Érika Cristina Pavarino

Estudo Citogenético de Células Normais e Tumorais de Indivíduos com Neoplasias Cutâneas

unesp

ERIKA CRISTINA PAVARINO

37

ESTUDO CITOGENÉTICO DE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS DE INDIVÍDUOS COM NEOPLASIAS CUTÂNEAS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

631/94

São José do Rio Preto - SP

1993

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" com auxílio financeiro da CAPES e FUNDUNESP.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, por terem possibilitado o meu
ingresso ao mundo da Ciência

Ao meu companheiro Paulo Henrique,
pelo carinho e compreensão

"Para todos os seres humanos constitui quase um dever
pensar que o que se tiver realizado é sempre pouco em
comparação com o que resta por fazer"

João XXIII

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para sua concretização.

Agradeço em especial à minha orientadora e amiga Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, pela confiança, paciência e orientação no planejamento e execução deste trabalho e pelos estímulos nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela amizade dedicada e colaboração em todos os momentos, inclusive na análise da pró-forma.

À Profa. Dra. Silva Regina Rogatto, pela atenção e análise cuidadosa da pró-forma e pelas valiosas sugestões apresentadas.

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

À coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Profa. Dra. Marileila Varella Garcia, pelo carinho e colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos Serviços de Dermatologia e Cirurgia Plástica da Faculdade Regional de Medicina, pelo envio das amostras, em especial ao médico dermatologista Dr. João Roberto Antonio pela atenção e interesse.

Aos pacientes e seus familiares, pela contribuição imprescindível.

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

À Profa. Dra. Maria Astride S. Corradi, pelo carinho e apoio em todos os momentos e por todas as sugestões.

À Profa. Dra. Agnes C. Fett Conte, por ter me iniciado na pesquisa em Citogenética Humana, sempre me incentivando e auxiliando.

À Profa. Dra. Eliana M. Versute e à Profa. Eny M. G. Bertollo, pelo incentivo e convivência amiga.

A todos os outros professores do Departamento de Biologia que sempre me acompanharam com empenho e dedicação.

Aos técnicos Josué R. dos Santos, Rosana Silistino e Sidnei Olívio, pela amizade e apoio técnico-laboratorial.

Às secretárias do Departamento de Biologia, da Seção de Pós-Graduação, aos funcionários da Biblioteca, do laboratório de

Computação e aos demais funcionários deste Instituto, pela presteza e eficiência com que sempre me atenderam.

À Rosa S. Kawasaki-Oyama, pela orientação sincera no início deste trabalho.

À Andrea R. B. Rossit, pela companhia agradável nos momentos que passamos no centro de microscopia.

Ao Marcelo F. Lourenço, pela amizade e pelo auxílio e disponibilidade nos serviços de digitação deste texto.

À Sheila A. Vayego, pela convivência amiga, incentivo, troca de experiências e esforços dedicados.

À Grasiela D. C. Severi Aguiar, pela dedicação, pelo apoio sincero e por todos os favores que tem me prestado, sempre solicita e incansável.

À Andrea B. C. F. de Salles, pelo carinho e companheirismo nos momentos de preparação para ingresso no Curso de Pós-Graduação e pela constante dedicação.

Ao demais colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo ambiente de trabalho cordial e solidariedade.

Aos meus pais Reginaldo e Oneida, por todo amor e apoio em todos os momentos de minha vida e pelos esforços desempenhados para minha formação profissional.

A todos os meus familiares, em especial aos meus irmãos Reginaldo e Regina e meu cunhado Ricardo, por tanta dedicação e afeto e, ao meu tio Seco, pela paciência e confiança durante a realização da parte fotográfica deste trabalho.

Ao meu companheiro Paulo Henrique, pela paciência e por todos os momentos de renúncia.

A Deus por tudo.

INDICE

I.INTRODUÇÃO..... 1

I.1. Pele e tumores cutâneos..... 1

I.2. Etiologia do câncer de pele..... 7

I.3. Fatores genéticos no desenvolvimento do câncer.....10

I.4. Objetivos..... 19

II. MATERIAL E MÉTODOS..... 21

II.1 Material..... 21

II.2 Métodos..... 21

III. RESULTADOS..... 27

III.1. Tumores malignos..... 34

III.2. Tumores benignos..... 40

III.3. Pele normal..... 46

IV. DISCUSSÃO..... 53

V. RESUMO..... 65

VI. SUMMARY..... 66

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 67

VIII. APÊNDICE..... 85

I. INTRODUÇÃO

I.1. Pele e tumores cutâneos

A pele é o orgão mais visível e acessível do corpo e, apesar de sua flexibilidade e elasticidade, é surpreendentemente resistente ao traumatismo e a diferentes tipos de radiação. Sua superfície descamativa é impermeável a muitas substâncias e sua rede de células monitoriza os antígenos potencialmente prejudiciais e filtra os raios nocivos da luz solar. Regula, ainda, a temperatura corporal e realiza importantes funções de excreção, armazenamento e síntese de substâncias. Graças à sua acessibilidade para estudo, representa um valioso instrumento no entendimento de muitos processos biológicos normais e também na compreensão e na observação dos efeitos de um grande número de agentes ambientais (Murphy **et al.**, 1986).

Do ponto de vista histológico, a pele é composta por três componentes estreitamente relacionados, a porção mais superficial chamada epiderme, a porção conjuntiva ricamente vascularizada e inervada conhecida como derme, e uma série de estruturas anexas, que compreendem os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (Klein-Szanto, 1989). Em continuidade com a derme está a hipoderme, composta por tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo que servem de suporte à pele e fazem sua união com os órgãos subjacentes (Junqueira & Carneiro, 1990).

A epiderme é um epitélio em renovação contínua que se queratiniza e dá origem a estruturas anexas (Holbrook & Wolff, 1988). Dois tipos celulares constituem a epiderme, os queratinócitos e as células dendríticas, entre elas os melanócitos que produzem o pigmento melanina, as células de Langerhans que fazem parte do sistema imune e as de Merckel com função neuroectodérmica (Klein-Szanto, 1989; Hashimoto & Mehregan, 1990; Junqueira & Carneiro, 1990; Lever & Schaumburg-Lever, 1990).

Os queratinócitos se dispõem em quatro camadas, sendo a mais profunda denominada estrato basal ou germinativo. As células basais são prismáticas ou cubóides, possuem núcleos alongados de coloração escura e citoplasma altamente basofílico com grânulos de melanina, cuja quantidade está diretamente relacionada com a cor da pele (Lever & Schaumburg-Lever, 1990). Essas células dividem-se

continuamente e sua subsequente migração e diferenciação resultam no estrato espinhoso. À medida que as células espinhosas progridem para a superfície, tornam-se achatadas com núcleos pequenos e condensados, adquirem grânulos citoplasmáticos e formam o estrato granuloso. Finalmente, a porção mais externa da epiderme compreende o estrato córneo, cujas células, extremamente achatadas e sem núcleos, mostram seu citoplasma preenchido por uma substância córnea chamada queratina (Klein-Szanto, 1989 ; Hashimoto & Mehregan, 1990; Junqueira & Carneiro, 1990).

Os melanócitos distribuem-se entre as células basais da epiderme e seu número varia com a região do corpo considerada e com a exposição à luz ultravioleta (UV). Essas células fabricam a melanina, um pigmento que protege a pele contra os danos da radiação, e transferem-na através dos seus processos dendríticos para os queratinócitos basais onde é armazenada. Indivíduos de pele escura, embora com densidade de melanócitos semelhante aos de pele clara, apresentam grânulos de melanina em todas as camadas da epiderme incluindo o estrato córneo e, algumas vezes, também na derme superior. Por outro lado, a pele de indivíduos caucasóides proveniente de sítios anatômicos habitualmente expostos à luz mostram maior número de melanócitos que a de regiões não expostas (Lever & Schaumburg-Lever, 1990).

As células de Langerhans são morfologicamente semelhantes aos melanócitos e manifestam características funcionais que provavelmente têm um importante papel na reação contra infecções virais e neoplasmas da pele, podendo ser alteradas pela radiação UV. Funções imunológicas também estão presentes nos queratinócitos, que produzem diferentes substâncias como o alfa-interferon e uma molécula relacionada com a interleucina-1 (Lever & Schaumberg-Lever, 1990).

A derme possui duas camadas de limitação pouco distinta, a papilar, que é mais superficial e constituída por tecido conjuntivo frouxo, e a reticular, que é constituída por tecido conjuntivo denso (Junqueira & Carneiro, 1990). Ambas são compostas de células (fibroblastos, histiócitos, células endoteliais, pericitos e mastócitos), fibras colágenas e elásticas e substância fundamental. Abaixo dessas duas camadas é encontrada a gordura subcutânea, cuja estrutura consiste de lóbulos de células adiposas, separados por septos fibrosos no interior dos quais existem nervos e vasos sanguíneos e linfáticos que suprem a pele suprajacente. As glândulas

sebáceas e sudoríparas estão sempre envoltas por células adiposas e localizadas próximas à junção da derme reticular com a hipoderme (Murphy **et al.**, 1986).

Os tumores cutâneos podem surgir de qualquer um dos componentes da pele (Klein-Szanto, 1989) e são classificados em ectodérmicos e mesodérmicos de acordo com a sua origem. Entre os ectodérmicos estão incluídos os tumores da epiderme e dos anexos cutâneos, e entre os mesodérmicos incluem-se aqueles derivados da derme e do tecido subcutâneo (Sampaio **et al.**, 1987). Em cada classe podem ocorrer tumores benignos e malignos. Os tumores benignos são normalmente caracterizados por crescimento localizado e, por definição, não penetram nos tecidos adjacentes e não se disseminam para sítios distantes. Em contraste, os tumores malignos ou cânceres têm propriedades de invasão dos tecidos contíguos e de metastização para outros locais do organismo (Lever & Shaumburg-Lever, 1990; Rubin & Farber, 1990).

A nomenclatura utilizada para os tumores de pele segue os mesmos critérios da aplicada para outras neoplasias. Tumores benignos são identificados pelo sufixo "oma", o qual é precedido pelo termo referente à célula ou tecido de origem como, por exemplo, o lipoma, que é um neoplasma mesenquimal derivado de células adiposas. Aos tumores epiteliais é dada uma variedade de nomes baseados nas suas características principais. É o caso de tumores ramificados e exofíticos do epitélio escamoso , que são chamados de papilomas (Rubin & Farber, 1990; Cotran **et al.**, 1991).

As neoplasias malignas, por sua vez, quando originadas do tecido mesenquimal são chamadas sarcomas, termo esse que é usado como sufixo após o tipo celular ou tecido envolvido como, por exemplo, o lipossarcoma, que deriva do tecido adiposo. As lesões originadas de células epiteliais recebem a designação de carcinoma acompanhada, sempre que possível, do nome do orgão ou tecido de origem, como o carcinoma espinocelular ou o carcinoma basocelular da pele (Rubin & Farber, 1990; Cotran **et al.**, 1991).

A persistência de certos termos históricos dificulta o entendimento da nomenclatura de neoplasias da pele. O melanoma, por exemplo, de acordo com as regras citadas, deveria tratar-se de um tumor benigno mas é, no entanto, altamente maligno. O carcinoma basocelular, ao contrário, é relativamente pouco agressivo e desig-

nado por muitos autores como epitelioma para enfatizar sua natureza localizada (Rubin & Farber, 1990).

As lesões benignas e pré-malignas da pele mais comuns correspondem aos nevos e às queratoses solares e seborréicas. Os nevos melanocíticos são manchas cutâneas resultantes da proliferação de melanócitos, cuja coloração varia de castanho claro a negro e cujo tamanho pode atingir desde milímetros até vários centímetros. Constituem uma lesão plana, ligeiramente saliente ou mesmo pedunculada, com superfície lisa ou verrucosa provida ou não de pelos (Sampaio **et al.**, 1987; Machado Filho, 1990). Podem ser congênitos ou erupcionarem na infância ou adolescência e menos frequentemente na idade adulta (Briggs, 1985; Hashimoto & Mehregan, 1990). Predominam nas áreas expostas da pele e inicialmente compreendem agregados celulares na epiderme inferior. À medida que crescem, suas células penetram na derme e produzem o nevo composto que apresenta componentes dérmicos e epidérmicos. Com a contínua migração celular, a lesão gradualmente desaparece da junção dermo-epidérmica e torna-se inteiramente dérmica (Murphy & Mihm Junior, 1991). Alguns nevos eventualmente sofrem hiperplasia e, em raros casos, progridem para uma displasia melanocítica com invasão vertical das camadas mais profundas da pele resultando, posteriormente, no melanoma primário (Klein-Szanto, 1989; Kacker **et al.**, 1990). O nevo displástico é geralmente maior que o melanocítico comum e tem características como pigmentação alterada e bordos irregulares, além de, histologicamente, apresentar atipia citológica e tecidual (Silva **et al.**, 1992).

A queratose solar, também conhecida como actínica ou senil, geralmente surge em áreas expostas da pele, sobretudo em indivíduos de pele clara com mais de 40 anos de idade. Apresenta-se como pápulas secas, ásperas e pardacentas, recobertas por escamas e de tamanho variável. Histologicamente, mostra espessamento do estrato córneo e da camada espinhosa, aumento da atividade mitótica e formação anormal de queratina (Furtado & Guedes, 1987; Hashimoto & Mehregan, 1990; Machado Filho, 1990; Murphy & Mihm Junior, 1991). O curso das lesões é crônico e pode haver malignização com evolução para carcinomas baso e espinocelular em aproximadamente 25% dos casos (Marks **et al.**, 1988; Klein-Szanto, 1989).

A queratose seborréica ou papiloma basocelular é um tumor benigno de células semelhantes às células basais, frequente após a meia-idade. Compreende placas de superfície gordurosa ou verrucosa,

geralmente friáveis e com pigmentação variável, formadas por cordões de células basais internamente preenchidos por queratina (Hashimoto & Mehregan, 1990).

Além dos tumores benignos citados, outros menos comuns também podem ocorrer, como o cisto sebáceo que é uma lesão proliferativa do epitélio do folículo piloso, e os tumores originados dos anexos cutâneos (Murphy & Mihm Junior, 1991). As lesões da hipoderme são muitas vezes citadas entre as neoplasias da pele e afetam os vasos, os nervos , o tecido conjuntivo e o tecido adiposo (Sampaio **et al.**, 1987; Klein-Szanto, 1989; Machado Filho, 1990). Os lipomas estão entre os exemplos mais frequentes e, do ponto de vista clínico e histológico, consistem de proliferações benignas do tecido adiposo, geralmente assintomáticas, com crescimento lento e ausência de metástases. Podem ser subcutâneos ou intramusculares, esses últimos com taxas de recorrência maiores que os primeiros (Dal Cin **et al.**, 1989; Sreekantaiah, **et al.**,1990a; 1991b).

As neoplasias malignas da pele mais comuns compreendem o melanoma e os carcinomas basocelular e espinocelular (Morton **et al.**, 1990). O melanoma é uma neoplasia de melanócitos atípicos localizados na junção dermo-epidérmica, que apresenta grande potencial de metastização (Reis, 1990; Silva **et al.**, 1992). É geralmente classificado em quatro tipos de acordo com suas características clínicas e histológicas (Vivier & Mckee, 1988). O melanoma lentigo maligno constitui cerca de 10% de todos os melanomas primários cutâneos e é encontrado mais frequentemente em pessoas idosas e em áreas do organismo expostas ao sol, como a face e o dorso das mãos (Morton **et al.**, 1990; Silva **et al.**, 1992). O melanoma de disseminação superficial é a forma mais comum e ocorre predominantemente em adultos jovens e em qualquer parte do tegumento, em especial no tronco e membros inferiores (Vivier & Mckee, 1988; Morton **et al.**, 1990; Silva **et al.**, 1992). O terceiro tipo ou nodular compreende de 10 a 15% de todos os melanomas cutâneos e é de prognóstico ruim porque manifesta invasão precoce da derme (Klein-Szanto, 1989; Morton **et al.**, 1990; Silva **et al.**, 1992). O tipo mais raro é o melanoma acral, que afeta as regiões palmares e plantares principalmente de indivíduos orientais e negros (Vivier & Mckee, 1988; Morton **et al.**, 1990; Silva **et al.**, 1992). Nesses quatro tipos tumorais, a origem reside em melanócitos isolados dentro da epiderme que, com a evolu-

ção da lesão, aumentam em número, mostram sinais de atipia e reunem-se em pequenos ninhos na junção dermo-epidérmica (Silva **et al.**, 1992).

A incidência do melanoma maligno é elevada e vem aumentando gradativamente, em particular entre indivíduos com idades inferiores a 65 anos (Morton **et al.**, 1990; Paul, 1990; Loggie **et al.**, 1991). Nos Estados Unidos, no ano de 1991, aproximadamente 32.000 americanos apresentaram melanoma e 6.500 foram a óbito (Koh, 1991). A Austrália mostra os maiores índices de mortalidade e de incidência da neoplasia, que afeta dez vezes mais a raça branca que a negra e atinge igualmente ambos os sexos, embora com sobrevida maior e menor risco de metástases entre mulheres (Parkin **et al.**, 1990; Geller **et al.**, 1992; Rivers & Ho, 1992; Silva **et al.**, 1992). O prognóstico depende de características histológicas, imunológicas e clínicas, entre elas a idade, e nesse caso, embora o seu significado não esteja completamente claro (Loggie **et al.**, 1991), não existem dúvidas de que as perspectivas são mais sombrias para pacientes acima de 70 anos de idade (Rivers & Ho, 1992; Silva **et al.**, 1992). A distribuição dessa neoplasia no organismo não parece relacionada com regiões mais ou menos expostas à luz (Morton **et al.**, 1990; Koh, 1991). Entretanto, o risco relativo do seu desenvolvimento aumenta com a presença de nevos (Silva **et al.**, 1992). O nevo displástico esporádico, por exemplo, está associado ao aparecimento de melanoma em cerca de 5% a 10% dos casos, risco esse que pode atingir 100% se houver casos de melanoma na família (Koh, 1991; Silva **et al.**, 1992).

O carcinoma basocelular, também conhecido como epitelioma da célula basal ou basotelioma, é um tumor maligno que se caracteriza pelo acúmulo de células semelhantes a queratinócitos não diferenciados, dispostas em ilhotas dérmicas comunicadas ou não com a epiderme adjacente. Em virtude do caráter indiferenciado de tais células, foi proposto que vestígios embrionários de queratinócitos podem constituir a origem desse tumor (Molès **et al.**, 1993). As lesões geralmente ocorrem na face, mas também podem surgir em áreas não expostas ao sol de pessoas idosas e de pele clara, na forma de pápulas lisas e brilhantes que quase sempre originam úlceras irregulares e elevadas (Ramos Junior., 1984; Murphy **et al.**, 1986; Reis, 1990). Embora essa neoplasia raramente metastize e possa em alguns casos sofrer regressão espontânea, ela é localmente invasiva, o que

é de particular importância quando situada próximo aos olhos, nariz ou orelhas (Vivier & Mckee, 1988). É responsável por aproximadamente 65 a 75% dos cânceres de pele e prevalece entre os caucasianos, atingindo apenas 0,5% dos negros e orientais (Hashimoto & Mehregan, 1990).

O carcinoma espinocelular, epidermóide ou de células escamosas é outro tumor maligno de pele originado da proliferação atípica de células espinhosas e, ao contrário do carcinoma basocelular, se infiltra e se fixa nos tecidos subcutâneos. Na fase inicial aparece como um nódulo pequeno, avermelhado e áspero, que cresce lateralmente e verticalmente e às vezes pode ulcerar (Ramos Junior., 1984; Sampaio **et al** ., 1987; Vivier & Mckee, 1988). Nesse tumor, do mesmo modo que em queratose solar que é precursora desse carcinoma e do carcinoma basocelular, são observados muitos focos de displasia emergente ao lado de neoplasia avançada e áreas normais. Tal achado tem sugerido, por isso, origem policlonal ou diferentes graus de transformação das células nessas condições (Slaughter, 1953; Hashimoto & Mehregan, 1990).

O carcinoma espinocelular é o tipo mais frequente de câncer de pele entre as pessoas claras depois do basotelioma, sendo os homens duas vezes mais afetados que as mulheres. Em 1990, nos Estados Unidos, foram estimados 100.000 a 150.000 casos novos , que surgem mais comumente em indivíduos com cerca de 65 anos de idade, embora também possam atingir pessoas jovens com condições predisponentes ou que sofreram extensiva exposição ao sol (Hashimoto & Mehregan, 1990, Johnson **et al**., 1992).

Outros tumores malignos menos comuns podem ocorrer na pele e, entre eles podem ser citados a histiocitose maligna, o carcinoma das células de Merckel, os carcinomas dos apêndices cutâneos e os sarcomas da derme (Klein-Szanto, 1989; Murphy & Mihm Junior, 1991).

I.2. Etiologia do câncer de pele

Há muitos anos é conhecido o fato de que a maioria dos agentes mutâgenicos mais potentes, tais como a luz ultravioleta, a radiação ionizante e certos produtos químicos, é também carcinogênica devido à sua capacidade de modificar o material genético da célula. A luz UV constitui uma porção significativa do espectro

solar e é composta por três tipos de raios: os raios UVB (290 a 320 nm) que atingem a Terra depois de serem parcialmente filtrados pela camada estratosférica de ozônio, os raios UVC (200 a 290 nm) que são totalmente bloqueados por essa camada e os UVA (320 a 400 nm) que não são significativamente reduzidos (Hashimoto & Mehregan , 1990). Os raios UVB induzem respostas proliferativas com consequente alteração na espessura da pele (Hall **et al.**, 1993). São mutagênicos e carcinogênicos porque levam à formação de anéis de ciclobutano entre as bases pirimídicas do DNA, o que resulta usualmente em dímeros de timina capazes de distorcer a estrutura dupla da molécula e bloquear a sua duplicação e transcrição (Gardner & Snustad, 1986; Reeves, 1989; Hashimoto & Mehregan, 1990; Daya-Grosjean **et al.**, 1993).

Na pele normal, os dímeros de timina são excisados e o defeito é reparado pela síntese de um novo segmento de DNA. O reparo por excisão é também conhecido como reparo não dependente da luz, ao contrário de um outro mecanismo, o da fotorreativação, que requer raios de luz de comprimento de onda compatíveis com a UVA e com a luz visível para ativação da enzima responsável pela reversão dos dímeros a monômeros. Por essa razão, é possível que a exposição seletiva à UVA e à luz visível seja benéfica na prevenção do câncer de pele (Hashimoto & Mehregan, 1990). Do mesmo modo, parece evidente que alterações no sitema de reparo do DNA podem levar ao aparecimento de neoplasias. O melhor exemplo dessa associação é dado pela doença autossômica recessiva denominada xeroderma pigmentoso (XP). Seus portadores manifestam sensibilidade à luz solar, envelhecimento prematuro e alta frequência de queratoses actínicas e câncer de pele em áreas expostas, provavelmente em virtude da incapacidade enzimática para corrigir lesões ocorridas no DNA das células epidérmicas causadas pela exposição à UV (Gardner & Snustad, 1986; Vivier & Mckee, 1988; Hashimoto & Mehregan, 1990; Hansson, 1992; Cheng & Loeb, 1993). Os estudos já realizados mostram que os linfócitos de indivíduos com xeroderma apresentam quebras cromossômicas espontâneas significativamente aumentadas. Além disso, as análises citogenéticas de células normais, pré-malignas e malignas desses pacientes sugerem que as aberrações cromossômicas podem representar um dos passos no processo da transformação neoplásica (Casati **et al.**, 1991).

Apesar da deficiência de reparo do DNA estar claramente

implicada na susceptibilidade ao câncer de pele no caso do XP, nem sempre é possível fazer uma relação direta desse tipo. Uma parte dos tumores cutâneos ocorre em pacientes de pele clara que sofreram grande exposição à luz solar mas que não apresentam deficiência enzimática conhecida, o que, entretanto, é geralmente difícil de ser comprovado. Nesse ponto, vale a pena citar que animais noturnos como ratos e camundongos têm um reparo de DNA muito lento após irradiação por UV. Desse modo, raças ou indivíduos com predisposição ao câncer de pele podem ter tido ancestrais que viveram em condições ambientais de pouca exposição ao sol e que foram submetidos, assim, a um relaxamento da seleção natural sobre a deficiência de reparo do DNA (Hashimoto & Mehregan, 1990). A favor dessa hipótese está o fato de que pacientes jovens portadores de carcinoma basocelular, que é típico da idade avançada, apresentam algumas vezes tal deficiência, do mesmo modo que aqueles com história familial de neoplasias cutâneas (Wei **et al.**, 1993). No caso de indivíduos idosos, que passaram a maior parte de suas vidas em locais ensolarados e são frequentemente acometidos por carcinomas cutâneos e por lesões pré-malignas (Klein-Szanto, 1989), a deficiência dos mecanismos de reparo pode ser consequência da idade avançada (Wei **et al.**, 1993). Entretanto, os resultados de pesquisas realizadas sobre o assunto são contraditórios, provavelmente devido às dificuldades técnicas de abordagem do problema (Warner & Price, 1989).

Um fator que está associado com o processo de malignização nesse grupo de doenças é, portanto, o próprio envelhecimento, particularmente porque a frequência de tumores de pele, assim como de muitos outros, aumenta consideravelmente com a idade. É difícil, todavia, esclarecer se o câncer e o envelhecimento são entidades interligadas ou independentes. Ambos têm pontos comuns e parecem ter origem em alterações que afetam a regulação normal dos genes, como deficiências, rearranjos, amplificações e mutações gênicas, combinadas ou não à deficiência de reparo do DNA (Gardner & Snustad, 1986; Cutler & Semsei, 1989). Os dois processos, porém, parecem seguir diferentes rumos, um deles resultando em morte celular e, portanto, em envelhecimento, e o outro em modificações no controle da divisão e diferenciação celular que caracterizam o câncer (Cutler & Semsei, 1989).

A fotoimunossupressão também pode ser importante no de-

senvolvimento de algumas neoplasias cutâneas. Tem sido demonstrado que a irradiação UVB lesa as células de Langerhans da epiderme e, além disso, suprime a hipersensibilidade por contato provavelmente em virtude de indução da produção de um inibidor da interleucina-1 pelos queratinócitos. Desse modo, parece razoável concluir que a UVB desregula o mecanismo imunológico da pele com consequente falha no reconhecimento de queratinócitos anormais (Hashimoto & Mehregan, 1990).

Além da luz UV, outras causas podem ser referidas para os tumores de pele. Por exemplo, um risco elevado de carcinoma espinocelular é observado entre trabalhadores com exposição profissional aos raios X (Burns **et al.**, 1989; Johnson **et al.**, 1992). Isso provavelmente ocorre porque a radiação ionizante induz alterações no material genético através da expulsão de um ou mais elétrons da molécula, o que resulta num íon ou radical livre instável altamente reativo (Lehninger, 1986). As consequentes lesões do DNA podem ser reparadas ou permanecerem como mutações com potencial para a carcinogênese (Watson **et al.**, 1987).

Outros agentes que podem levar à malignização cutânea compreendem os efeitos diretos dos hidrocarbonetos orgânicos, como o alcatrão de hulha e dos sais inorgânicos de arsênico (Weisburger & Willians, 1982; Elwood **et al.**, 1989; Johnson **et al.**, 1992), e infecções do vírus do papiloma humano, imunossupressão, úlceras, dermatoses crônicas e cicatrizes pré-existentes (Johnson **et al.**, 1992; Kwa **et al.**, 1992). Determinadas síndromes genéticas também aumentam a probabilidade de tumores na pele, como as genodermatoses, a epidermodisplasia verruciforme, a epidermólise bolhosa, a disqueratose congênita e a síndrome do nevo basocelular (Elwood **et al.**, 1989; Hashimoto & Mehregan, 1990). A própria predisposição familial também já foi citada (Czarnecki **et al.**, 1992). Interessantemente, uma dieta rica em vegetais, em especial de crucíferas, peixes, e alimentos ricos em beta-caroteno e vitamina C, parece proteger o indivíduo dos carcinomas baso e espinocelulares (Kune **et al.**, 1992).

I.3. Fatores genéticos no desenvolvimento do cancêr

A transformação de uma célula normal em maligna é um processo gradual de múltiplas etapas e envolve alterações genéticas sequenciais. Muitas dessas alterações são mediadas por aberrações cromossômicas e resultam em modificações nos mecanismos de controle

de proliferação e de diferenciação celular (Chiao **et al.**, 1990; Solomon **et al.**, 1991).

Em nível molecular, grupos específicos de genes são alvos de tais alterações. Entre eles podem ser citados os protoncogenes, que participam da regulação do crescimento tecidual normal mas que, após eventos que incluem desde mutações em ponto até modificações estruturais visíveis citogeneticamente, tornam-se capazes de induzir a transformação neoplásica em condições naturais ou experimentais (Pimentel, 1985; Solomon **et al.**,1991). Atualmente, mais de 56 protoncogenes foram identificados no genoma humano, muitos dos quais já foram mapeados (Sandberg, 1990, Mitelman, 1991). Seus produtos incluem fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, enzimas associadas com receptores, moduladores da transmissão de sinais através da membrana e outros que atuam no núcleo celular, aparentemente de forma direta na duplicação ou transcrição do DNA e mesmo nos eventos pós-transcricionais (Pimentel, 1985; Weber & Mc Clure, 1987; Huber, 1989; Barbacid, 1990; Klein, 1990; Feldman & Yaar, 1991).

O segundo tipo de fatores relacionados com o processo neoplásico é o de genes supressores de tumor, também conhecidos como antioncogenes ou oncogenes recessivos. Possuem papel regulador na proliferação e diferenciação normal através da ação sobre os protoncogenes e, quando sofrem perda de função, contribuem para a tumorigênese (Anderson & Spandidos, 1988; Knudson Junior, 1989; Solomon **et al.**, 1991; Thompson, 1991; Weinberg, 1991).

Em resumo, a divisão de células normais é regulada por protoncogenes e esses, por sua vez, são controlados pelos genes supressores. Mutações que potencializam as atividades de um protoncogene levam ao crescimento da neoplasia e, ao contário, lesões que inativam um gene supressor liberam a célula das restrições impostas por ele, resultando também em proliferação desordenada (Weinberg ,1991).

A identificação dos genes envolvidos no processo neoplásico depende em grande parte da caracterização molecular dos rearranjos cromossômicos observados em câncer. Esses rearranjos, classificados pela citogenética clássica em estruturais e numéricos, podem ser agrupados em três categorias amplas de acordo com o mecanismo através dos quais promovem crescimento maligno, a saber, as translo-

cações, inversões e inserções, as deficiências parciais e monossomias cromossômicas e as amplificações que compreendem trissomias, isocromossomos, **double-minutes** (DM) e regiões homogeneamente coradas (HSR) (Sandberg, 1990).

As translocações, inversões e inserções afetam sequências de DNA próximas aos pontos de quebra e podem resultar na desregulação de genes celulares normais ou na formação de genes oncogênicos quiméricos. As deficiências parciais e totais e as amplificações causam, muitas vezes, alterações na dosagem de blocos grandes de genes tornando difícil a identificação das sequências responsáveis pela indução das alterações fenotípicas. As deficiências e monossomias são geralmente sugestivas da perda de função de um gene, perda essa importante na iniciação ou progressão do processo maligno e provavelmente relacionada com genes supressores (Solomon **et al.**, 1991).

A primeira anomalia cromossômica consistente observada em uma neoplasia humana, a leucemia mielóide crônica (LMC), compreendeu um cromossomo do grupo G aparentemente deficiente denominado cromossomo PHILADELPHIA ou Ph^1 (Nowel & Hungerford, 1960; Tough **et al.**, 1961), depois reconhecido como sendo resultado de uma translocação geralmente envolvendo os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34; q11)] (Rowley, 1973).

Após a descrição do cromossomo Ph^1, muitos outros rearranjos cromossômicos estruturais foram detectados em neoplasias e serão feitas a seguir algumas considerações sobre suas consequências moleculares. Por exemplo, na translocação entre os cromossomos 9 e 22 em LMC, ocorre a fusão do gene BCR, presente na banda 22q11, e do protoncogene ABL1, presente em 9q34. A proteína quimérica codificada, a p210, mantém ativos os sítios de ambas as proteínas, agora reunidas em uma única (Heisterkamp **et al.**, 1984; Bartram **et al.**, 1985; Rowley, 1990; Solomon **et al.**, 1991; Witte, 1993). O motivo pelo qual o novo polipeptídio formado contribui para a transformação maligna ainda é desconhecido, mas sabe-se que sua atividade de tirosina quinase é maior que da proteína original fabricada pelo protoncogene ABL1, que em condições normais parece ser uma molécula de transdução citoplasmática e relacionada com o controle da proliferação celular (Heim & Mitelman, 1987; Feldman & Yaar, 1991).

Uma outra consequência molecular dos rearranjos estruturais em câncer é que eles podem desencadear a expressão aumentada de

protoncogenes em consequência de sua justaposição a sequências promotoras ou estimuladoras de transcrição, normalmente ativas no tipo celular do qual o tumor se originou. Mais de 10 oncogenes foram descritos em associação com mecanismos de desregulação desse tipo e, em cânceres hematológicos, envolvem principalmente sequências estimuladoras da transcrição de imunoglobulinas (Ig) e de receptores de células T (Solomon **et al.**, 1991). No caso do linfoma de Burkitt, por exemplo, o protoncogene MYC, localizado na banda 8q24, é translocado próximo ao gene da cadeia pesada das Ig, presente na banda 14q32. A translocação provavelmente justapõe os estimuladores de transcrição associados com o gene da cadeia de Ig e o protoncogene MYC, levando à sua expressão aumentada (Dalla-Favera **et al.**, 1982, 1983; Nowel & Croce, 1986; Croce, 1987; Heim & Mitelman, 1987; Sandberg, 1990; Secker-Walker, 1990; Thompson, 1991). Outro exemplo desse mecanismo de ativação é o da translocação t(5;14)(q31;q32) que ocorre em leucemia linfocítica aguda da célula pré-B. Nesse rearranjo, o gene do fator de crescimento interleucina-3 é colocado próximo ao estimulador de transcrição do gene da cadeia pesada de Ig. A consequente superprodução de interleucina-3 leva a um aumento na frequência de divisão celular e à elevação no número de glóbulos brancos. Esse efeito pode ser compensado por antagonistas de interleucina-3, fato esse utilizado na terapia viável e eficiente para esse tipo de leucemia, surgida a partir da caracterização molecular de seu rearranjo cromossômico (Solomon **et al.**, 1991).

As descrições de rearranjos estruturais em tumores sólidos são muitas, embora o entendimento molecular desses rearranjos está muito aquém daquele em neoplasias hematológicas, principalmente devido às dificuldades metodológicas no estudo desses tumores. Alguns exemplos, entretanto, podem ser citados. Um deles é o da translocação t(4;14)(p14;p11) em um carcinoma basocelular da pele (Kawasaki **et al.**, 1991a) e da inversão inv(4)(p15q26) em um carcinoma espinocelular da laringe (Jin **et al.**, 1988). O fator de crescimento epidérmico (EGF), mapeado em 4q25 (Cox **et al.**, 1989), pode estar envolvido nos dois rearranjos e participar do processo neoplásico. Outro exemplo é o de adenomas da paratireóide, que apresentam uma inversão do cromossomo 11, inv(11)(p15;q13), com justaposição dos elementos reguladores da transcrição do hormônio da paratireóide e do oncogene PRAD1. Esse oncogene codifica uma proteína tipo

ciclina relacionada com a regulação do ciclo celular que, provavelmente em consequência do rearranjo, aparece nesses tumores com expressão aumentada (Solomon **et al.**, 1991).

As amplificações também têm importantes consequências moleculares na célula neoplásica. As mais conhecidas referem-se àquelas decorrentes de trissomias, poliploidias e duplicações gênicas do tipo **double-minutes** e regiões homogeneamente coradas. As anomalias numéricas do cromossomo 7 em melanoma maligmo, por exemplo, parecem estar envolvidas com a expressão aumentada do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico mapeado em 7p12-p13 (McAlpine **et al.**, 1990; Parmiter & Nowell, 1993), o que pode conferir às células uma vantagem seletiva de crescimento (Cowan **et al.**, 1988; Limon **et al.**, 1988; Sozzi **et al.**, 1990). Alterações do tipo poliploidia podem ter efeitos semelhantes (Solomon **et al.**, 1991). No caso de DM e HSR, o exemplo melhor conhecido é o dos neuroblastomas, que resultam na amplificação do oncogene MYCN e, portanto, na expressão elevada do seu produto, significativamente correlacionada com um prognóstico desfavorável da doença (Brodeur & Seeger, 1986; Heim & Mitelman, 1987; Sandberg, 1990; Solomon **et al.**, 1991)

Em relação às deficiências cromossômicas totais ou parciais, as implicações referem-se principalmente à perda de funções gênicas importantes. A deficiência da banda 13q14 observada em retinoblastoma, por exemplo, resulta na inativação de um gene supressor aí localizado, o gene RB1, o que pode desencadear essa neoplasia (Carney, 1990; Chiao **et al.**, 1990; Sobel, 1990). Tal gene fabrica uma fosfoproteína de 105 KD de localização nuclear, que é capaz de ligar-se ao DNA e de formar complexos com proteínas virais. Possivelmente esses complexos inibem a função do RB1 mimetizando a inativação do gene correspondente e, dessa forma, liberando a célula das restrições de crescimento impostas por ele (Weinberg, 1991).

Outros genes supressores, além do RB1, já foram relacionados com o desenvolvimento do processo maligno. No caso do melanoma, por exemplo, a perda da heterozigosidade de alelos dos cromossomos 6 foi identificada em amostras investigadas através da técnica de **Southern Blot**. Tais resultados e a observação da reversão do fenótipo maligno após a introdução do cromossomo 6 normal em células cancerosas sugerem a existência de genes supressores aí localizados que participam do processo neoplásico (Trent **et al.**, 1990a).

Algumas deficiências cromossômicas são comuns a tipos de lesões com a mesma origem histológica. Por exemplo a del(1)(p32-36) é observada em dois tumores de origem neuroectodérmica, o neuroblastoma e o glioma, o que indica a existência de um loco regulador comum que precisa ser inativado para o desenvolvimento de neoplasmas neuroectodérmicos (Solomon **et al.**, 1991). Certas deficiências, entretanto, são comuns a condições de origens muito diferentes. Por exemplo, a região 1p11-22 está afetada em melanoma, adenocarcinoma de mama, mesotelioma pleural, histiocitoma fibroso maligno e leiomiossarcoma intestinal. Esses dados sugerem que os genes supressores regulam o crescimento de vários tecidos e que a sua inativação está relacionada ao desenvolvimento dos tumores correspondentes (Sandberg **et al.**, 1988; Solomon **et al.**, 1991).

A perda de segmentos cromossômicos também parece estar correlacionada com estágios avançados de algumas formas de câncer. Aberrações do cromossomo 1, por exemplo, são observadas em fases tardias de várias lesões malignas incluindo retinoblastoma, tumor de Wilms, carcinoma colo-retal, adenocarcinoma de ovário, de útero, de bexiga e de mama. Isso sugere que alguns genes supressores localizados nesse cromossomo são importantes para a aquisição de um potencial de crescimento mais agressivo e invasivo mas não para o início do processo tumoral (Solomon **et al.**, 1991).

Embora, em casos específicos, o papel isolado de um oncogene ou de um gene supressor seja significativo no desenvolvimento de uma neoplasia, como é o caso da LMC e do retinoblastoma, na maioria das vezes a ação desses fatores é coordenada e complexa. Tal fato pode ser observado em câncer de cólon, cujo estudo tem sido facilitado porque a transformação do epitélio normal do intestino para carcinoma é feita através de uma série de passos bem definidos que compreendem desde a fase de pólipos adenomatosos até a de displasia não-invasiva e, finalmente, de neoplasia maligna (Sandberg, 1990; Fox, 1992). Em estágios iniciais do processo, na fase de adenomas, é frequentemente detectada a ativação do oncogene KRAS2 e a perda ou mutação de genes do cromossomo 5, provavelmente localizados na banda 5q22 (Weinberg, 1991). Dois genes supressores de tumor já foram isolados dessa região, o MCC (gene mutante em carcinoma colo-retal) e o APC (polipose adenomatosa de cólon). Mutações em APC foram observadas em carcinoma colo-retal familial e esporádico, en-

quanto mutações em MCC têm sido verificadas apenas em casos esporádicos, sugerindo que, embora ambos possam atuar no desenvolvimento do carcinoma colo-retal, somente mutações de APC na linhagem germinativa predispõem indivíduos para o câncer (Solomon, **et al.**, 1991; Fox, 1992).

A evolução subsequente dessa doença é acompanhada, na maioria dos casos, pela inativação do gene supressor de tumor DCC (gene deficiente em carcinoma colo-retal) mapeado no cromossomo 18(18q21-3) e pela inativação do gene supressor TP53 mapeado no cromossomo 17(17p13). O gene DCC codifica uma fosfoproteína de 190 KD envolvida em interações de superfície celular (Weinberg, 1991). A ausência funcional desse gene, portanto, pode conferir vantagem de crescimento decorrente da perda de inibição de proliferação por contato célula-célula, mediada pelas moléculas de adesão. O gene TP53 codifica uma fosfoproteína de 53 KD relacionada com o controle do ciclo celular e presente normalmente em baixos níveis (Solomon **et al.**, 1991; Weinberg, 1991; Fox, 1992; Levine, 1992). É interessante citar que os alelos normais desse gene suprimem o crescimento celular e, talvez, sejam determinantes da estabilidade cromossômica, enquanto os alelos mutantes têm ação contrária (Hall **et al.**, 1993). A proteína normal pode formar longos complexos inativos com a mutante ou com algumas oncoproteínas privando o núcleo da forma p53 ativa, de modo similar ao que ocorre com a RB1 (Weinberg, 1991). A presença de alterações constitucionais do gene TP53 parece predispor os portadores ao desenvolvimento de um ou mais tumores e, embora os mecanismos envolvidos não estejam esclarecidos, existem envidências de que tais mutações caracterizam o estágio de transformação no qual são acumuladas outras alterações celulares e genéticas (Malkin **et al.**, 1992).

No caso de tumores de pele relacionados com exposição à luz solar, mutações específicas da radiação UV consistindo de dímeros de ciclobutano, foram observadas no gene TP53 de carcinomas espinocelulares e basocelulares. Esses achados identificam a mutação do TP53 como um passo na progressão tumoral conectando diretamente um carcinógeno com o gene envolvido (Brash **et al.**, 1991; Molès **et al.**, 1993). A mutação em TP53 parece ocorrer em estágios subsequentes à ativação do oncogene HRAS, embora essa última nem sempre tenha sido verificada nos tumores estudados. Por exemplo, alguns autores têm detectado mutações em ponto ou amplificações dos oncogenes HRAS,

KRAS e NRAS em neoplasias de pele (Ananthaswamy **et al.**, 1988; Rumsby **et al.**, 1990; van der Schroeff **et al.**, 1990; Brash **et al.**, 1991; Daya-Grosjean **et al.**, 1993). Os estudos em modelos animais têm revelado, por sua vez, que tal ativação parece ser um passo essencial na carcinogênese cutânea em camundongo (Harper **et al.**, 1987; Molès **et al.**, 1993). Ao contrário desses dados, Campbell **et al.** (1993) não encontraram qualquer alteração desses oncogenes em 40 carcinomas basocelulares, 12 carcinomas espinocelulares e 12 carcinomas espinocelulares **in situ** (Doença de Bowen) por eles estudados e sugeriram que os seus resultados podem ser decorrentes de problemas técnicos ou então refletir uma diferença molecular dessas lesões entre áreas geográficas com baixo ou alto nível de exposição solar.

Em relação aos achados citogenéticos em tumores cutâneos, diferentes tipos de aberrações com consequências moleculares nem sempre esclarecidas foram observadas. Em melanomas, há o envolvimento consistente dos cromossomos 1, 3, 6, 7, 9, 10, 11 e 19 (Trent **et al.**, 1989a; 1990b; Kacker **et al.**, 1990; Parmiter & Nowell, 1993, Petty **et al.**, 1993). As alterações numéricas e estruturais do cromossomo 1 são as mais frequentes e estão associadas com a progressão e o grau de malignidade, como já foi citado anteriormente (Trent **et al.**, 1989a; Mitelman, 1991). Os nevos, em, especial os displásticos, são condições consideradas predisponentes a esse neoplasma (Klein-Szanto, 1989; Silva **et al.**, 1992) e, em alguns casos, manifestam lesões em segmentos cromossômicos usualmente observados em melanoma, o que sugere a existência de um ou mais genes que participam dos estágios iniciais de neoplasias melanocíticas (Richmond **et al.**, 1986; Cowan **et al.**, 1988; Parmiter **et al.**, 1988).

Em lipomas, a análise cariotípica revela que um terço desses tumores tem cariótipo normal e uma grande parte dos restantes apresenta a translocação recíproca da região 12q13-15 em geral para as bandas q27-28 do cromossomo 3 (Sreekantaiah **et al.**, 1991b; Cooper, 1993). É interessante que os correspondentes malignos dos lipomas, os lipossarcomas, também apresentam alterações das bandas 12q13-15, indicando que existem nesse local genes relacionados com a proliferação celular (Sreekantaiah & Sandberg, 1991). Cromossomos em anel foram observados em 5% dos lipomas já estudados (Heim **et al.**, 1986, Mandahl **et al.**, 1987, 1988, Sreekantaiah **et al.**, 1991b, Cooper,1993) e, embora a origem desses cromossomos não tenha sido

determinada, foi proposto que alguns deles podem surgir da associação telomérica do cromossomo 3q+ resultante da translocação t(3;12) (Heim **et al.**, 1986; Sreekantaiah **et al.**, 1991a). Finalmente, uma pequena proporção desses tumores exibem outras anormalidades, incluindo os rearranjos das regiões 6p21-23 e 13q12-q22 (Sreekantaiah **et al.**, 1989, Sreekantaiah **et al.**, 1990b, Sreekantaiah & Sandberg, 1991, Sreekantaiah **et al.**, 1991b, Cooper, 1993).

A presença de heterogeneidade citogenética nesses tumores já foi verificada por Sreekantaiah **et al.** (1991a) em um lipoma atípico, que exibiu três clones anormais caracterizados respectivamente pela translocação t(12;21), pelas translocações t(2;12) e t(19;20) e por um cromossomo em anel. Em um espécime obtido posteriormente do mesmo local, o clone predominante continha as translocações t(2;12) e t(3;11) e um cromossomo em anel. Os achados nessa lesão tiveram três interpretações. Uma delas é que o tumor poderia conter áreas histologicamente diferentes que se refletiriam na sua constituição cromossômica. Outra possibilidade é que a instabilidade genética do tecido resultou em evolução clonal e emergência ou regressão de subpopulações diferentes. A terceira possibilidade é que a heterogeneidade intratumoral foi resultado de uma origem multi-cêntrica desse neoplasma.

Resultados citogenéticos de certa forma semelhantes aos desse lipoma são encontrados entre os carcinomas espinocelulares, basocelulares e lesões benignas de pele correspondentes. As análises de tais tumores mostram alterações clonais simples ou múltiplas não relacionadas, além de frequências elevadas de anomalias não-clonais. A maioria das alterações são translocações balanceadas, embora deficiências parciais, isocromossomos, dicêntricos, inversões, cromossomos em anel, marcadores, monossomias e trissomias também tenham sido descritas, e, até o presente, não foi reconhecido qualquer rearranjo consistente (Fitchet **et al.**, 1984; Aledo **et al.**, 1988; 1989a; b; Heim **et al.**, 1988b; 1989a; b; c; Scappattici **et al.**, 1989a; b; Kawasaki **et al.**, 1991a; b; Mertens **et al.**, 1989a; b; 1990; 1991; 1992). Segundo Mertens **et al** (1989b), as anomalias esporádicas nesses tumores na realidade refletem pequenos clones celulares, que em função do número de células estudadas, não satisfazem o critério de clonalidade adotado. Se essa idéia for correta, o nível de heterogeneidade cariotípica no grupo é de fato muito elevado, porque frequências desses rearranjos atingem até 47% (Kawasaki-Oyama **et**

al., 1993).

A presença de clones múltiplos nessas lesões levantou a hipótese de uma origem policlonal em tais casos (Heim **et al.**, 1988b), que é reforçada por observações histológicas de focos primários múltiplos em carcinomas epiteliais (Slaughter **et al.**, 1953). Realmente, considerando o fato da pele estar constantemente exposta a agentes carcinogênicos, como a luz ultravioleta, não parece improvável que tumores múltiplos surjam em diferentes pontos do epitélio (Mertens **et al.**, 1989a; 1992). Entretanto tais clones também podem ser resultado de condições **in vitro** e não refletirem a situação **in vivo**. Na tentativa de esclarecer esse ponto, Heim **et al.**(1989c) analisaram a evolução cariotípica de uma linhagem celular de carcinoma espinocelular **in situ** (Doença de Bowen). Os dados obtidos mostraram redução da complexidade genética proporcional ao aumento do número de repiques realizados, de modo que um único clone foi observado no final do experimento. O resultado indicou que as condições de cultivo não foram responsáveis pelo aparecimento de aberações cromossômicas múltiplas, mas, ao contrário, exerceram uma pressão seletiva sobre elas.

Uma outra explicação para a presença de múltiplos clones em lesões de pele é a ocorrência de uma mutação que confere instabilidade genética e susceptibilidade à ação de vários agentes físicos ou químicos e leva à aquisição de constituição genética heterogênea (Fett-Conte, 1992). As aberrações cromossômicas seriam, portanto, secundárias a essa mutação, e não indicariam origem policlonal dos tumores (Wolman, 1986; Holliday, 1989). É possível mesmo que tais eventos tenham pouco significado na gênese ou na progressão de lesões epiteliais e não sejam representativos das células neoplásicas. Esta conclusão advém do fato de terem sido observados achados semelhantes, tais como clones múltiplos não relacionados e frequência elevada de rearranjos esporádicos, em amostras de pele normal provenientes de áreas expostas à luz solar (Mertens **et al.**, 1992).

I.4 Objetivos:

Levando-se em consideração estas observações, parece importante a análise de tumores cutâneos e de pele normal de regiões adjacentes à lesão ou expostas à luz solar. Essa foi a proposição do presente trabalho que teve como objetivos:

1. Pesquisar a ocorrência de aberrações cromossômicas clonais e não clonais em células de tumores cutâneos, tanto benignos como malignos, e em fibroblastos de pele normal derivada de regiões adjacentes à lesão ou expostas à luz solar.

2. Comparar os achados citogenéticos observados entre si e com os dados da literatura, considerando especialmente os pontos de quebra detectados em sítios gênicos importantes.

3. Fornecer subsídios para diagnóstico e prognóstico nos casos em que isso for possível.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material

Foram processados e cultivados 48 espécimes provenientes de tumores cutâneos benignos ou malignos e 40 de pele normal adjacente ou derivada de regiões expostas à luz solar de 47 indivíduos portadores de lesões benignas ou malignas da pele. A margem de segurança para obtenção das biópsias de pele normal adjacente ao tumor foi de 0,5 a 1 cm de acordo com o grau de invasividade da lesão, o que é suficiente para garantir a ausência de tecido neoplásico no local. O material foi obtido anteriormente ao tratamento radio e quimioterápico e foi encaminhado pelos Serviços de Dermatologia e Cirurgia Plástica do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto.

Os pacientes, de ambos os sexos, tinham pele clara e idades variando de 22 a 85 anos. De cada um deles foram obtidos dados sobre a ocorrência de outros casos de neoplasias na família, a evolução da doença, as atividades profissionais exercidas e a possível exposição a agentes carcinogênicos e mutagênicos.

O estudo citogenético foi realizado em oito das amostras de pele normal e oito daquelas de neoplasias cutâneas provenientes de 13 indivíduos. Entretanto, a análise de ambos os tecidos do mesmo indivíduo foi possível somente em dois casos. Dois pacientes eram do sexo masculino e 11 do sexo feminino e a idade média foi de 38,5 anos nas amostras de tumor e de 54,4 anos nas de pele normal.

Os dados relativos ao tipo de tecido, normal ou neoplásico, e ao sexo e idade dos 47 pacientes na época do estudo estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

II.2. Métodos

As culturas de células foram desenvolvidas segundo técnica proposta por Limon **et al.** (1986), com modificações descritas a seguir. Os meios de cultura e as soluções utilizadas estão detalhados no Apêndice.

Colheita

Cada amostra, com cerca de 0,5 a 1 cm^3, foi obtida assepticamente e transferida para um recipiente estéril contendo solução

Tabela 1. Tipo de tecido cultivado, idade e sexo dos pacientes portadores de tumores malignos (M: masculino; F: feminino; T: tumor; P: pele; Ca: carcinoma).

Tecido neoplásico	Tecido normal	idade	sexo
Ca basocelular			
744-T		78	F
745-T		63	F
746-T*	746-P	55	F
747-T*	747-P	70	F
751-T		49	M
755-T	755-P	82	M
756-T	756-P	60	M
757-T	757-P	62	M
759-T	759-P	70	M
760-T	760-P	70	F
761-T	761-P	60	M
776-T	776-P*	75	M
783-T	783-P	66	M
787-T	787-P	79	M
788-T	788-P	59	F
797-T	797-P	52	F
803-T	803-P	64	F
808-T		67	F
823-T	823-P	66	F
831-T	831-P*	68	F
848-T	848-P	56	F
851-T	851-P	65	F
855-T	855-P	55	M
858-T	858-P	54	F
882-T	882-P*	66	F
892-T*	892-P	33	F
969-T		56	F
994-T	994-P	34	F
	997-P	55	F
Ca espinocelular			
748-T	748-P	80	F
762-T		55	F
773-T	773-P	54	F
774-T	774-P	73	F
818-T	818-P	66	F
836-T	836-P	84	M
1011-T	1011-P*	85	F

*: Casos analisados.

Tabela 2. Tipo de tecido cultivado, idade e sexo dos pacientes portadores de tumores pré-malignos ou benignos (M: masculino; F: feminino; T: tumor; P: pele; Ca: carcinoma; T1, T2 ou P1, P2: amostras diferentes provenientes do mesmo indivíduo).

Tecido neoplásico	Tecido normal	idade	sexo
Tumores pré-malignos			
Corno cutâneo			
804-T	804-P	32	M
Ceratose solar			
922-T		60	M
Tumores benignos			
Cisto sebáceo			
888-T*	888-P	27	M
Lipoma			
904-T*	904-P	37	F
Nevo celular			
881-T1*	881-P1*	35	F
881-T2	881-P2*	35	F
887-T*	887-P1	26	F
	887-P2*	26	F
925-T*		55	F
1051-T1	1051-P	41	F
1051-T2		41	F
Queloide			
903-T		22	F
Queratoacantoma			
921-T	921-P*	45	F
Verruga			
898-T	898-P	55	F

*: Casos analisados.

salina de Hanks. O material foi mantido à temperatura ambiente ou a 4 °C e transportado ao laboratório com as informações gerais sobre o paciente. O período entre a colheita e seu processamento não ultrapassou 24 horas com a finalidade de assegurar a viabilidade das células.

Assepsia e descontaminação

No laboratório, as amostras de tumor e pele normal foram manipuladas separadamente e em câmara asséptica (câmara de fluxo laminar vertical).

A fim de eliminar possíveis contaminações já presentes nos espécimes, esses foram lavados em três banhos consecutivos de solução salina de Hanks.

Desagregação da amostra e cultivo celular

O tecido, colocado em uma placa de Petri com algumas gotas de meio incompleto, foi dissociado mecanicamente em pequenos fragmentos de 1-3 mm^3, com o auxílio de tesoura ou bisturi e de uma pinça. O material foi, então, centrifugado com meio incompleto por oito minutos a 800 rpm. Ao sedimento foram acrescentados 4,5 ml de meio completo e o material foi transferido para um frasco plástico descartável com 0,5 ml de colagenase (concentração de 2000 U/ml) que permaneceu incubado a 37 °C por um a quatro dias para desagregação enzimática. Após esse período, a suspensão celular resultante foi pipetada várias vezes para melhor separação das células e, em seguida, centrifugada durante oito minutos a 800rpm. O sedimento foi lavado em 5 ml de meio de cultura incompleto e distribuído em dois ou mais frascos plásticos descartáveis de 25 ml (Descarplast ou Costar) com 1,5 ou 2ml de meio de cultura suplementado com 10, 20 ou 30% de soro fetal bovino. Após dois a quatro dias de incubação a 37 °C, o meio com material necrótico foi substituído por 5ml de meio de cultura completo pré-aquecido.

Na tentativa de obter melhores índices de crescimento, algumas amostras, tanto de tumor como de pele normal, foram submetidas à técnica de explante primário, que consiste apenas na dissociação mecânica do tecido e na semeadura dos fragmentos assim obtidos em frascos contendo um filme de soro. Tais frascos, mantidos em posição invertida, receberam 2ml de meio completo de tal forma a

não permitir que a solução entrasse em contato com os fragmentos e, assim, facilitar sua fixação ao substrato. Após incubação a 37 °C por 24 horas, os frascos voltaram à posição original ficando, então, os explantes banhados pelo meio de cultura que, depois de três a seis dias, foi substituído por 5ml de meio completo. Numa variação dessa técnica, os fragmentos foram colocados em frascos com quantidades mínimas de meio de cultura e receberam, após três a seis dias, 5ml de meio de cultura completo.

O crescimento celular e a atividade mitótica, tanto nos casos que sofreram desagregação enzimática como naqueles processados pela técnica de explante, foram examinados diariamente em microscópio invertido e o meio de cultura foi trocado a cada três a cinco dias, dependendo do crescimento observado.

Bloqueio, hipotonização, fixação e coloração

O bloqueio da divisão celular foi individualizado para cada frasco e realizado quando havia um número satisfatório de mitoses. A interrupção de cultivo foi feita com a adição de 50 ul de colcemide (concentração final de 0,02 ug/ml) durante duas horas, ou com 0,1ml de colquicina (concentração final de 0,33 ug/ml) durante três horas. Em alguns casos, que apresentaram baixo número de metáfases após 20 dias de cultivo, foram adicionados 25 ul de colcemide (concentração final de 0,01 ug/ml) por 16 horas.

Após esse período, o meio de cultura foi substituído por 8 ml de solução hipotônica pré-aquecida de citrato de sódio 0,8% e o material foi reincubado por 30 a 40 minutos. As células que ainda permaneciam aderidas após esse tratamento foram removidas mecanicamente com o auxílio de um raspador ("scraper") e a suspensão obtida foi centrifugada por oito minutos a 800 rpm. Em seguida, o material foi fixado em solução de metanol-ácido acético (3:1) em três etapas de 20, 10 e 5 minutos, alternadas com a troca de fixador após centrifugações a 800rpm por oito minutos. A suspensão celular foi gotejada em lâminas geladas e úmidas ou em lâminas secas, que foram flambadas e aquecidas em estufa a 90-92 °C por 20 minutos e submetidas à técnica de bandamento G e, quando necessário, à técnica de bandamento C.

Para bandamento G, desenvolvido segundo Grouchy & Turleau (1977) com modificações, o material foi imerso sequencialmente em solução de álcool metílico 50% e água destilada por dois minutos

cada, e em tampão Sorensen, pH 6,8, por no mínimo 30 minutos. Logo após, foi tratado com solução de tripsina 0,1% por um tempo variável de 1 a 10 segundos. Em seguida, o material foi imerso em solução salina de PBS por dois minutos, corado com solução tamponada de Giemsa 2% por 5 minutos e lavado em água destilada. Em alguns casos, a técnica de bandamento G utilizada foi a de Selden **et al.**(1975), que consiste no tratamento do material com banhos consecutivos de solução de tripsina-EDTA diluída em Hanks (6:50) por 1 a 3 minutos e de soro fetal bovino também diluído em Hanks (1:5), e na coloração com solução tamponada de Giemsa 2% por 5 minutos.

O bandamento C seguiu a técnica de Sumner (1972) com modificações. O material foi colocado em HCl 0,2N por 15 minutos e lavado em água destilada gelada. Posteriormente, foi tratado com solução de hidróxido de bário 5% a 37 °C por tempo variável de 12 a 15 minutos, com água destilada a 37 °C, e com banhos de solução salina 2X SSC à temperatura ambiente por 10 minutos e a 60 °C por 60 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em água desionizada gelada, desidratadas durante cinco minutos em álcool 70% e em álcool 90%, sendo finalmente coradas com solução tamponada de Giemsa 2%.

Análise cromossômica

A análise de metáfases coradas após bandamento G foi considerada total quando todos os cromossomos da célula puderam ser identificados, e parcial quando pelo menos sete pares cromossômicos foram identificados (Protocols of the Genetics Center, 1988). A análise em coloração usual foi realizada em metáfases cujos cromossomos, mesmo após o tratamento com tripsina, não apresentaram bandas.

A identificação e classificação dos eventos citogenéticos foi feita de acordo com a Conferência de Paris de 1971 (Paris Conference, 1972; 1975) e do ISCN (1985; 1991). Foi considerada clonal a alteração estrutural ou hiperdiploidia observada em pelo menos duas células provenientes de réplicas diferentes da mesma cultura. No caso das hipodiploidias, a clonalidade só foi considerada quando a alteração estava presente em três células de duas ou mais réplicas da cultura. A poliploidia e a endorreduplicação, mesmo obedecendo a esses critérios, não foram consideradas clonais (Mitelman, 1985; Sandberg, 1990; Mertens **et al.**, 1992). A nomenclatura dos genes possivelmente envolvidos nos rearranjos observados foi feita segundo McAlpine **et al.**(1991).

III. RESULTADOS

No presente estudo foram processadas e cultivadas 48 amostras provenientes de tumores cutâneos benignos e malignos e 40 amostras de pele normal adjacente ou derivada de regiões expostas à luz solar.

Entre as amostras tumorais, 30 não exibiram crescimento celular, 13 por não aderirem ao frasco ou por não exibirem proliferação após a adesão e 17 em virtude de contaminação por fungos ou bactérias ocorrida na fase de desagregação enzimática ou nos primeiros dias de cultura. Das 18 com crescimento celular, dez não exibiram metáfases, quatro delas porque contaminaram durante o cultivo, e oito resultaram em metáfases passíveis de análise. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.

Em relação às amostras de pele normal, 25 não cresceram **in vitro**, 13 por ausência de adesão ao frasco ou por não apresentarem proliferação e 12 devido a contaminações durante a desagregação enzimática ou nas fases iniciais de cultivo. Das 15 que cresceram, sete não exibiram metáfases, três delas porque contaminaram durante o cultivo, e oito apresentaram índices mitóticos satisfatórios, resultando em metáfases passíveis de análise. Esses dados estão apresentados na Tabela 4.

Os tumores estudados citogeneticamente foram identificados como três carcinomas basocelulares (746-T, 747-T, 892-T), um cisto sebáceo (888-T), três nevos celulares (881-T1, 887-T e 925-T), e um lipoma (904-T). Os espécimes mostraram início de crescimento celular **in vitro** entre 24 horas e 14 dias após a semeadura e a interrupção da divisão celular foi realizada após períodos que variaram de 13 a 45 dias, com adição de colcemide por 2 horas. No caso das oito amostras de pele normal estudadas citogeneticamente, o crescimento celular ocorreu 5 a 6 dias após a semeadura, com exceção do caso 881-P1 que só iniciou o crescimento após 32 dias. A interrupção da divisão celular foi realizada depois de 27 a 49 dias de cultivo com adição de colcemide ou colquicina por 2 a 3 horas, exceto nos casos 881-P1, 887-P2 e 921-P que foram submetidos à colcemide por 16 horas. A Tabela 5 contém os dados relativos ao período de cultivo e tempo de bloqueio da divisão celular das amostras analisadas citogeneticamente.

Em todos os casos estudados, as células apresentaram

Tabela 3. Resultados relativos ao cultivo de amostras de tumores de pele (T: tumor; Ca: carcinoma; T1 e T2: amostras diferentes provenientes do mesmo indivíduo).

Amostra	Caso	Sem crescimento		Com crescimento	
		s/ contaminação	c/ contaminação	s/ metáfases	c/metáfases
Tumores malignos					
Ca basocelular	744-T		+		
	745-T		+		
	746-T				+
	747-T				+
	751-T		+		
	755-T		+		
	756-T			+a	
	757-T		+		
	759-T		+		
	760-T		+		
	761-T		+		
	776-T		+		
	783-T	+			
	787-T		+		
	788-T	+			
	797-T	+			
	803-T			+a	
	808-T			+a	
	823-T	+			
	831-T	+			
	848-T	+			
	851-T	+			
	855-T			+	
	858-T			+	
	882-T			+	
	892-T				+
	969-T	+			
	994-T	+			
Ca espinocelular	748-T	+			
	762-T		+		
	773-T	+			
	774-T		+		
	818-T		+		
	836-T	+			
	1011-T		+		
Tumores pré-malignos					
Corno cutâneo	804-T			+a	
Ceratose solar	922-T		+		
Tumores benignos					
Cisto sebáceo	888-T				+
Lipoma	904-T				+
Nevo Celular	881-T1				+
	881-T2		+		
	887-T				+
	925-T				+
	1051-T1			+	
	1051-T2			+	
Queloide	903-T			+	
Queratoacantoma	921-T	+			
Verruga	898-T		+		
		13	17	10	8
Total 48		30		18	

a: Casos que contaminaram durante o cultivo celular.

Tabela 4. Resultados relativos ao cultivo de amostras de pele normal (P: pele; Pi e P2: amostras de pele de locais diferentes provenientes do mesmo indivíduo).

Caso	Sem crescimento		Com crescimento	
	s/ contaminação	c/ contaminação	s/ metáfases	c/metáfases
746-P	+			
747-P			+a	
748-P		+		
755-P	+			
756-P			+a	
757-P	+			
759-P		+		
760-P		+		
761-P		+		
773-P	+			
774-P		+		
776-P				+
783-P	+			
787-P			+	
788-P		+		
797-P	+			
803-P	+			
804-P	+			
818-P			+	
823-P	+			
831-P				+
836-P	+			
848-P	+			
851-P	+			
855-P			+	
858-P	+			
881-P1				+
881-P2				+
882-P				+
887-P1		+		
887-P2				+
888-P			+a	
892-P		+		
898-P		+		
904-P			+	
921-P				+
994-P		+		
997-P		+		
1011-P				+
1051-P		+		
	13	12	7	8
Total 40	25		15	

a: Casos que contaminaram durante o cultivo celular.

Tabela 5. Dados relativos ao período de cultivo e tempo de bloqueio de divisão celular das amostras estudadas citogeneticamente (Ca: carcinoma; T ou T1: tumor ; P; P1 ou P2: pele).

Amostras	Caso	Período de cultivo (dias)	Tempo de bloqueio (horas)
Tumores malignos			
Ca basocelular	746-T	26-45	2
	747-T	26	2
	892-T	13-15	2
Tumores benignos			
Cisto sebáceo	888-T	20-21	2
Nevo celular	881-T1	20-34	2
	887-T	20	2
	925-T	26-27	2
Lipoma	904-T	26	2
Pele Normal	776-P	49	2
	831-P	27-48	3
	881-P1	41	16
	881-P2	32-33	2
	882-P	35-41	2
	887-P2	27	16
	921-P	28	16
	1011-P	28	2

morfologia fibroblastóide e/ou epitelióide (Figura 1) mas, por ocasião da confluência, geralmente adquiriam morfologia fibroblastóide.

Com exceção da amostra 921-P, nas demais foram detectadas aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas. A frequência de células poliplóides e com endorreduplicação variou de zero a 23,2% e de zero a 3,2%, respectivamente, e a de células com separação de cromátides atingiu no máximo 2,8%, com exceção do caso 881-P1 que mostrou valor igual a 81%. Tais frequências foram calculadas a partir do número de metáfases obtidas, ao contrário da frequência de aberrações cromossômicas adquiridas, que foi calculada sobre o total de células analisadas. Essa última, no caso de quebras e falhas cromatídicas e cromossômicas, não ultrapassou 4% nos diferentes casos estudados, exceto a amostra 888-T que revelou uma quebra cromossômica em 10 células analisadas. A variante polimórfica 14p+ foi observada no espécime 746-T, as variantes 13p+ e 22p+ nos casos 881-T1, P1 e P2, e o aumento de heterocromatina constitutiva 1qh+ nas amostras 887-T e P2 (Figura 2).

Nenhum dos pacientes apresentou história familial de neoplasia. Em relação à exposição a agentes carcinogênicos e mutagênicos, o caso 776-P esteve extensivamente exposto ao sol devido à sua atividade profissional (trabalhador rural) e, com exceção dos casos 747-T, 904-T, 925-T, 831-P e 1101-P, todos os outros eram fumantes.

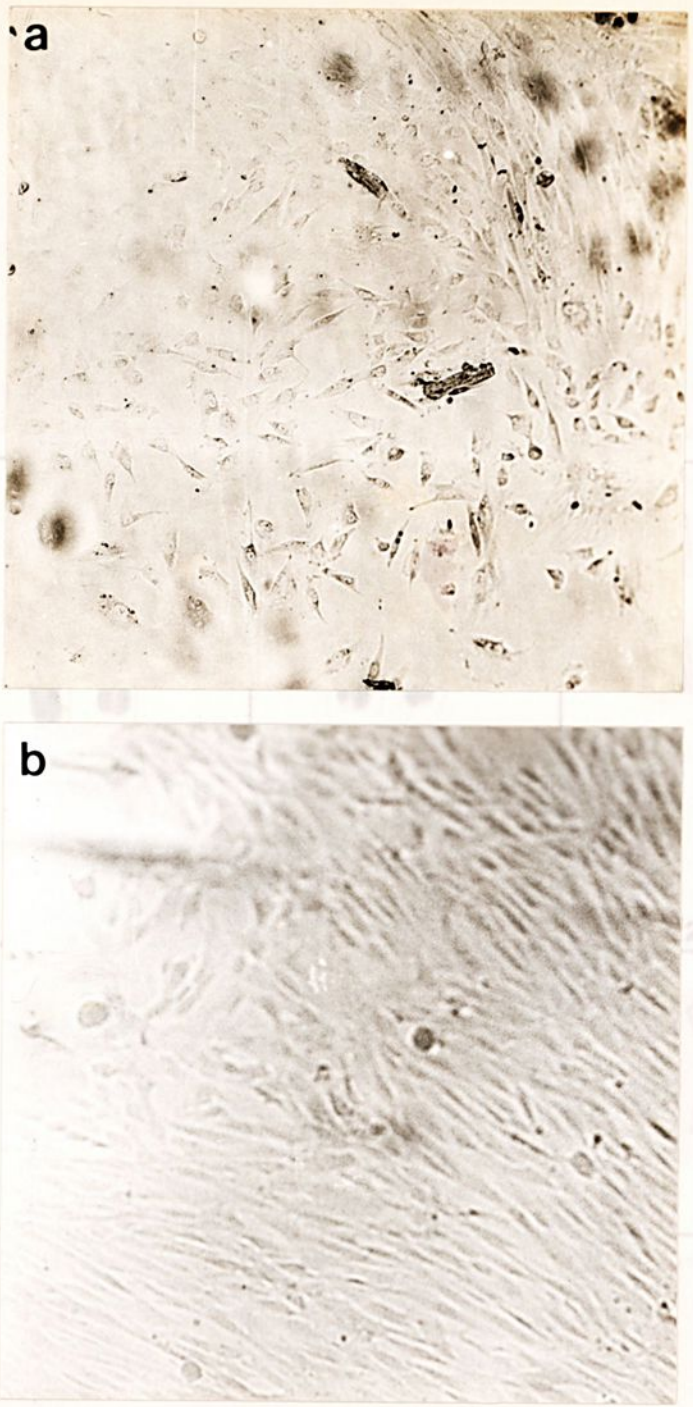


Figura 1. Fotomicrografias obtidas das culturas 858-T e 881-P2 mostrando células com morfologia epitelióide (a) e fibroblastóide (b).

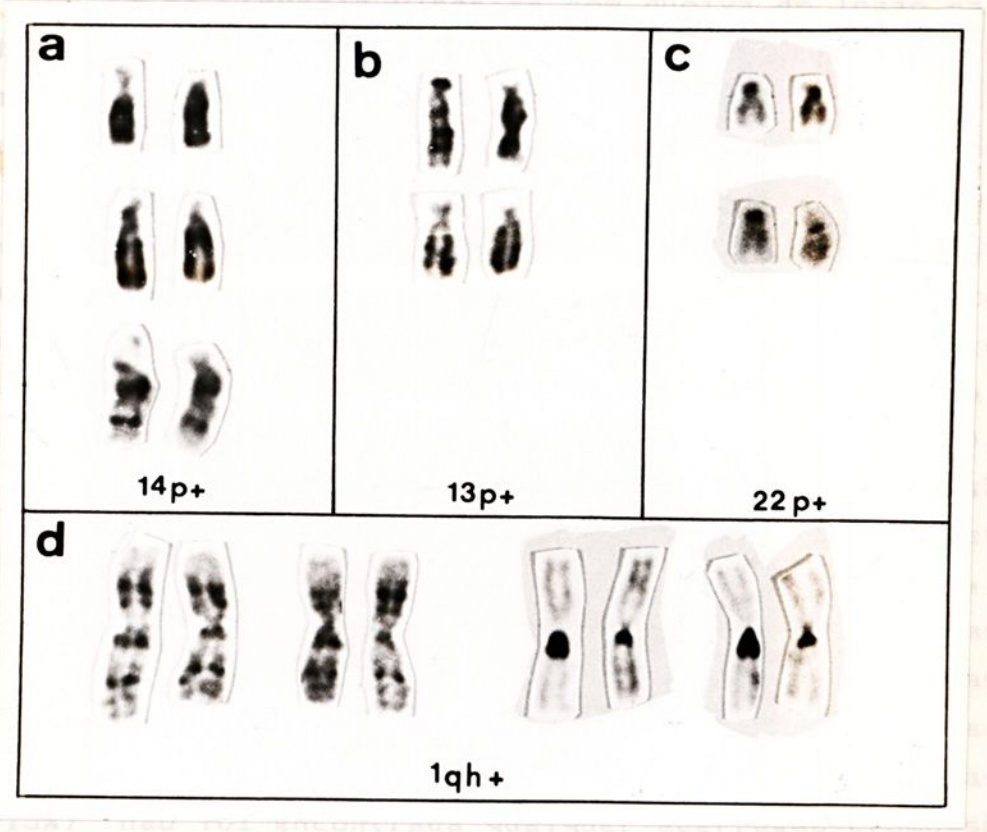


Figura 2. Cariogramas parciais das amostras estudadas mostrando cromossomos com variantes polimórficas e seus homólogos: (a) 14p+ do caso 746-T; (b) 13p+ , (c) 22p+ do caso 881-P2 e (d) 1qh+ do caso 887-T em bandamento G à esquerda e C à direita.

III.1 Tumores malignos

Os resultados citogenéticos relativos aos tumores malignos estudados estão resumidos na Tabela 6 e serão detalhados a seguir.

Carcinomas basocelulares

Caso 746-T

A paciente, de 55 anos de idade, doméstica e fumante, procurou o Serviço de Cirurgia Plástica com queixa de lesão na face, identificada histopatologicamente como um carcinoma basocelular sólido. Uma amostra do material obtido na cirurgia foi processada e cultivada em três réplicas, subdivididas posteriormente em cinco.

Foram obtidas 632 metáfases, das quais 33 exibiram cromossomos apenas passíveis de contagem, 31 foram examinadas em coloração usual, 81 permitiram a análise parcial e 37 foram completamente analisadas em bandamento G. Do total de metáfases encontradas, 43 apresentaram constituição poliplóide (Figura 3), uma delas com cariótipo 90,XXXX,t(1;12)(p13;q21),-19,ace (Figura 4a), uma outra exibiu endorreduplicação e 18 mostraram separação de cromátides. Vinte e oito células eram portadoras de diferentes alterações cariotípicas, uma do rearranjo ?t(1;3) (Figura 4b), seis da translocação t(4;12)(q35;q21-22) (Figura 4d) e duas da translocação t(16;17)(q24;q11) (Figura 4e), além de outras com cromossomos marcadores e com perdas e ganhos cromossômicos, das quais duas apresentaram a trissomia 18 (Figura 4c). Nas outras 120 células (80,5%) não foi encontrada qualquer aberração cromossômica. Nessa amostra foi observada a variante polimórfica 14p+ (Figura 2a).

Caso 747-T

A paciente, de 70 anos de idade, doméstica e não fumante, apresentava um carcinoma basocelular na região fronto-parietal. A lesão foi retirada e uma amostra cultivada em duas réplicas por 26 dias.

Foram obtidas 129 metáfases mas apenas oito permitiram a contagem do número cromossômico, uma foi analisada em coloração usual, dez foram totalmente e 20 parcialmente analisadas em bandamento G. Do total de metáfases observadas, nove eram poliplóides, uma delas com a deficiência parcial del(3)(q12), também observada

Tabela 6. Aberrações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [ ] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nos tumores malignos estudados.

Caso	MO	MA	Aberrações Cromossômicas
Carcinomas basocelulares			
746-T	632	149	90,XXXX,t(1;12)(p13;q21),-19,ace[1] 46,XX,der(1)?t(1;3),-3,+mar[1] 46,XX,t(4;12)(q35;q21-22)[4] 46,XX,t(4;12)(q35;q21-22),?del(13)(q)[1] 47,XX,t(4;12)(q35;q21-22),+?10[1] 46,XX,t(16;17)(q24;q11)[2] 46,XX,-B,+?C[1] 44,XX,-1,-13[1] 45,XX,-6[1] 44,XX,-7,-9[1] 45,X,-X[3] 47,XX,+18[2] 45,XX,-19[1] 44,XX,-B,-C[1] 45,XX,-C[4] 45,XX,-D[1] 45,XX,-E[1] 45,XX,-G[1] 47,XX,+mar[1] Poliploidia[42] Endorreduplicação[1] Separação de cromátides[18]
747-T	129	31	?92,XXXX,del(3)(q12)[1] 45,XX,del(3)(q12),-20[1] 44,XX,-9,-18[1] 43,XX,-11,-15,-22[1] 45,XX,-13[1] 43,XX,-17,-21,-22,ace,ace[1] 47,XX,+mar[1] Poliploidia[8]
892-T	106	13	Poliploidia[1] Separação de cromátides[3]

Figura 3. Fotomicrografia de uma célula poliplóide do caso 746-T.



Figura 3. Fotomicrografia de uma célula poliplóide do caso 746-T.

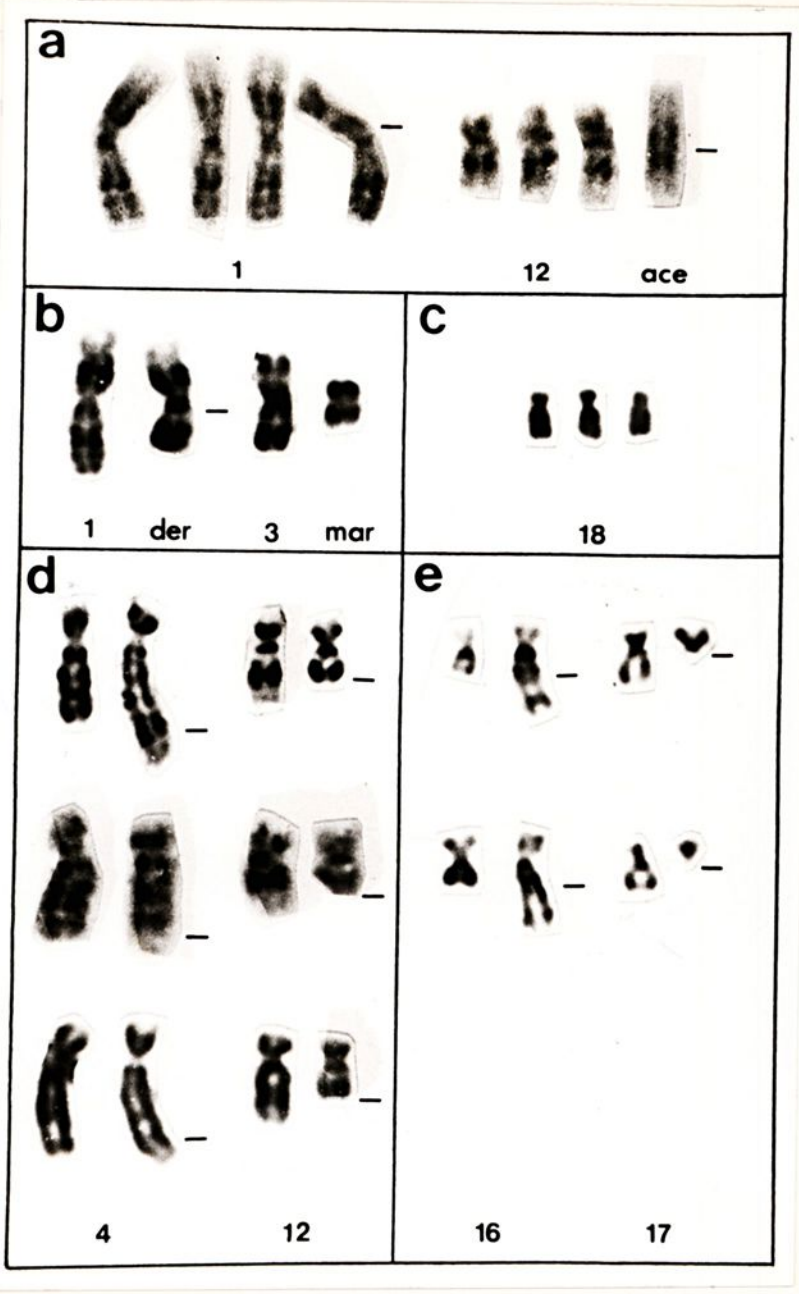


Figura 4. Cariogramas parciais do caso 746-T mostrando as aberrações cariotípicas esporádicas:(a)t(1;12)(p13;q21) e (b)?t(1;3); e as aberrações cariotípicas recorrentes: (c) trissomia 18 (d) t(4;12)(q35;q21-22) e (e) t(16;17)(q24;q11). Os traços indicam os pontos de quebra.

em uma célula hipodiplóide (Figura 5). Quatro mostraram perdas cromossômicas esporádicas, associadas ou não a fragmentos acêntricos, uma possuia cariótipo 47,XX,+mar e as outras 24 (77,4%) não exibiram qualquer aberração cromossômica.

Caso 892-T

A paciente, de 33 anos de idade, doméstica e fumante, desenvolveu um carcinoma basocelular no ombro esquerdo. Parte da lesão foi semeada em duas réplicas, que posteriormente foram subdivididas em quatro.

Das 106 metáfases encontradas, oito permitiram apenas a contagem do número cromossômico, sete foram parcialmente analisadas e seis completamente analisadas após a utilização da técnica de bandamento G. As únicas alterações cromossômicas detectadas foram a poliploidia em uma célula e a separação de cromátides em três.

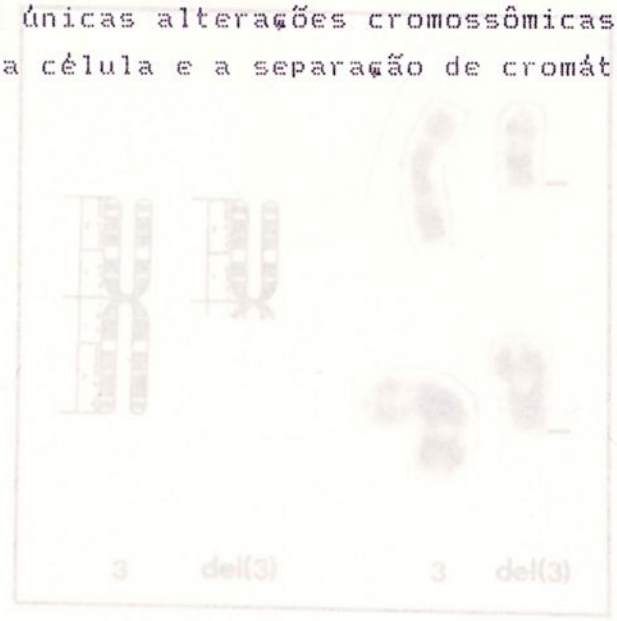


Figura 5. Cariogramas parciais da deficiência del(3)(q12) do caso 747-T e sua representação esquemática. Os traços indicam os pontos de quebra.

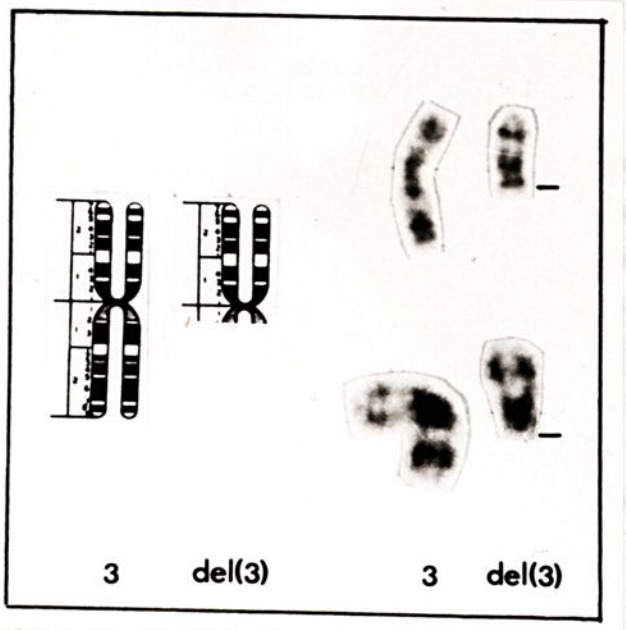


Figura 5. Cariogramas parciais da deficiência del(3)(q12) do caso 747-T e sua representação esquemática. Os traços indicam os pontos de quebra.

III.2 Tumores benignos

Os resultados citogenéticos relativos aos tumores benignos estudados estão resumidos na Tabela 7 e serão detalhados a seguir.

Nevos celulares

Caso 881-T1

A paciente, de 35 anos de idade, doméstica e fumante, apresentava vários nevos distribuídos por todo corpo e foi submetida à exérese de um deles localizado na face e de duas amostras de pele da face e do tronco (881-P1 e P2). O material proveniente do nevo foi cultivado em duas réplicas, uma das quais subdividida posteriormente em duas. As três réplicas apresentaram índice mitótico satisfatório e sofreram interrupção de cultivo por ação de colcemide durante duas horas.

Foram obtidas 35 metáfases, apenas uma com poliploidia. Do total, sete permitiram apenas a contagem do número cromossômico e somente duas foram analisadas em bandamento G, uma das quais apresentou a trissomia do cromossomo 18. Essa paciente revelou células com variantes 13p+ e 22p+.

Caso 887-T

A paciente, de 26 anos de idade, fumante e doméstica, manifestava vários nevos por todo o corpo e foi submetida à exérese de um deles localizado no queixo e de uma amostra de pele do pescoço (887-P2). O material proveniente do nevo foi processado e cultivado inicialmente em duas réplicas, das quais uma foi posteriormente subdividida em duas.

Foram observadas 428 metáfases, uma delas com endorreduplicação (Figura 6), seis poliplóides e sete com separação de cromátides. Em 15 foi possível apenas a contagem do número cromossômico, 65 foram parcialmente analisadas após bandamento G e 26 foram analisadas completamente. Três células mostraram perdas cromossômicas esporádicas, três outras os cariótipos 45,-X,t(X;1) (q13;q25), 46,XX,t(11;?)(q24;?), 47,XX,+?9, e duas exibiram um fragmento acêntrico. Nas outras 83 metáfases (91,2%) não foi detectada qualquer aberração cromossômica. Nesse caso foi observada a variante polimórfica 1qh+ (Figura 2d).

Tabela 7. Aberrações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [ ] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nos tumores benignos estudados.

Caso	MO	MA	Aberrações Cromossômicas
Nevos celulares			
881-T1	35	2	47,XX,+18[1] Poliplodia[1]
887-T	428	91	45,-X,t(X;1)(q13;q25)[1] 46,XX,t(1;?)(q24;?)[1] 46,XX,ace[2] 45,XX,-3[1] 44,XX,-3,-C[1] 43,XX,-16,-18,-19[1] 47,XX,+?9[1] Poliploidia[6] Endorreduplicação[1] Separação de cromátides[7]
925-T	550	50	45,XX,-3[1] 45,XX,-11[2] 45,XX,-7,-9,+mar[1] 45,XX,-16[1] 45,XX,-20[1] 45,XX,-B[1] 45,XX,-C[4] 44,XX,-D,-F[1] 47,XX,+mar[1] Poliploidia[7] Separação de cromátides[3]
Cisto sebáceo			
888-T	99	10	45,XY,-C[1] Poliploidia[2]
Lipoma			
904-T	151	15	?92,t(3;12)(q28;q14)[5] 46,XX,t(3;12)(q28;q14)[7] 44,XX,-1,t(3;12)(q28;q14),-18[1] 45,t(3;12)(q28;q14),-C[1] 47,XX,t(3;12)(q28;q14),+C[1] Poliploidia[29] Poliploidia e separação de cromátides[1]



Figura 6. Fotomicrografia de uma célula com endorreduplicação do caso 887-T.

Caso 925-T

A paciente, de 25 anos de idade, doméstica e não fumante, foi submetida à exérese de um nevo localizado na face. Parte do material foi cultivado em três réplicas das quais foi possível a obtenção de 550 metáfases, sete delas poliplóides e três com separação de cromátides. A contagem do número cromossômico foi feita em 106 células, nove foram analisadas em coloração usual, cinco foram totalmente e 36 parcialmente analisadas após a utilização da técnica de bandamento G. Onze revelaram perdas cromossômicas esporádicas, duas apresentaram os cariótipos 47,XX,+mar e 45,XX,-7,-9, +mar e nas outras 37 (74%) não foi detectada qualquer aberração cromossômica.

Cisto sebáceo

Caso 888-T

O paciente, de 27 anos de idade e fumante, foi submetido à exérese de um cisto sebáceo localizado nas costas. Parte do material foi enviada ao laboratório e submetida à desagregação enzimática e cultivo celular em duas réplicas, uma das quais foi posteriormente subdividida em duas.

Foram obtidas 99 metáfases, duas delas poliplóides. A contagem do número cromossômico foi realizada em 18 células, oito foram analisadas parcialmente e duas totalmente em bandamento G. Uma única metáfase apresentou o cariótipo 45,XY,-C e nas nove restantes (90%) não foi detectada qualquer aberração cromossômica.

Lipoma

Caso 904-T

A paciente, doméstica, não-fumante e com 37 anos de idade, procurou o Serviço de Dermatologia para a retirada de um lipoma localizado na coxa. Parte do material foi cultivada em duas réplicas mas apenas uma mostrou crescimento celular e, após 26 dias, sofreu ação de colcemide por duas horas.

Das 151 metáfases obtidas, 15 foram analisadas em bandamente G. Foram encontradas 35 células poliplóides, uma das quais com separação de cromátides e outras cinco com a translocação t(3;12)(q28;q14). Dez células não poliplóides foram detectadas com a

mesma translocação (Figura 7) e, entre essas, duas mostraram perdas cromossômicas esporádicas e uma outra um cromossomo adicional do grupo C.

Figura 7. Cariogramas parciais da translocação t(3;12)(q29;q14) do caso 904-I e sua representação esquemática. Os traços indicam os pontos de quebra.

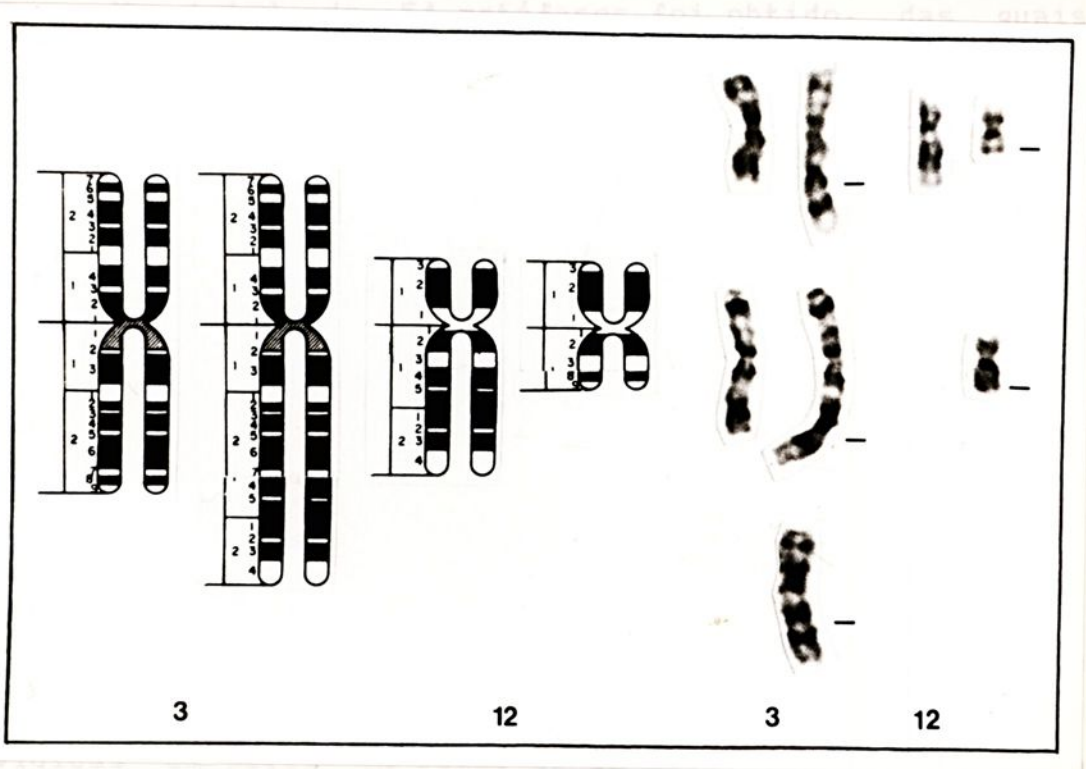


Figura 7. Cariogramas parciais da translocação t(3;12)(q28;q14) do caso 904-T e sua representação esquemática. Os traços indicam os pontos de quebra.

III.3 Pele normal

Os resultados citogenéticos relativos às amostras de pele normal estudadas estão resumidos na Tabela 8 e serão detalhados a seguir.

Caso 776-P

O paciente, de 75 anos de idade, trabalhador rural e fumante, apresentava um carcinoma basocelular na pálpebra inferior. Uma amostra de pele normal da região malar desse paciente foi cultivada em uma réplica.

Um total de 54 metáfases foi obtido, das quais duas apresentaram constituição poliplóide. A contagem do número cromossômico foi realizado em nove células, uma foi examinada em coloração usual e oito após bandamento G, sete das quais foram parcialmente e uma completamente analisada. Foram encontradas duas células com cariótipos 45,XY,-C e 46,XY,+C,-19, e sete (77,8%) não exibiram qualquer aberração cromossômica.

Caso 831-P

A paciente, de 68 anos de idade, doméstica e não fumante, procurou o Serviço de Dermatologia com queixa de reaparecimento de um nódulo ulcerado, localizado na testa, identificado após a biópsia como carcinoma basocelular.

Uma amostra de pele normal localizada próxima à lesão foi inicialmente cultivada em duas réplicas que, posteriormente, foram subdivididas em sete. Um total de 52 metáfases foi observado, das quais quatro eram poliplóides. Em sete foi possível a contagem do número cromossômico, uma foi analisada em coloração usual, cinco foram parcialmente e duas totalmente analisadas em bandamento G. Foram detectadas uma célula com a translocação t(1;14)(q12;p11) (Figura 8), uma com o cariótipo 46,XX,-C,+14, uma com diversas monossomias e cinco (62,5%) não mostraram qualquer aberração cromossômica.

Caso 881-P1 e Caso 881-P2

Essa paciente já foi citada como portadora de vários nevos distribuídos por todo o corpo (caso 881-T). Uma pequena porção

Tabela 8. Aberrações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [ ] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nas amostras de pele normal estudadas.

Caso	MO	MA	Aberrações Cromossômicas
776-P	54	9	45,XY,-C[1] 46,XY,+C,-19[1] Poliploidia[2]
831-P	52	8	46,XX,t(1;14)(q12;p11)[1] 46,XX,-C,+14[1] 43,XX,-C,-E,-E[1] Poliploidia[4]
881-P1	121	7	46,XX,?dic(5)[3] Poliploidia[3] Separação de cromátides[98]
881-P2	763	33	46,XX,?t(17;20)(q22;q13)[1] 46,XX,?del(11)(q)[1] 44,XX,-2,-C[1] Poliplodia[18] Endorreduplicação[1] Poliplodia e endorreduplicação[1]
882-P	251	19	45,XX,-?14[1] 45,XX,-?19[1] 45,XX,-C[1] Poliplodia[16] Endorreduplicação[8] Poliploidia e separação de cromátides[2]
887-P2	84	24	Endorreduplicação[1]
921-P	95	6	
1011-P	267	85	46,XX,t(1;1)(p34;p36)t(5;12),(p11-12;q24)-10,+mar[1] 46,XX,t(3;6)(p14;p21.1)[4] 46,XX,t(3;6)(p14;p21.1),-18,+mar[1] 46,XX,t(7;15)(p13-15;q14-15)[1] 45,XX,-?14[1] 45,XX,-C[1] 47,XX,+C[1] 47,XX,+?mar[1] Poliploidia[14] Separação de cromátides[3] Poliploidia e separação de cromátides[1]

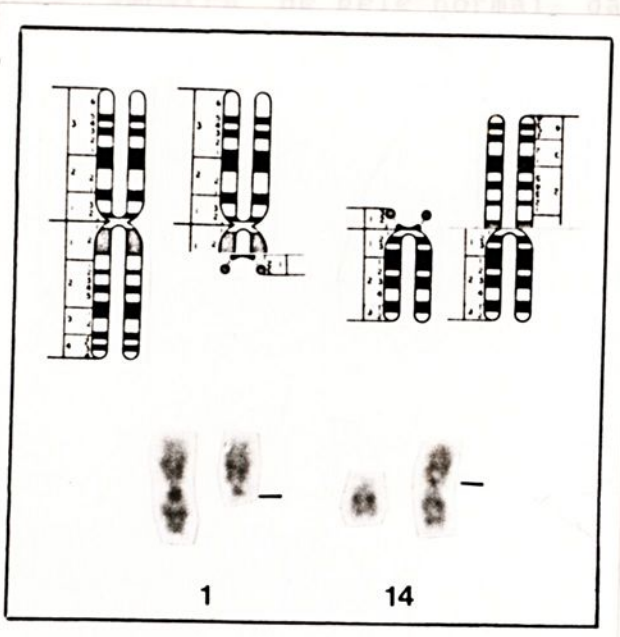


Figura 8. Cariograma parcial da translocação t(1;14)(q12;p11) do caso 831-P e sua representação esquemática. Os traços indicam os pontos de quebra.

da pele próxima a um nevo da face (caso 881-P1) foi retirada e submetida ao cultivo por 41 dias em duas réplicas, uma das quais foi descartada por não apresentar adesão ao substrato. Apesar do índice mitótico satisfatório na réplica restante, não foi possível a obtenção de preparações de boa qualidade após coloração com bandamento G. Das 121 metáfases observadas, três células apresentaram poliploidia e 98 mostraram separação de cromátides (Figura 9). Do total, somente sete foram analisadas após bandamento G, quatro parcialmente e três totalmente. Três células exibiram um cromossomo 5 aparentemente dicêntrico e as outras quatro (57,14%) não mostraram aberrações cromossômicas.

Uma outra amostra de pele normal da mesma paciente, próxima a um nevo localizado no tronco (caso 881-P2), foi cultivada em três réplicas, uma das quais subdividida posteriormente em duas. Das quatro réplicas, somente três obtiveram crescimento celular e resultaram em 763 metáfases. A contagem do número cromossômico foi realizado em 38 delas, uma foi examinada em coloração usual, e 32 foram analisadas em bandamento G, 25 parcialmente e sete totalmente. Das metáfases obtidas, foram encontradas uma célula com endorreduplicação e 19 com poliploidia, uma das quais também com endorreduplicação. Além dessas, foram observadas duas metáfases com os cariótipos 46,XX,?t(17;20)(q22;q13) e 46,XX,?del(11)(q), e 30 (91%) sem qualquer aberração cromossômica. Nessa amostra, como na anterior, foram detectadas as variantes polimórficas 13p+ (Figura 2b) e 22p+ (Figura 2c).

Caso 882-P

A paciente, de 66 anos de idade, doméstica e fumante, foi submetida à exérese de um carcinoma basocelular localizado próximo ao olho esquerdo. Adjacente à lesão, foi obtida um pequena amostra da pele normal que foi inicialmente semeada em duas réplicas, posteriormente subdivididas em três.

Foi obtido um total de 251 metáfases, das quais 18 mostraram poliploidia, duas delas também com separação de cromátides, e oito eram portadoras de endorreduplicação. A contagem do número cromosômico foi realizada em 64 metáfases e 17 foram analisadas parcialmente e duas totalmente após a técnica de bandamento G. Três revelaram perdas cromossômicas esporádicas e 16 (84,21%) não apresentaram aberração cromossômica.



Figura 9. Fotomicrografia de uma célula com separação de cromátides do caso 881-P1.

Caso 887-P2

Essa paciente já foi citada como portadora de vários nevos celulares por todo o corpo (caso 887-T). Uma amostra de pele normal localizada próxima a um dos nevos do pescoço foi cultivada em duas réplicas, das quais somente uma obteve crescimento celular pois a outra sofreu contaminação no início do cultivo. Das 84 metáfases obtidas, sete foram analisadas em coloração usual, 16 foram analisadas parcialmente e somente uma foi totalmente analisada em bandamento G. A única alteração observada foi a endorreduplicação em uma célula.

Caso 921-P

A paciente, de 45 anos de idade, doméstica e fumante, apresentava um queratoacantoma na face. Uma amostra de pele normal localizada próxima à lesão foi obtida e cultivada em duas réplicas que contaminaram por fungos durante o processo. Apesar da contaminação, foi realizado o bloqueio com colcemide e foram obtidas 95 metáfases que não permitiram uma investigação citogenética satisfatória. Nove delas possibilitaram apenas contagem do número cromossômico e cinco foram parcialmente e uma totalmente analisada em bandamento G. Não foi detectada qualquer alteração cromossômica nesse caso.

Caso 1011-P

A paciente, de 85 anos de idade, doméstica e não-fumante, apresentava um carcinoma espinocelular no dorso da mão. Uma pequena amostra de pele normal próxima ao carcinoma foi obtida e cultivada em quatro réplicas, das quais três contaminaram durante o cultivo. Da réplica restante foi obtido um total de 267 metáfases, entre as quais 15 apresentaram poliploidia e quatro mostraram separação de cromátides, uma delas também poliplóide. A contagem do número cromossômico foi realizada em 30 células, 51 foram analisadas parcialmente e 34 totalmente em bandamento G. Foram observadas as translocações t(1;1)(p34;p36) (Figura 10a) e t(5;12)(p11-12; q24) (Figura 10b) em uma célula, a translocação t(7;15)(p13-15;q14-15) (Figura 10c) em outra, a translocação t(3;6)(p14;p21.1) (Figura 10d) em cinco, além de perdas e ganhos cromossômicos esporádicas e cromossomos marcadores. Não foi detectada aberração cromossômica nas outras 74 células (87%).

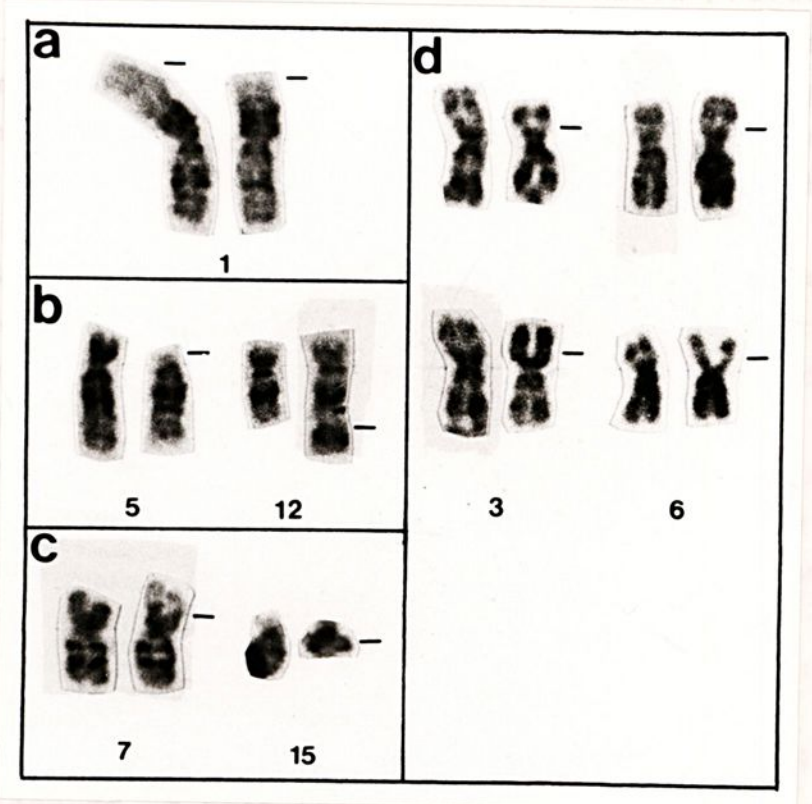


Figura 10. Cariogramas parciais do caso 1011-P mostrando as aberrações cromossômicas esporádicas: (a) t(1;1)(p34;p36), (b)t(5;12)(p11-12;q24) , (c)t(7;15)(p13-15;q14-15) e a translocação recorrente: (d) t(3;6)(p14;p21.1). Os traços indicam os pontos de quebra.

IV. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram cultivadas amostras de tumores cutâneos benignos e malignos e de pele normal de 47 indivíduos. Entretanto, em alguns casos não foram obtidos resultados em função da contaminação de espécimes durante as várias etapas do processo ou da ausência de crescimento celular.

Das 88 amostras processadas, 36 mostraram contaminação por fungos ou bactérias, 29 (33%) durante a desagregação enzimática ou durante as fases iniciais da cultura. Muito provavelmente tal contaminação ocorreu nas etapas de colheita ou de transporte, ou teve origem no próprio material **in vivo**, pois é comum a presença de microrganismos na pele (Roth & James, 1988). Deve ser ressaltado que a maioria das exéreses foram efetuadas em salas de ambulatório e não em centro cirúrgico. Embora os médicos responsáveis tenham sido orientados sobre a necessidade de condições asséptica para o sucesso do cultivo, isso nem sempre pôde ser rigorosamente obedecido, em especial no manuseio inicial do espécime até a sua colocação no meio de transporte. Após essa primeira fase e quando já apresentavam crescimento **in vitro**, poucas amostras (7,9%) mostraram contaminação. Nesses casos, a introdução dos microrganismos pode ter sido feita através de soluções, vidrarias ou facilitada pela estrutura e localização não ideais do laboratório.

Em relação à ausência do crescimento celular, 26 amostras não mostraram adesão ao substrato ou, mesmo aderindo, não exibiram qualquer sinal de proliferação. É difícil concluir qual ou quais as causas que levaram a esse resultado, mas ele deve depender em grande parte da adequação do meio de cultura e sua suplementação, da eficiência ou validade dos reagentes e do tipo de substrato utilizado, como também da presença de material necrótico e de outras características do tecido (Freshney, 1987; Gama, 1991; Limon, 1992). Convém lembrar que a idade dos indivíduos é de grande importância na proliferação celular. Já é bem conhecido que os fibroblastos apresentam um número limitado de divisões **in vitro**, que pode atingir valores próximos a 50 no caso de células embrionárias mas que não ultrapassa 30 se provenientes de indivíduos adultos (Hayflick, 1979). No presente trabalho, a média de idade dos pacientes foi de 38,5 anos nas amostras de tumores e de 54,4 anos nas de pele normal, o que pode ser responsável, em parte, pelas dificuldades na obtenção

de crescimento celular satisfatório, especialmente no segundo grupo.

A maioria dos tumores recebidos foi proveniente de indivíduos com idade acima de 55 anos e de pele clara. Isso já era esperado, pois as pessoas que sofreram ação consistente à luz solar e possuem uma baixa proteção do tegumento a esse agente têm maior probabilidade de desenvolver câncer em virtude das lesões no DNA causadas pelos raios ultravioleta (Klein-Szanto, 1989). Como citado previamente, tais lesões compreendem dímeros de timina que , se não forem reparados, levam a quebras unicatenárias da molécula e, conseqüentemante, a quebras e falhas cromossômicas que podem constituir um dos passos iniciais da carcinogênese (Casati **et al.**, 1991; Daya-Grosjean **et al.**, 1993).

Não existem conclusões definitivas sobre o decréscimo da atividade das enzimas responsáveis pelo reparo do DNA com a idade (Warner & Price, 1989), mas é possível que ele possa ocorrer, preferencialmente em determinados tecidos (Mullaart **et al.**, 1990) e acentuado por outros agentes reconhecidamente clastogênicos como o fumo (Lezana **et al.**, 1977, Nagaya & Torium, 1985). É possível, também, que na população geral existam portadores de mutações herdadas nesse sistema, que acumulam os efeitos da ação do sol com a idade ou que os manifestam em limiares mais baixos que o normal, por exemplo em situações de pigmentação diminuída da pele ou em idades atípicas (Hashimoto & Mehregan, 1990; Casati **et al.**, 1991; Wei **et al.**, 1993), como é o caso das pacientes 762-T, 892-T e 994-T, de 25, 33 e 34 anos, respectivamente, que desenvolveram carcinomas característicos de idades avançadas.

Os tumores cutâneos mais frequentemente recebidos para estudo foram os malignos, provavelmente porque os benignos não trazem danos ao hospedeiro e, por isso, não são motivos de procura ambulatorial. Os mais comuns entre eles foram os carcinomas basocelulares, o que está de acordo com a literatura que cita essa neoplasia como a mais frequente na população (Hashimoto & Mehregan, 1990). O sexo mais representado na amostra foi o feminino e isso pode ser explicado pelas possíveis diferenças entre os sexos relacionadas com taxas de sobrevida (Goldstein, 1971) ou, até mesmo, com preocupações de estética e saúde.

No presente estudo, com exceção de uma amostra (921-P), todas as outras exibiram alterações cariotípicas. Devido ao critério de clonalidade adotado, somente uma delas detectada em um carcinoma

basocelular (747-T), foi considerada clonal. Deve ser ressaltado que outras anomalias observadas não puderam ser classificadas como tal porque, apesar de recorrentes, estiveram presentes em apenas uma réplica da cultura. Esse fato pode ter sido consequência do número de frascos obtidos ou de células analisadas por frasco ou, até mesmo, das pressões seletivas nas várias réplicas. É o caso de uma amostra de carcinoma basocelular (746-T), que exibiu uma translocação em seis células entre 129 do frasco I e não pode ser detectada nas 20 metáfases dos frascos II e III. Outro exemplo é o lipoma estudado (904-T), que mostrou o mesmo rearranjo em todas as células analisadas da única réplica obtida, rearranjo esse típico do neoplasma em questão e já referido por diferentes autores (Cooper, 1993).

Além dessas alterações recorrentes, uma elevada frequência de aberrações cariotípicas esporádicas foi observada. Já é bem conhecido que a instabilidade cromossômica pode levar a desequilíbrios gênicos, resultando em vantagens de crescimento às células portadoras devido à perda de genes supressores de tumor ou à amplificação de oncogenes (Weinberg, 1989; Solomon **et al.**, 1991). Essa instabilidade pode ser expressa na forma de euploidias, como poliploidias e endorreduplicações, na forma de aneuploidias, ou mesmo como aberrações cromossômicas estruturais. Sua associação com câncer fica evidente da observação da sua alta frequência em indivíduos expostos a agentes carcinogênicos (Henderson **et al.**, 1991) e em portadores de síndromes genéticas que mostram predisposição a diferentes neoplasias, além de ser característica de células tumorais (Sandberg, 1990). Não é surpreendente, portanto, a observação de metáfases com aberrações esporádicas nas lesões estudadas. Mais difícil, entretanto, é explicar sua presença em pele normal.

A poliploidia, por exemplo, foi verificada em quase todos os espécimes e atingiu até 8% das metáfases obtidas, salvo no caso 904-T corespondente a um lipoma, que mostrou frequência superior a 20%. Essa alteração tem sido referida por vários autores em diferentes tumores de pele (Chen & Shaw, 1973; Becher **et al.**,1983; Balaban **et al.**, 1984; Ochi **et al.**, 1984; Parmiter **et al.**, 1986; Richmond **et al.**, 1986; Aledo **et al.**, 1988; Cowan **et al.**, 1988; Limon **et al.**, 1988; Trent **et al.**, 1989a; b; Sozzi **et al.**, 1990; Atkin & Baker, 1990) e, apesar de sua ocorrência refletir muitas

vezes um efeito de condições **in vitro** (Chen & Shaw,1973), é possível que ela represente também um evento comum nas culturas de algumas lesões cutâneas e indique malignidade ou instabilidade genética (Hemmer **et al.**, 1900; Lasko **et al.**, 1991).

A endorreduplicação é um outro fenômeno às vezes observado em análises de células tumorais, entretanto, no presente estudo, foi detectada em quatro casos, dois dos quais eram de pele normal. Sua frequência foi inferior à de células poliplóides e nunca superior a 4%. Segundo Chen & Shaw (1973), a endorreduplicação predomina nas passagens iniciais da cultura, ao contrário da poliploidia que aumenta com o número de repiques. Dado que os casos estudados permaneceram em cultivo por períodos quase sempre superiores a 20 dias e foram subdivididos em várias réplicas, essa hipótese pode explicar a presença de poliploidia mas não a de endorreduplicação.

Uma alteração cariotípica também detectada nas amostras de pele e tumorais, mas mais frequente nessas últimas, foi a separação de cromátides, observada em até 3% das metáfases obtidas, com exceção de um caso de pele (881-P1) que mostrou frequência de 81%. Esse fenômeno tem recebido pouca atenção da literatura porém já foi referido na análise de algumas neoplasias, tais como aquelas do sitema hematopoético e seminomas (Atkin & Baker, 1992).

A separação de cromátides em células tratadas com bloqueadores de metáfases pode ser decorrente de condições ambientais, tais como exposição prolongada ou doses elevadas de colcemide, resultando num estágio conhecido como C-anáfase (Chamla, 1988, Atkin & Baker, 1992). Deve ser citado que a amostra analisada em que esse fenômeno foi extremamente comum (881-P1) sofreu exposição à colcemide por 16 horas enquanto uma segunda amostra da mesma paciente (881-P2), em que esse período foi reduzido para apenas duas horas, não mostrou células com essa alteração. Outros casos (887-P2 e 921-P), todavia, em que o tempo de colcemide também foi de 16 horas revelaram, respectivamente, frequência muito baixa e ausência do mesmo fenômeno. Em conclusão, apesar das condições de cultura serem uma causa possível do achado descrito , não deve ser descartada a hipótese de que as células anômalas sejam marcadores de condições neoplásicas ou pré-neoplásicas ou sejam responsáveis pela origem de células poliplóides (Atkin & Baker, 1992).

Variantes polimórficas também foram detectadas em três

pacientes e consistiram do aumento do braço curto dos cromossomos 13, 14 e 22 e da heterocromatina constitutiva do cromossomo 1. Vários estudos têm tentado associar os polimorfismos heterocromáticos com câncer e grande número de dados já foi obtido. Atkin (1977) foi o primeiro a sugerir uma relação entre heteromorfismo de tamanho da heterocromatina do cromossomo 1 e susceptibilidade a algumas formas de câncer, como o carcinoma de ovário. Em 1979, Shabtai & Halbrecht observaram um aumento na frequência de heteromorfismos dos tipos 1qh+, 9qh+, além de inversão parcial ou total de heterocromatina dos cromossomos 1 e 9 em portadores de doenças hematológicas malignas e pré-malignas. Outros autores, entretanto, não encontraram a mesma relação e a aparente contradição pode ser atribuída ao caráter subjetivo das análises, à seleção do grupo investigado e às diferenças étnicas das amostras, ou mesmo à metodologia empregada e a fatores casuais. De qualquer modo, não há dúvidas de que pacientes com alguns tipos de neoplasias, como por exemplo carcinomas e adenomas de cólon, mostram frequências significativamente mais altas de variantes heteromórficas, o que poderia levar a quebras comossômicas e recombinação e facilitar o aparecimento de alterações genéticas envolvidas na transformação neoplásica (Fett-Conte, 1992).

Outros eventos citogenéticos também foram detectados pelo presente estudo. Entre as aneuploidias, as monossomias foram as mais comuns e observadas tanto nas amostras tumorais quanto de pele normal, porém de modo mais consistente nas primeiras. Tais diferenças em frequência poderiam ser explicadas facilmente se, no primeiro grupo, os pacientes tivessem recebido tratamentos radio ou quimioterápicos na época do estudo, ou se os procedimentos técnicos aos quais as células foram submetidas fossem diferentes nos dois grupos. Dado que isso não ocorreu, o resultado parece ser decorrente de características próprias do tecido e refletir a instabilidade cromossômica comum das células neoplásicas e, em menor grau, daquelas provenientes de indivíduos idosos portadores de tumores de pele.

As aneuploidias podem levar a erros mitóticos em virtude da desestabilização causada pela complexidade maior das ligações dos cromossomos às fibras do fuso e da sua reunião na placa metafásica (Chen, 1983; Wolman, 1986). Além disso, contribuem para a perda de genes ou para o aumento na concentração de seus produtos, com possível efeito na proliferação celular (Weinberg, 1991). As deficiências

e as trissomias parciais, essas últimas representadas algumas vezes por cromossomos marcadores, também podem ter consequências semelhantes (Solomon **et al.**, 1991) e foram observadas, no presente trabalho, tanto em tumores quanto em pele normal, incluindo a deficiência clonal del(3)(q12) em um carcinoma basocelular (747-T).

Além das aneuploidias, as alterações estruturais como translocações e deficiências estiveram presentes na amostra estudada, independente ou não da condição neoplásica. O detalhamento dos rearranjos em cada caso específico será apresentado a seguir.

Os resultados da análise dos nevos melanocíticos mostraram a maioria das células com constituição aparentemente normal e, entre as alterações numéricas e estruturais, foram detectadas translocações esporádicas afetando as bandas 1q25, Xq13 e 11q24, além da trissomia 18. Anormalidades envolvendo esses cromossomos já foram detectadas em células de indivíduos portadores de melanoma (Mitelman , 1991) e, considerando que o nevo é uma condição predisponente para esse tipo de neoplasia (Klein-Szanto, 1989; Silva **et al.**, 1992), tais resultados merecem ser discutidos cuidadosamente.

Alguns autores já relataram o envolvimento do braço longo do cromossomo 1 em melanomas malignos (Atkin & Baker, 1981; Balaban **et al.**, 1984; Pedersen **et al.**, 1986; Cowan **et al.**, 1988; Kacker **et al.**, 1990; Sozzi **et al.**, 1990; Parmiter & Nowell, 1993), além de uma translocação e de uma deficiência da banda 1q25 onde está mapeado o protoncogene ABL2 (Bruns & Dracopoli, 1991; Mitelman, 1991). Apesar disso, na maioria dos tumores estudados ocorrem translocações e deficiências do braço curto do cromossomo 1 na forma de aberrações secundárias, sugerindo que um ou mais genes aí localizados podem ser importantes na progressão dessa doença (Trent et al, 1989a). Deve ser salientado que os protoncogenes NRAS e RAP1A e o gene do fator de crescimento para o nervo (NGFB) foram mapeados em 1p23 (Bruns & Dracopoli, 1991) e alterações do NGFB têm sido detectadas em melanomas, assim como mutações levando à ativação do protoncogene NRAS (Sozzi **et al.**, 1990; Parmiter & Nowell, 1993). Também no braço curto, na banda 1p36, está localizado o gene da síndrome do melanoma-nevo displástico (Bruns & Dracopoli, 1991; Goldstein **et al.**, 1993; Parmiter & Nowell, 1993). Essa doença tem herança autossômica dominante e se caracteriza pela presença de nevos pigmentados que frequentemente malignizam (Greene, 1984, Kraemer & Greene, 1985; Black & Hunt, 1990). É interessante que já

foram observadas tranlocações dessa banda em vários pacientes com melanoma (Balaban **et al.**, 1984; Pedersen, **et al.**, 1986; Mitelman, 1991).

Anormalidades do cromossomo 1, entretanto, não são específicas para esse tipo tumoral e foram relatadas em outros tipos de neoplasmas e em doenças hematológicas, estando frequentemente associadas com sua progressão e invasividade (Trent **et al.**, 1989a; Sozzi **et al**, 1990). Em relação às bandas observadas nos rearranjos presentemente detectados, diferentes translocações de 1q25 foram referidas em adenoma e carcinoma de ovário, adenocarcinoma de mama, útero e cérvix, sarcoma de Ewing, meningiomas, mesotelioma, neuroepitelioma e lipoma e uma translocação t(X;1) foi descrita em carcinoma espinocelular de laringe (Mitelman, 1991). A banda Xq13, por outro lado, que contém o protoncogene MYBL2 (Davies **et al.**, 1991), já foi citada em aberrações cromossômicas de adenocarcinoma de rim e de intestino, carcinoma de ovário (Mitelman, 1991), além de melanoma maligno (Pedersen **et al.**, 1986).

Com referência aos nevos estudados e em particular ao rearranjo do segmento 11q24, deve ser salientado que anormalidades estruturais do cromossomo 11, especialmente do seu braço curto, foram observadas em muitos casos de melanoma (Cowan, **et al.**, 1988; Heim **et al.**, 1988a; Kacker **et al.**, 1990; Nedoszytko **et al.**, 1992; Parmiter & Nowell, 1993), e correlacionadas com suas lesões metastáticas (Nedoszytko **et al.**, 1992; Roten **et al.**, 1993). A trissomia 18, por sua vez, embora presente em uma única célula de um dos nevos estudados (881-T), também foi observada em melanoma maligno (Mitelman, 1991).

Em vista desses achados, e considerando que um nevo pode sofrer displasia e progredir para uma condição mais agressiva, os achados citogenéticos das lesões melanocíticas estudadas, embora não clonais, podem indicar a ativação de genes relacionados com a proliferação celular ou o início de um processo de malignização e reforçam a importância de análises desse tipo no prognóstico de condições benignas e pré-malignas.

Um lipoma também fez parte do presente trabalho. Desde sua caracterização citogenética inicial, mais de 250 desses tumores foram estudados (Sreekantaiah **et al.**, 1991b) e a região 12q13-15 tem sido rearranjada repetidamente em mais de 70% dos casos com

anormalidades estruturais e também em seus correspondentes malignos, os lipossarcomas (Sandberg & Turc-Carel, 1987; Sreekantaiah & Sandberg, 1991; Sreekantaiah **et al.**, 1991b). Outros neoplasmas mesenquimais, tais como os leiomiomas e os adenomas de glândula salivar, apresentam do mesmo modo alterações afetando essa região. Isso parece sugerir a existência de genes nesse local que levam ao desenvolvimento dos tumores em questão, embora não seja possível descartar a hipótese de que a transformação neoplásica em cada um deles envolva genes diferentes. A análise molecular dos oncogenes WNT1 (previamente chamado de INT1) e o GLI, mapeados em 12q12-14, não tem revelado anomalias nas lesões estudadas até o momento, a não ser aquelas no padrão de metilação em GLI que foram detectadas em lipossarcomas mixóides (Arheden **et al.**, 1988; 1989; Gemmill **et al.**, 1992; Sreekantaiah & Sandberg, 1991; Sreekantaiah **et al.**, 1991b).

Vários segmentos cromossômicos têm sido translocados para a região 12q13-15 em lipomas, entre eles a região 3q27-28, que parece ser um marcador de um subgrupo de lipomas porque não foi encontrada participando de rearranjos em outros tipos de tumores benignos adiposos como, por exemplo, o lipoblastoma e o fibrolipoma (Sandberg **et al.**, 1986; Mandahl **et al.**, 1987; 1988; Heim **et al.**, 1986; Turc-Carel **et al.**, 1986a; Sreekantaiah & Sandberg, 1991; Sreekantaiah **et al.**, 1990c, 1991b).

Os achados citogenéticos em lipossarcomas, por sua vez são caracterizados pela translocação t(12;16)(q13.3;p11.2) e indicam que os genes localizados em 16p11 também são essenciais para o desenvolvimento dessa neoplasia (Turc-Carel **et al.**, 1986b; Mertens **et al.**, 1987; Bridge **et al.**, 1988; Walter **et al.**, 1988; Eneroth **et al.**, 1990). Como pode ser observado, ocorre similaridade das bandas envolvidas em lesões benignas e malignas desse tecido, e alguns autores têm sugerido que, provavelmente, alterações nas sequências comuns são responsáveis apenas pela proliferação celular enquanto as diferenças de comportamento são decorrentes do rearranjo de genes nas outras bandas especificamente envolvidas em cada caso (Mandahl, 1988; Sreekantaiah & Sandberg, 1991; Sreekantaiah **et al.**, 1991b). Entretanto, algumas análises parecem indicar que os pontos de quebra não são os mesmos nos dois grupos e que nos lipomas compreendem apenas a banda 12q15 (Mròzek **et al.**, 1993).

Os achados citogenéticos do lipoma estudado revelaram, além da translocação t(3;12)(q28;q14), mais de 20% de suas células

com poliploidia, evento esse pouco frequente entre os lipomas já analisados (Sreekantaiah **et al.**, 1991b; Cooper, 1993). Tal anormalidade, do mesmo modo que as alterações cariotípicas complexas, pode refletir instabilidade cromossômica e estar associada com crescimento aberrante dessas lesões (Sreekantaiah **et al.**, 1990a).

Em relação aos outros tumores estudados, os resultados citogenéticos revelaram uma deficiência parcial clonal e duas translocações recorrentes, além de diversas alterações cromossômicas esporádicas em dois carcinomas basocelulares (746-T e 747-T). Pelas razões citadas anteriormente, as duas translocações não obedeceram aos critérios de clonalidadde adotados mas não é possivel excluir a hipótese de que elas, na verdade, sejam clonais. Os dados da literatura mostram que os carcinomas basocelulares, bem como os espinocelulares de pele apresentam aberrações cromossômicas esporádicas e aberrações clonais que, em diversos casos, são múltiplas e não relacionadas (Mertens **et al.**, 1992). A maioria delas compreende translocações balanceadas, embora outros tipos de anomalias já tenham sido observados. Nenhum rearranjo consistente foi detectado nesse grupo e somente duas bandas, 6q27 e 16p13, foram afetadas mais do que uma vez (Mertens **et al.**, 1992), do mesmo modo que os braços curtos de cromossomos acrocêntricos (Aledo **et al.**, 1988; Heim **et al.**, 1988b; Oyama, 1991).

Tais achados diferem do padrão citogenético da maioria das neoplasias já analisadas que, em geral, está associado com uma alteração específica indicativa da origem monoclonal da lesão, e cuja complexidade cariotípica, especialmente no nível de aneuploidias, está correlacionada com o grau de malignidade (Sandberg, 1990; Mertens **et al.**, 1992). A ausência de tais características nas lesões de pele pode apenas refletir o fato de que o número desses tumores analisados ainda é pequeno, mas também pode indicar que o seu padrão cariotípico é, na verdade, totalmente diferente de outras neoplasias.

Uma das explicações para esse padrão é que os diferentes clones citogeneticamente não relacionados refletem a origem policlonal dessas condições (Heim **et al.**, 1988b). Outra explicação é que esses clones representam anomalias secundárias de um neoplasma estabelecido em que uma mutação tumorigênica não visível ocorreu primeiramente e levou à instabilidade genética. Por outro lado, aberrações

instáveis, como quebras e falhas cromossômicas, são raras nesses casos (Heim **et al.**, 1989b) e realmente não foram observadas com frequência elevada nas amostras estudadas. Além disso, os dados clínicos e histológicos falam a favor de focos tumorais múltiplos decorrentes da exposição constante da pele a agentes mutagênicos, o que aumenta a probabilidade de malignização em pontos diferentes do tegumento (Slaughter **et al.**, 1953; Mertens **et al.**, 1992)

Uma outra possibilidade é que esses clones são decorrentes de fatores que atuam **in vitro**. Entretanto, a análise feita por Heim **et al.**(1989c) da evolução cariotípica de um carcinoma **in situ** (Doença de Bowen) mostrou, ao contrário, que as condições de cultivo são responsáveis pela pressão seletiva sobre eles.

Um dos grandes problemas no estudo dos tumores de pele é a dificuldade em reconhecer a origem epitelióide ou fibroblastóide das células aberrantes. Realmente, as amostras estudadas mostraram os dois tipos celulares durante seu cultivo. Isso pode levantar a hipótese de que as mutações cromossômicas estão presentes em células que não fazem parte do parênquima tumoral mas são fibroblastos do estroma ou células epitelióides não neoplásicas (Mertens **et al.**, 1992).

A presente análise de amostras de pele normal proveniente geralmente de regiões expostas ao sol e de tumores cutâneos revelou que os dois grupos mostram uma frequência elevada de anomalias cromossômicas não clonais. As alterações estruturais observadas nos carcinomas basocelulares (746-T e 747-T) consistiram das translocações equilibradas ?t(1;3), t(4;12)(q35;q21-22), t(16;17)(q24;q11), da translocação não equilibrada t(1;12)(p13;q21) e da deficiência clonal del(3)(q12). Essas anormalidades nunca foram relatadas pela literatura que trata de lesões cutâneas. Contudo, os pontos de quebra já foram encontrados em rearranjos de tumores epiteliais e melanocíticos (Mitelman, 1991). As bandas 1p13, 3q12 e 12q21 foram observadas em rearranjos de carcinoma basocelular e espinocelular **in situ** , de queratose seborréica e de papiloma da pele (Mertens **et al.**, 1989a; b; Scapatticci **et al.**, 1989a; b) e, como referido anteriormente, na primeira delas estão mapeados os protoncogenes NRAS, RAP1A e o gene do fator de crescimento para o nervo (NGFB) (Bruns & Dracopoli, 1991).

Como nas amostras tumorais, as de pele normal também apresentaram várias aberrações cromossômicas não clonais, uma delas

recorrente. O caso 1011-P foi o que apresentou maior número de rearranjos, que podem ser decorrente do fato da paciente estar com 85 anos na época, e, portanto, ter sofrido maior exposição ao sol e a outros agentes mutagênicos. Ao contrário, os casos 887-P2 e 921-P praticamente não exibiram alterações, o primeiro possivelmente por se tratar de indivíduo jovem e o segundo pelo número reduzido de metáfases analisadas.

Foram detectadas nesse grupo as translocações t(1;14)(q12;p11), t(17;20)(q22;q13), t(1;1)(p34;p36), t(5;12)(p11-12;q24), t(3;6)(p14;p21.1) e t(7;15)(p13-15;q14-15). Esses achados aparentemente casuais se tornam interessantes quando comparados com aqueles já descritos na literatura para algumas lesões cutâneas.

A translocação t(3;6), por exemplo, vista em uma paciente com carcinoma espinocelular (1011-P) já foi observada em uma metaplasia do epitélio escamoso estratificado (Garewal **et al.**, 1989) e em um carcinoma **in situ** de pele (Heim **et al.**, 1988b), esse último com a banda rearranjada do cromossomo 6 idêntica àquela observada no presente caso. Na região 6p21.3 está mapeado o protoncogene PIM-1 e o gene para o fator de necrose de tumor (Ziegler **et al.**, 1991), o que pode sugerir a participação desse loco no processo maligno. A translocação t(17;20), por sua vez, observada no caso de uma paciente (881-P2) portadora de muitos nevos celulares distribuídos pelo corpo, já foi detectada com os mesmos pontos de quebra em um melanoma maligno por Kacker **et al** (1990). Esse rearranjo também já foi observado em outro caso de melanoma por Limon **et al.**(1988), entretanto, com o envolvimento de outras bandas.

É interessante que a amostra 831-P proveniente de uma paciente com carcinoma basocelular, exibiu a translocação t(1;14)(q12;p11), observada por Atkin & Baker (1981) em melanoma maligno. O ponto de quebra 14p11 tem sido referido, além dos melanomas (Heim **et al.**, 1988a; Kacker **et al.**, 1990), em carcinomas espinocelulares da pele e da laringe (Aledo **et al.**, 1988; Mitelman, 1991), e em tumores benignos como, por exemplo, o queratoacantoma (Mertens **et al**, 1989b). É possível, portanto, que essa região contenha genes que estão relacionados com o desenvolvimento de algumas neoplasias epiteliais.

As outras translocações vistas na amostra de pele 1011-P não têm sido descritas em tumores cutâneos, mas algumas bandas

envolvidas, como 1p34, 1p36 e 5p11, já foram referidas em rearranjos presentes em melanomas malignos (Pedersen **et al.**, 1986; Cowan **et al.**, 1988; Heim **et al.**, 1988a; Mitelman, 1991) e a 7p13 em queratose seborréica (Mertens **et al.**, 1989b), banda essa da localização do gene do receptor para o fator de crescimento epidérmico (McAlpine **et al.**, 1991).

Os resultados acima descritos revelam que as anomalias cariotípicas ocorrem tanto nos fibroblastos de pele normal de indivíduos idosos com tumores quanto em células de lesões cutâneas, embora mais raramente entre os primeiros. Os dados de Mertens **et al.** (1992) também mostraram dados semelhantes em pele de regiões expostas ou não ao sol proveniente de pacientes idosos, sendo as frequências mais baixas naquelas de regiões protegidas. Os achados sugerem, portanto, que as aberrações cromossômicas múltiplas descritas em carcinomas cutâneos não são representativas das células neoplásicas, embora afetem genes importantes no processo de malignização ou proliferação celular. Sua presença em fibroblastos normais de tecidos submetidos consistentemente a agentes carcinogênicos, como os raios ultravioletas, pode indicar o acúmulo de danos no epitélio (Mertens **et al.**, 1992), e refletir indiretamente o risco elevado de transformação maligna a que está sujeito o tegumento desses indivíduos.

V. RESUMO

A análise citogenética de tumores de pele tem revelado algumas características cariotípicas consistentes, como a alta freqüência de aberrações estruturais não clonais e a presença de pequenos clones com rearranjos estruturais balanceados, muitos deles múltiplos e não relacionados, que falam a favor de uma origem multicelular da lesão. Entretanto, a ausência de um denominador citogenético comum e o fato da pele estar constantemete exposta a agentes mutagênicos e carcinogênicos, como a irradiação ultravioleta, sugerem que essas anomalias representam mutações cromossômicas acumuladas nas células cutâneas e não refletem alterações genômicas na população de células tumorais.

Com o objetivo de investigar essa hipótese, o presente estudo analisou citogeneticamente oito amostras de lesões de pele e oito de pele normal proveniente de áreas expostas à luz solar ou adjacentes às lesões. Todos os casos exibiram poliploidia, endorreduplicação ou anomalias numéricas, com exceção de uma amostra de pele normal. Aberrações estruturais esporádicas ou recorrentes foram vistas em quatro tumores e quatro peles normais. Entre os tumores, dois carcinomas basocelulares de dois indivíduos do sexo feminino com 55 e 70 anos, revelaram as translocações esporádicas t(1;12) e t(1;3), as recorrentes t(4;12) e t(16;17) e a deficiência clonal del(3)(q12). Um nevo celular apresentou as translocações esporádicas t(X;1) e t(11;14) e um lipoma exibiu a translocação recorrente t(3;12). Os rearranjos estruturais observados em amostras de pele normal de pacientes com 35 a 85 anos de idade consistiram das translocações esporádicas t(1;14), t(17;20), t(1;1), t(5;12), t(7;15), da recorrente t(3;6) e do suposto dicêntrico ?dic(5).

Os achados citogenéticos revelaram que os rearranjos cromossômicos são comuns em pele normal exposta à luz solar, de forma semelhante ao que ocorre em tumores, sugerindo que tais anormalidades não são representativas do parênquima neoplásico e podem indicar o nível de exposição carcinogênica do tecido e o risco de transformação maligna no epitélio adjacente.

VI.SUMMARY

Cytogenetic analyses of skin tumors have repeatedly revealed some karyologic features: a high frequency of nonclonal structural aberrations and small clones characterized by balanced structural rearrangements; most of them are multiple and unrelated, suggesting multi-cellular origin. However, the lack of common cytogenetic denominators and the fact that the skin is constantliy exposed to mutagens/carcinogens, like UV radiation, make possible that those aberrations represent accumulated chromosomal mutations in cutaneous cells and do not reflect genomic changes in the tumor cell population.

To investigate this hypothesis, the present study analysed short-term cultured cells from eight neoplastic and eight nonneoplastic skin samples from sun-exposed areas or areas close to the tumors.

All cases showed polyploidy, endoreduplication or numerical anomalies, except for one sample from nonneoplastic skin. Four tumors and four normal skin samples had sporadic or recurrent structural aberrations. The first and second tumors, two basal cell carcinomas from 55-year-old and 70-year-old women, showed the sporadic translocations t(1;12), t(1;3), the recurrent translocations t(4;12), t(16;17) and the clonal deficiency del(3)(q12). A cellular nevus had the sporadic translocations t(X;1) and t(11;14). The lipoma exhibited the recurrent translocation t(3;12). Structural rearrangements in samples from normal skin of 35-year-old to 85-year-old patients consisted of the sporadic translocations t(1;14), t(17;20), t(1;1) and t(5;12), the recurrent translocation t(3;6) and the supposed dicentric ?dic(5).

The cytogenetic findings revealed that chromosome rearrangements are common in sun-exposed normal skins, similar to the situation in the tumors, and suggest that those karyotypic abnormalities may not be representative of the neoplastic parenchyma. Their presence might also indicate the level of carcinogenic exposure of the tissue and the risk of malignant transformation in the surrounding epithelium.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEDO, R., AURIAS, A., CHRÉTIEN, B., DUTRILAUX, B. Jumping translocation of chromossome 14 in skin squamous cell from a xeroderma pigmentosum patient. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.33, p.29-33, 1988.

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

ALEDO, R., DUTRILLAUX, B., LOMBARD,M., AURIAS, A. Cytogenetic study on eleven cutaneous neoplasms and two pre-tumoral lesions from xeroderma pigmentosum patientes. **Int. J. Cancer**, v.44, p.79-83, 1989b.

ANANTHASWAMY, H.N., PRICE, J.E., GOLDBERG, L.H., BALES, E.S. Detection and identification of activated oncogenes in human skin cancers occurring on sun-exposed body sites. **Cancer Res.**, v.48, p.3341-3346, 1988.

ANDERSON, M.L.M., SPANDIDOS, D.A. Onco-suppressor genes and their involvement in cancer. **Anticancer Res.**, v. 8, p.873-880, 1998.

ARHEDEN, K., MANDAHL, N., STRÖMBECK, B., ISAKSSOA, M., MITELMAN, F. Chromosome localization of the human oncogene INT1 to 12q13 by in situ hybridization. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 47, p. 86-87, 1988.

ARHEDEN, K., MANDAHL, N., HEIM, S., MITELMAN, F. The INT1 oncogene is not rearranged or amplified in lipomas with structural chromosomal abnormalities of 12q13-15. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.42, p. 143-146, 1989.

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

ATKIN, N.B., BAKER, M.C. A metastic malignant melanoma with 24 chromosomes. **Hum. Genet.**, v.58, p.217-219, 1981.

ATKIN, N.B., BAKER, M.C. Cytogenetic studies of basal cell carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, p. 281-282, 1990.

ATKIN, N.B., BAKER, M.C. Mitotic spindle failure in human cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 62, p. 106-107, 1992.

BALABAN, G., HERLYN, M., GUERRY IV, D., BARTOLO, R., KOPROWSKI, H., CLARK W.H., NOWELL, P.C. Cytogenetics of human malignant melanoma and premalignant lesions. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.11, p.429-439, 1984.

BARBACID, M. Ras oncogenes: their role in neoplasia. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.20, p.225-235, 1990.

BARTRAM, C.R., KLEIN, A., GROSVELD, G. C-abl and bcr rearrangement in Ph^1-negative CML. In: **Leukemia: Recent Advances in Biology And Treatment**. New York: Alan R. Liss, 1985, p. 41-48.

BECHER, R., GIBAS, Z., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A. Nonrandon chromosome changes in malignant melanoma **Cancer Res.**, v. 43, p. 5010-5016, 1983.

BLACK, W.C., HUNT, W.C. Histologic correlations with the clinical diagnosis of dysplastic nevus. **Amer. J. Surg. Pathol.**, v. 14, p. 44-52, 1990.

BRASH, D.E., RUDOLPH, J.A., SIMON, J.A., LIN, A., McKENNA, G.J., BADEN, H.P., HALPERIN, A.J., PONTÉN, J. A role for sunlight in skin cancer: UV - induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p. 10124-10128, 1991.

BRIDGE, J.A., SHAFFER, B., NEFF,J.R., SANGER, W.G., MORAN,J. A complex translocation involving chromosomes 12 and 16 in a metastatic myxoid liposarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 34, p. 119-120, 1988.

BRIGGS, J.C. Melanoma precursor lesions and bordeline melanomas. **Histopathology**, v. 9, p. 1251-1262, 1985.

BRODEUR, G.M., SEEGER, R.C. Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implications. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.19, p.101-111, 1986.

BRUNS, G.A., DRACOPOLI, N.C. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 1. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 58, p. 103-141, 1991.

BURNS, F.J., ALBERT, R.E., GARTE, S.J. Radiation- induced cancer in rat skin. In: CONTI, C.J. et al. (Ed.). **Skin tumors: experimental and clinical aspects.** New York: Raven Press, 1989. p. 293-319.

CAMPBELL, C., QUINN, A.G., REES, J.L. Codon 12 Harvey-ras mutations are rare events in non-melanoma human skin cancer. **Br. J. Dermatol.**, v. 128, p. 111-114, 1993.

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

CASATI, A., STEFANINI, M., GIORGE, R., GHETTI, P., NUZZO, F. Chromosome rearrangements in normal fibroblasts from xeroderma pigmentosum homozygotes and heterozygotes. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.51, p.89-101, 1991.

CHAMLA, Y. C-anaphases in lymphocyte cultures versus premature centromere division syndromes. **Hum. Genet.**, v.78, p.111-114, 1988.

CHEN, T.R. Chromosome changes in 6-TG- resistant mutant strains derived from a karyotypically stable human line, C32. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 35, p. 181-189, 1983.

CHEN, T.R., SHAW, M.W. Stable chromosome changes in a human malignant melanoma. **Cancer Res.**, v. 33, p. 2042-2047, 1973.

CHENG, K.C., LOEB, L.A. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. In: WOUDE, G.F.V, KLEIN, G. (Ed.). **Advances in cancer research.** San Diego: Academic Press, 1993. v. 60, p. 121-156.

CHIAO, P.J., BISCHOFF, F.Z., STRONG, L.C., TAINSKY, M.A. The current state of oncogenes and cancer: experimental approaches for analyzing oncogenetic events in human cancer. **Cancer Metast. Rev.**, v.9, p. 63-80, 1990.

COOPER, C.S. The molecular and genetic caracterization of human soft tissue tumors. In: WOUDE, G.F.V., KLEIN, G. (Ed.). **Advances in cancer research.** San Diego: Academic Press, 1993. v. 60, p. 75-120.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 197-253.

COX, D.R., MURRAY, J.C., BUETOW, K.H. Report of committee on the genetic constitution of chromosome 4. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.51, p. 121-136, 1989.

COWAN, J.M., HALABAN, R., FRANCKE, U. Cytogenetic analisys of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.80, p. 1159-1164, 1988.

CROCE, C.M. Role of chromossome translocations in human neoplasias. **Cell**, v.49, p. 155-156, 1987.

CUTLER, R.G., SEMSEI, I. Development, cancer and aging: possible common mechanismos of action and regulation. **J. Gerontol.**, v.44, p. 25-34, 1989.

CZARNECKI, D., ZALCBERG, J., MEEHAN, C., O'BRIEN, T., LEAHY, S., BANKIER, A., NASH, C.G. Familial ocurrence of multiple nonmelanoma skin cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 61, p.1-5, 1992.

DALLA-FAVERA, R., BREGNI, M., ERICKSON, J., PATTERSON, D., GALLO, R., CROCE, C.M. Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 7824-7827, 1982.

DALLA-FAVERA, R., MARTINOTTI, S., GALLO, R.C., ERICKSON J., CROCE, C.M. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. **Science**, v. 219, p. 963-967, 1983.

DAL CIN, P., SANDBERG, A.A. Chromosome changes in soft tissue tumors: benign and malignant. **Cancer Invest.**, v.7, p. 63-76, 1989.

DAVIES, K.E., MANDEL, J.-L., MONACO, A.P., NUSSBAUM, R.L., WILLARD, H.F. Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 58, p. 853-966, 1991.

DAYA-GROSJEAN, L., ROBERT, C., DROUGARD, C., SUAREZ, H., SARASIN, A. Hight mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. **Cancer Res.**, v. 53, p.1625-1629, 1993.

ELWOOD, J.M., WHITEHEAD, S.M., GALLAGHER, R.P. Epidemiology of human malignant skin tumors with special reference to natural and

artificial ultravioleta radiation exposures. In: CONTI, C.J. **et al.** (Ed.). **Skin tumors: experimental and clinical aspects.** New York: Raven Press, 1989. p. 55-84.

ENEROTH, M., MANDAHL, N., HEIM, S., WILLÉN, H., RYDHOLM, A., ALBERTS, K.A., MITELMAN, F. Localization of the chromosomal breakpoints of the t(12;16) in liposarcoma to subbands 12q13.3 and 16p11.2. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.48, p. 101-107, 1990.

FELDMAN, S.R., YAAR, M. Oncogenes. **Arch. Dermatol.**, v.127, p.707-711, 1991.

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 Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Cincias Exatas. UNESP. 1992.

FITCHETT, M., DOWNING, R.G., HOPKISON, D.A., BALEY, A.C. Intersticial deletion of chromosome band 13q14 associated with squamous cell carcinoma. **J. Med. Genet.**, v.21, p.399, 1984.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells - A manual of basic technique.** New York: Alan R. Liss, 1987. 253p.

FOX, R. Colorectal cancer: new evidence for the adenoma/carcinoma sequence. **Lancet**, v. 340, p. 210-211, 1992.

FURTADO, T.A., GUEDES, A.C.M. Pele e anexos. In: LOPES, E.R. **et al.** (Ed.). **Bogliolo patologia.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 995-1046.

GAMA, N.B. **Estudo citogenético de neoplasias benignas e malignas humanas.** São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1991. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP. 1991.

GARDNER, E.J., SNUSTAD, D.P. **Genética.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 497p.

GAREWAL, H.S., SAMPLINER, R., LIU, Y., TRENT, J.M. Chromosomal rearrangements in Barrett's esophagus. A premalignant lesion of

esophageal adenocarcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 42, p. 281-296, 1989.

GELLER, A.C., KOH, H.K., MILLER, D.R., MERCER, M.B. , LEW, R.A. Death rates of malignant melanoma among white men - United States, 1973-1988. **Arch. Dermatol.**, v. 128, p. 451-452, 1992.

GEMMILL, R.M., MENDEZ, M.J., DOUGHERTY, C.M., PAULIEN, S., LIAO, M. MITCHELL, D., JANKOWSKI, S.A., TRENT, J.M., BERGER, C., SANDBERG, A.A., MELTZER, P.S. Isolation of a yeast artificial chromosome clone that spans the (12;16) translocation breakpoint characteristic of myxoid liposarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 62, p. 166-170, 1992.

GOLDSTEIN, S. The biology of aging. **The N. Engl. J. Med.**, v. 285, p.1120-1129, 1971.

GOLDSTEIN, A.M., DRACOPOLI, N.C., HO, E.C., FRASER, M.C., KEARNS, K.S., BALE, S., McBRIDE, O.W., CLARK JUNIOR, W.H., TUCKER, M. A. Further evidence for a locus for cutaneous malignant melanoma - dysplastic nevus (CMM/DN) on chromosome 1p, and evidence for genetic heterogeneity. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 52, p. 537-550, 1993.

GREENE, M.H. Dysplastic nevus syndrome. **Hosp. Pract.**, p. 91-108, 1984.

GROUCHY, J.D.E., TURLEAU, C. **Atlas des maladies chromosomiques.** Paris: Expansion Scientifique Française, 1977.

HALL, P.A., McKEE, P.H., MENAGE, H.P., DOVER, R., LANE, D.P. High levels of p53 protein in UV- irradiated normal human skin. **Oncongene**, v. 8, p. 203-207, 1993.

HANSSON, J. Inherited defects in DNA repair and susceptibility to DNA - damaging agents. **Toxicol. Lett.** v. 64, p. 141-148, 1992.

HARPER, J.R., REYNOLDS, S.H., GREENHALGH, D.A., STRICKLAND, J.E., LACAL, J.C., YUSPA, S.H. Analysis of the ras^{H} oncogene and its p21 product in chemically induced skin tumors and tumor-derived cell lines. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1821-1825, 1987.

HASHIMOTO, K., MEHREGAN, A.H. **Tumors of the epidermis:** practical dermatopathology series. Boston: Butterworths, 1990. 270p.

HAYFLICK, L. The cell biology of aging. **J. Invest. Dermatol.**, v. 73, p. 8-14, 1979.

HEIM, S., MITELMAN, F. **Cancer cytogenetics.** New York: Alan R. Liss, 1987. 309p.

HEIM, S., MANDAHL, N., KRISTOFFERSSON, U., MITELMAN, F., RÖÖSER, B., RYDHOLM, A., WILLÉN, H. Reciprocal translocation t(3;12)(q27;q13) in lipoma. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 23, p.301-304, 1986.

HEIM, S., MANDAHL, N., ARHEDEN, K., GIOVANELLA, B.C., YIM, S.O., STEHLIN JUNIOR, J.S., MITELMAN, F. Multiple karyotypic abnormalities, including structural rearrangements of 11p, in cell lines from malignant melanomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 35, p. 5-20, 1988a.

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

HEIM, S., JIN, Y.-S., MANDAHL, N., MITELMAN, F. Multiple cytogenetically unrelated clones in short-term cultures from squamous cell carcinomas. **In: International Workshop on Chromosomes in Tumors,** 3, Tucson, 26/02-01/03/ 1989a. Abstracts. p. 30.

HEIM, S., MERTENS, F., JIN, Y.-S., MANDAHL, N., JOHANSSON, B., BIÖRKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Diverse chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the skin. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.39, p. 69-76, 1989b.

HEIM, S., CARON, M., JIN, Y.-S., MANDAHL, N., MITELMAN, F. Genetic convergence during serial **in vitro** passage of a polyclonal squamous cell carcinoma. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.52 p.133-135, 1989c.

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

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

HENDERSON, B.E., ROSS, R.K., PIKE, M.C. Toward the primary prevention of cancer. **Science**, v.254, p. 1131-1138, 1991.

HOLBROOK, K.A., WOLFF, K. Estrutura y desarrollo de la piel. In: FITZPATRICK, T.B. **et al** . (Ed.). **Dermatología en medicina general.** 3.ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 1988. v. 1, p. 199-238.

HOLLIDAY, R. Chromosome error propagation and cancer. **Trends in Genetics**, v.5, p.42-45, 1989.

HUBER, B.E. Therapeutic opportunities involving cellular oncogenes: novel approaches fostered by biotechnology. **Faseb J.**, v.3, p. 5-13, 1989.

ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. HARNDEN, D.G., PATH, F.R.C., KLINGER, H.P. (Ed.). Karger, Basel, 1985. p.117.

ISCN: Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an international system for human cytogenetic nomenclature. MITELMAN, F. (Ed.). Karger, Basel, 1991. p.56.

JIN, Y.-S., HEIM, S., MANDAHL, N., BIÖRKLUND, A., WENNERBERG,J., MITELMAN, F. Inversion inv(4)(p15q26) in a squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 36, p. 233-234, 1988.

JOHNSON, T.M., ROWE, D.E., NELSON, B.R., SWANSON, N.A., ARBOR, A. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 26, p.467-484, 1992.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 512p.

KACKER, R.K., GIOVANELLA, B.C., PATHAK, S. Consistent karyotypic abnormalities in human malignant melanomas. **Anticancer Res.**, v.10, p. 859-871, 1990.

KAWASAKI, R.S., CALDEIRA, L.F., ANDRÉ, F.S., GASQUES, J.A.L.,

CASTILHO, W.H., BOZOLA, A.R., THOMÉ, J.A., TAJARA, E.H. Translocation t(4;14) and concomitent inversion inv(4) in basal cell carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 56, p. 177-180, 1991a.

KAWASAKI, R.S., CALDEIRA, L.F., ANDRÉ, F.S., GASQUES, J.A.L., CASTILHO, W.H., BOZOLA, A.R., THOMÉ, J.A., TAJARA, E.H. Multiple cytogenetic clones in basal cell carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 54, p.33- 38, 1991b.

KAWASAKI-OYAMA, R.S., ANDRÉ, F.S., CALDEIRA, L.F., CASTILHO, W.H., GASQUES, J.A.L., BOZOLA, A.R., THOMÉ, J.A., TAJARA, E.H. Cytogenetic findings in two basal cell carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 1993 (no prelo).

KLEIN, G. Multistep emancipation of tumors from growth control: can it be curbed in single step? **BioEssays**, v.12, p.347-350, 1990.

KLEIN-SZANTO, A.J.P. Pathology of human and experimental skin tumors. In: Conti, C.J. **et al.** (Ed.). **Skin tumors: experimental and clinical aspects.** New York: Raven Press, 1989. p.19-53.

KNUDSON JUNIOR, A.G. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. **Cancer**, v. 63, p. 1888-1891, 1989.

KOH, H.K. Cutaneous melanoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 171-182, 1991.

KRAEMER, K.H., GREENE, M.H. Dysplastic nevus syndrome. **Dermatol. Clin.**, v. 3, p. 225-237, 1985.

KUNE, G.A., BANNERMAN, S., FIELD, B., WATSON, L.F., CLELAND, H., MERENSTEIN, D., VITETTA, L. Diet, alcohol, smoking, serum beta-carotene, and vitamin-A in male nonmelanocytic skin cancer patients and controls. **Nutr. Cancer**, v. 18, p. 237-244, 1992.

KWA, R.E., CAMPANA, K., MOY, R.L. Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.26, p. 1-26, 1992.

LASKO, D. CAVENEE, W., NORDENSKJÖLD, M. Loss of constitucional heterozygosity in human cancer. **Annu. Rev. Genet.**, v. 25, p. 281-314, 1991.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica.**, 3. ed. São Paulo:

Sarvier, 1986. 725p.

LEVINE, A.J. The p53 tumor-supressor gene. **N. Engl. J. Med.**,v. 326, p.1350-1352, 1992.

LEVER, W.F., SCHAUMBURG-LEVER, G. **Histopathology of the skin.** 7. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1990. p. 9-43.

LEZANA, E.A., BIANCHI, N.O., BIANCHI, M.S., ZEBALA-SUAREZ, J.E. Sister chromatid exchanges in Down syndromes and normal human beings. **Mutat. Res.**, v.45, p.85-90, 1977.

LIMON, J. Methodological developments in the cytogenetics of epithelial tumors. **In: 3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors.** Porto/Espinho, 26-29/04/1992. Abstracts Session I.

LIMON, J., DAL CIN, P., SANDBERG, A.A. Amplification of long term collagenase disagregation for cytogenetic analysis of human solid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.23, p.305-315, 1986.

LIMON, J., DAL CIN, P., SAIT, S.N.J., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A. Chromosome changes in metastic human melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.30, p.201-211, 1988.

LOGGIE, B., RONAN, S.G., BEAN, J., DAS GUPTA, T.K. Invasive cutaneous melanoma in elderly patients. **Arch. Dermatol.**, v. 127, p.1188-1193, 1991.

MACHADO FILHO, C.D.A. Tumores cutâneos benignos. In: CUCÉ, L.C., FESTA NETO, C. (Ed.). **Manual de dermatologia.** Rio de Janeiro: Ateneu Editora, 1990. p.415-445.

MALKIN, D., JOLLY, 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. Germiline mutations of the p53 tumor-supressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. **N. Engl. J. Med.**, v.326, p.1309-1315, 1992.

MANDAHL, N., HEIM, S., JOHANSSON, B., BENNET, K., MERTENS, F., OLSSON, G., RÖÖSER, B., RYDHOLM, A., WILLÉN, H., MITELMAN, F. Lipomas have characteristic structural chromosomal rearrangements of 12q13-14. **Int. J. Cancer**, v. 39, p.685-688, 1987.

MANDAHL, N., HEIM, S., ARHEDEN, K., RYDHOLM, A., WILLEN, H., MITELMAN, F. Three major cytogenetic subgroups can be identified among chromosomally abnormal solitary lipomas. **Hum. Genet.**, v.79, p. 203-208, 1988.

MARKS, R., RENNIE, G., SELWOOD, T. The relationship of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas to solar keratoses. **Arch. Dermatol.**, v. 124, p. 1039-1042, 1988.

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

McALPINE. P.S., SHOWS, T.B., BOUCHEIX, C., HUEBNER, M., ANDERSON, W.A. The 1991 catalog of mapped genes and report of the nomenclature committee. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, p.5-102, 1991.

MERTENS, F., JOHANSSON, B., MANDAHL, N. HEIM, S., BENNET, K., RYDHOLM, A., WILLEN, H., MITELMAN, F. Clonal chromosome abnormalities in two liposarcomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 28, p. 137-144, 1987.

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

MERTENS, F., HEIM, S., MANDAHL, N., JOHANSSON, B., RYDHOLM, A., BIÖRKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Clonal chromosome aberrations in a keratoacanthoma and a basal cell papilloma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.39, p.227-232, 1989b.

MERTENS, F., HEIM, S., MANDAHL, N., MITELMAN, F. Cytogenetic analysis of basal cell carcinoma. **In: European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors**, 2, Leuven, 30/07-01/08/1990. Abstracts, A3.

MERTENS, F., HEIM, S., MANDAHL, N., JOHANSSON, B., MERTENS, O., PERSSON, B., SALEMARK, L., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F. Cytogenetic analysis of 33 basal cell carcinoma. **Cancer Res.**, v. 51, p. 954-957, 1991.

MERTENS, F., JIN, Y.-S, HEIM, S., MANDAHL, N., JONSSON, N., MERTENS, O., PERSSON, B., SALEMARK, L., WENNERBERG, J., MITELMAN, F. Clonal structural chromosome aberrations in nonneplastic cells of the skin and upper aerodigestive tract. **Genes Chrom. Cancer**, v.4, p.235-240, 1992.

MITELMAN, F. **Catalogue of Chromosome Aberrations in Cancer.** 2.ed. New York: Alan R. Liss, 1985. v.5, 707p.

MITELMAN, F. **Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer.** 4.ed. New York: Wiley-Liss, 1991. 1987p.

MOLES, J.-P., MOYRET, C., GUILLOT, B. JEANTEUR, P., GUILHOU, J.-J., THEILLET, C., BASSET- SEQUIN, N. p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. **Oncogene**, v. 8, p. 583-588, 1993.

MORTON, D.L., COCHRAN, A.J., LAZAR, G. Melanoma. In: HASKELL, C.M. (Ed.). **Cancer treatment.** 3. ed. Philadelphia: W. S. Saunders Company, 1990. p. 500-512.

MRÓZEK, K., KARAKOUSIS, C.P., BLOOMFIELD, C.D. Chromosome 12 breakpoints are cytogenetivcally 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.

MULLAART, E., LOHMAN, P.H.M., BERENDS, F., VIJG, J. DNA damage metabolism and aging. **Mut. Res.**, v. 237, p.189-210, 1990.

MURPHY, G.F., KWAN, T.H., MIHM JUNIOR, M.C. Pele. In: ROBBINS, S.L. **et al.**(Ed.). **Patologia estrutural e funcional.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 1207-1250.

MURPHY, G.F., MIHM JUNIOR, M.C. A pele. In: COTRAN, R.S. **et al.**(Ed.). **Patologia estrutural e funcional.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 1056-1086.

NAGAYA, T., TORIUM, H. Effects of smoking on spontaneous and induced sister chromatid exchanges in lymphocytes. **Toxil. Letters**, v.25, p.293-296, 1985.

NEDOSZYTKO, B., MRÓZEK, K., LIMON, J. Absence of structural rearrangements of chromosome 11 in human primary malignant

melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.58, p.196-197, 1992.

NOWELL, P.C., CROCE, C.M. Chromosomes, genes, and cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 125, p. 8-15, 1986.

NOWEL, P.C., HUNGERFORD, D.A. A double minutes chromosome in human cronic granulocytic leukemia. **Science**, v.132, p. 1497, 1960.

OCHI, H., WAKE, N., RAO, U., TAKEUCHI, I., SLOCUM, H.K., RUSTUM, Y. M., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A. Serial cytogenetic analysis of a recurrent malignant melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 11, p. 175-183, 1984.

OYAMA, R.S.K. **Estudo citogenético em tumores de pele.** São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1991. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP. 1991.

PARIS CONFERENCE(1971): Standardization in human cytogenetics. **Birth Defects**, v.8, 1972.

PARIS CONFERENCE(1971): SUPPLEMENT(1975): Standardization in human cytogenetcs. **Birth Defects**, v.11, 1975.

PARKIN, W.E., PETONE, M.E., HARLAN, D.M., KOHLER, B.A., LEWIS, H.C. Malignant melanoma of the skin - New Jersey, 1979-1985. **Arch. Dermatol.**, v. 126, p.1001, 1990.

PARMITER, A.H., BALABAN, G., HERLYN, M., CLARK JUNIOR, W.H., NOWELL, P.C. A t(1;9) chromosome translocation in three cases of human malignant melanoma **Cancer Res.**, v. 46, p. 1526-1529, 1986.

PARMITER, A.H., BALABAN, G., CLARK JUNIOR, W.H., NOWELL, P.C. Possible involvement of the chromosome region 10q24-q26 in early stages of melanocytic neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.30, p.313-317, 1988.

PARMITER, A.H., NOWELL, P.C. Cytogenetics of melanocytic tumors. **J. Invest. Dermatol.**, v. 100, p. 254-258, 1993.

PAUL, E. Malignant melanoma. **Arch. Dermatol.**, v.126, p. 540-541, 1990.

PEDERSEN, M.I., BENNETT, J.W., WANG, N. Nonrandom chromosome structural aberrations and oncogene loci in human malignant

melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.20, p.11-27, 1986.

PETTY, E.M., BOLOGNIA, J.L., BALE, A.E., YANG-FENG, T. Cutaneous malignant melanoma and atypical moles associated with a constitutional rearrangement of chromosomes 5 and 9. **Am. J. Med. Genet.**, v. 45, p. 77-80, 1993.

PIMENTEL, E. Oncogenes and human cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.14, p.347-368, 1985.

PROTOCOLS OF THE GENETICS CENTER. SOUTHWEST BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE. Blood Culture Procedure. Scohsdale, 1988.

RAMOS JUNIOR, J. **Oncologia clínica.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1984. 320p.

REEVES, G. Sunlight, DNA repair, and skin cancer. **Lancet**, v. 1, p. 1362- 1363, 1989.

REIS, V.M.S. dos. Tumores cutâneos malignos. In: CUCÉ, L.C., FESTA NETO, C. (Ed.). **Manual de dermatologia.** Rio de Janeiro: Ateneu Editora, 1990. p. 447-453.

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

RIVERS, J.K., HO, V.C. Malignant melanoma. **Arch. Dermatol.**, v. 128, p. 537-542, 1992.

ROTEN, S.V., DELOZIER-BLANCHET, C.D., MASOUYÉ, I. SAURAT, J.H. Melanoma associated with ring chromosome 7. **Dermatology.** v. 186, p. 138-143, 1993.

ROTH, R.R., JAMES, W.D. Microbial ecology of the skin. **Ann. Rev. Microbial.**, v. 42, p. 441-464, 1988.

ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identifies by quinacrine fluorescence and giemsa staining. **Nature**, v.243, p.290-292, 1973.

ROWLEY, J.D. The philadelphia chromosome translocation. **Cancer**, v. 65, p. 2178-2184, 1990.

RUBIN, E., FARBER, J.L. **Patologia** . 1. ed. Rio de Janeiro:

Interlivros Edições, 1990. p. 128-176.

RUMSBY, G., CARTER, R.L., GUSTERSON, B.A. Low incidence of ras oncogene activation in human squamous cell carcinomas **Br. J. Cancer**, v. 61, p.365-368, 1990.

SAMPAIO, S.A.P., CASTRO, R.M., RIVITTI, E.A. **Dermatologia básica.** 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1987, 645p.

SANDBERG, A.A. **The chromosomes in human cancer and leukemia.** 2. ed. New York: Eselvier North Holland, 1990. 1315p.

SANDBERG, A.A., TURC-CAREL, C. The cytogenetics of solid tumors. **Cancer**, v. 59, p. 387-395, 1987.

SANDBERG, A.A., GIBAS, Z., SAREN, E., LI, F.P., LIMON, J., TEBBI, C.K. Chromosome abnormalities in two benign adipose tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.22, p.55-61, 1986.

SANDBERG, A.A. TURC-CAREL, C., GEMMILL, R.M. Chromosomes in solid tumors and beyond. **Cancer Res.** v.48, p.1049-1059, 1988.

SCAPPATICCI, S., FRACCARO, M., ORECCHIA, G. Multiple clonal chromosome in superficial basal cell epithelioma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.42, p.309-311, 1989a.

SCAPPATICCI, S., LAMBIASE, S., FRACCARO, M., ORECCHIA, G. A clonal t(9;12)(q32;q21) in cultured fibroblasts from a case of Bowen' s disease. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.43, p.249-250, 1989b.

SECKER-WALKER, L.M. Prognostic and biological importance of chromosome findings in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 49, p. 1-13, 1990.

SELDEN, 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.

SHABTAI, F., HALBRECHT, I. Risks of malignancy and chromosomal polymorphisms: a possible mecanisms of association. **Clin. Genet.**, v.15, p.73-77, 1979.

SILVA, L.A. da, BRIGGS, P.L., AZULAY, R.D. Melanoma: revisão. **An. Acad. Nac. Med.**, v. 152, p., 156-161, 1992.

SLAUGHTER, D.P., SOUTHWICK, H.W., SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. **Cancer**, v.6, p.963-968, 1953.

SOBEL, M.E. Metastasis suppressor genes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 267-276, 1990.

SOLOMON, E., BORROW, J., GODDARD, A.D. Chromosome aberrations and cancer. **Science**, v.254, p.1153-1160, 1991.

SOZZI, G., MIOZZO, M., CALDERONE, C., FOSSATI, G., PIEROTTI, M.A., CASCINELLI, N., PORTA, G.D. Chromosome abnormalities and fragile sites in human melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.44, p.61-67, 1990.

SREEKANTAIAH, C., SANDBERG, A.A. Clustering of aberrations to specific chromosome regions in benign neoplasms **Int. J. Cancer**, v.48, 194-198, 1991.

SREEKANTAIAH, C., BERGER, C.S., KARAKOUSIS, C.P., RAO, U., LEONG, S.P.L., SANDBERG,A.A. Cytogenetic subtype involving chromosome 13 in lipoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.39, p.281-288, 1989.

SREEKANTAIAH, C., LEONG, S.P.L., SANDBERG, A.A. Complex cytogenetic changes in benign neoplasms. Report of six lipomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.47, p.113-130, 1990a.

SREEKANTAIAH, C., LEONG, S.P.L., FLEMING, S., SANDBERG, A.A. Translocation (2;6)(q36;p21.3) in lipoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.45, p.81-84, 1990b.

SREEKANTAIAH, C., LEONG, S.P.L., CHU, D., SANDBERG, A.A. Translocation (X;12)(q27;q14) in lipoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.49, p.235-239, 1990c.

SREEKANTAIAH, C., LEONG, S.P.L., DAVIS, J.R., SANDBERG, A.A. Intratumoral cytogenetic heterogeneity in benign neoplasm. **Cancer**, v.67, p.3110-3116, 1991a.

SREEKANTAIAH, 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 prolife of 109 lipomas. **Cancer Res.**, v. 51, p. 422-433, 1991b.

SUMNER, A.T. A sample technique for demonstrating centromeric

heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, v.75, p.304-306, 1972.

THOMPSON, M.W., McINNES, R.R., WILLARD, H.F. **Genetics in Medicine.** 5.ed. Philadelphia: Saunders Company, 1991. 500p.

TOUGH, I.M., BAIKIE, A.G., HARNDEN, D.G., KING, M.J., BROWN, N.W.C., BUCKTON, K.E., JACOBS, P.A., McBRIDE, J.A. Cytogenetic studies in chronic myeloid leukaemia and acute leukaemia associated with mongolism. **Lancet**, v.1, p.411-417, 1961.

TRENT, J.M., LEONG, S.P.L., MEYSKENS, F.L. Chromosome alterations in human malignant melanoma. In: CONTI, C.J. **et al.**(Ed.). **Skin tumors: experimental and clinical aspects.** New York: Raven Press, 1989a. p. 165-186.

TRENT, J.M., THOMPSON, F.H., MEYSKENS JUNIOR, F.L. Identification of a recurring translocation site involving chromosome 6 in human malignant melanoma. **Cancer Res.**, v.49, p.420-423, 1989b.

TRENT, J.M., STRANBRIDGE, E.J., McBRIDE, H.L., MEESE, E.U., CASEY, G., ARAUJO, D.E., WITKOWSKI, C.M., NAGLE, R.B. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. **Science**, v.247, p.568-571, 1990a.

TRENT, J.M., MEYSKENS, F.L., SALMON, S.E., RYSCHON, K., LEONG, S.P.L., DAVIS, J.R., McGEE, D.L. Relation of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. **N. Eng. J. Med.**, v.322, p.1508-1511, 1990b.

TURC-CAREL, C., DAL CIN, P., RAO, U., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A. A. Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. I. A benign lipoma with reciprocal translocation t(3;12)(q28;q14). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 23, p. 283-289, 1986a.

TURC-CAREL, C., LIMON, J., DAL CIN, P., RAO, U. KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A. Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(p13;p11) in myxoid liposarcomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 23, p. 291-299, 1986b.

Van der SCHROEFF, J.G., EVERS, L.M., BOOT, A.J.M., BOS, J.L. Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 94, p. 423-425, 1990.

VIVIER, A. du, McKEE, P.H. Tumores malignos da pele. In: VIVIER, A. du. (Ed.). **Atlas colorido de clínica dermatológica.** São Paulo: Manole Editora, 1988. p.7.1-7.36.

ZIEGLER, A., FIELD, L.L., SAKAGUCHI, A.Y. Report of the committee on the genetic constituion of chromosome 6. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 58, p. 295-336, 1991.

WALTER, T.A., DECKER, H.-J.H., LEONG, P.L., SANDBERG, A.A. Short communication: A case of myxoid liposarcoma with translocation t(12;16) as the only abnormality. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 34, p. 117-118, 1988.

WARNER, H.R. PRICE, A.R. Involvement of DNA repair in cancer and aging. **J. Gerontol.**, v.44, p.45-54, 1989.

WATSON, J.D., HOPKINS, N.H., ROBERTS, J.W., STEITZ, J.A., WEINER, A.M. **Molecular biology of the gene.** 4.ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing, 1987. v.1, 774p.

WEBER, J., McCLURE, M. Oncogenes and cancer. **Br. Med. J.**, v.249, p.1246-1248, 1987.

WEI, Q., MATANOSKI, G.M., FARMER, E.R., HEDAYATI, M.A., GROSSMAN, L. DNA repair and aging in basal cell carcinoma: A molecular epidemiology study. **Proc. natl. Acad. Sci.**, v. 90, p.1614-1618, 1993.

WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 49, p. 3713-3721, 1989.

WEINBERG, R.A. Tumor supressor genes. **Science**, v.254, p.1138-1146, 1991.

WEISBURGER, J.H., WILLIANS, G.M. Chemical carcinogenesis. In: HOLLAND, J.F., FREI III, E. (Ed.). **Cancer medicine.** 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982. p. 42-95.

WITTE, O.N. Role of the bcr-abl oncogene in human leukemia: Fifteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. **Cancer Res.**, v. 53, p. 485-489, 1993.

WOLMAN, S.R. Cytogenetic heterogeneity: its role in tumor evolution. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.19, p.129-140, 1986.

VIII. APÊNDICE

Meios de cultura e soluções utilizadas

a. Meios de cultura

a1. Meios incompletos

Meio Ham F-10 (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 4 °C por um período aproximado de 30 dias.

Meio Ham F-10 (CULTILAB)

O meio está pronto para uso. Foi mantido a 4 oC por um período aproximado de 30 dias.

a2. Meio completo

- 100 ml de meio de cultura incompleto
- 1 ml de solução de penicilina/estreptomicina (concentração final de 125 U/ml:125 ug/ml) ou de penicilina/quemicetina (concentração final de 125U/ml:5ug/ml)
- 10, 20 ou 30 ml de soro fetal bovino (CULTILAB)
- 1 ml de solução de glutamina 200mM
- 20 ul de solução de insulina

Sua estocagem foi feita a 4 °C por um período aproximado de 30 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 KH_2PO_4
- 47,5 mg de Na_2HPO_4
- 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 ou lavagem da amostra. 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.

b1. Para transporte das amostras

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

b2. Para lavagem das amostras

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

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

A solução de uso foi obtida a partir de:

- 0,5 ml de solução-mãe de penicilina (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 (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.

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

A solução de uso foi obtida a partir de:

- 0,5 ml de solução-mãe de penicilina (concentração de 1 000 000 U/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril

- 0,5 ml de solução-mãe de quemicetina (concentração de 40 000ug/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril

- 39 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

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

e. 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.

f. Solução de insulina (BIOBRAS U-40)

A solução comercial possui concentração de 40 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada a 4 °C por um período aproximado de 30 dias.

g. 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 um ano e meio.

h. Solução de anfotericina B (Fungizon-SQUIBB) (5 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 por um período aproximado de 6 meses.

i. Solução de colagenase (GIBCO-TIPO II) (2000 U/ml)

A solução de colagenase foi obtida dissolvendo-se essa substância em meio de cultura incompleto numa concentração final de 2000 U/ml. Após seu preparo, foi mantida em banho-maria a 37 °C por duas horas e, em seguida, a 4 °C por 12 a 14 horas. A solução foi, então, esterilizada por filtração e estocada a - 20 °C por dois a três meses.

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

- 1,0 mg de colquicina (uma pérola)
- 60 ml de água desioniozada estéril

A solução foi distribuída em frascos escuros, que foram autoclavados por 30 minutos e estocados a 4 °C por até seis meses.

k. 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). Foi estocada a -20 °C após filtração, por um período aproximado de um ano.

- 2 ml de solução-mãe de colcemide em 10 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução de uso 2 ug/ml). Foi estocada a 4 °C por um período aproximado de seis meses.

l. Solução hipotônica de citrato de sódio (0,8%)

- 0,8 g de citrato de sódio em 100ml de água desionizada

Foi estocada à temperatura ambiente ou a 4 °C, por dois a três meses.

m. Fixador

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

Foi preparado minutos antes do uso.

n. Tampão Sorensen, pH 6,8

Foi preparado a partir de :

- 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

n1. Solução A

- 14,196 g de difosfato de sódio (Na2PO4)
- 500 ml de água desionizada

n2. Solução B

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

o. Soluções de tripsina

o1. Solução de tripsina (BIOBRAS ou DIFCO) para bandamento cromossômico (1mg/ml)

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

o2. Solução de tripsina/EDTA (CULTILAB) para repique de culturas

A solução está pronta para uso e foi mantida a -20 °C por um período aproximado de 6 meses.

p. Solução salina de PBS

A solução foi preparada dissolvendo-se:

- 8 g de NaCl
- 0,2 g de KCl
- 1,15 g de difosfato de sódio (Na2HPO4)
- 0,2 g de monofosfato de potássio (KH2PO4)
- 1000 ml de água desionizada

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

q. Solução salina 2 x SSC

- 8,765 g de NaCl
- 4,41 g de C6H5Na3O7
- 500 ml de água desionizada

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

r. Solução de hidróxido de bário (5%)

- 3,0 g de Ba(OH)2.8H2O
- 60 ml de água desionizada na temperatura de 50-60 °C

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

s. Corante Giemsa (MERCK) (2%)

A solução mãe foi obtida dissolvendo-se:

- 0,5 g 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.