



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**Estudos citogenéticos de mutações na transformação de neoplasias
benignas em malignas do sistema musculoesquelético**

ELISA ITO KAWAHARA

**BOTUCATU - SP
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**Estudos citogenéticos de mutações na transformação de neoplasias
benignas em malignas do sistema musculoesquelético**

ELISA ITO KAWAHARA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo RazeraBaruffi

MONOGRAFIA APRESENTADA AO INSTITUTO
DE BIOCIÊNCIAS, CAMPUS DE BOTUCATU,
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHAREL
EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**BOTUCATU - SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Kawahara, Elisa Ito.

Estudos citogenéticos de mutações na transformação de neoplasias benignas em malignas do sistema musculoesquelético / Elisa Ito Kawahara. – Botucatu : [s.n.], 2012

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

Orientador: Marcelo RazerBaruffi

Capes: 20205007

1. Citogenética. 2. Tumores – Tratamento. 3. Câncer – Aspectos genéticos. 4. Ossos – Inflamação. 5. Tecido muscoesquelético. 6. Mutagênese.

Palavras-chave: Citogenética; Neoplasias benignas; Neoplasias malignas; Sistema musculoesquelético; Transformação.

Agradecimentos

Eu não poderia pensar neste trabalho como apenas meu. Foram tantas pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente que seria impossível dizer que cheguei ao meu objetivo sozinha.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, que sempre souberam exercer seus papéis com tanta excelência e dedicação. Sempre me guiaram pelos caminhos certos, me apoiaram e com certeza são as pessoas mais importantes na minha conquista.

Obrigada também aos meus irmãos, Fabio e Rafael, por apenas serem quem são. Refletindo vejo o quanto a vida teria sido mais dura e complicada sem eles.

Agradeço ao meu orientador, Marcelo Baruffi, pela confiança. Gostaria de agradecer também a todos os funcionários do Departamento de Genética do IBB, em especial à Rosana, Valquiria, Betina, Deise e Zé por toda paciência e ajuda. Obrigada também ao professor Danilo Moretti pela disponibilidade de seu laboratório.

Devo agradecer também a toda equipe do Hospital Amaral Carvalho, em especial ao Thiagus, por terem disponibilizado seus serviços e fornecido as amostras para pesquisa.

Obrigada aos meus colegas e amigos de laboratório, João e Bruna, pelo companheirismo e pelas histórias compartilhadas.

Obrigada à República TPM, por ter me ajudado e acolhido quando precisei, além de terem feito desse meu último ano inesquecível. Obrigada família TPM.

Obrigada Ivan, Neto, Mazza, Leo, Bruno, Matheus e Felipe por nunca terem deixado de ser a minha alegria nos finais de semana em Indaiatuba nesses últimos anos e pela amizade desde sempre.

Finalmente, obrigada aos meus amigos de sala e companheiros de intervalo, que sempre estiveram ao meu lado, principalmente à Simone, Diego, Nadine e Hugo. Obrigada também ao Júlio, que por muitas vezes foi a força à mais que precisei.

A todos esses, obrigada por todos os momentos vividos e compartilhados, bons e ruins, nesses quatro anos de faculdade, e por terem feito parte dos melhores anos que já vivi.

*“Que todo o mundo tenha o direito de aprender a ler, eis o que com o tempo vos
desgosta; não só de escrever, mas de pensar.”*

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

O câncer tem sido alvo de incessantes pesquisas sobre sua etiologia, desenvolvimento, progresso e tratamentos. Sua importância no campo científico se dá pela sua alta taxa de mortalidade e morbidade. O fato de que seja uma doença genética, que pode ter interferência ambiental e dietética, está cada vez mais elucidado, porém ainda existem muitos mecanismos a serem desvendados.

As neoplasias ósseas, benignas ou malignas, e processos inflamatórios ósseos acometem desde crianças até adultos e idosos, podendo causar danos físicos, incapacidade motora e até a morte. Portanto, presumir o potencial de transformação maligna das lesões benignas, agressividade tumoral, capacidade de invasão tecidual, probabilidade de recidiva, propensão ao desenvolvimento de metástases e resposta ao tratamento, é um valioso expediente na escolha da proposta terapêutica.

Estudos genéticos e citogenéticos têm ajudado a aumentar o entendimento sobre a carcinogênese, progressão tumoral, prognósticos e diagnósticos. Portanto, este estudo teve como objetivo detectar mutações e marcadores cromossômicos consistentes e recorrentes na transformação de tumores benignos em malignos no sistema musculoesquelético, através de análises com citogenética clássica, e relacionar estes achados com o prognóstico e diagnóstico dos pacientes.

Dentre os casos coletados e analisados citogeneticamente, foram selecionados três casos de lesões ósseas benignas e três lesões ósseas malignas tidas como a progressão tumoral dos respectivos casos benignos, para discussão e relato de caso. Os achados citogenéticos relataram consistentes alterações numéricas e estruturais clonais em regiões cromossômicas com genes importantes envolvidos na progressão tumoral. Pode-se citar a perda da região contendo o gene *TP53*, supressor tumoral, tanto em lesões benignas como em maligna, como um dos achados mais relevantes neste estudo.

Dessa forma, os resultados obtidos relataram alterações cromossômicas consistentes, mostrando uma íntima relação das mutações encontradas com a progressão tumoral e a malignidade dos tumores. Os resultados foram relacionados com a literatura e assim discutidas suas prováveis contribuições na etiologia, desenvolvimento e progresso de cada lesão.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	6
1.1 – Tecido ósseo.....	6
1.2 – Biogênese das células neoplásicas.....	7
1.3 – Neoplasias ósseas.....	11
1.3.1 – Neoplasias benignas.....	12
1.3.2 – Neoplasias malignas.....	14
1.4 – Osteomielite.....	16
1.5 – Genética das neoplasias ósseas.....	18
2 – OBJETIVOS.....	21
3 – JUSTIFICATIVA.....	22
4 – PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5 – RESULTADOS.....	24
5.1 – Análises citogenéticas.....	28
5.2 – Números modais.....	44
6 – DISCUSSÃO.....	53
7 – CONCLUSÃO.....	58

1 - INTRODUÇÃO

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

Embora atualmente seja conhecido como uma doença relacionada ao meio ambiente e de aparecimento mais esporádico, o câncer é considerado como uma doença genética baseada na presença de mutação genética como um fator consistente (Sudoyo et al., 2011). Esse conceito vem, entre outros, da constatação de anormalidades cromossômicas. Essas anormalidades podem surgir como uma consequência de erros randômicos de replicação, exposição à carcinógenos ou processos de reparo de DNA danificados (Sudoyo et al., 2011). É aparente que o câncer também seja uma doença causada por “mudanças epigenéticas” – padrões alterados de expressão dos genes, que são mediados por mecanismos que não afetam a sequência primária do DNA (Baylin et al., 2006).

No ano de 2003, houve 402.190 novos casos de neoplasias diagnosticadas em todo Brasil, com 129.960 mortes, possuindo a incidência de 357,1 casos novos a cada 100.000 homens e 403,5 casos novos no sexo feminino; sendo a segunda maior causa de óbitos com 12,7%, ficando atrás somente das patologias relacionadas com o aparelho circulatório (INCA, 2006). Os tumores ósseos têm sua maior ocorrência nos adolescentes, sendo os mais frequentes o tumor de Ewing e o osteossarcoma (INCA, 2006).

Recentes avanços tecnológicos em genética molecular e citogenética têm facilitado a identificação de alguns dos eventos críticos associados com o desenvolvimento do câncer (Baruffi et al., 2003). Além da citogenética convencional, ultimamente o campo continua crescendo rapidamente com o advento de tecnologias de citogenética molecular, como a hibridização por fluorescência *in-situ* (FISH) (Sudoyo et al., 2011).

1.1 – Tecido ósseo

O osso é um tipo de tecido conjuntivo e é ímpar, pois é um dos poucos tecidos que normalmente sofre mineralização. Bioquimicamente, este tecido é definido por sua distinta

mistura de elementos inorgânicos (65%) e matriz orgânica (35%). O componente inorgânico proporciona força e rigidez ao osso e é o depósito de 99% do cálcio, 85% do fósforo e 65% do sódio e magnésio do organismo (Kumar et al., 2000).

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

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

Os osteócitos são as mais numerosas células formadoras de tecido ósseo e se comunicam por uma rede de túneis onde passam produtos séricos, cálcio e fósforo. Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea e são derivadas das células progenitoras hematopoiéticas, que originam os monócitos e macrófagos, mas participam também do processo de liberação de substâncias que iniciam a renovação óssea (Kumar et al., 2000).

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

1.2 - Biogênese das células neoplásicas

Para compreender o processo carcinogênico e planejar formas mais eficazes de tratamento, é necessário entender a biologia da célula e suas interações nos tecidos, principalmente no que tange aos eventos genéticos envolvidos. Dentre esses eventos, as

mutações ocorrem em classes de genes como os proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo a danos no DNA, fatores celulares de crescimento e vias de sinalização tirosina quinases (Baruffi et al., 2002).

A tumorigênese é um processo de múltiplos passos, incluindo iniciação, promoção e progressão, e uma patologia multifatorial caracterizada pelo acúmulo de muitas alterações, entre as quais mudanças genéticas, citogenéticas e epigenéticas (Sandoval et al., 2012).

Tradicionalmente, o câncer tem sido visto como um conjunto de doenças que são desencadeadas por progressivas anormalidades genéticas que incluem mutações em genes supressores tumorais e oncogenes, e anormalidades cromossômicas (Baylin et al., 2006). O objetivo de grande parte da pesquisa do câncer é identificar genes que são afetados na transformação de uma única célula normal em uma neoplasia totalmente maligna e entender como cada uma destas alterações contribui para o fenótipo neoplásico (Kumar et al., 2000).

Fisiologicamente, a proliferação celular apresenta as seguintes etapas: a) ligação de um fator de crescimento a seu receptor específico na membrana celular; b) ativação transitória e limitada do receptor do fator de crescimento, que, por sua vez, ativa várias proteínas transdutoras de sinais na parte interna da membrana plasmática; c) transmissão do sinal transmitido através do citosol para o núcleo através de mensageiros secundários; d) indução e ativação de fatores reguladores nucleares que iniciam a transcrição do DNA; e) entrada e progressão da célula no ciclo celular resultando em sua divisão celular. (Kumar et al., 2000)

Genes que promovem o crescimento normal da célula, os proto-oncogenes, podem se converter a oncogenes por mutações pontuais, amplificação ou desregulação da expressão gênica (Sudoyo et al., 2011). Rearranjos cromossômicos são uma origem comum para ativação de mutações. São exemplos as amplificações e justaposições aberrantes de um promotor ou iniciador de um gene com um proto-oncogene, que causa expressão alterada de uma proteína de oncogene. Outro cenário é exemplificado por translocações, inversões e inserções que levam à formação de oncogenes de fusão. O mecanismo de fusão de oncogene tem recebido crescente atenção pois muitas dessas fusões levam à ativação de proteínas tirosina quinases (PTKs) em vários tipos de câncer (Sandberg et al., 2010).

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

Outro tipo de rearranjo genético envolve genes supressores tumorais. A inativação desses genes leva a uma proliferação celular descontrolada e baixa regulação da apoptose. As proteínas resultantes da expressão desses genes estão envolvidas em vários processos celulares como divisão, diferenciação, morte celular programada e reparo do DNA. Os genes supressores tumorais podem ser inativados por deleções do próprio gene, mutações e mudanças epigenéticas. Neste último caso, DNA metiltransferases metilam regiões CpG que estão localizadas na região promotora dos genes supressores tumorais, silenciando sua expressão. (Sandberg et al., 2010; Snustad et al., 2008)

O gene supressor tumoral *TP53* tem sido alvo em pesquisas sobre câncer pois está frequentemente mutado na doença e seu espectro de mutações nesses cânceres proporciona pistas para a etiologia e a patogenia molecular de neoplasias. O gene *TP53* é claramente um componente das vias bioquímicas centrais da carcinogênese; alterações na proteína p53 devido a mutações *missense* ou perda da proteína p53 por mutações *nonsense* ou *frameshift* fornecem vantagens seletivas para expansão clonal de células neoplásica e pré-neoplásicas (Greenblatt et al., 1994).

Estudos mostram que a proteína p53 está envolvida na transcrição de genes, síntese e reparo de DNA, plasticidade genômica e na morte celular programada. Esses complexos processos bioquímicos são realizados por maquinarias reguladas por múltiplas proteínas, portanto não é de se surpreender que o p53 se associa com outras proteínas celulares (Greenblatt et al., 1994)

O gene *PTEN/MMAC1*, também supressor tumoral, foi mapeado no braço longo do cromossomo 10, especificamente em 10q28 (Lin et al., 2002). Perda de função desse gene ocorre numa ampla gama de cânceres humanos através de mutações, deleções, transcrição silenciada ou instabilidade da proteína numa frequência que pode rivalizar com alterações do *TP53* em configurações específicas (Chalhoub et al., 2009).

O gene *PTEN* está relacionado com a via de sinalização PI3K, que regula diversos processos celulares incluindo metabolismo, sobrevivência, proliferação, apoptose, crescimento e migração celular. Esta via está amplamente relacionada à biogênese de neoplasias ósseas (Chalhoub et al., 2009).

Os produtos de vários genes neoplásicos e as cascatas regulatórias a que eles pertencem estão localizados no núcleo, como as moléculas que regulam a transdução de sinais e receptores de superfície celular. Incluem-se nessa categoria, de receptores fatores inibidores de crescimento, o TGF- β e proteínas que regulam a adesão celular, como as caderinas. A perda dessas proteínas pode favorecer o fenótipo maligno ao facilitar a desagregação das células (Kumar et al., 2000).

A homeostase de organismos multicelulares é criticamente dependente da correta interpretação dos abundantes sinais, aos quais as células são expostas durante sua vida (Baruffi et al., 2002). O controle da diferenciação e do crescimento celular ocorre por sinais conhecidos como fatores de crescimento (FC). São polipeptídeos considerados como moléculas sinalizadoras que agem como mediadores positivos da divisão celular, exercendo vários efeitos biológicos (Sweeney et al., 2001; Zwick et al., 2001). Estes fatores têm grande afinidade de interação pelos receptores transmembrana pertencentes à família dos receptores de tirosina quinase (receptor tyrosinekinase ou RTKs) (Longati et al., 2001). Suspeita-se que a grande maioria dos FC desempenha algum papel na carcinogênese (Kumar et al., 2000).

Sabe-se que os genes que impedem ou que induzem a morte celular programada também constituem importantes variáveis na equação do câncer. O primeiro gene antiapoptótico identificado foi o gene *BCL-2*, um membro de uma família de proteínas de homo e heterodimerização, algumas das quais inibem a apoptose, enquanto outras a favorecem (Kumar et al., 2000).

Mutações que alteram a sequência de nucleotídeos na cadeia de DNA, como transição ou transversão, acarretam um pareamento inadequado das bases nucleotídicas, promovendo distorções na configuração da dupla hélice de DNA. Erros no reparo do DNA danificado, se não forem imediatamente corrigidos, podem levar a célula ao longo da via de transformação neoplásica. Os genes de reparo do DNA são uma classe de genes que

produzem proteínas relacionadas com a função reparadora destas mutações (Lodish, et al., 2000). Mutações que levam à perda de função nos genes de reparo do DNA possuem papel importante na carcinogênese (Nishio et al., 2006).

Estudos citogenéticos desempenham um papel essencial na identificação de recorrentes anormalidades cromossômicas que são características de vários cânceres (Sandberg et al., 2010), demonstrando pontos críticos do genoma em classes de genes importantes na regulação do ciclo celular, como no caso dos genes *TP53*, *MDM2*, *hMSH2*, *CDK4*, entre outros (Nishio et al., 2006). Além disso, também podem desenvolver papel importante no prognóstico e no acompanhamento de pacientes com câncer, na determinação de possíveis alterações cariotípicas adicionais, o que pode indicar uma doença mais agressiva (Sandberg et al., 2010).

1.3 – Neoplasias Ósseas

As características clínicas dos tumores ósseos frequentemente não são específicas ou reconhecidas e, como consequência muitas vezes estes tumores não são detectados nas fases iniciais. Os sintomas indicadores da doença são dor, inchaço e desconforto (Rozeman et al., 2006). Mais de 200 distúrbios diferentes de desenvolvimento foram definidos e suas manifestações variam desde a simples perda de uma falange até deformidades disseminadas e fatais (Kumar et al., 2000).

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

A incidência destas lesões é de 0,8/100.000 habitantes e não apresenta tendência em aumentar ou diminuir, sendo que o maior número de seus diagnósticos primários é representado pelos osteossarcomas (35,1%), seguido por condrossarcomas (25,8%), sarcomas de Ewing (16,0%) e cordomas (8,4%) (Dorfman et al., 1998).

As neoplasias ósseas possuem uma grande variedade de subtipos histológicos, revelando a grande heterogeneidade de diferenciação celular nestes tumores. Fato este que

torna difícil o diagnóstico histológico diferencial, bem como o clínico-radiológico. Todas as dificuldades refletem-se na terapêutica e prognóstico destes tumores (Malawer et al, 1997).

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

As neoplasias ósseas possuem uma grande variedade de subtipos histológicos, revelando a grande heterogeneidade de diferenciação celular nestes tumores. Fato este que torna difícil o diagnóstico histológico diferencial, bem como o clínico-radiológico. Todas as dificuldades refletem-se na terapêutica e no prognóstico destes tumores (Malawer et al., 1997).

Já que muitos tumores ósseos e de partes moles são caracterizados por mudanças genéticas específicas, notáveis translocações resultantes de fusão de genes, o *status* genético do tumor pode proporcionar importantes informações clínicas (Walther et al., 2011). O conhecimento do padrão cariotípico destas lesões é importante para a constituição de indicadores de prognósticos mais precisos para estes grupos de lesões ósseas (Dorfman et al., 1998). Na oncologia clínica, a citogenética para os tumores sólidos é usada no diagnóstico, avaliação de resposta ao tratamento do câncer metastático, marcador de prognóstico e tratamentos específicos (Sudoyo et al., 2011) .

1.3.1 – Neoplasias benignas

Osteoblastoma

Dentre os tumores benignos, osteoblastoma, apesar de histologicamente relacionado com osteomaosteóide, é uma lesão de crescimento progressivo de uma dimensão maior, às vezes dolorida, e é caracterizada pela ausência de qualquer reação de formação óssea ao seu redor (Huvos, 1991). A transformação maligna de osteoblastoma para osteossarcoma tem sido relatada em raros casos. Em todos eles a transformação ocorreu em situações de

recorrência dos tumores. Porém, o diagnóstico de “malignidade” em osteoblastomas, recorrentes ou em outros casos, é particularmente difícil pelo comportamento agressivo em alguns casos (Horvai et al., 2006).

O osteoblastoma envolve mais comumente a coluna vertebral (34%), os ossos longos do esqueleto apendicular (30%), os pequenos ossos das mãos e pés (13,5%) assim como os do crânio, maxila e da mandíbula (14,6%) (Huvos, 1991).

Esta lesão causa dor, inchaço, desconforto, além da perda prematura da habilidade funcional, especialmente em lesões da coluna vertebral (escoliose, espasmo muscular e sintomas neurológicos), requerendo, assim, tratamento médico o mais cedo possível (Schajowicz, 2000).

Encondromas e Osteocondromas

Já entre as lesões cartilaginosas benignas estão os encondromas, que são caracterizados pelo crescimento benigno da cartilagem hialina que se desenvolve dentro da cavidade medular de um único osso; e os osteocondromas, que são saliências ósseas cobertas de cartilagem na superfície externa de um osso (Huvos, 1991). Estas são as lesões benignas mais frequentes e que podem progredir para condrossarcoma central ou periférico, respectivamente (Bovée et al., 2010).

Os encondromas são mais frequentemente encontrados como lesões únicas, porém podem ocorrer como múltiplas lesões, conhecidas como encondromatose, em condições como doença de Ollier e síndrome de Maffucci. O potencial para progressão maligna é maior quando múltiplas lesões estão presentes, e é relatado que seja maior do que 35% em doença de Ollier e maior que 50% na síndrome de Maffucci (Bovée et al., 2010).

Estas lesões se desenvolvem lentamente e gradualmente e são bem estabelecidas antes de queixas clínicas se tornem aparentes, resultando numa relativa curta duração dos sintomas. Estes tumores são mais comuns nas mãos onde cerca de 35% de todas as lesões ocorrem nos pequenos ossos tubulares das mãos (Huvos, 1991).

Os osteocondromas também podem ser encontrados de forma única ou em múltiplas lesões, visto como síndrome de múltiplos osteocondromas (MO). A transformação

maligna também é possível, porém ocorre num nível menor em MO (1-5%) do que em endondromatose (Bovée et al., 2010).

Estes tumores são frequentemente assintomáticos e, portanto, são descobertos apenas pela sensação de um nódulo indolor no osso envolvido. Estas lesões só ocorrem em ossos que se desenvolveram de cartilagens, mais frequentemente nos ossos tubulares longos (Huvos, 1991).

1.3.2 – Neoplasias malignas

Osteossarcoma

O osteossarcoma é o tumor sólido maligno mais comum na infância, ocorrendo em aproximadamente seis crianças em um milhão, por ano. Seu pico de incidência durante o estirão na adolescência sugere uma anormalidade nas células de crescimento do osso que leva à doença maligna (Hou et al., 2006). Potenciais células de origem dos osteossarcomas são as células-tronco mesenquimais, precursoras de osteoblastos (Cleton-Jansen et al., 2009).

Análises com técnicas de citogenética molecular e citogenética clássica com bandamento-G em osteossarcomas têm descrito cariótipos complexos com múltiplas alterações numéricas e estruturais (Sadikovic et al., 2009).

O nível de crescimento tumoral, o grau de destruição óssea e a severidade dos sintomas variam muito. O início súbito de sintomas graves é a regra geral, embora prolongado, desenvolvimento lento, dor leve a moderada e sensibilidade são frequentemente observados. Os ossos longos das extremidades do corpo são os sítios mais comumente acometidos, o fêmur está envolvido em 44% dos casos e o úmero em 15% (Huvos, 1991).

Durante as últimas décadas, o prognóstico dos pacientes com osteossarcoma tem sido notavelmente melhorado pela combinação de tratamentos cirúrgicos e quimioterápicos (Miwa et al., 2011). Porém, resultados continuam pobres para a maioria dos pacientes com osteossarcoma metastático ou recorrente, e até mesmo para alguns pacientes com a doença localizada, apesar da intensificação da quimioterapia inicial e/ou do uso de agentes quimioterápicos de segunda linha (Freeman et al., 2008).

Condrossarcoma

Já o condrossarcoma é um tumor maligno caracterizado pela formação de cartilagem, mas não de osso, pelas células tumorais (Schajowicz, 2000) e a maioria se desenvolve no tórax, pelve e ossos longos (Bovée et al., 2005). Adultos, principalmente na terceira até a sexta década de vida, são os mais afetados e sua distribuição é igual entre homens e mulheres (Bovée et al., 2005). Dor é o mais comum e primeiro sintoma sentido nesta doença, porém em alguns casos raros o condrossarcoma pode ser assintomático. Quando presentes, dor e sensibilidade são raramente severos, mas proporcionam uma valiosa ajuda para o diagnóstico, já que as lesões benignas não são sensíveis nem dolorosas (Huvos, 1991).

O condrossarcoma pode surgir de novo (primário) ou de lesões benignas cartilaginosas pré-existentes, como os encondromas ou osteocondromas (secundário). Condrossarcomas convencionais são graduados em nível I, II ou III. Também existem os tipos especializados como os de células claras, mesenquimal, indiferenciado e mixóide. Os fundamentos moleculares de alguns desses tumores podem se sobrepor, podendo ocorrer uma progressão ordenada de anormalidades moleculares adquiridas, com avanço do grau I para o grau III (Terek, 2006). Essa progressão é refletida pelo aumento do número de células, atipia celular, mudanças na matriz muco-mixóide e vascularização aumentada (Bovée et al., 2010).

A heterogeneidade histopatológica e clínica desse tipo tumoral e seus tumores relacionados, benignos e malignos, é refletida na diversidade das mudanças genéticas (citogenéticas e genéticas moleculares) descritas sobre esses casos (Sandberg, 2004). Revelando essas mudanças e estudando vias de sinalização de crescimento desregulado, muitas pistas para o tratamento específico do condrossarcoma têm sido descobertas durante a última década. Além disso, apesar das similaridades histológicas, diferenças genéticas entre condrossarcoma central e periférico sugerem que alvos terapêuticos podem diferenciar entre esses dois tipos (Bovée et al., 2010).

Fibrossarcoma

Outro tipo de tumor maligno é o fibrossarcoma, um tumor fibroblástico caracterizado por quantidades variáveis de produção de colágeno e sem qualquer tendência para formação de tumor ósseo, osteóide ou cartilagem, quer seja no seu local de origem ou em suas metástases. O fibrossarcoma pode surgir como uma lesão “primária” sem nenhuma condição óssea pré-existente associada. Mas também pode surgir como lesões “secundárias” de lesões ósseas benignas como displasia fibrosa, doença de Paget, infarto ou cisto ósseo e osteomielite (Huvos, 1991).

Esta lesão ocorre mais comumente nos ossos tubulares, preferencialmente na região metafisária ou epifisária da extremidade inferior do fêmur e na extremidade superior da fíbula. Os sintomas do fibrossarcoma não são típicos; são semelhantes aos apresentados por outros tumores ósseos malignos, sendo os mais comuns a dor e o inchaço, com uma massa palpável, mais frequente no fibrossarcoma periférico ou nos tumores com alto grau de malignidade (Schajowicz, 2000).

Histologicamente, o fibrossarcoma pode ser caracterizado pela presença de células fusiformes, geralmente arranjadas em feixes, associadas à substância intercelular fibrosa, onde finas fibras de colágeno estão normalmente arranjadas no chamado padrão espinha de peixe, sem qualquer evidência de formação osteóide ou cartilaginosa. A quantidade de fibras, a atipia nuclear e o número de figuras mitóticas podem variar consideravelmente entre diferentes casos e são considerados na classificação desses tumores, podendo ser classificado de acordo com o aumento de a malignidade e a diminuição da diferenciação (Hattinger et al., 2004).

O tratamento consiste em ampla cirurgia de excisão ou amputação, frequentemente associada a regimes quimioterápicos adjuvantes e neoadjuvantes, que são similares ou idênticos aos usados para osteossarcoma de alto grau (Hattinger et al., 2004).

1.4 - Osteomielite

Osteomielite (OM) é uma infecção causada por microorganismos que invadem e destroem progressivamente o osso no local da infecção. Em adultos OM ocorre usualmente após complicações decorrentes de fraturas e cirurgias. O grau de acometimento da OM é

influenciado por fatores como o local de acometimento, a natureza, e a severidade da injúria óssea e a virulência do microorganismo isolado no osso (Wyngaarden et al,1993; Asensi et al, 2007).

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

O diagnóstico diferencial de OM crônica em atividade ou superposta a outras patologias é complicado, bem como o seu próprio conceito de cura, podendo ocorrer prolongados intervalos assintomáticos (Sapienza et al, 2005). Fatos estes que levam a esta classe de lesões a possuir um certo "misticismo", caracterizando-se como um desafio, tanto para o paciente como para o ortopedista e o cirurgião; demonstrando um tratamento não efetivo pela alta incidência de sua recorrência e potencial de complicação. A condição de se apresentar de várias formas pode confundi-la através da similaridade com outras patologias, incluindo as malignas. (Museru et al, 2001).

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

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

Os indícios clínicos para a malignização da OM são: aumento da massa óssea, o aumento da dor, hemorragia, descarga purulenta pelo longo do trato de escape do foco

infeccioso. Radiograficamente ocorre à aceleração da natureza destrutiva da lesão e de massa de partes moles (Asensi et al, 2007).

1.5 – Genética das neoplasias ósseas

A complexidade das mudanças cromossômicas em tumores sólidos pode ser associada a uma cascata de muitos estágios de transformações genéticas. De acordo com este conceito, alterações genéticas iniciais levam a um aumento no crescimento celular, seguido de uma série de mudanças que consequentemente resultam na transformação maligna e metástase (Sudoyo et al., 2011).

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

Condrossarcoma mixóide extraesqueleto $t(9;22)(q22;q21)$ -*TEC-TCF12*; lipossarcomamixóide $t(12;16)(q13;p11)$ -*TLS(FUS)-CHOP*, $t(12;22)(q13;q12)$ -*EWS-CHOP*; sarcoma sinovial $t(X;18)(p11;q11)$ -*SYT-SSX1 SYT-SSX2* (Sandberg et al, 2002).

Estas alterações não possuem potenciais somente para a classificação desta classe neoplásica, mas servem para o diagnóstico diferencial onde há natureza histológica confusa,

e como guia para estudos moleculares, para o melhor entendimento e estabelecimento de genes envolvidos na gênese do câncer (Yoshida et al, 2004).

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

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

Na evolução do encondroma à condrossarcoma central de baixo grau, ocorre uma evolução cariotípica apresentando as seguintes alterações genéticas: *near*ploidia, perda de 9p21, rearranjos envolvendo *HMGA2* mapeado na região 12q13-15, sinalização ativa de *PTHLH*, inativação de sinalização hedgehog, expressão *JUNB* e expressão *COX2*. A sua evolução para alto grau sofre a seguintes alterações: aneuploidias, formação de cariótipos complexos nas células tumorais, aumento da sinalização *PTHLH*, alterações no gene *TP53* e perda do gene *P16*, aumento da glicólise e diminuição da fosforilação oxidativa, aumento das MMP 1,2,9,13, aumento das Catepsinas B e L e alteração no *PDGFRα* (Bovée et al2005; Terek et al, 2006).

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

Um retrospecto na literatura revelou as seguintes regiões cromossômicas envolvidas em alterações não balanceadas: 1p11~13; 1q10~12; 1q21~22; 11p14~p15; 12p13; 14p11~p13; 15p11~p13; 17p12~13; 19q13 e 22q11~13. Ganhos gênicos em: 1; 4q12-13; 4q28~31; 5p13-14; 6p; 7q31~32; 8q21; 8q21.3~q22; 8q23; 8q23~q24-12; 12p; 12q13~q15; 17p11-p13; 17p11~2; 19q12~q22; 20q. Perda nos cromossomos 5q; 6q11~q14; 8p23; 9; 10; 12p12-pter; 13; 13q14; 17. Alterações cariotípicas singulares em menor frequência (5%): add(11)(p15); add(14)(q32); t(2;13)(p13;q24); t(10;13)(q22;q21); inv(6)(p23q15); 13q14 e +17 (Stock et al, 2000; Sandberg et al, 2003).

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

São poucos os relatos de neoplasias ósseas benignas como nos três casos abalizados de osteomaostóide com o principal achado sendo del(22)(q13.1) (Baruffi et al, 2001), e em osteoblastoma – *FOS* e *JUN* se expressando moderadamente (Sandberg et al, 2003).

As neoplasias de partes moles também demonstram algumas regiões envolvidas de forma recorrente como: 1q11-12; 19p13; 1p36; 1p21; 1p11; 17p11; 19q13 (Örndalet et al, 1994).

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

Lipossarcoma é o mais frequente sarcoma de partes moles com uma perfazendo 20% das malignidades mesenquimais. Lipossarcoma - bem diferenciado: amplificação da região 12q13-15 – gene *MDM2*; - mixóide: t(12;16)(q13; p11), fusão gênica – *TLS/CHOP*; - Pleomórfico: amplificação 12q14; 15 envolvendo o gene *MDM2* e mutação nos éxons 7 e 8 com perda heterozigotidade em TP53 (Sandberg, 2004; Macarenco et al, 2007).

2 - OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa tem por objetivo geral analisar citogeneticamente neoplasias ósseas benignas e malignas considerando-se os seus sítios anatômicos, a sua história natural de etiologia, a dificuldade de caracterização diferencial entre os subtipos histológicos e o comportamento agressivo de modo diferente em algumas destas lesões, com os objetivos específicos de:

- Detectar alterações cromossômicas (aneuploidias, rearranjos e marcadores cromossômicos) clonais características consistentes e recorrentes.
- A partir das alterações detectadas, identificar marcadores de evolução das lesões benignas para as lesões malignas.
- Identificar mutações que possam ser eventos críticos na etiologia e evolução dessas patologias pela descrição de pontos de quebra cromossômicos e sua relação com os genes envolvidos no controle da proliferação celular.
- Associar os resultados obtidos com as análises clínico-radiológicas e histopatológicas, visando um melhor entendimento, diagnóstico, e tratamentos mais precoces, específicos e eficazes.

3 - JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença genética causada por acúmulo de mutações no DNA e que apresenta um alto índice de morbidade e mortalidade. Apesar desses altos índices, nos últimos anos foi feito um enorme progresso para detectar e tratar os tipos diferentes de câncer.

As técnicas de citogenética e genética molecular têm ajudado cientistas a desenvolver novas estratégias de terapia, fornecer diagnósticos e prognósticos mais precisos e com isso ajudar a melhorar a expectativa de vida de pacientes acometidos pelas neoplasias ósseas.

As alterações genéticas em neoplasias ósseas ainda são pouco conhecidas, mas estudos nessa área vêm crescendo cada vez mais. Análises citogenéticas auxiliam na pesquisa de mutações genéticas cruciais na biogênese e desenvolvimento da doença. Portanto, este estudo tem como objetivo contribuir com as pesquisas neste tipo de neoplasia, ajudando a elucidar e desenvolver novas estratégias que beneficiem o tratamento e prognóstico dos pacientes.

4 –PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades científicas desenvolvidas no laboratório GECAN (Genética e Câncer) dependeram diretamente da coleta das amostras (Tab.1 e Tab.2) de tecidos para análise citogenética após cultura *in vitro* de curta e média duração. O material foi coletado pela equipe cirúrgica da ortopedia oncológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu, São Paulo, Brasil. Para a coleta desse material foi necessária aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em reunião do dia 5 de maio de 2008, com número de protocolo Of. 144/08-CEP.

Foi coletado também material para análise do Hospital Amaral Carvalho da cidade de Jaú, São Paulo, Brasil, tendo o projeto sido aceito pelo comitê de ética da Instituição, promovendo assim um aumento no número das amostras das patologias ósseas para este estudo.

As amostras de tecido a fresco, coletadas sob condições estéreis, foram processadas prontamente em fluxo laminar de forma estéril. Os fragmentos de tecidos foram primeiramente seccionados com pinças e tesouras cirúrgicas em placas de Petri, depois dissociados enzimaticamente com uma solução de colagenase (tipo IV, Sigma) 0,4% e transferidos para frascos de cultura contendo meio HAM F-10 (Sigma) suplementado com 15% de soro bovino fetal, vitaminas e antibióticos. As culturas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C e alimentadas em média duas vezes por semana. O tempo de cultura foi ajustado individualmente para cada caso, dependendo do índice mitótico observado em microscópio invertido.

As amostras em cultura foram colhidas e as células armazenadas em freezer. O material foi paulatinamente preparado e submetido às análises citogenéticas de acordo com o número ideal de casos que puderam ser agrupados para que seus estudos pudessem gerar resultados significativos para publicação.

4.1 – Citogenética Clássica

Para a análise citogenética, células em fase de crescimento exponencial foram primeiramente tratadas com colchicina 0,0016% por pelo menos seis horas; solução hipotônica de KCl 0,075M por 30 minutos e o metanol: ácido acético (3:1) foi usado como fixador. Estudo cromossômico foi realizado somente nas culturas primárias. As lâminas foram submetidas à técnica por bandamento cromossômico GTG.

A identificação e classificação dos cromossomos foram baseadas nas recomendações do ISCN (1985,1991,1995). Para a determinação de clone citogenético, foi utilizado o critério definido pelo ISCN (1991), onde na determinação dos clones numéricos não são inclusas as metáfases consideradas como poliplóides, ou seja, $2n > 57$ e por analogia de critérios, também não foram consideradas as metáfases com $2n < 35$.

5 - RESULTADOS

Foram coletadas 40 amostras de tecidos ósseos (Tab. 1), no Hospital de Clínicas da faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, de pacientes com suspeita de terem neoplasias, e realizada a análise citogenética dos casos nos quais a cultura celular foi bem sucedida.

Tabela 1. Amostras coletadas e submetidas a técnicas citogenéticas, do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu

<u>Amostra</u>	<u>Diagnóstico</u>
TU1	Tumor de células gigantes
TU2	Cisto ósseo aneurismático
TU3	Mieloma múltiplo
TU4	Osteomielite crônica inespecífica
TU5	Osteomielite crônica inespecífica
TU6	Tumor de células gigantes
TU7	Osteomielite crônica inespecífica
TU8	Fibrossarcoma
TU9	Plasmocitoma
TU10	Condrossarcoma
TU11	Tumor desmóide
TU12	Osteossarcoma
TU13	Osteossarcoma
TU14	Leiomiossarcoma
TU15	Fibroma desmoplástico

Tabela 1 – Continuação

TU16	Schwanoma
TU17	Condrossarcoma
TU18	Plasmocitoma
TU19	Hemangioma
TU20	Osteomaosteóide
TU21	Plasmocitoma
TU22	Cisto ósseo simples
TU23	Encondroma
TU24	Carcinoma espinho celular
TU25	Condrossarcoma
TU26	Tumor de células gigantes
TU27	Metástase de CA próstata
TU28	Condroblastoma
TU29	Hemangioma
TU30	Sarcoma de Ewing
TU31	Cisto ósseo
TU32	Osteomaosteóide
TU33	A confirmar
TU34	A confirmar
TU35	Osteomielite crônica
TU36	Osteomielite crônica
TU37	Fibrossarcoma
TU38	A confirmar
TU39	A confirmar
TU40	Fibrossarcoma

Também foram coletadas 31 amostras de tecido ósseo (Tab. 2) em biópsias, no Hospital do Câncer Amaral Carvalho de Jaú, de pacientes com suspeitas de terem neoplasias. As amostras que tiveram sucesso na cultura celular também passaram pela análise citogenética ou estão congeladas para futura análise. As amostras que não aparecem na Tabela 2 foram descartadas, pois a cultura celular não foi bem sucedida por motivos de contaminação ou pouco crescimento celular.

Tabela 2 – Amostras coletadas e submetidas a técnicas citogenéticas, do Hospital do Câncer Amaral Carvalho de Jaú

<u>Amostra</u>	<u>Diagnóstico</u>
ACO. 01	A confirmar
ACO. 02	A confirmar
ACO. 03	Tumor de células gigantes
ACO. 04	Adenocarcinoma metastático
ACO. 05	Tumor mesenquimal
ACO. 07	Osteocondroma
ACO. 09	Tumor de células gigantes
ACO. 11	Sem sinais de malignidade
ACO. 16	A confirmar

Tabela 2 - Continuação

ACO. 17	Carcinoma metastático
ACO. 18	Plasmocitoma
ACO. 19	A confirmar
ACO. 20	Lipoma intramuscular
ACO. 21	Metástase de carcinoma ductal
ACO. 22	Osteoblastoma
ACO. 23	Ausência de neoplasia
ACO. 24	Neoplasia fibrohistiocítica benigna
ACO. 25	Tumor de células gigantes
ACO. 26	A confirmar
ACO. 27	Encondroma
ACO. 29	A confirmar
ACO. 31	A confirmar

As amostras que estão descritas como “a confirmar” são casos em que o diagnóstico não pôde ser obtido até o momento da finalização deste trabalho, pois o acesso aos prontuários não foi possível por conta dos pacientes estarem em tratamento ou por óbito.

Foi realizado os estudos de análise citogenética e o levantamento bibliográfico de três lesões ósseas benignas e suas possíveis lesões ósseas malignas correspondentes. Foram estudados um caso de encondroma, um condrossarcoma, um osteblastoma, um osteossarcoma, uma osteomielite crônica e um fibrossarcoma.

5.1 – Análises citogenéticas

Caso 1 -ACO 27 – Encondroma

Fórmula cariotípica de 20 células após bandamento GTG

M1) 46,XX

M2) 45,XX,-3,-5,+mar1

M3) 41,X,-X,del(4)(p15),-9,-18,-20,-20

M4) 38,X,-X,-3,-8,-13,-15,-17,-17,-22

M5) 44,X,-X,-3,add(15)(p13)

M6) 46,XX

M7) 44,X,-X,add(15)(p13),-16,-18,+mar2

M8) 43,X,-X,-11,-19

M9) 44,XX,-4,-15,

M10) 44,XX,-16,-18

M11) 46,XX,-2,+mar2

M12) 45,X,-X

M13) 42,XX,t(8;21)(q22;p23),-17,-20,-21,-22

M14) 46,XX,add(15)(p13)

M15) 46,XX,del(13)(q21)

M16) 44,X,-X,-13

M17) Descartada

M18) 43,XX,-1,-18,-22

M19) 46,XX,-2,+19

M20) 46,XX,add(15)(p13)

Alterações não clonais:

-1[1],-2[2],-4[1],del(4)(p15)[1],-5[1],-8[1],t(8;21)(q22;p23)[1],-9[1],-11[1],-13[2],del(13)(q21),-15[2],-16[2],-17[2],-19[1],+19[1],-20[2],-21[1],+mar1[1],+mar2[2]

Alterações clonais:

-X[7],-3[3],add(15)(p13)[4],-18[4],-22[3]

Cariótipo Composto:

38~46,XX,-X[7],-3[3],add(15)(p13)[4],-18[4],-22[3]

46,XX[2]/cp(13)

Figura 1 – Caso 1 – ACO 27 – M5 [44,X,-X,-3,add(15)(p13)]

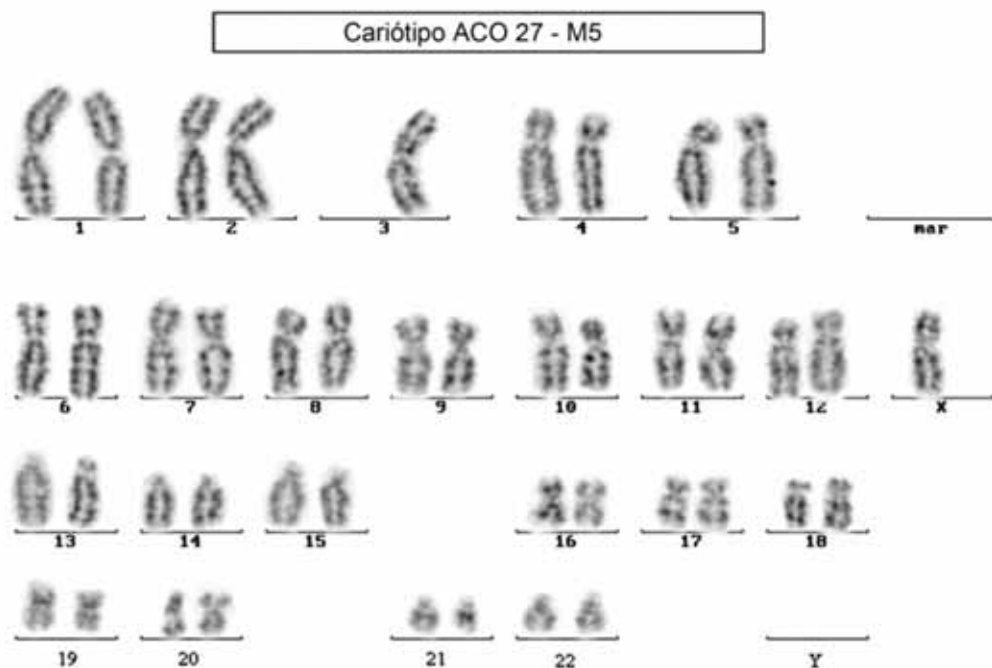
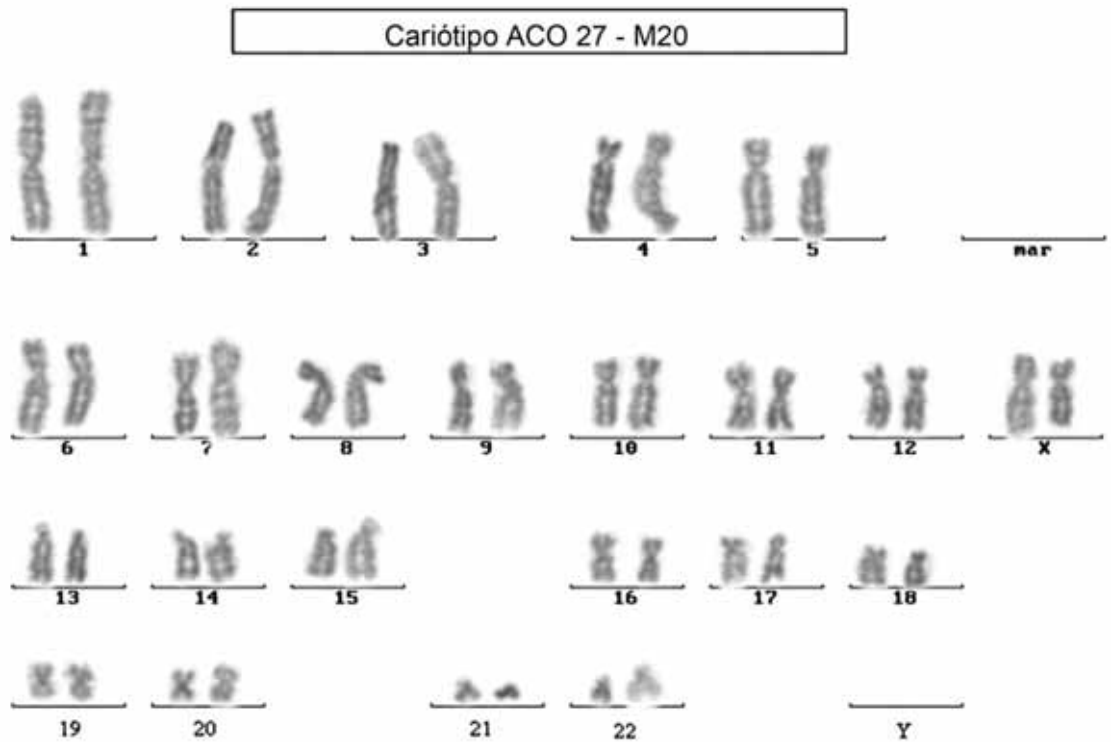


Figura 2 – Caso 1 – ACO 27 – M20 [46,XX,add(15)(p13)]



Caso 2 - TU 25 – Condrossarcoma

Fórmula cariotípica de 22 células após bandamento GTG

M1) 40,X,-Y,-5,del(6)(q22),-9,-11,-16,-19

M2) 45,X,-Y,del(6)(q22)

M3) 47,XY,del(9)(q22),-21,+mar1,+mar2

M4) 46,XY,del(18)(q22)

M5) 46,XY,-15,+mar3

M6) 46,XY,del(6)(q22)

M7) 46,XY

M8) 46,XY,del(6)(q22)

M9) 43,XY,-5,+13,-17,-17,-22

M10) 45,XY,t(8;20)(q24;q13),-20
 M11) 47,XY,+mar2
 M12) 46,XY
 M13) 46,XY,del(7)(q31)
 M14) Descartada
 M15) 46,XY
 M16) 45,Y,-X
 M17) 41,XY,-6,-10,-11,-13,t(17;19)(p13;q13),-19
 M18) 43,XY,-1,-3,-7,-15,+21
 M19) 44,XY,-10,-17
 M20) Descartada
 M21) 46,XY,-9,+mar4
 M22) 45,XY,-8,-9,+mar5

Alterações não clonais:

-X[1],-Y[2],-1[1],-3[1],-5[2],-6[1],-7[1],del(7)(q31)[1],-8[1],t(8;20)(q24;q31)[1],del(9)(q22)[1],-
 10[2],-11[2],-13[1],+13[1],-15[2],-16[1],-17[2],t(17;19)(p13;q13)[1],del(18)(q22)[1],-19[2],-
 21[1],+21[1],+mar1[1],+mar2[2],+mar3[1],+mar4[1],+mar5[1]

Alterações clonais:

del(6)(q22)[4],-9[3]

Cariótipo composto:

40~46,XY,del(6)(q22)[4],-9[3]
 46,XY[3]/cp(6)

Figura 3 – Caso 2 – TU 25 – M8 [46,XY,del(6)(q22)]

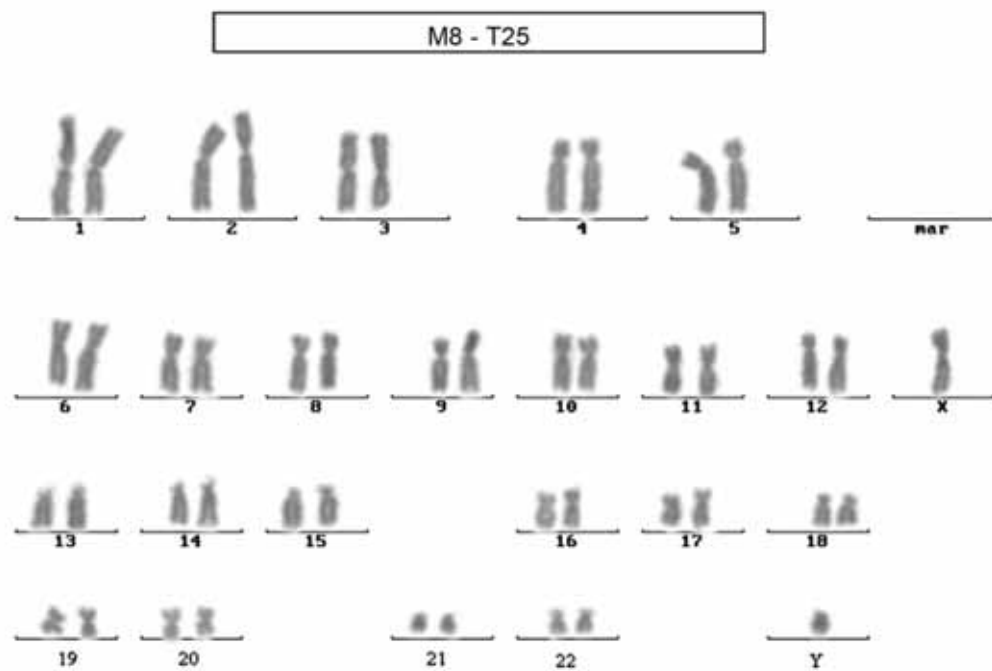
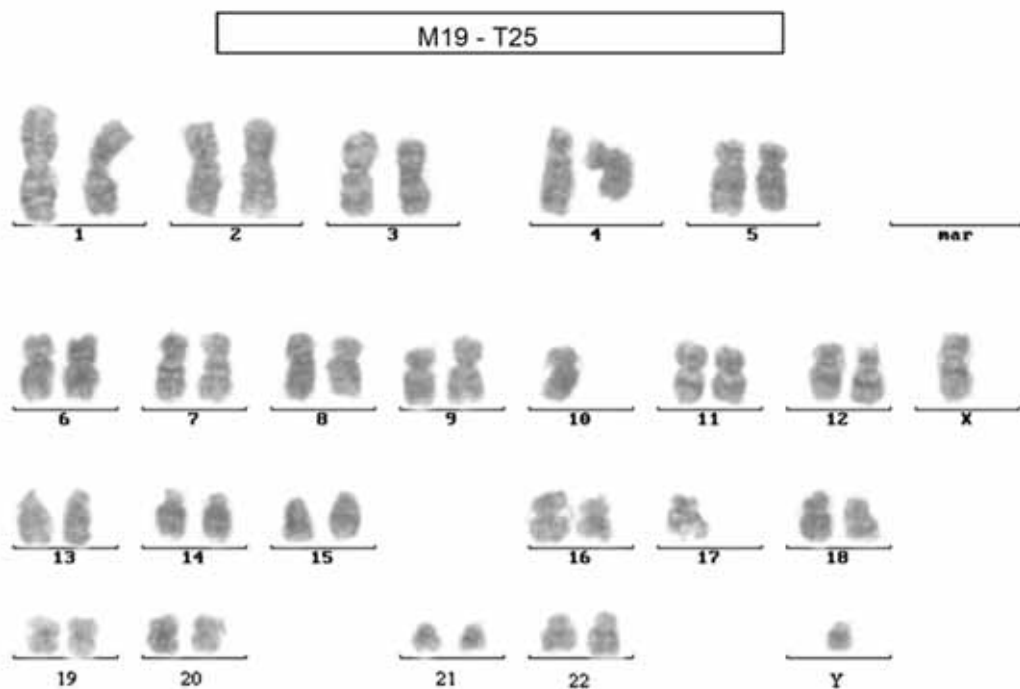


Figura 4 – Caso 2 – TU 25 – M19 [44,XY,-10,-17]



Caso 3 - ACO 22 - Osteoblastoma

Fórmula cariotípica de 21 células após bandamento GTG

M1) 42,Y,-X,-1,-4,-5,-17,+mar1

M2) 45,XY,del(4)(q31),-5,del(7)(q31)

M3) 39,Y,-X,-4,-5,-17,-17,-19,-19,-22,+mar2

M4) 45,XY,add(6)(p25),add(6)(q27),-9,-21,+mar3

M5) 44,Y,-X,-21,-22,+mar1

M6) 46,XY,+X,del(4)(q31),-5

M7) 42,XY,-9,-18,-22,-22

M8) 41,X,-Y,-12,-15,-17,-20

M9) 46,XY,del(4)(q31)

M10) 40,X,-Y,-7,-11,-16,-20,-22

M11) 45,XY,del(4)(q31),-22

M12) 44,XY,-17,-19,

M13) 45,XY,-4

M14) 42,XY,-8,-14,-15,-19

M15) 43,Y,-X,-6,-14,-22,+mar4

M16) 44,XY,-2,-15

M17) 42,XY,-5,-5,-6,-8,-9,-18,+20,+mar5

M18) 42,XY,-5,-6,-6,-22

M19) 46,XY,del(4)(q31) FOTO

M20) 46,XY

M21) 41,XY,-2,-5,-6,-8,-16,-20,-22,+mar6,+mar7

Alterações cromossômicas clonais:

-X[4],-4[3],del(4)(q31)[5],-5[7],-6[4],-8[3],-9[3],-15[3],-17[4],-19[3],-20[3],-22[8]

Alterações cromossômicas não clonais:

+X[1],-Y[2],-1[1],-2[2],add(6)(p25)[1],add(6)(q27)[1],del(7)9q31),-7[1],-11[1],-12[1],-14[2],-16[2],-18[2],+20[1],-21[2],+mar1[2],+mar2[1],+mar3[1],+mar4[1],+mar5[1],+mar6[1],+mar7[1]

Cariótipo Composto:

39~46,XY,-X[4],-4[3],del(4)(q31)[5],-5[7],-6[4],-8[3],-9[3],-15[3],-17[4],-19[3],-20[3],-22[8]
46,XY[1]/cp[21]

Figura 5 - Caso 3 - ACO 22 – M8 [41,X,-Y,-12,-15,-17,-20]

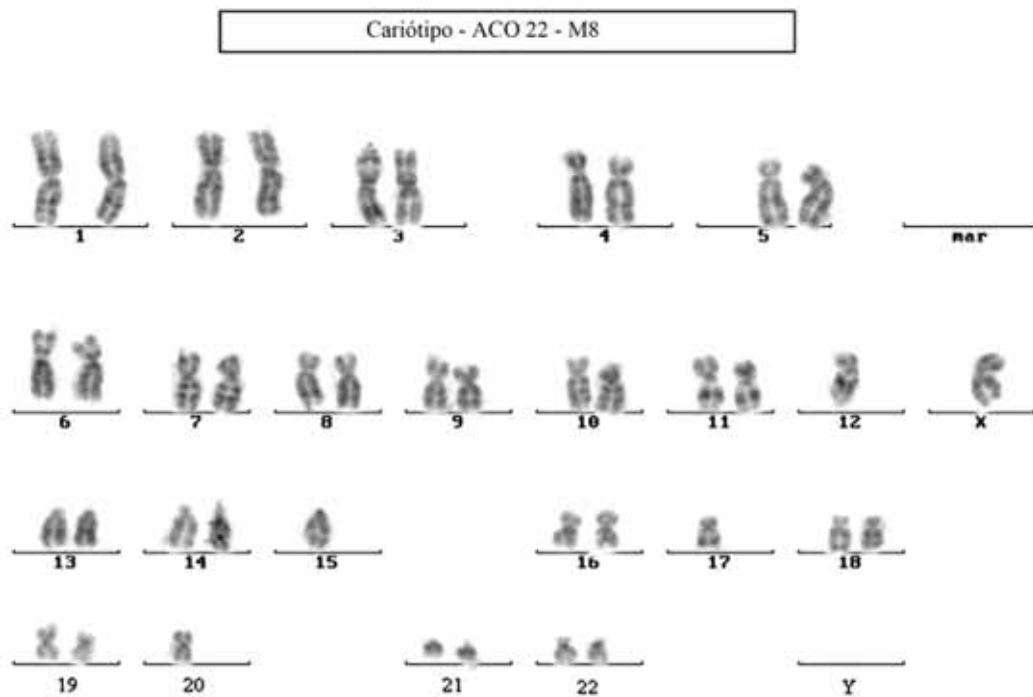


Figura 6 – Caso 3 -ACO 22 – M11 [45,XY,del(4)(q31),-22]

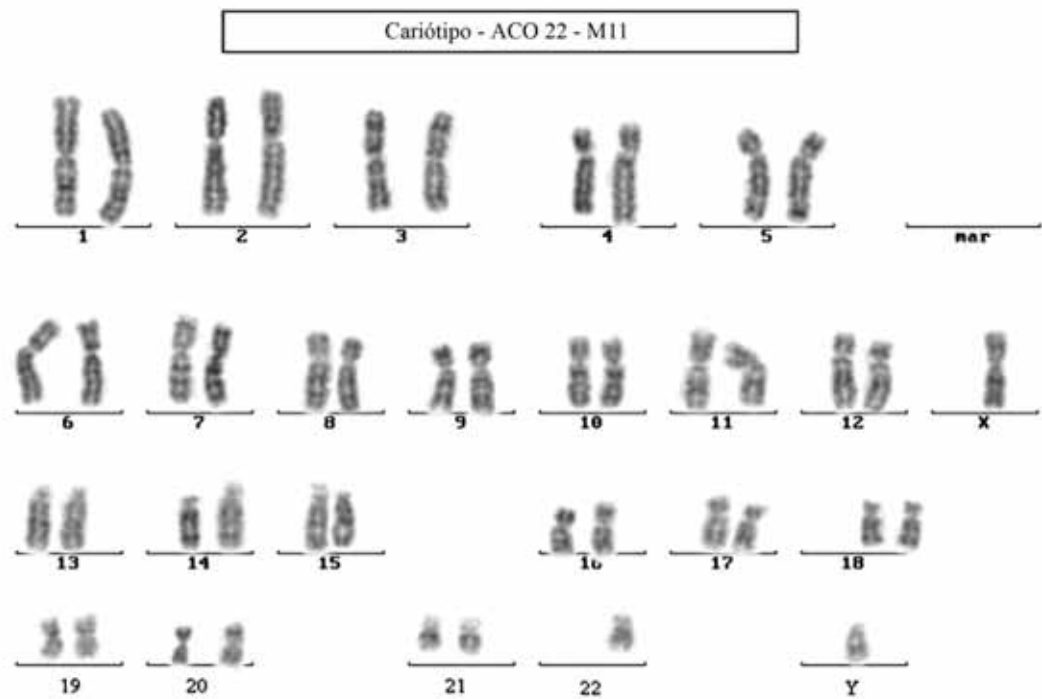
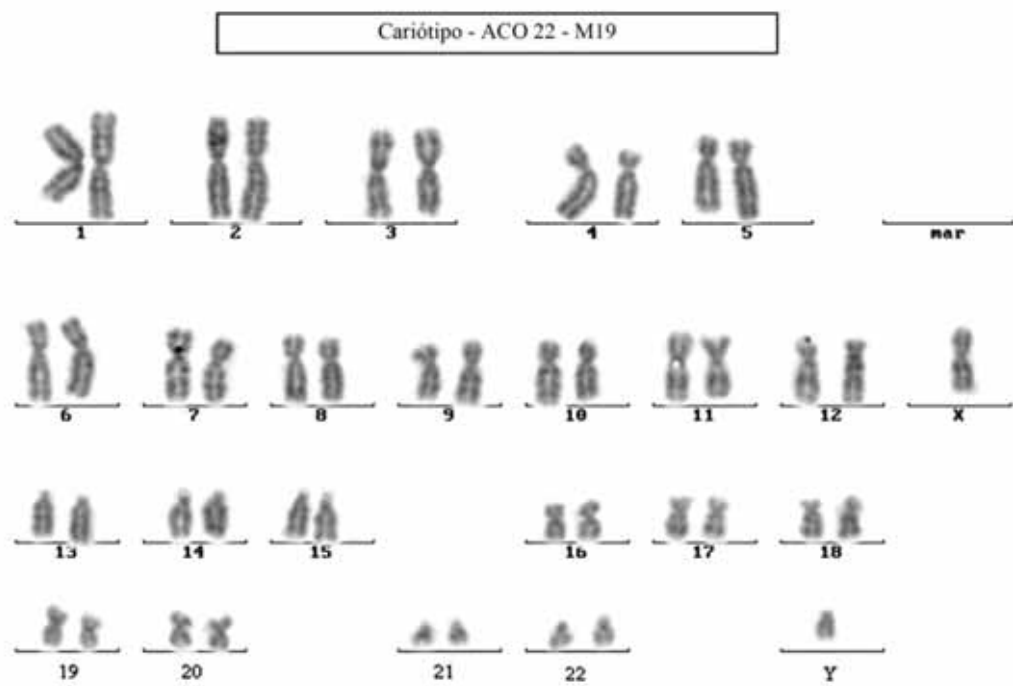


Figura 7 – Caso 3 - ACO 22 – M19 [46,XY,del(4)(q31)]



Caso 4 - T28 –Osteossarcoma

Fórmula cariotípica de 16 células após bandamento GTG

M1) 43,XX,del(1)(q42),-19,-20,-20

M2) 45,XX,-12,add(13)(p13),add(14)(p13)

M3) 46,XX,del(4)(q32),add(13)(p13),add(14)(p13)

M4) 46,XX,+9,-17

M5) 45,XX,add(4)(p16),-8,-11,+mar1

M6) 45,X,-X

M7) 43,X,-X,del(4)(q32),-5,del(6)(q22),-13,-15,-16,-19,+mar2,+mar3,+mar4

M8) 54,X,-X,+16,+17,+17,+18,+18,+20,+20,+mar5,+mar6

M9) 44,XX,add(14)(p13),-21,-21

M10) 46,XX,del(4)(q32)

M11) Descartada

M12) 45,X,-X,del(4)(q32),-22,+mar7

M13) 45,X,-X,del(4)(q32),add(14)(p13),+16,-21,-22,+mar8

M14) 46,XX,add(13)(p13),-20,+mar9

M15) 46,XX

M16) 45,XX,-6,-11,-15,+mar10,+mar11

Alterações cromossômicas clonais:

-X[5],del(4)(q32)[5],add(13)(p13)[3],add(14)(p13)[4]

Alterações cromossômicas não clonais:

del(1)(q42)[1],add(4)(p16)[1],-5[1],del(6)(q22)[1],-6[1],-8[1],+9[1],-11[2],-12[1],-13[1],-15[2],-16[1],+16[2],-17[1],+17[1],+18[1],-19[2],-20[2],+20[1],-21[2],-22[2],
+mar1[1],+mar2[1],+mar3[1],+mar4[1],+mar5[1],+mar6[1],+mar6[1],+mar6[1],+mar7[1],+mar8[1],+mar9[1],+mar10[1],+mar11[1]

Cariótipo composto:

43~54,XX,-X[5],del(4)(q32)[5],add(13)(p13)[3],add(14)(p13)[4]

46,XX[1]/cp[11]

Figura 8 – Caso 4 – TU 28 – M9 [44,XX,add(14)(p13),-21,-21]

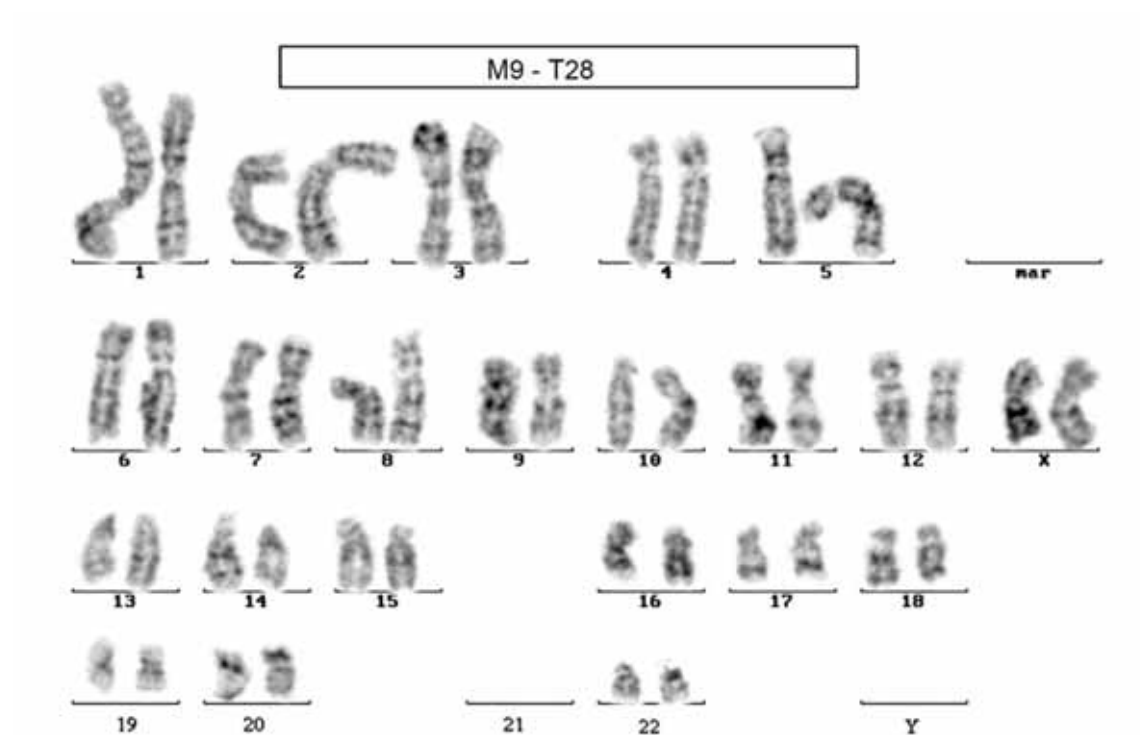


Figura 9 – Caso 4 – TU28 – M12 [45,X,-X,del(4)(q32),-22,+mar7]

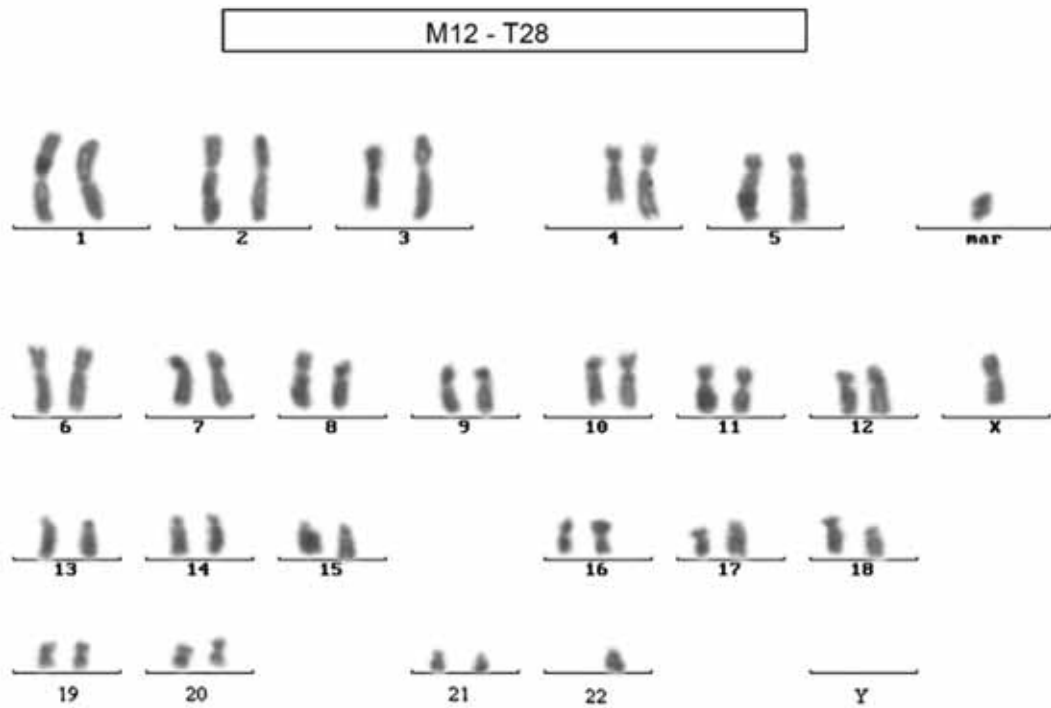
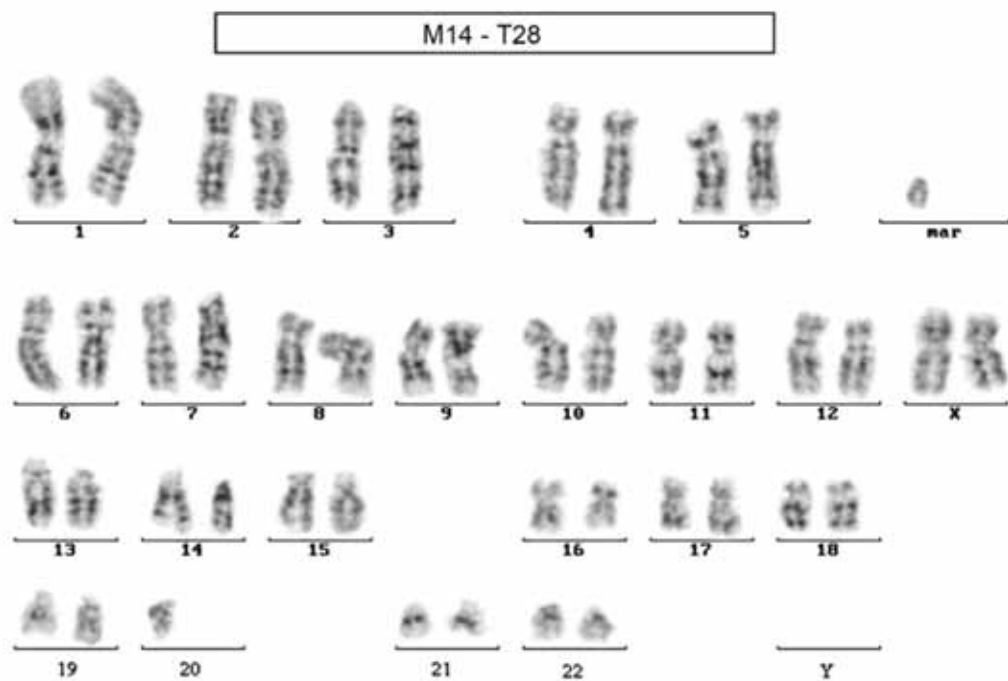


Figura 10 – Caso 4 – TU28 – M14 [46,XX,add(13)(p13),-20,+mar9]



Caso 5 - TU 35 - Osteomielite Crônica

Fórmula cariotípica de 21 células após bandamento GTG

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

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

M3) end46,XX

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

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

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

M7) 44,X,-X,-3

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

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

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

M11) 45,XX,-1,-17,+mar6

M12) 44,X,-X,-11,-12,del(17)(p13)-22,+mar2,+mar7,+mar8 – Figura 2

M13) 42,X,-X,-4,-10,-19,-21,+mar3

M14) 43,XX,-1,del(17)(p13),-10,-20,+mar1

M15) 42,X,-X,-22,-22,+mar2

M16) 38,-X-X,-1,-2,-10,-11,-12,-19,t(19;7)(p13;q36)

M17) 46,XX

M18) 47,XX,-1,-1,+15,+16,-20,+mar2,+mar9

M19) 44,XX,-1,-2,-8,-22,+mar10,+mar11

M20) 46,X,-X,+mar3

M21) 47,X,-X,+mar2,+mar12

Alterações cromossômicas não clonais:

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

Alterações cromossômicas clonais:

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

Cariótipo composto:

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

Figura 11 – Caso 5 – TU35 - [44,X,-X,add(12)(q24.3),-20]

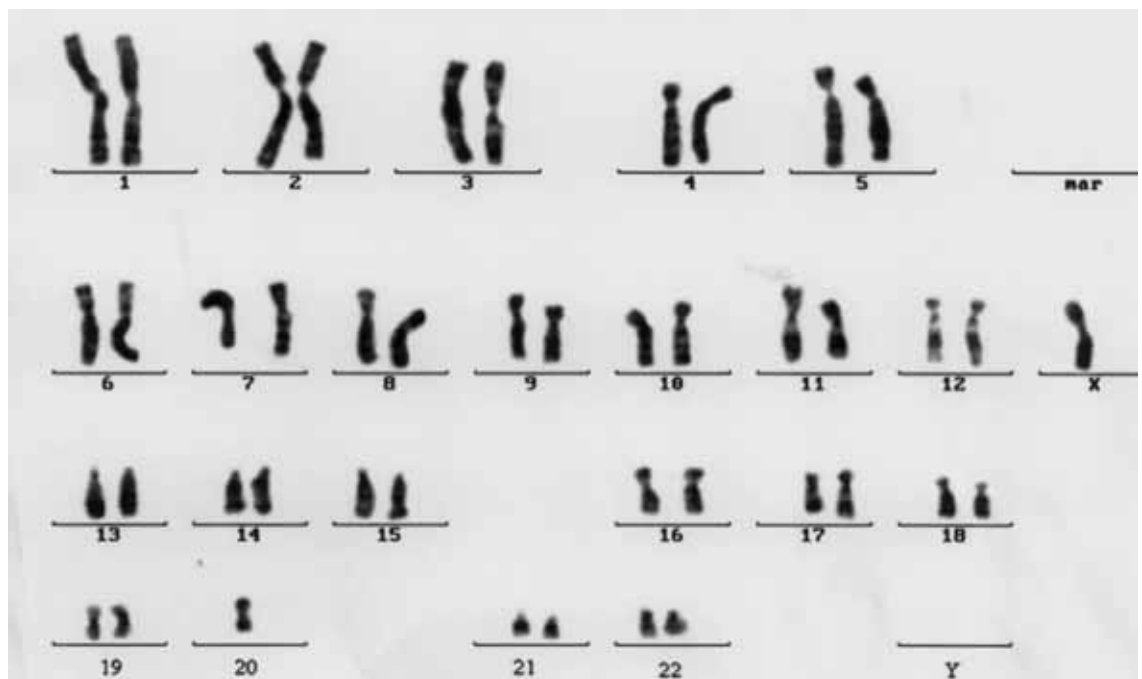


Figura 12 - add(12)(q24.3) – cariótipos parciais



Figura 13 – Caso 5 – TU35 - [44,X,-X,-4,-11,-12,del(17)(p13),-22,+mar2,+mar7,+mar8]

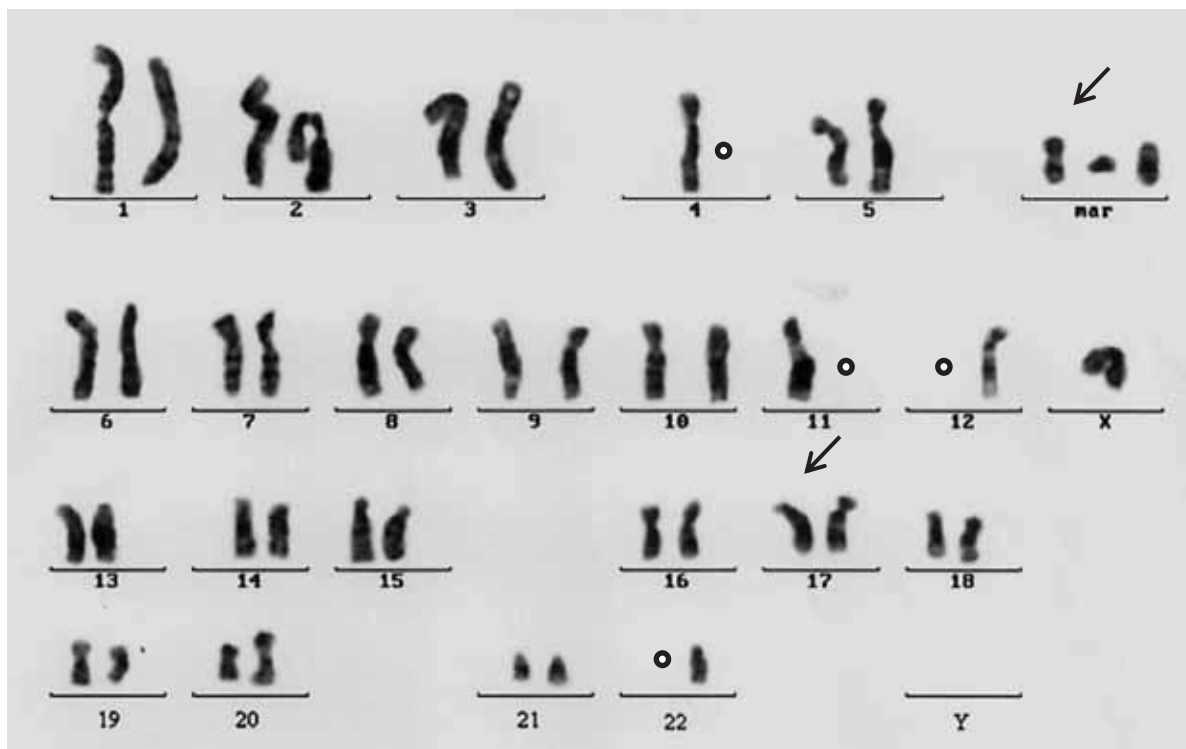
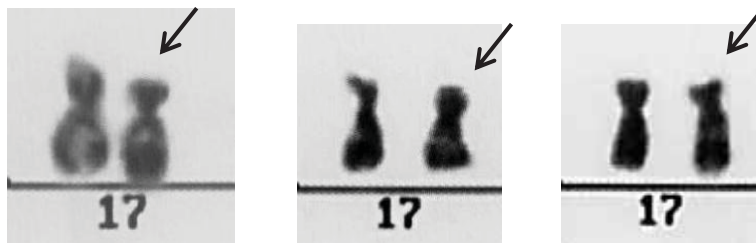


Figura 14 - del(17)(p13) – cariótipos parciais



Caso 6 – TU40 –Fibrossarcoma

Fórmula cariotípica de 23 células após bandamento GTG

M1) 42,-X,-Y,-6,-9,-19,-21,+mar1,+mar2

M2) 46,XY,-19,+mar3

M3) 47,XY,+mar4

M4) Descartada

M5) 46,XY,-13,-15,+mar5,+mar6

M6) 43,XY,+12,t(17;22)(p13;p13)

M7) 43,XY,+2,-7,-13,t(15;22)(p13;p13),-17,-19,-19,-22,+mar7,+mar8

M8) Descartada

M9) 44,XY,-18,-19

M10) 44,X,-Y,-18

M11) 47,XY,-11,-17,+t(16;21)(p13;p13),+mar9,+mar10

M12) 40,X,-Y,-3,-9,-15,-18,-19

M13) 45,XY,-2,-16,+mar11

M14) Descartada

M15) 43,X,+X,-Y,-1,-19,-19,-22

M16) Descartada

M17) 46,X,+X,-Y,-2,-4,+mar12

M18) 43,X,-Y,-20,-22

M19) 46,X,+X,-Y

M20) 45,Y,-X,-17,+20,-21,+mar13

M21) 44,X,+X,-Y,-3,+4,-5,+9,-10,+15,-22,-22

M22) 43,X,-Y,-4,-9,-9,-17,+mar14,+mar15

M23) 45,X,+X,-Y,-7,t(13;21)(p13;p13)

Alterações cromossômicas não clonais:

-X[2],-1[1],-2[2],+2[1],-3[2],-4[2],+4[1],-5[1],-6[1],-7[2],+9[1],-10[1],-11[1],+12[1],-13[2],
t(13;21)(p13;p13),-15[2],+15[1],t(15;22)(p13;p13),-16[1],+t(16;21)(p13;p13),
t(17;22)(p13;p13),-20[2],+20[1],-21[2],+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,
+mar8,+mar9,+mar10,+mar11,+mar12,+mar13,+mar14,+mar15,+mar16

Alterações cromossômicas clonais:

+X[5],-Y[10],-9[3],-17[4],-18[4],-19[7],-22[5]

Cariótipo composto:

40~47,XY,+X[5],-Y[10],-9[3],-17[4],-18[4],-19[7],-22[5]

46,XY[0]/cp[16]

Figura 15 – Caso 6 – TU40 – M3 [47,XY,+mar4]

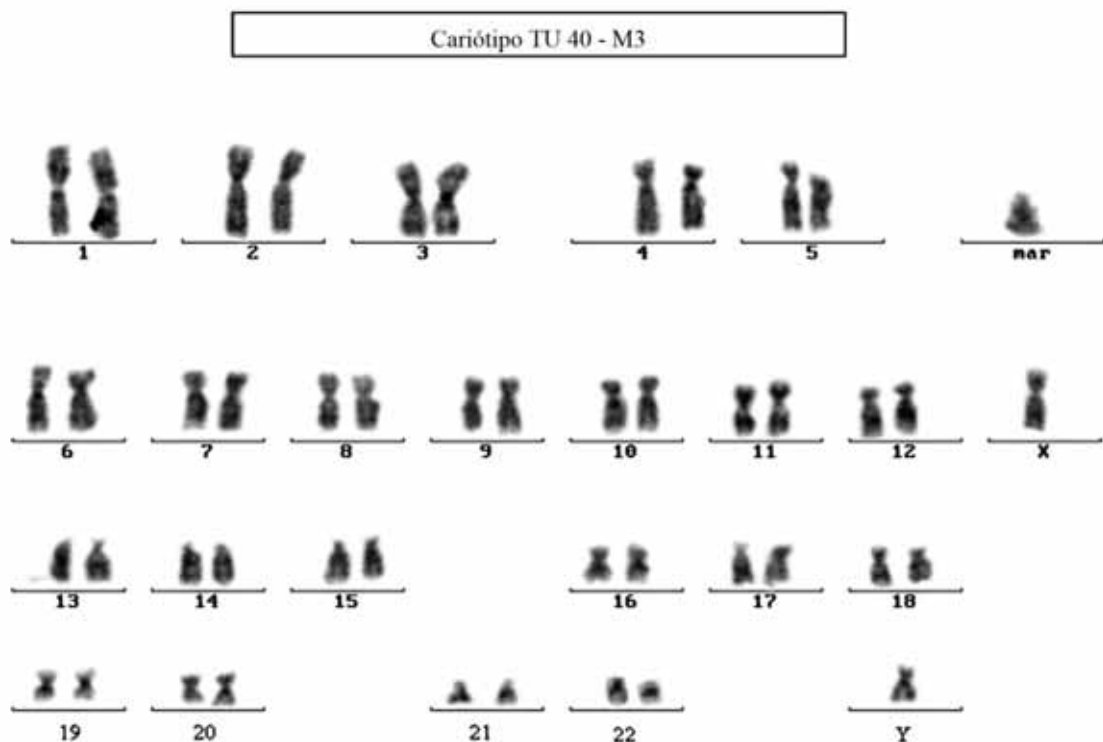
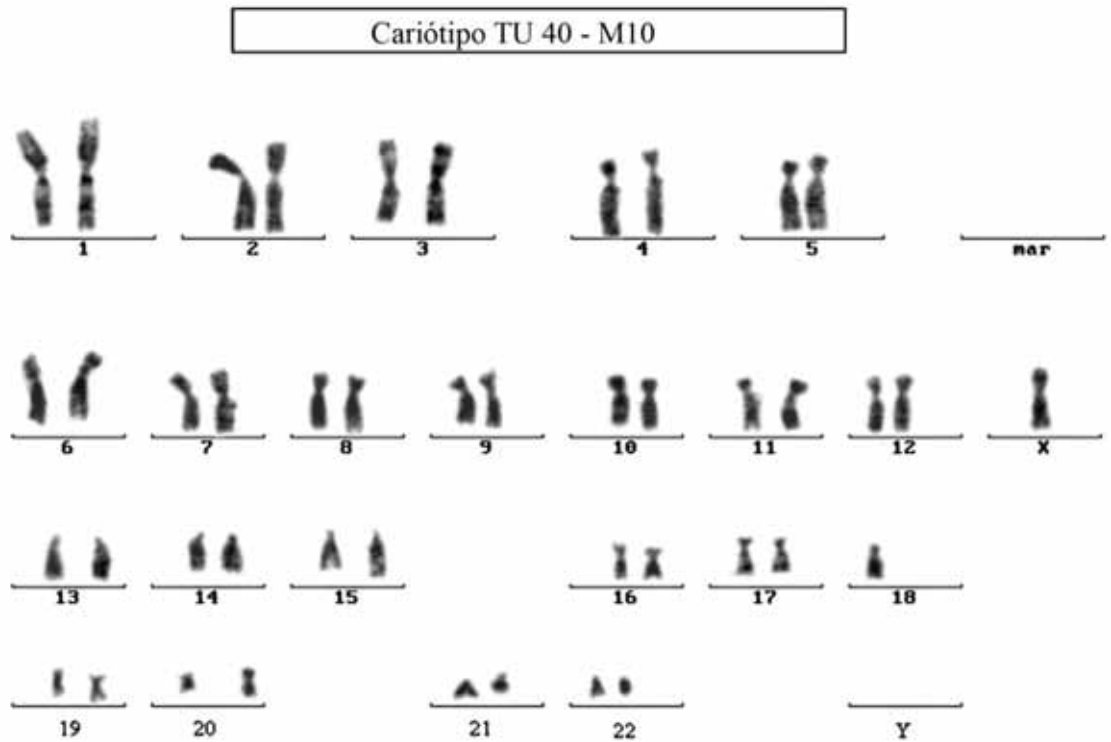


Figura 16 – Caso 6 – TU40 – M10[44,X,-Y,-18]



5.2 – Números modais

CASO 1 (ACO 27) - Encondroma

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (31,25% das células analisadas)

N de cromossomos: 38 40 41 42 43 44 45 46 47 51 total

Número de células: 16 2 5 9 11 12 25 8 1 80

Níveis de ploidia: Hipo 57,5% Di 31,25% Hiper 11,25%

M1- 43	M27- 46	M53- 45	M79- 46
M2- 38	M28- 46	M54- 46	M80- 42
M3- 46	M29- 44	M55- 46	
M4- 46	M30- 40	M56- 41	
M5- 40	M31- 45	M57- 44	
M6- 46	M32- 44	M58- 43	
M7- 46	M33- 46	M59- 45	
M8- 46	M34- 46	M60- 44	
M9- 42	M35- 41	M61- 46	
M10- 47	M36- 43	M62- 46	
M11- 46	M37- 46	M63- 43	
M12- 40	M38- 44	M64- 46	
M13- 46	M39- 45	M65- 43	
M14- 43	M40- 43	M66- 45	
M15- 46	M41- 47	M67- 45	
M16- 47	M42- 46	M68- 47	
M17- 40	M43- 44	M69- 43	
M18- 42	M44- 47	M70- 44	
M19- 43	M45- 42	M71- 45	
M20- 45	M46- 40	M72- 45	
M21- 40	M47- 51	M73- 46	
M22- 46	M48- 42	M74- 44	
M23- 47	M49- 45	M75- 46	
M24- 45	M50- 44	M76- 46	
M25- 45	M51- 44	M77- 47	
M26- 47	M52- 44	M78- 46	

CASO 2 (TU 25) - Condrossarcoma

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (37,8% das células analisadas)

N de cromossomos: 41 42 43 44 45 46 47 48 50 total

Número de células: 43 6 11 12 **28** 8 5 2 74

Níveis de ploidia: **Hipo 41,9%** **Di 37,8%** **Hiper 20,3%**

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

CASO 3 (ACO 22) - Osteoblastoma

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (20,8% das células analisadas)

N de cromossomos: 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 total

Número de células: 2 6 9 13 16 8 13 20 3 5 1 96

Níveis de ploidia: Hipo 69,8% Di 20,8% Hiper 9,4%

M1- 43	M20- 42	M39- 42	M58- 42
M2- 46	M21- 48	M40- 42	M59- 40
M3- 42	M22- 46	M41- 46	M60- 46
M4- 45	M23- 46	M42- 46	M61- 46
M5- 46	M24- 41	M43- 46	M62- 46
M6- 40	M25- 45	M44- 43	M63- 45
M7- 43	M26- 49	M45- 46	M64- 48
M8- 45	M27- 44	M46- 46	M65- 44
M9- 41	M28- 47	M47- 43	M66- 48
M10- 42	M29- 43	M48- 41	M67- 47
M11- 43	M30- 46	M49- 41	M68- 44
M12- 46	M31- 45	M50- 45	M69- 40
M13- 43	M32- 44	M51- 45	M70- 40
M14- 40	M33- 45	M52- 48	M71- 45
M15- 43	M34- 42	M53- 46	M72- 41
M16- 45	M35- 44	M54- 45	M73- 43
M17- 42	M36- 45	M55- 45	M74- 43
M18- 42	M37- 46	M56- 46	M75- 41
M19- 43	M38- 46	M57- 47	M76- 42

M77- 43	M82- 44	M87- 39	M92- 41
M78- 48	M83- 43	M88- 42	M93- 41
M79- 40	M84- 46	M89- 44	M94- 43
M80- 39	M85- 41	M90- 43	M95- 42
M81- 46	M86- 43	M91- 42	M96- 44

CASO 4 (TU 28) - Osteossarcoma

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (28,2% das células analisadas)

N de cromossomos: 40 41 42 43 44 45 46 47 49 54 total

Número de células: 11 5 6 4 6 11 2 2 1 39

Níveis de ploidia: Hipo 59% Di 28,2% Hiper 12,8%

M1- 45	M11- 47	M21- 42	M31- 46
M2- 42	M12- 46	M22- 43	M32- 42
M3- 49	M13- 45	M23- 46	M33- 46
M4- 46	M14- 44	M24- 43	M34- 43
M5- 43	M15- 45	M25- 47	M35- 46
M6- 41	M16- 43	M26- 46	M36- 46
M7- 44	M17- 54	M27- 43	M37- 43
M8- 40	M18- 45	M28- 46	M38- 42
M9- 45	M19- 44	M29- 49	M39- 46
M10- 45	M20- 46	M30- 44	

CASO 5 (TU35) – Osteomielite Crônica

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

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

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

Número de células: 25 4 5 18 6 8 6 19 4 5 2 75

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

M1- 46	M20- 45	M39- 46	M58- 44
M2- 46	M21- 47	M40- 40	M59- 40
M3- 46	M22- 46	M41- 46	M60- 46
M4- 47	M23- 46	M42- 44	M61- 38
M5- 43	M24- 48	M43- 46	M62- 46
M6- 43	M25- 38	M44- 43	M63- 38
M7- 45	M26- 46	M45- 39	M64- 42
M8- 44	M27- 45	M46- 44	M65- 37
M9- 37	M28- 48	M47- 39	M66- 45
M10- 40	M29- 45	M48- 38	M67- 39
M11- 40	M30- 41	M49- 40	M68- 48
M12- 42	M31- 42	M50- 38	M69- 47
M13- 46	M32- 39	M51- 44	M70- 46
M14- 46	M33- 42	M52- 46	M71- 48
M15- 46	M34- 42	M53- 47	M72- 46
M16- 42	M35- 49	M54- 48	M73- 46
M17- 43	M36- 44	M55- 45	M74- 44
M18- 43	M37- 43	M56- 49	M75-46
M19- 42	M38- 42	M57- 44	

CASO 6 (TU 40) - Fibrossarcoma

Análise citogenética número modal e variação cromossômica

Número modal = 46 (17% das células analisadas)

N de cromossomos: 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 52 total

Número de células: 25 3 3 9 8 15 **12** 10 3 3 1 74

Níveis de ploidia: **Hipo 60%** **Di 17%** **Hiper 23%**

M1- 46	M21- 42	M41- 43	M61- 45
M2- 45	M22- 44	M42- 44	M62- 41
M3- 46	M23- 44	M43- 46	M63- 47
M4- 43	M24- 45	M44- 46	M64- 42
M5- 49	M25- 48	M45- 48	M65- 45
M6- 44	M26- 43	M46- 46	M66- 49
M7- 44	M27- 46	M47- 43	M67- 44
M8- 45	M28- 43	M48- 45	M68- 44
M9- 49	M29- 47	M49- 47	M69- 45
M10- 45	M30- 42	M50- 45	M70- 52
M11- 40	M31- 48	M51- 45	M71- 47
M12- 41	M32- 43	M52- 40	M72- 47
M13- 45	M33- 46	M53- 46	M73- 39
M14- 43	M34- 47	M54- 46	M74- 39
M15- 46	M35- 47	M55- 46	
M16- 43	M36- 45	M56- 41	
M17- 47	M37- 40	M57- 45	
M18- 45	M38- 44	M58- 45	
M19- 47	M39- 40	M59- 46	
M20- 43	M40- 47	M60- 40	

As Tabelas 3 e 4 mostram a análise citogenética parcial feita nas amostras coletadas, segundo a qualidade do material. As amostras com material de boa qualidade foram analisadas. As amostras ausentes nas tabelas ainda não foram analisadas ou foram descartadas.

A Tabela 5 mostra sucintamente os dados clínicos e os resultados finais obtidos nos casos estudados neste trabalho.

Tabela 3 – Análises parciais das amostras coletadas no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu.

<u>Amostra</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Análise</u>
T06	Tumor de células gigantes	Nenhuma metáfase
T08	Sarcoma de alto grau, tumor de Triton	Nenhuma metáfase
T10	Osteoporose	Nenhuma metáfase
T12	Osteossarcoma condroblástico	Nenhuma metáfase
T15	Metástase de adenocarcinoma	Nenhuma metáfase
T16	Schwanoma	Nenhuma metáfase
T17	Condroblastoma	Nenhuma metáfase
T18	Mieloma múltiplo/plasmocitoma	Nenhuma metáfase
T20	Fibrolipoma	Poucas metáfases
T23	Condroblastoma	Poucas metáfases
T24	Metástase de adenocarcinoma	Poucas metáfases
T25	Condrossarcoma central primário	Analisado
T28	Osteossarcoma metastático	Analisado
T29	Fibrolipoma	Banda de baixa qualidade
T30	Fratura (ausência de neoplasia)	Banda de baixa qualidade
T31	Sarcoma pouco diferenciado	Analisado
T35	Osteomielite	Analisado
T36	Osteomielite	Analisado
T37	Fibrose e osteogênese reacional	Poucas metáfases
T40	Fibrossarcoma	Analisado
T41	Osteossarcoma úmero	Nenhuma metáfase

Tabela 4 - Análises parciais das amostras coletadas no Hospital do Câncer Amaral Carvalho de Jaú.

<u>Amostra</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Análise</u>
ACO 03	Tumor de células gigantes	Poucas metáfases
ACO 04	Adenocarcinoma metastático	Poucas metáfases
ACO 07	Osteocondroma	Poucas metáfases
ACO 09	Tumor de células gigantes	Poucas metáfases
ACO 22	Osteoblastoma	Analisado
ACO 25	Tumor de células gigantes	Analisado
ACO 27	Encondroma	Analisado

Tabela 5 – Dados clínicos e resultados citogenéticos dos seis casos estudados.

<u>Caso</u>	<u>Sexo</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Nº Modal (%) / Variação Cromossômica</u>	<u>Cariótipo Composto</u>
1	F	Encondroma	46 (31,25%) / 25-80	38~46,XX,-X[7],-3[3],add(15)(p13)[4],-18[4],-22[3] 46,XX[2]/cp(13)
2	M	Condrossarcoma	46 (37,8%) / 28-74	40~46,XY,del(6)(q22)[4],-9[3] 46,XY[3]/cp(6)
3	M	Osteoblastoma	46 (20,8%) / 20-96	39~46,XY,-X[4],-4[3],del(4)(q31)[5],-5[7],-6[4],-8[3],-9[3],-15[3],-17[4],-19[3],-20[3],-22[8] 46,XY[1]/cp[21]
4	F	Osteossarcoma	46 (28,2%) / 11-39	43~54,XX,-X[5],del(4)(q32)[5],add(13)(p13)[3],add(14)(p13)[4] 46,XX[1]/cp[11]
5	F	Osteomielite Crônica	46 (25,33%) / 19-75	38~47,XX,-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],-19[3],-20[4],-21[3],-22[4],+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3] 46,XX[1]/cp[19]
6	M	Fibrossarcoma	46 (17%) / 12-74	40~47,XY,+X[5],-Y[10],-9[3],-17[4],-18[4],-19[7],-22[5] 46,XY[0]/cp[16]

6 - DISCUSSÃO

EncondromaversusCondrossarcoma

Como os encondromas estão próximos da placa epifisária, podem resultar de uma falha na diferenciação dos condrócitos desta placa. De fato, encondromas demonstram constitutiva atividade na sinalização de hedgehog, que inibe a diferenciação dos condrócitos da placa epifisária. Nos pacientes com encondromatose, 8% também possui uma mutação na região cromossômica 12p11.22, que codifica o receptor PTHLH, *PTHR1*, no seu tecido tumoral. Isso interrompe o ciclo de *feedback* IHH-PTHLH, causando constitutiva sinalização de hedgehog (Bovée et al., 2010).

Análises citogenéticas de condrossarcomas têm mostrado uma extrema heterogeneidade de achados. Anormalidades citogenéticas incluem perda ou duplicação de cromossomos, deleções ou duplicações de regiões cromossômicas, e translocações (Terek, 2006).

Foi relatada uma relação positiva entre o grau histológico e o grau de complexidade do cariótipo em condrossarcomas centrais. Aneuploidia é também associada com o grau de crescimento histológico. Um importante papel do cromossomo 9p21 foi sugerido pela citogenética e pela hibridização genômica comparativa, a perda de heterozigose. O *CDKN2A (P16)*, gene supressor tumoral, localizado nessa região, se mostrou ser importante para o progresso do condrossarcoma, desde que sua inativação foi restrita aos tumores de alto grau (Bovée et al., 2005).

Mutações do *TP53* com perda de heterozigosidade (LOH) podem ter um papel importante na transformação de condrossarcomas convencionais de baixo grau pré-existent em tumores indiferenciados de alta malignidade, com base em estudos de diferentes porções tumorais (Sandberg, 2004).

Foi relatado que a perda da região 6q estava associada com a sobrevivência de metástases livres prejudicadas. Agrupamentos hierárquicos unicamente com clones para o cromossomo 6, parcialmente separaram condrossarcomas de grau III dos outros graus de tumores (Rozeman et al., 2006).

Neste trabalho foram relatadas variações na aneuploidia do caso de encondroma (ACO 27) estudado. Fato este que pode estar relacionado com um crescimento histológico aumentado, que pode ser relacionado à progressão tumoral que esta lesão pode sofrer. Também foi detectada uma adição add(15)(p13), sem achados na literatura sobre envolvimento com a carcinogênese desse tipo tumoral, mas recorrente neste caso estudado, podendo estar envolvida na progressão tumoral.

Já no caso do condrossarcoma (TU 25) estudado, vimos uma variação da aneuploidia para o cromossomo 9, neste caso deletado. A perda desse cromossomo pode estar ligada ao aumento do grau de malignidade do tumor por conter o gene CDKN2A (*P16*), supressor tumoral.

Também foi constatada a deleção del(6)(q22) no condrossarcoma estudado, que pela literatura está ligada ao favorecimento de desenvolvimento de metástases, característico de condrossarcomas de grau III.

Osteoblastoma versus Osteossarcoma

Alterações citogenéticas para o osteoblastoma ainda não foram bem descritos na literatura, sem achados significativos para este caso. No caso estudado neste trabalho (ACO 22), pudemos ver muitas variações numéricas em vários cromossomos e uma deleção del(4)(q31) recorrentes. As alterações numéricas clonais desse caso pode estar também ligada ao grau de crescimento histológico aumentado, assim como no encondroma, apresentando também uma deleção recorrente do cromossomo 9.

Já na região deletada do cromossomo 4, foi feito um levantamento sobre os genes presentes nessa região e foi encontrado o gene *SMAD1*, que codifica uma proteína responsável por mediar sinais para proteínas da morfogenética óssea (BMPs), que estão envolvidas em várias atividades biológicas como crescimento celular, apoptose, morfogênese, desenvolvimento e resposta imune (OMIM, 4q31). Pode-se então relacionar esse achado com o fato de que, se deletado, este gene pode fazer com que essas atividades biológicas fiquem afetadas negativamente e dessa forma podendo ser um fator em potencial para a progressão tumoral deste osteoblastoma.

Foram achados também alguns outros genes como *FBXW7* e o *SFRP2*, que estão envolvidos na carcinogênese de outros tipos tumorais, como o gástrico e o de próstata (OMIM, 4q31.3), mas que, por estarem descritos como fatores potenciais na formação desses tumores, podem estar envolvidos com a etiologia deste osteoblastoma e sua progressão maligna.

Técnicas de citogenética molecular juntamente com análises de citogenética clássica de bandamento GTG em osteossarcomas têm descrito cariótipos complexos com múltiplas aberrações cromossômicas numéricas e estruturais incluindo um alto nível de amplificações em 1q21, 6p21, 8q21-24, 12q13-q14 e 17p12-q11. Foi relatado também uma deleção no cromossomo 8p21.2-p21.3, graças a maior sensibilidade de ensaios baseados em *arrays*. Nessa região do cromossomo 8, foi encontrado o gene *DOCK5*. Evidências mostram que a expressão desse gene é essencial para a diferenciação óssea, com osteoclastos precursores (Sadikovic et al., 2009).

Estudo por análises citogenéticas realizado com osteossarcomas mostrou que ganhos predominaram sobre deleções para todos os cromossomos. Três casos de osteossarcoma estudados tiveram adição numa região em comum do cromossomo 8 (8q22.3-24.1), mas em dois desses casos esses ganhos não tiveram significância. Porém, a literatura mostra que o cromossomo 8 apresenta mudanças no número de cópias, rearranjos e amplificações neste tipo tumoral como em muitos cânceres. Análises com CGH revelaram ganho e/ou amplificação 8q e deleções 8p (Baruffi et al., 2003).

O caso de osteossarcoma estudado (TU 28) apresentou a perda recorrente do cromossomo 8. Este achado pode estar envolvido com o grau de malignidade do caso pela perda de regiões importantes para a diferenciação óssea, como descrito nos casos citados.

No osteossarcoma estudado também foi encontrada a deleção del(4)(q32) recorrente, em que foram encontrados genes que podem estar envolvidos na carcinogênese. O gene *MAP9*, localizado nessa região, está ligado à progressão mitótica e contribui na estabilização do gene *TP53* em resposta ao dano do DNA

(OMIM, 4q32.1). Dessa forma, se deletado, pode estar ligado a um desequilíbrio nas atividades biológicas da célula, sendo favorável ao câncer.

Os outros achados citogenéticos clonais no caso do osteossarcoma, add(13)(p13) e add(14)(p13), não estão descritos na literatura, podendo este ser o primeiro trabalho a relatá-los.

Osteomielite crônica *versus* Fibrossarcoma

O caso de osteomielite crônica analisado neste estudo (TU 35), apresentou um cariótipo composto bastante complexo. Além de apresentar variação na aneuploidia, apresentou também ganho e perda de regiões cromossômicas e presença de marcadores cromossômicos. Sua complexidade cariotípica pode estar ligada com o grau de malignidade e capacidade de transformação em fibrossarcoma, como foi realmente relatado neste caso.

A mutação recorrente add(12)(q24.3), está numa região que apresenta alguns genes que podem estar ligados à progressão maligna dessa lesão óssea. O gene *DIABLO* é um desses genes e este codifica um inibidor de proteína de apoptose (OMIM, 12q24.31). Com o ganho dessa região esse gene terá mais expressão do que o normal e poderá impedir em excesso a apoptose celular, favorecendo o câncer.

Outro gene é o *RAN*, que codifica uma proteína com muitas funções, entre elas o controle da síntese de DNA, e por isso interage com muitas outras proteínas. Mutações nesse gene interrompem a síntese de DNA (OMIM, 12q24.3) e podem ser mais um passo para a transformação maligna da osteomielite crônica.

A outra mutação clonal desse caso, del(17)(p13), apresenta-se numa região com um gene já descrito na literatura de grande importância na etiologia do câncer, o *TP53*. Este é um gene supressor tumoral comumente mutado em neoplasias humanas (Greenblatt et al., 1994). Neste caso, o gene está deletado, portanto, as células perdem a capacidade de controlar o progresso tumoral, sendo mais um fator favorável à carcinogênese.

O caso estudado de fibrossarcoma (TU 40), apresentou variações numéricas clonais de alguns cromossomos. Em especial, pode-se citar a perda do cromossomo 17, onde o gene *TP53* está localizado, provavelmente favorecendo o grau de malignidade do tumor.

O fibrossarcoma foi pouco estudado citogeneticamente e não apresenta muitos dados na literatura. Mas casos antigos relataram ganhos e perdas estruturais ou numéricas do cromossomo 17 (Gorman et al., 1990; Sreekantaiah et al., 1994). E mais recentemente, estudo com técnica de CGH relatou um ganho número de cópias no cromossomo 22q11.2-q12, onde está localizado o gene *PDGF-B*, que exibe atividade de transformação e potencial mitogênico, porém seu papel não está totalmente elucidado na carcinogênese. Este gene tem demonstrado ter um papel importante no desenvolvimento do fibrossarcoma superficial de tecidos moles em adultos, que é o equivalente em tecidos moles do fibrossarcoma de osso (Hattinger et al., 2004).

7 – CONCLUSÃO

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

O estudo realizado relatou várias alterações citogenéticas clonais consistentes que se mostraram potenciais mudanças genéticas na carcinogênese e transformação tumoral. Dessa forma, foram relacionados os dados obtidos com a literatura e assim discutido suas prováveis contribuições na etiologia, desenvolvimento e progresso de cada lesão.

O câncer tem sido amplamente estudado nos dias de hoje, porém ainda há muitos mecanismos genéticos a serem desvendados. Portanto, este estudo visou contribuir na elucidação da etiologia, desenvolvimento, transformação, prognóstico e diagnósticos das lesões tumorais ou pré-tumorais ósseas. Dessa forma, facilita-se também o desenvolvimento de novas formas de terapia mais específicas e menos invasivas do câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

BARUFFI, M.R.; ENGEL, E.E.; SQUIRE, J.A.; TONE, L.G.; ROGATTO, S.R.: Chromossomal imbalances detected in primary bone tumors by comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization. Genetics and Molecular Biology, v.6, n.2, p. 107-113, 2003.

BARUFFI, M.R.; VOLPON, J.B.; CASARTELLI, C.: Osteoid osteomas with chromosome alterations involving 22q. Cancer Genet.Cytogenet.V.Jan 15, n. 124(2), p. 127-31. 2001.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E.: Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. Nature Reviews, v. 6, p. 107-16, 2006.

BOVÉE, J.V.M.G.; CLETON-JANSEN, A.; TAMINIAU, A.H.M.T.; HOGENDOORN, P.: Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. Lancet Oncol, v. 6, p. 599-607, 2005.

BOVÉE, J.V.M.G.; HOGENDOORN, P.C.W.; WUNDER, J.S.; ALMAN, B.A.: Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. Nature Reviews, v. 10, p. 481-488, 2010.

CHALHOUB, N.; BAKER, S.J.: PTEN and the PI3-Kinase pathway in cancer. Annu Rev Pathol., v.4, p.127-150, 2009.

CLETON-JANSEN, A.M.; ANNINGA, J.K.; BRIAIRE-DE BRUIJN, I.H.; ROMEO, S.; OOSTING, J.; EGELER, R.M.; GELDERBLOM, H.; TAMINIAU, A.H.M.; HOGENDOORN, P.C.W.: Profiling of high-grade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumourigenic pathways. *British Journal of Cancer*, v. 101, p. 1909-1918, 2009.

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

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

FREEMAN, S.S.; ALLEN, S.W.; GANTI, R.; WU, J.; MA, J.; SU, X.; NEALE, G.; DOME, J.S.; DAW, N.C.; KHOURY, J.D.: Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors. *InterScience*, v. 113, n. 6, p. 1453-1461, 2008.

GORMAN, P.A.; MALONE, M.; PRITCHARD, J.; SHEER, D.: Deletion of part of the short arm of chromosome 17 in a congenital fibrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 48, p. 193-198, 1990.

GREENBLATT, M.S.; BENNET, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, v. 54, p. 4855-4878, 1994.

HATTINGER, C.M.; TARKKANEN, M.; BENINI, S.; PASELLO, M.; STOICO, G.; BACCHINI, P.; KNUUTILA, S.; SCOTLANDI, K.; PICCI, P.; SERRA, M.: Genetic analysis of fibrosarcoma of bone, a rare tumour entity closely related to osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone. *Eur J Cell Biol*, v. 83, p. 483-491, 2004.

HORVAI, A. ; UNNI, K.K. : Premalignant conditions of bone. *Journal of Orthopaedic Science*, v. 11, p. 412-423, 2006.

HOU, P.; JI, M.; YANG, B.; CHEN, Z.; QIU, J.; SHI, X.; LU, Z.: Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. *InterScience*, v. 106, n. 7, p.1602-1609, 2006.

HUVOS, A.G.: Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. Saunders Company, 2ª ed., 1991.

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

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

KUMAR, V. ; COTRAN V. ; COLLINS, R.S. ; et al. *Patologia Estrutural e Funcional – Robbins*. ed.6a, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., Brasil, p1332, 2000.

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

LIN, C.; MEITNER, P.A.; TEREK, R.M.: PTEN mutation is rare in chondrossarcoma. *Diagnostic Molecular Pathology*, v.11, n.1, p.22-26, 2002.

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

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

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

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

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

MIWA, S.; SUGIMOTO, N.; SHIRAI, T.; HAYASHI, K.; NISHIDA, H.; OHNARI, I.; TAKEUCHI, A.; YACHIE, A.; TSUCHIYA, H.: Caffeine activates tumor suppressor PTEN in sarcomas cells. *International Journal of Oncology*, v. 39, p. 465-472, 2011.

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

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

NOWELL, P.C. AND HUNGERFORD, D.A.: A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*, v. 132, p. 1497, 1960.

OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.

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

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

ROZEMAN, L.B.; CLETON-JANSEN, A.M.; HOGENDOORN, P.C.W.: Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *International Orthopaedics*, v. 30, n. 6, p. 437-444, 2006.

ROZEMAN, L.B.; SZUHAI, K.; SCHRAGE, Y.M.; ROSENBERG, C.; TANKE, H.J.; TAMINIAU, A.H.M.; CLETON-JANSEN, A.M.; BOVÉE, J.V.M.G.; HOGENDOORN, P.C.W.: Array-comparative genomic hybridization of central chondrosarcoma. *InterScience*, v. 107, n.2, p. 380-388, 2006.

SADIKOVIC, B.; YOSHIMOTO, M.; CHILTON-MACNEILL, S.; THORNER, P.; SQUIRE, J.A.; ZIELENSKA, M.: Identification of interactive networks of gene expression associated with osteosarcoma oncogenesis by integrated molecular profiling. *Human Molecular Genetics*, v. 18, n. 11, p. 1962-1975, 2009.

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

SANDBERG, A.A.: Genetics of chondrosarcoma and related tumors. *Curr Opin Oncol*, v. 16, p. 342-354, 2004.

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

SANDBERG, A.A.; MELONI-EHRIG, A.M.: Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments, v.203, p.102-126, 2010.

SANDOVAL, J.; ESTELLER, M.: Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.22, p.50-55, 2012.

SAPIENZA, M.T.; HIRONAKA, F.; LIMA, A.L.L.M., et al. Avaliação de atividade inflamatória na osteomielite crônica. Contribuição da cintilografia com anticorpos policlonais. *Rev. Assoc. Med. Brás, São Paulo*, vol.46(2).

SCHAJOWICZ, F.: Neoplasias Ósseas e Lesões Pseudotumorais. *Revinter*, 2ª ed., 2000.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J.: Fundamentos de Genética. Guanabara Koogan, 4ª ed. Rio de Janeiro, RJ, 2008.

SREEKANTIAH, C.; LADANYI, M.; RODRIGUEZ, E.; CHAGANTI, R.S.K.: Chromosomal aberrations in soft tissue tumors. *American Journal of Pathology*, v. 144, n. 6, p. 1121-1134, 1994.

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

SUDOYO, A.W.; HARDI, F.: Cytogenetics in Solid Tumors: Lessons from the Philadelphia Chromosome. *Cytogenetics in Solid Tumors*. v. 43, p. 68-73, 2011.

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

TEREK, R.M.: Recent advances in the basic science of chondrosarcoma. *Orthopedic Clin N Am*, v. 37, p. 9-14, 2006.

WALTHER, C. ; DOMANSKI, H.A. ; STEYERN, F.V. ; MANDAHN, N. ; MERTENS, F. : Chromosome banding analysis of cells from fine-needle aspiration biopsy samples from soft tissue and bone tumors : is it clinically meaningful ?. *CancerGenetics*, v. 204, p. 203-206, 2011.

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

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

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

ZWICK, E.; BANGE, J.; ULLRICH, A.: Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *EndocrRelatCancer*, v. 8, p. 161-173, 2001.