoplastic diseases. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v.22, p.219-274, 1985.
- . Chromosomal lesions and solid tumors. **Hosp. Pract.**, v.23, p.93-106, 1988.
- . **The chromosomes in human cancer and leukemia**. 2.ed., New York: Elsevier, 1990. 1315p.
- . Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia. **Mutation Res.**, v.247, p.231-240, 1991.
- SANDBERG, A.A., TURC-CAREL, C., GEMMILL, R.M. Chromosomes in solid tumors and beyond. **Cancer Res.**, v.48, p.1049-1059, 1988.
- SATO, T., AKIYAMA, F., SAKAMOTO, G., KASUMI, F., NAKAMURA, Y. Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. **Cancer Res.**, v.51, p.5794-5799, 1991.
- SCHAJOWICZ, F., MCGUIRE, M.H. Diagnostic difficulties in skeletal pathology. **Clin. Orth.**, v.240, p.281-310, 1989.

- SCHEFFER, H., KRUIZE, Y.C.M., OSING, J., KUIKEN, G., OOSTERHUIS, J.W., LEEUW, J.A., KOOPS, H.S., BURS, C.H.C.M. Complete association of loss of heterozigosity of chromosomes 13 and 17 in osteosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.53, p.45-55, 1991.
- SCHWARTZ, H.S., BUTLER, M.G., JENKINS, R.B., MILLER, D.A., NOSES, H.L. Telomeric associations and consistent growth factor over expression detected in giant cell tumor of bone. **Cancer. Genet. Cytogenet.**, v.56, p.263-276, 1991.
- SEIZINGER, B.R., KLINGER, H.P., JUNIEN, C., NAKAMURA, Y., Le BEAU, M., CAVENEE, W., EMANUEL, B., PONDER, B., NAYLOR, S., MITELMAN, F., LOUIS, D., MENON, A., NEWSHAM, I., DECKER, H., KAEHLBLING, M., HENRY, I., DEIMLING, A. Report of the committee on chromosome and gene loss in human neoplasia. **Human Gene Mapping 11** (1991). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, p.1080-1096, 1991.
- SELLEN, J.R., MOORHEAD, P.S., OEHLERT, M.L., PATTERSON, D.F. The giemsa banding pattern of the canine karyotype. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.15, p.380-387, 1975.
- SERUCA, R., DAVID, L., HOLM, R., VEIGA, I., NESLAND, J.M., FANGAN, B.M., CASTEDO, S., BORRESEN, A.L., SOBRINHO-SIMÕES, M. p53 expression/mutation in gastric carcinomas. In: **EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS**, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.12.
- SHILOH, Y., MOR, O., MANOR, A., BAR-AM, I., ROTMAN, G., EUBANDS, J., GUTMAN, M., RANZANI, G.N., HOULDSWORTH, J., EVANS, G., AVIVI, L. DNA sequences amplified in cancer cells: an interface between tumor biology and human genome analysis. **Mutation Res.**, v.276, p.329-337, 1992.
- SIRSAT, N.V., DOCTOR, V.M. Benign chondroblastoma of bone. **J. Bone Joint Surg. (AM)**, v.52B, p.741-745, 1970.
- SINOVIC, J.F., BRIDGE, J.A., NEFF, J.R. Ring chromosome in parosteal osteosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.62, p.50-52, 1992.
- SLAMON, D.J., GODOLPHIN, W., JONES, L.A., HOET, J.A., WONG, S.G., KEITH, D.E., LEVIN, W.J., STUART, S.G., UDOVE, J., ULLRICH, A., PRESS, M.F. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v.244, p.707-712, 1989.
- SOARES, P., ROQUE, L., WYNFORD-THOMAS, D., CASTEDO, S., SOARES, H., SOBRINHO-SIMÕES, M. Rearrangements of ret proto-oncogene in

- papillary thyroid carcinomas. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.35.
- SOBEL, M.E. Metastasis suppressor genes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.82, p.267-276, 1990.
- SOLOMON, E., BORROW, J., GODDARD, A.D. Chromosome aberrations and cancer. **Science**, v.254, p.1153-1160, 1991.
- SPANDIDOS, D. Oncogenes and onco-suppressor genes as prognostic indicators in the development of human tumors. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.9.
- SREEKANTIAH, C., LEONG, S.P.L., DAVIS J.R., SANDBERG, A.A. Cytogenetic and flow cytometric analysis of a clear cell chondrosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.52, p.193-199, 1991a.
- SREEKANTIAH, C., LEONG, S.P.L., KARAKOUSIS, C.P., McGEE, D.L., RAPPAPORT, W.D., VILLAR, H.V., NEAL, D., FLEMING, S., WANKEL, A., HERRINGTON, P.N., CARMONA, R., SANDBERG, A.A. Cytogenetic profile of 109 lipomas. **Cancer Res.**, v.51, p.422-433, 1991b.
- STEVENSON, D.A., MILNER, B.H., ALLAN, L., KITCHENER, H.C., HAITES, N.E. Evidence for complete homozygosity of chromosome 17, containing a mutated p53 gene in a case of poorly differentiated ovarian serous adenocarcinoma. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 3, 1992, Porto/Espinho-Portugal. **Programme and Abstracts**. Porto/Espinho. 1992. p.10.
- TEYSSIER, J.R. Nonrandom chromosomal changes in human solid tumors: Application of an improved culture method. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.79, p.1189-1198, 1987.
- . The chromosomal analysis of human solid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.37, p.103-125, 1989.
- TEYSSIER, J.R., FERRE, D. Frequent clonal chromosomal changes in human non-malignant tumors. **Int. J. Cancer**, v.44, p.828-832, 1989.
- TIEPPO, C.E., CHIOLI, J.R., CURCELLI, E.C., de LUCCA, E., PEREIRA, H.D.R. Instabilidade cromossômica induzida pela bleomicina em tumores ósseos benignos formadores de cartilagem. **Rev. Bras.**



- Ortop.**, v.27, p.615-622, 1992.
- TOGUUCHIDA, J., ISHIZAKI, K., SASAKI, M.S., IKENAGA, M., SUGIMOTO, M., KOTOURA, Y., YAMAMURO, T. Chromosomal reorganization for the expression of recessive mutation of retinoblastoma susceptibility gene in the development of osteosarcoma. **Cancer Res.**, v.48, p.3939-3943, 1988.
- TOGUUCHIDA, J., YAMAGUCHI, T., DAYTON, S.H., BEAUCHAMP, R.L., HERRERA, G.E., ISHIZAKI, K., YAMAMURO, T., MEYERS, P.A., LITTLE, J.B., SASAKI, M.S., WEICHSELBAUM, R.R., YANDELL, D.W. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. **The N. Engl. J. Med.**, v.326, p.1301-1308, 1992.
- TURC-CAREL, C., PHILIP, I., BERGER, M.-P., PHILIP, T., LENOIR, G.M. Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation $t(11;22)(q24;q12)$. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.12, 1-19, 1984.
- TURC-CAREL, C., AURIAS, A., MUGNERET, F., LIZARD, S., SIDANER, I., VOLK, C., THIERY, J.P., OLSCHWANG, S., PHILIP, I., BERGER, M.P., PHILIP, T., LENOIR, G.M., MAZABRAUD, A. Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases and remarkable consistency of $t(11;22)(q24;q12)$. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.32, p.229-238, 1988.
- UNNI, K.K., DAHLIN, D.C. Premalignant tumors and conditions of bone. **The Am. J. Surg. Pathol.**, v.3, p.47-60, 1979.
- VANNI, R., COSSY, L., LICHERI, S. Atherosclerotic plaque as a benign tumor? **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.47, p.273-274, 1990.
- VARELLA-GARCIA, M., TAJARA, E.H. **Métodos para análise de cromossomos humanos: Manual básico de protocolos.** São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, 1991. 60p.
- WANG-PENG, J., FRETER, C.E., KNUTSEN, T., NANFRO, J.J., GAZDAR, A. Translocation $t(11;22)$ in esthesioneuroblastoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.29, p.155-157, 1987.
- WATANABE, S., FURUYA, T., OCHI, H. Chromosome fragile sites for cancer research. In: SLUYSER, M. (Ed.). **Molecular biology of cancer genes.** New York: Ellis Horwood, 1990. p.24-44.
- WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.49, p.3713-3721, 1989.
- . Tumor suppressor genes. **Science**, v.254, p.1138-1146, 1991.



WILLIAMS, N.N., DALY, J.M. Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v.171, p.257-266, 1990.

WUNDER, J.S., CZITROM, A.A., KANDEL, R., ANDRULIS, I.L. Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.83, p.194-200, 1991.

ZIEGLER, A., FIELD, L.L., SAKAGUCHI, A.Y. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. **Human Gene Mapping 11** (1991). **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, p.295-336, 1991.

* As citações bibliográficas e a lista de referências foram feitas de acordo com a norma NBR 6023 da ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: referências bibliográficas**. Rio de Janeiro, 1989. 18p).

a.1. Meio Ham F-10 incompleto (SIGMA)

- 9,8 g de pó de meio de cultura e 0,6 g de bicarbonato de sódio diluídos em 1000 ml de água desionizada autoclavada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada em volumes de 100 ml a 5 °C, por um período aproximadamente de 30 dias.

a.2. Meio Ham F-10 incompleto (CULTILAB)

Está pronto para o uso. Foi estocado a 40°C, por aproximadamente 30 dias.

a.3. Meio Ham F-10 completo

- 100 ml de meio de cultura incompleto
- 1 ml de solução de penicilina/estreptomicina ou penicilina/quemisetina em concentração final de 125 U/ml : 125ug/ml ou 125 U/ml : 5ug/ml

- 20 ml de soro fetal bovino (CULTILAB)

- 1 ml de solução de glutamina 200mM

- 20 ul de solução de insulina

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

IX. APENDICE

IX.1. Soluções

Foram utilizadas soluções de aminoácidos, antibióticos, antimicótico, bloqueador metafásico, corantes, enzimas, meios de cultura, soluções fixadora, hipotônica e salina de acordo com as concentrações e técnicas de prepararo correntemente em uso no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Biologia do IBILCE, UNESP (Varella-Garcia & Tajara, 1991). As soluções serão descritas a seguir.

IX.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

a. Meios de cultura

a.1. Meio Ham F-10 incompleto (SIGMA)

- 9,8 g do pó de meio de cultura e 0,6 g de bicarbonato de sódio diluídos em 1000 ml de água desionizada autoclavada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada em volumes de 100ml a 5 °C, por um período aproximadamente de 30 dias.

a.2. Meio Ham F-10 incompleto (CULTILAB)

Está pronto para o uso. Foi estocado a 4°C, por aproximadamente 30 dias.

a.3. Meio Ham F-10 completo

- 100 ml de meio de cultura incompleto
- 1 ml de solução de penicilina/estreptomicina ou penicilina/quemeticetina em concentração final de 125 U/ml : 125ug/ml ou 125 U/ml : 5ug/ml
- 20 ml de soro fetal bovino (CULTILAB)
- 1 ml de solução de glutamina 200mM
- 20 ul de solução de insulina

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



b. Solução salina de Hanks sem Ca e Mg

- 1000 ml de água desionizada
- 8,0 g de NaCl
- 0,4 g de KCl
- 1,0 g de glicose
- 60 mg de KH₂PO₄
- 47,5 mg de Na₂HPO₄
- 17 mg de vermelho de fenol

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

A solução de Hanks recebeu diferentes antibióticos de acordo com sua finalidade, se para transporte da amostra do hospital para o laboratório, ou para lavagem do tecido. A anfotericina B foi utilizada apenas na solução de lavagem, em virtude de sua grande toxicidade. Ambos os tipos foram estocados a 4°C, por períodos de até seis meses.

b.1. Para transporte das amostras

- 100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg
- 2 ml de solução de penicilina/estreptomicina ou penicilina/quemisetina com concentração final de 250 U/ml : 250 ug/ml ou 250 u/ml : 10 ug/ml
- 0,2 ml de sulfato de gentamicina, concentração final 0,04 mg/ml

b.2. Para lavagem das amostras de tecidos

- 100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg
- 2 ml de solução de penicilina/estreptomicina ou penicilina/quemisetina com concentração final 250 U/ml : 250 ug/ml ou 250 : 10 ug/ml
- 0,2 ml de sulfato de gentamicina, concentração final 0,04 mg/ml
- 50 ul de anfotericina B, concentração final 2,5 ul/ml.



c. Antibióticos

c.1. Solução de penicilina/estreptomicina (12500 U/ml/
12500ug/ml) (SQUIBB/CEME)

A solução de uso foi obtida a partir de:

- 0,5 ml de solução-mãe de penicilina com concentração de 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 de 500.000 ug/ml, preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril

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

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

c.2. Solução de penicilina/quemicetina (12500U/ml/500ug/ml)
(SQUIBB/CARLO-ERBA)

A solução de uso foi obtida a partir de:

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

- 0,5 ml da solução-mãe de quemicetina com concentração de 40000 ug/ml preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril.

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

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

A solução de L-glutamina foi obtida diluindo-se:

- 2,92 g de L-glutamina em 100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg.

Após a esterilização por filtração, foi estocada a -20°C por 1 ano.



e. Solução de insulina (BIOBRAS U-40 ou U-40)

A solução comercial possui concentração de 40 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada a 4°C.

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

A solução comercial possui concentração de 20 U/ml e está pronta para uso, foi estocada a 4°C por 1 ano e seis meses.

g. Solução de anfotericina B (Fungizon-SQUIBB) (50 mg/ml)

A solução de anfotericina foi preparada diluindo-se:

- 50 mg de anfotericina B em 10 ml de água desionizada estéril. A solução foi estocada a -20°C.

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

A solução de colcemide foi preparada a partir de :

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

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

i. Solução hipotônica

A solução hipotônica compreendeu uma solução aquosa de citrato de sódio 1,0%, estocada a temperatura ambiente ou a 4°C, por dois a três meses.

j. Fixador

A solução de fixador foi preparada minutos antes de seu uso misturando-se:

- 3 partes de metanol

- 1 parte de ácido acético glacial

Foi preparado momentos antes do uso.



k. Tampão Sorensen, pH 6,8

Foi preparado a partir de :

- 1,13 g de difosfato de sódio (Na_2HPO_4)
- 49 ml de solução A
- 51 ml de solução B
- 200 ml de água desionizada

Foi mantido a 4°C por no máximo seis meses.

o. Corante Giemsa (MERCK) (2%)

k.1. Solução A

Foi preparada com:

- 0,5g de Giemsa em 33 ml de glicerina durante duas horas a 60°C em banho maria
- 14,196 g de difosfato de sódio (Na_2PO_4)
- 500 ml de água desionizada

k.2. Solução B

Foi preparada com:

- 13,61 g de monofosfato de potássio (KH_2PO_4)
- 500 ml de água desionizada

A estocagem das três soluções foi feita a 5°C por seis meses.

l. Solução de tripsina (BIOBRAS) para bandamento cromossômico (0,2%)

A solução foi preparada dissolvendo-se 0,06 g de tripsina em 60 ml de PBS minutos antes do uso.

A solução estava pronta para o uso e foi mantida a -20°C .

m. Solução de tripsina/EDTA (CULTILAB) (para repique de culturas)

A solução está pronta para o uso e foi mantida a -20°C , por um período de até seis meses.

n. Solução salina de PBS

A solução foi preparada dissolvendo-se:



X. AGRADECIMENTOS

- 8 g de NaCl
- 0,2 g de KCl
- 1,15 g de difosfato de sódio (Na_2HPO_4)
- 0,2 g de monofosfato de potássio (KH_2PO_4)
- 1000 ml de água desionizada

A solução foi mantida a 4°C por no máximo 6 meses.

o. Corante Giemsa (MERCK) (2%)

A solução mãe foi obtida dissolvendo-se:

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

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

Agradeço ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, Araraquã, pela disponibilidade das condições materiais.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Tereza da Silva, em especial, pelo carinho e auxílio em todo o decorrer deste trabalho. Também agradeço às minhas amigas, principalmente aquelas em que a amizade é o melhor presente.

Agradeço aos Profas. Dra. Eliane Silva e Eliane M. Versuthe, pelo incentivo, colaboração e ajuda a me dedicados e à Profa. Eng. M. S. Bartelli, pela amizade e incentivo ao ingresso no curso de pós-graduação, e pela introdução nessa área de pesquisa.

Agradeço aos Profas. Drs. Adilson S. C. Silva, Eliane M.A. Carareto, Horácio E.M.C. Arruda, Maria Amélia S. Corradi e Maria Tereza V. A. Oliveira pela amizade, carinho e incentivo constantes a mim dedicados.

Agradeço aos colegas Josué R. dos Santos, Rosana Silistino e Sidney Oliveira em o apoio laboratorial e convivência amiga.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial às Secretárias Yone S. Dias, Simone C. Fernandes e Olga H.



X. AGRADECIMENTOS

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

A Profa. Dra. Marileila Varella Garcia, exemplo de seriedade e capacidade científica, pela orientação no planejamento e execução deste estudo, pela oportunidade e pela confiança atribuída.

A Profa. Dra. Agnes C. Fett Conte, pelo carinho e interesse dado a este estudo, pela amizade dedicada, pessoa a quem tive como exemplo de persistência, carinho e amor ao trabalho.

A Profa. Dra. Lúcia Martelli, pela atenção, pela análise cuidadosa e pelas valiosas sugestões, que enriqueceram significativamente este estudo.

Ao médico ortopedista Oswaldo J. De Conti, pelo envio das amostras e pela atenção, interesse e dedicação a este estudo.

Aos pacientes e seus familiares, que em momentos tão difíceis contribuíram anonimamente para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. James R. Coleman, do Departamento de Botânica, pela revisão do Abstract.

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pela disposição das condições materiais.

A Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, em especial, pelo carinho, atenção e amizade com que me auxiliou no decorrer deste trabalho, nos inúmeros momentos de dúvidas, principalmente naqueles em que a tristeza e o desânimo prevaleciam.

As Profas. Dras. Ana Elizabete Silva e Eliana M. Versutte, pelo incentivo, colaboração e amizade a mim dedicados e à Profa. Eny M. G. Bertollo, pela amizade e incentivo ao ingresso no curso de pós-graduação, e pela introdução nesta área de pesquisa.

As Profas. Dras. Adelina B. C. Silva, Cláudia M.A. Carareto, Hermione E.M.C. Bicudo, Maria Astride S. Corradi e Maria Tercília V. A. Oliveira pela amizade, carinho e incentivo constantes a mim dedicados.

Aos técnicos Josué R. dos Santos, Rosana Silistino e Sidnei Olívio pelo apoio laboratorial e convivência amiga.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia, em especial às Senhoras Yone S. Dias, Simone C. Fernandes e Olga B.



Pelicer, pelo carinho e amizade a mim dedicados; às funcionárias da Biblioteca pela presteza nos serviços de comutação bibliográfica, e às secretárias da Seção de Pós-Graduação, pela atenção.

A amiga Profa. Mônica V. Nunes pela amizade sincera, carinho, dedicação e apoio, principalmente nas horas mais difíceis.

Aos amigos Profa. Fádua R. C. Rits e Médico Veterinário Alexander L. M. Rits pela amizade verdadeira, atenção e carinho a mim dedicados.

A amiga Profa. Patrícia F. Ribeiro, pela grande amizade e carinho sempre dedicado.

As companheiras de Laboratório Profas. Érika C. Pavarino e Grasiela D. C. Severi Aguiar, pela amizade, troca de experiências, esforços e solidariedade nos momentos de desabafo.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, antigos e atuais, pelo ambiente de trabalho sempre agradável.

Aos meus irmãos e cunhados, Marcos, Silvana, Sônia, Júlio, Stela e Dênio, pela amizade, compreensão e por todo o carinho, apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos Vinícius, Ana Eliza, Ana Amélia e Carolina, pelo amor, carinho e pela serenidade que me transmitiam.

Aos meus pais Walter e Maria Teresinha, pelo amor, carinho, estímulo e sacrifícios dispensados no decorrer de minha vida.

A minha querida avó Idalina, por tanta preocupação, esperança, amor e dedicação.

Aos meus sogros Celso e Nelzi, pela acolhida carinhosa e incentivo.

Ao meu querido esposo, Marcelo, pelo amor, dedicação, compreensão, amizade e principalmente pela infinita paciência a mim dedicados.

A Deus por me manter firme e forte em meu caminho.



