Patrícia de F. Faleiros Ribeiro

Estudo Citogenético em Lesões Benignas de Tireóide e Glândula Salivar

Patrícia de F. Faleiros Ribeiro

ESTUDO CITOGENÉTICO EM LESÕES BENIGNAS DE TIREÓIDE E GLÂNDULA SALIVAR

Dissertação apresentada para a 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 - UNESP.

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

655/94

São José do Rio Preto - SP

1994

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

Orientadora: Profª Drª Marileila Varella Garcia

Co-orientadora: Profª Drª Ana Elizabete Silva

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

"Só pelo caminho da dor se chega ao mais elevado conhecimento".

Ésquilo

Ao finalizar este trabalho, dedico-o:

- A meu esposo, Luiz Tadeu, amigo e companheiro sempre presente, pelo carinho e compreensão.

- A meus pais, pelo esforço, apoio e dedicação.

"Mestre, faz perdurável a minha paixão e
passageiro meu desencanto".

Gabriela Mistral

À minha orientadora, Marileila,
Que me serviu,
Que me abrandou
As asperesas do caminho,
Com a humildade e a grandeza
De quem sabe,
Meu carinho, minha eterna gratidão.

unesp

"O caminho da Ciência parte dos primeiros princípios ou vai em busca deles?"

Platão

"Jamais aprenderei a morrer. Mesmo no momento final haverei de estar ao lado da vida".

Lêdo Ivo

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. Marileila Varella Garcia pelo apoio, paciência e confiança, pela orientação segura no planejamento e execução deste trabalho, pelo exemplo de seriedade e capacidade científica e pela contribuição para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

À Profa. Ana Elizabete Silva pela disponibilidade em auxiliar como co-orientadora para a realização deste trabalho, mas especialmente pela sua amizade e confiança.

À Profa. Eloiza Helena Tajara pela amizade, carinho, atenção e colaboração em todos os momentos no decorrer deste trabalho, inclusive na análise da pró-forma.

À Profa. Dra. Sílvia Regina Rogatto, pela atenção e análise cuidadosa da pró-forma e pelas valiosas sugestões, que enriqueceram significativamente este estudo.

Aos professores do Departamento de Biologia e Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do IBILCE-UNESP, pela transmissão de conhecimentos e experiências e pela amizade e convívio salutar.

Às Profas. Dras. Cláudia M. A. Carareto, Hermione E. M. C. Bicudo, Maria Astride S. Coradi e Maria Tercília V. A. de Oliveira, pela amizade, carinho e incentivo constante a mim dedicados.

Aos colegas e companheiros do Curso de Pós-Graduação, pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas de experiências e idéias.

Às Profas. Dras. Agnes C. Fette Conte e Eliana M. Versute, pelo incentivo, colaboração e amizade e às Profas. Eny M. G. Bertollo e Dorotéia Rossi Silva Souza, pelo incentivo e convivência amiga.



Aos pacientes e seus familiares, pela contribuição imprescindível.

Aos médicos cirurgiões Dr. Emílio Juste Júnior e Dr. José Victor Maniglia e ao patologista Dr. Luis Vitor de Lima Salomão, pela disponibilidade em fornecer as amostras utilizadas neste estudo.

Aos médicos Dr. Antônio de Rosis, Dr. Heitor J. Guimarães Filho e Dr. João Armando, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

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

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

Às secretárias do Departamento de Biologia, Olga B. Pelicer e Simone C. Fernandes, pelo carinho e amizade a mim dedicados; aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, da Biblioteca, do laboratório de Computação e aos demais funcionários deste Instituto, pela presteza e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários do Polo Computacional deste Instituto, em especial ao Cristiano Nunes Pereira, Guilherme Dworak, Tarlei Lodi e José Maria de Almeida, pela presteza com que me auxiliaram na utilização do Internet e dos programas para a digitação.

À minha grande amiga Sheila Adami Vayego, pela dedicação e apoio sincero em todos momentos.

À Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, pelo apoio, amizade e carinho constante.

A meus pais, Lourenço e Etelvina, pelo amor, carinho, estímulo e sacrifícios dispensados no decorrer de minha vida.

A meus irmãos e cunhados, Eliana e Clóvis, José Francisco e Elza, pela amizade e incentivo, pelo amor, carinho, apoio e dedicação.

A todos os meus sobrinhos, pelo amor, carinho e serenidade que me



transmitem.

A meus padrinhos que muito contribuiram à minha formação, pelo carinho e amor a mim dedicado.

A meus sogros, Edna e Geraldo, pelo carinho e amizade.

A todos os meus familiares, pelo afeto, paciência e confiança.

A meu esposo e companheiro, Luiz Tadeu, por tanto amor e dedicação e por todos os momentos de renúncia.

A Deus por tudo, pela vida e por ter permitido que tudo isto se realizasse.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO 1

I.1. Considerações Gerais 1

I.2. Base Genética das Neoplasias 2

I.3. Lesões Benignas e Malignas de Cabeça e Pescoço 9

I.4. Alterações citogenéticas em lesões neoplásicas e não-neoplásicas de Cabeça e Pescoço 16

I.5. Objetivos 21

II. MATERIAL E MÉTODOS 22

II.1. Material 22

II.2. Métodos 22

III. RESULTADOS 30

III.1. Pacientes com Bócio Colóide Multinodular 30

III.2. Paciente com Adenoma Pleomorfo de Glândula Salivar 46

IV. DISCUSSÃO 52

IV.1. Bócio Colóide Multinodular 52

IV.2. Adenoma Pleomorfo de Glândula Salivar 55

V. RESUMO E CONCLUSÕES 57

VI. SUMMARY 59

VII. BIBLIOGRAFIA 60

VIII. APÊNDICE 75

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações Gerais

A designação neoplasia corresponde, etmologicamente, a um "crescimento novo" e pode ser definida como uma massa de tecido resultante de proliferação celular excessiva e inadequada. As designações tumor e neoplasma também são freqüentemente usadas como sinônimos de neoplasia, e a designação câncer é empregada nas neoplasias malignas (Cotran **et al.**, 1991). Na classificação dos neoplasmas são utilizados parâmetros como o comportamento celular, a histomorfologia e também aspectos histogenéticos. As células das condições benignas geralmente são bem diferenciadas, não se separam do clone primário e, desse modo, não produzem metástases. As formas benignas geralmente não colocam em risco a vida de seus portadores e a remoção dessas lesões proporciona a cura dos pacientes. Já as células dos neoplasmas malignos variam desde indiferenciadas a bem diferenciadas e apresentam a superfície alterada e menos adesiva, o que permite a infiltração e destruição dos tecidos normais adjacentes e a disseminação para locais distantes da colônia primária, por intermédio da corrente sanguínea e linfática, dando origem às colônias secundárias ou metastáticas.

A nomenclatura das neoplasias é baseada no tipo do tecido de origem e no seu comportamento. As neoplasias benignas são designadas histologicamente conforme o tipo de célula parenquimal, como é o caso dos fibromas e lipomas. Os tumores epiteliais benignos podem ser classificados com base na arquitetura microscópica, como é o caso dos adenomas, designação de tumores derivados de glândulas ou com padrões glandulares, e dos cistadenomas, designação das neoplasias que formam grandes massas císticas. Esses tumores podem, ainda, ser nomeados conforme os padrões macroscópicos, como indica o uso do termo papiloma em neoplasias que formam, a partir das superfícies epiteliais, projeções digitiformes ou verrucosas visíveis micro ou macroscopicamente (Cotran **et al.**, 1991).

Os cânceres de origem nos tecidos mesenquimais são designados sarcomas, como é o caso do fibrossarcoma, do lipossarcoma e do rabdomiossarcoma. As condições malignas com origem em tecidos epiteliais são denominadas carcinomas. Esses podem ser enquadrados em outras classificações, com base, por exemplo, no tipo celular, como é o caso dos adenocarcinomas e dos carcinomas de células escamosas (CCE). Na classificação dos tumores é recomendado que se especifique o órgão de origem e o grau de diferenciação (Cotran **et al.**, 1991).

A incidência de câncer nas populações humanas está se tornando cada vez mais elevada. A mortalidade proporcional por neoplasias no Brasil aumentou de 2,7% em



1930, para 11,2% em 1980. Contribuições para tais alterações podem ter ocorrido pelas modificações demográficas e econômicas ocorridas no país, devido à industrialização, êxodo rural e fluxo migratório (Kowalski & Franco, 1991), assim como ao aumento na longevidade média. Nos Estados Unidos, cerca de um milhão de novos casos são diagnosticados anualmente e, conforme as estimativas da Sociedade Americana de Cancerologia, aproximadamente 500 mil pessoas foram a óbito em 1989 devido a essa doença, o que correspondeu a cerca de 22% do total de mortes (Cotran **et al.**, 1991).

I.2. Base Genética das Neoplasias

Para o desenvolvimento dos neoplasmas são requeridos eventos sequenciais múltiplos, que conferem vantagens de proliferação e alteram o padrão de diferenciação das células (Lasko **et al.**, 1991). Conforme esses autores, a maioria dos eventos envolve modificações constitucionais ou adquiridas do material genético, que podem afetar a regulação gênica e resultar em alteração no controle da divisão celular.

A presença de determinadas mutações somáticas pode levar a lesão a se comportar de modo benigno, apresentando crescimento lento e localização restrita e, em consequência, oferecendo poucos danos aos seus portadores. Por outro lado, a aquisição de mutações específicas pode ser responsável por uma maior agressividade da lesão, conferindo-lhe características invasivas e capacidade de metastatização, oferecendo grandes prejuízos aos seus portadores, incluindo a morte (Cotran **et al.**, 1991).

As células tumorais vão adquirindo novas características fenotípicas, levando a um aumento do comportamento agressivo. Desse modo, os tumores apresentam alterações genéticas mais pronunciadas nas fases tardias, do que no seu início (Pejovic **et al.**, 1990). O crescimento neoplásico ocorre a partir de uma linhagem-tronco ou clone primário que origina os clones secundários. Esses podem desaparecer por serem inviáveis ou sensíveis às condições ambientais, podem sobreviver conjuntamente com a linhagem principal, ou até mesmo substituí-la, dependendo da seleção proporcionada pelo organismo. Análises de marcadores genéticos bioquímicos confirmam a origem e evolução clonais dos tumores. As mutações gênicas e as alterações cromossômicas, as irregularidades mitóticas e as atipias nucleares são frequentes nas neoplasias, sugerindo que as células neoplásicas são geneticamente instáveis, apresentando mutagênese aumentada ou reparo genômico deficiente, o que pode explicar o desenvolvimento de resistência a hormônios, a compostos químicos, a radioterapia e a imunoterapia (Scully, 1993). Por outro lado, o desenvolvimento de heterogeneidade genética nos tumores pode ser devido a um relaxamento dos mecanismos de seleção pelo organismo contra os clones anômalos .

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

A maioria das neoplasias apresenta anomalias cromossômicas múltiplas. O evento citogenético primário é essencial à transformação neoplásica. Já as alterações citogenéticas secundárias, consideradas responsáveis pela progressão e dispersão das células malignas, são adquiridas posteriormente e decorrentes da instabilidade do genoma tumoral (Sandberg, 1990). De acordo com esse autor, a partir da identificação de aberrações cromossômicas primárias em vários tipos de neoplasias, foram feitas importantes contribuições para o diagnóstico, o prognóstico e a escolha da terapia mais adequada.

Há um grande número de publicações relacionando alterações cariotípicas a tumores sólidos, no entanto a identificação dos eventos citogenéticos iniciais do desenvolvimento tumoral é limitado, porque tais lesões são, em geral, estudadas em estágios mais avançados, quando o reconhecimento da alteração primária, entre as numerosas anomalias secundárias presentes, é muito difícil. As alterações secundárias podem fornecer subsídios para o esclarecimento da progressão tumoral e as alterações primárias têm um significado patogenético incontestável, embora a distinção entre ambas nem sempre seja possível (Trent **et al.**, 1989). Muitas aberrações cromossômicas induzem eventos moleculares que afetam sequências de oncogenes ou de genes supressores de tumor, de reguladores de diferenciação celular ou de padrões metabólicos específicos e de genes que codificam fatores envolvidos no crescimento ou nas interações celulares.

O entendimento do significado das informações citogenéticas em tumores sólidos é consideravelmente menor que em neoplasias hematológicas, basicamente devido às dificuldades metodológicas no estudo daqueles tumores. Contudo, podem ser citados alguns exemplos de neoplasias que afetam os tecidos sólidos nas quais foi possível correlacionar alterações cromossômicas específicas e secundárias com o prognóstico, proporcionando à citogenética condições de fornecer informações valiosas ao estudo dessas doenças.

De acordo com Sandberg (1986), a presença de numerosos marcadores em carcinoma de células transicionais de bexiga está relacionada com uma maior agressividade da lesão. Teyssier (1989) correlacionou esse achado à presença de poliploidia, que nesta doença representa um risco aumentado de recorrência e um mau prognóstico. Conforme Buys (1991), a presença de rearranjos no cromossomo 19p13 em histiocitoma fibroso maligno está relacionada ao prognóstico ruim da doença.

Um exemplo da contribuição da citogenética ao estudo dos tumores sólidos foi dado por Hayashi **et al.** (1987) e Kaneko **et al.** (1987), para revisão Bown (1992), que referiram as deficiências ou rearranjos no cromossomo 1p distal, como sendo as mais frequentes alterações em neuroblastoma, que juntamente com células hipo ou

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

pseudodiplóides representam um prognóstico desfavorável nessa doença. Solomon **et al.** (1991) sugeriram, em sua revisão, a existência de um loco regulador comum na região envolvida pela deficiência del(1)(p32-36) em neuroblastoma e glioma, ambos de origem neuroectodérmica, que deve ser inativado para que ocorra o desenvolvimento desses neoplasmas.

O entendimento da base biológica das lesões benignas e pré-malignas também foi beneficiado pelos avanços da citogenética, pois até pouco tempo se acreditava que os tumores benignos eram citogeneticamente normais e que a presença de alterações cromossômicas indicava transformação maligna. Contudo, estudos mais recentes demonstraram a ocorrência de anomalias cariotípicas em células de tecidos normais e em células provenientes de tumores benignos. Muitas dessas alterações são específicas, o que auxilia no diagnóstico desses tumores. O fato de não ocorrer transformação maligna nesses casos pode estar relacionado à ausência de mutações necessárias para tal, ou ainda à presença de outros fatores nas etapas iniciais do processo. É provável que certos genes críticos permaneçam inativados, ao passo que outros sejam ativados. Entre os genes ativados, encontram-se aqueles que fornecem vantagens proliferativas às células durante a diferenciação. Esses genes devem estar envolvidos nos cânceres, interrelacionados com mutações que são responsáveis por características de malignidade, como a capacidade de invasão dos tecidos circundantes, vasos sanguíneos e linfáticos e, consequentemente, de produzir metástases.

Alguns exemplos de tumores benignos com marcadores cromossômicos são os meningeomas, caracterizados pela monossomia total ou parcial do cromossomo 22 (Zang & Singer, 1967, Rogatto & Casartelli, 1988, para revisão, Heim & Mitelman, 1989, Mitelman, 1991). Contudo, cariótipos complexos foram encontrados envolvidos na progressão de meningeomas malignos, estando relacionados com um prognóstico desfavorável (Casartelli **et al.**, 1989). Outro exemplo é o adenoma pleomorfo ou tumor misto de glândula salivar, cujas alterações citogenéticas caracterizam três subtipos, que envolvem rearranjos em 3p21, 8q12 e 12q13-15 e a t(3;8)(p21;q12) relaciona-se a um prognóstico ruim (Sandberg, 1988, Teyssier, 1989, Teyssier & Ferre, 1989, Mitelman, 1990). As bandas 12q13-15 mostram envolvimento recorrente em tumores benignos e malignos do tecido adiposo, bem como em tumores benignos de glândula salivar e da musculatura lisa. Translocações entre as bandas 12q13-15 e os segmentos 1p, 2p, 3q e 21q são verificadas nos lipomas (Heim **et al.**, 1986, Sreekantaiah & Sandberg, 1991). Stenman **et al.** (1993) referiram que em tumores benignos, especialmente adenomas pleomorfos, há mais frequentemente variações nos pontos de quebra dos cromossomos 12 envolvidos em

translocações do que em tumores malignos, como os lipossarcomas, sugerindo que tal achado pode ter significados diferentes entre tumores benignos e malignos.

Sreekantaiah e Sandberg (1991) verificaram a presença de alterações cromossômicas em neoplasias benignas, especialmente nos cromossomos 1, 2, 6, 11, 12, 13 e 22, e sugeriram a presença de genes nos sítios envolvidos que devem ser responsáveis pela regulação do crescimento celular, mas não pela transformação maligna.

Mesmo em lesões não-tumorais e em tecidos normais adjacentes a tumores também já foram descritas anomalias cromossômicas clonais. Alterações numéricas foram relatadas por Gama **et al.** (1991) em um bócio colóide multinodular. Vayego (1993), em um caso de cisto ósseo solitário verificou uma complexa translocação, aparentemente balanceada, envolvendo múltiplos cromossomos. Tecidos renais normais de pacientes com câncer renal, estudados por Lee **et al.** (1987), apresentaram trissomia dos cromossomos X, 7 e 10 e monossomia do cromossomo Y. Tecidos aparentemente normais de cérebro de pacientes portadores de tumores malignos desse órgão exibiram clones com trissomia do cromossomo 7 e monossomia dos cromossomos X e Y (Heim **et al.**, 1989). A trissomia do cromossomo 7 foi, ainda, verificada em epitélio bronquial normal de pacientes com câncer de pulmão, por Kovacs & Brusa (1989). Hermann & Lalley (1992) também encontraram a trissomia do cromossomo 7 em carcinoma papilar da tireóide.

Todavia, o significado desse achado não é conhecido e precisa ser melhor investigado. Genes implicados na proliferação celular, como o oncogene **MET** e o gene para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) foram mapeados no cromossomo 7 e podem estar relacionados com as anomalias desse cromossomo. Conforme Bown (1992), o início da transformação celular nesses tecidos pode estar relacionado a tais alterações cromossômicas e, dessa forma, a possibilidade de mosaicismo constitucional tecido-específico deve ser considerada no momento de se interpretar cariótipos aneuplóides em tumores sólidos.

Buys (1991), por sua vez, sugeriu que alguns indivíduos são geneticamente mais suscetíveis ao câncer que outros, por apresentarem um maior número de alterações cromossômicas em seu tecido normal. Tem sido observados resultados conflitantes referentes à frequência de anomalias cromossômicas adquiridas em células normais de pacientes com câncer que, em parte, são devidos às diferenças metodológicas (Nordenson **et al.**, 1984, Hsu **et al.**, 1989).

Sandberg (1990) destacou que as alterações cromossômicas observadas em neoplasias precisam ser caracterizadas em nível molecular, de forma a identificar os genes envolvidos no processo neoplásico. O trabalho conjunto e simultâneo das áreas de Citogenética e Biologia Molecular tem oferecido substancial contribuição para o

unesp

mapeamento de genes envolvidos na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer. Entre tais genes, encontram-se os oncogenes, os quais apresentam a capacidade de induzir a transformação neoplásica, em condições normais ou experimentais, e são resultantes de alterações dos protoncogenes. Os protoncogenes têm importante papel no funcionamento celular, que é demonstrado pelo fato de serem altamente conservados durante o processo evolutivo. Subsídios para a transformação neoplásica são fornecidos pela ativação de um protoncogene, mesmo em um único alelo. Tal ativação pode ocorrer por uma variedade de mecanismos, entre os quais a amplificação gênica, a mutação em ponto ou aberrações cromossômicas, como as translocações e as deficiências, todos alterando a estrutura do gene ou sua expressão (Knudson, 1985, Fearon, 1994, Kelley & Johnson, 1994).

Foram identificados no genoma humano mais de cinquenta e seis protoncogenes, muitos dos quais já estão mapeados (McAlpine **et al.**, 1991). Os protoncogenes se expressam durante o crescimento controlado, tal como na embriogênese, cicatrização, regeneração de tecidos como o fígado e, assim, de modo geral, no processo de divisão celular (Anderson **et al.**, 1992). Seus produtos atuam no controle do crescimento e na diferenciação celular e, entre eles, estão os fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, proteínas que se ligam ao GTP, fatores de transcrição e moduladores de transmissão de sinais através da membrana plasmática (Hunter, 1991, Feldman & Yaar, 1991, Anderson **et al.**, 1992).

Os genes supressores de tumores ou anti-oncogenes pertencem a outra classe de genes relacionada ao processo neoplásico. É provável que esses genes atuem como supressores dos oncogenes e que sua alteração, em ambos os homólogos, possa levar ao processo maligno pela perda de seu papel regulador (Knudson, 1985, Anderson & Spandidos, 1990, Fearon, 1994, Kelley & Johnson, 1994). Os genes supressores de tumor atuam, em alguns casos, como reguladores negativos da divisão celular e estão mais frequentemente mutados em cânceres humanos do que os oncogenes. Indivíduos heterozigotos de mutações em genes supressores de tumor na linhagem germinativa são mais fortemente predispostos a uma ou mais formas de câncer e a maioria dos cânceres herdados de forma dominante é atribuída a essa heterozigose. Alguns cânceres embrionários e infantis têm baixas frequências de mutações em genes supressores de tumor, contudo outros como os sarcomas apresentam um número maior dessas mutações e mais ainda os carcinomas, refletindo a hierarquia sobre o crescimento das populações celulares, conforme destacado por Knudson, 1993. Esse autor citou oito anti-oncogenes já clonados, **RB1**, **WT1**, **VHL**, **APC**, **DCC**, **TP53**, **NF1** e **NF2**, dos quais todos, exceto o **DCC**, foram encontrados mutados na linhagem germinativa de indivíduos predispostos a um ou mais tipos de tumor. Outros sete supostos anti-oncogenes, **BRCA1**, **RCC**, **NB1**,

unesp

MLM, **MEN1**, **BCNS** e **LC1** foram mapeados, mas não clonados, e também mostraram-se mutados em células germinativas de indivíduos predispostos a tumores, com exceção do **LC1**. Muitos outros possíveis anti-oncogenes estão sendo procurados com base na associação de tumores com eventos cromossômicos delecionais.

Os genes supressores de tumor encontram-se amplamente distribuídos no genoma humano: **NB1** em 1p36, **RCC** em 3p14, **VHL** em 3p25, **APC** em 5q21, **MLM** em 9p21, **BCNS** em 9q31, **WT1** em 11p13, **MEN1** em 11q13, **RB1** em 13q14, **TP53** em 17p13, **NF1**, em 17q11, **BCRA1**, em 17q21, **DCC** em 18q21 e **NF2** em 22q12 (Knudson, 1993).

O supressor de tumor mais recentemente localizado é o **MTS1** (Multiple Tumor Suppressor 1), mapeado em 9p21 e clonado por Kamb **et al.** (1994). Este gene codifica uma proteína, chamada 16, que havia sido previamente identificada como inibidora da quinase dependente da ciclina cdk4. A deficiência em homozigose do gene foi primeiramente detectada em linhagens celulares de melanoma, mas estudos realizados a seguir confirmaram tal deficiência em linhagens estabelecidas a partir de tumores de pulmão, mama, cérebro, bexiga, ovário, rim e tumores ósseos. As descobertas dessas alterações genéticas pode, num futuro próximo, contribuir para a detecção de lesões pré-malignas, assim como na prevenção, diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer humano (Hackford, 1993, Carbone & Minna, 1993, Kelley & Johnson, 1994).

De maneira geral, a divisão celular normal é regulada pelos protoncogenes, que, por sua vez, são regulados pelos genes supressores. O crescimento neoplásico pode ocorrer devido a mutações que potencializam as atividades de um protoncogene ou que inativam as de um gene supressor. Contudo, as evidências acumuladas sugerem que eles são de fato fisiologicamente diferentes e que a progressão de muitos tumores para a malignidade requer a ocorrência de ambos os tipos de alterações no genoma da célula tumoral (Weinberg, 1991).

Em tumores sólidos, é grande o número de descrições de rearranjos cromossômicos e a identificação dos genes envolvidos no processo neoplásico está intimamente relacionada à caracterização molecular desses rearranjos. Mitelman & Heim (1988) referiram que 38% das bandas cromossômicas, envolvidas em aberrações primárias de diferentes tipos de tumores, coincidiam com a localização de oncogenes e que os rearranjos nessas localizações devem ser responsáveis por alterações moleculares que iniciam a transformação celular.

Diferentes formas de alterações em oncogenes são descritas em neoplasias, entre elas a fusão do protoncogene **ABL1**, em 9q34, com o gene **BCR**, em 22q11, na leucemia mielóide crônica (Grofen **et al.**, 1984, Chen **et al.**, 1988), a amplificação

(DM/HSR) do **MYCN**, em 8q14, nos neuroblastomas (Thompson, **et al.**, 1991, Bown, 1992) e nos melanomas (Bauer **et al.**, 1990) e mutações gênicas nos genes da família **RAS**, **HRAS1** em carcinoma de bexiga, **HRAS** e **KRAS1** em neoplasias de pâncreas (Höfler **et al.**, 1988), **NRAS** e **KRAS** em carcinoma de estômago (Nagata **et al.**, 1990) e **HRAS**, **KRAS** e **NRAS** em tumores de cólon (Nagata **et al.**, 1990) e em neoplasias de pele (Corominas **et al.**, 1989, Daya-Grosjean **et al.**, 1993).

Por outro lado, mutações que afetam os genes supressores também estão relacionadas ao processo de transformação neoplásica, entre elas as deficiências do gene **RB1** em retinoblastoma (Lee **et al.**, 1987, Chiao **et al.**, 1990), osteossarcoma (Hansen, 1991, Wunder **et al.**, 1991), câncer de pulmão (Weinberg, 1991) e câncer de cólon (Knudson, 1971, Knudson **et al.**, 1975, para revisão: Lothe **et al.**, 1992) e mutações dos genes **MMC**, **APC e DCC** em câncer de cólon (Fearon **et al.**, 1990, para revisão: Smith & Alonso, 1993). Mutações que inativam o gene supressor **TP53** estão presentes em câncer de cólon, mama e pulmão (Levine, 1992), de bexiga, sistema nervoso, fígado e órgãos hematopoiéticos (para revisão, Weinberg, 1991) e nos tumores de tireóide (Herrmann, **et al.** 1992), entre outros.

Um bom exemplo da importante contribuição dos dados citogenéticos e moleculares na determinação do diagnóstico, prognóstico e escolha de tratamento terapêutico adequado é mostrado em câncer de cólon. Tem sido documentada a transformação do epitélio normal do intestino para carcinoma por intermédio de uma série de passos bem definidos que compreendem desde a fase de pólipos adenomatosos, passando por displasia não-invasiva e culminando em neoplasia maligna (Fearon & Vogelstein, 1990, para revisão, Vogelstein & Kinzler, 1993). Mutações em um dos três genes **RAS** foram identificadas em cerca de 10% dos adenomas com menos de 1cm de diâmetro, em aproximadamente 50% dos adenomas com mais de 1cm de diâmetro e em 50% dos carcinomas colo-retais (Fearon, 1994). A ativação dos genes **RAS,** possivelmente, deve-se à perda ou mutação dos genes MMC e APC, provavelmente localizados na banda 5q22 (Weinberg, 1991). Mutações somáticas no gene **APC** foram observadas em frequências semelhantes em adenomas e carcinomas de cólon, familiais ou esporádicos. Tais mutações devem ocorrer nas fases iniciais da sequência adenoma-carcinoma, podendo, inclusive, constituir um evento genético somático iniciador no desenvolvimento de alguns adenomas em pacientes que não apresentaram polipose (Fearon, 1994). Por outro lado, mutações em **MMC** têm sido descritas apenas em casos esporádicos e ainda não ficou estabelecido se a perda da heterozigose do locus **MMC** contribui para o fenótipo neoplásico ou se ocorre como resultado da proximidade ao **APC** ou a outros genes supressores de tumor (Kelley & Johnson, 1994).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

A perda de um alelo do locus **DCC**, mapeado em 18q21, foi verificada em 71% dos cânceres de cólon. A perda da expressão do gene **DCC** parece ser um evento tardio no processo da carcinogênese colo-retal, sendo mais frequentemente observada nos carcinomas (Kelly & Johnson, 1994).

Conforme revisto por Goddard & Solomon (1993) e Fearon (1994), os tumores colo-retais parecem resultar da combinação de ativação mutacional de oncogenes, como o **RAS**, com mutações que inativam os genes supressores de tumor, incluindo o **APC**, **TP53** e **DCC**. Há indicações de que são necessárias alterações genéticas múltiplas para o desenvolvimento dos carcinomas, enquanto poucas mutações são necessárias ao desenvolvimento dos adenomas. Dessa forma, a evolução sequencial dos tumores colo-retais parece envolver mutações no gene **APC** e perda da heterozigose em 5q, que ocorrem nos estágios iniciais da formação do adenoma; mutações no oncogene **RAS**, que deve indicar a progressão de um pequeno adenoma com baixo potencial maligno a um maior e clinicamente mais agressivo, e inativação dos genes **TP53** e **DCC,** que determinam a progressão de um grande adenoma até carcinoma **in situ** e carcinoma invasivo.

I.3. Lesões Benignas e Malignas de Cabeça e Pescoço

As neoplasias de cabeça e pescoço situam-se entre as mais frequentes na espécie humana. Só nos E.U.A., estima-se que tenha ocorrido aproximadamente 42800 casos de câncer de cabeça e pescoço em 1992, com 11600 mortes (Vokes **et al.**, 1993).

As neoplasias de cabeça e pescoço podem afetar nariz, seios nasais, nasofaringe, laringe, cavidade oral, glândulas salivares, tireóide e ouvido. Devido ao fato da tireóide eglândulas salivares serem englobadas pelos estudos da região de cabeça e pescoço, serão discutidos aqui os dados relativos às neoplasias dos vários órgãos dessa região. Os tipos de neoplasias encontradas nessa região estão apresentados na Tabela 1, de acordo com Cotran **et al.** (1991), e na sequência faz-se um resumo sobre cada um deles.

Os carcinomas de células escamosas (CCE) de cabeça e pescoço constituem um grupo biologicamente heterogêneo, com variações no comportamento clínico, grau de agressividade e resposta à terapia (Tharapel & Lester, 1990). Há uma predominância em homens e o risco aumenta com a idade. Entre os fatores etiológicos estão carcinógenos ambientais como tabaco e álcool (Otto & Bowes, 1990, Tharapel & Lester, 1990, Cotran **et al.**, 1991, Watts **et al.**, 1991, Latif **et al.**, 1992, Osella **et al.**, 1992, Davidson **et al.**, 1993, Vokes **et al.**, 1993, Young, 1993), maconha (Vokes **et al.**, 1993) e asbestos (Cotran **et al.**, 1991). Contudo, também tem sido sugerida uma predisposição

unesp

TABELA 1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço, de acordo com Cotran **et al**. (1991), com modificações.

Local	Tipos de neoplasmas	
	Benignos	Malignos
Nariz	plasmocitoma isolado papiloma	
		neuroblastoma olfativo (estesioneuroblastoma) carcinoma de céls. escamosas
Seios nasais	plasmocitoma isolado papiloma	
		carcinoma de céls. escamosas
Nasofaringe	angiofibroma	
		carcinoma de céls. escamosas
Laringe	pólipo papiloma condroma leiomioma	
		condrossarcoma leiomiossarcoma carcinoma de céls. escamosas
Ouvido	papiloma de céls. escamosas	carcinoma de céls. escamosas carcinoma de células basais melanoma maligno
	colesteatoma paraganglioma não-cromafinico neuroma acústico	
Cavidade oral	papiloma de céls. escamosas	carcinoma de céls. escamosas
Glândulas salivares	cistadenoma papilar linfomatoso (Tumor de Warthin) adenoma pleomorfo tumor mucoepidermóide tumor de células acinares	 adenocarcinoma pleomorfo carcinoma mucoepidermóide carcinoma de células acinares carcinoma adenóide cístico (cilindroma)
Tireóide		carcinoma medular
	adenoma folicular cistadenoma papilar adenoma atípico	carcinoma folicular carcinoma papilar carcinoma indiferenciado

genética, a partir de estudos de famílias com múltiplos indivíduos afetados (Tharapel & Lester, 1990, Latif **et al.**, 1992, Osella **et al.**, 1992) e também pela ocorrência esporádica em adultos jovens e em indivíduos que não usam o tabaco e o álcool (Vokes **et al.**, 1993). De acordo com Vokes **et al.** (1993), há dados que indicam que o álcool, além de ser um fator de risco independente, potencializa a carcinogênese relacionada ao tabaco. Fatores alimentícios também estão relacionados, e dados epidemiológicos sugerem uma função protetora da dieta rica em carotenóides, indicando uma associação inversa entre o consumo de frutas e verduras e a incidência de câncer de cabeça e pescoço.

Entre os fatores de risco ocupacionais Vokes **et al.** (1993) incluiram o refinamento de níquel, a carpintaria e a exposição a fibras têxteis.

Adultos jovens com CCE do trato aerodigestivo superior expressaram hipersensibilidade cromossômica ao agente clastogênico bleomicina (Schantz & Hsu, 1989). Foi verificado que os cromossomos de pacientes com câncer de cólon, pulmão e cabeça e pescoço eram mais suscetíveis aos efeitos dessa droga, que é um agente degradante do DNA, do que os de pacientes com câncer de mama, de indivíduos controles normais (Hsu et al., 1989) ou de pacientes com tumores do sistema nervoso central (Schantz **et al.**, 1989). Essa suscetibilidade foi mais evidente em pacientes com câncer de laringe e faringe (Schantz **et al.**, 1989). Esses autores concluíram, então, que as respostas diferenciais aos efeitos mutagênicos podem ser um reflexo de deficiências no sistema de reparo do DNA. Desse modo, os pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentariam um alto grau de sensibilidade cromossômica aos mutagênicos, o que pode contribuir para o desenvolvimento neoplásico. As quebras cromossômicas foram observadas mais frequentemente em pacientes nos estágios mais avançados da doença. Assim, se a instabilidade genética em um tumor for um fator determinante para sua progressão, os pacientes predispostos a tais instabilidades poderiam ter uma doença com progressão mais rápida.

Tais resultados levaram os autores a sugerir que o desenvolvimento da doença depende não somente da exposição a um agente carcinogênico responsável, tal como o tabaco, um vírus oncogênico ou ambos, mas também de uma sensibilidade herdada e geneticamente definida a mutagênicos em geral. Por isso, em estudos epidemiológicos devem ser considerados o tipo e o nível de exposição a carcinógenos e a sensibilidade individual aos efeitos genotóxicos, na intenção de detectar os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.

unesp

Entre os tumores de ocorrência no nariz, nos seios nasais e na nasofaringe encontram-se os plasmocitomas, cuja origem pode ocorrer nas estruturas linfóides adjacentes ao nariz e aos seios nasais e que apresentam crescimento polipóide, os neuroblastomas olfativos (estesioneuroblastomas) que são altamente malignos e os angiofibromas nasofaríngeos de ocorrência quase exclusiva em adolescentes masculinos. Os carcinomas nessas localizações são do tipo de células escamosas e, em muitos deles, foi identificada associação com o vírus Epstein-Barr (Otto & Bowes, 1990, Sandberg, 1990, Cotran **et al.**,1991, Vonsover **et al.**, 1991, Vokes **et al.**, 1993). Muitos desses carcinomas são radiossensíveis e há indicações de que os carcinomas de nasofaringe não estão relacionados ao uso do tabaco e álcool (Cotran **et al.**, 1991, Parise-Júnior **et al.**, 1992).

Os tumores benignos da laringe incluem pólipos, papilomas, condromas e leiomiomas, correspondentes aos tipos de células encontradas nessa estrutura, sendo os papilomas e pólipos os mais frequentes. Os papilomas ocorrem em qualquer idade, mostrando lesões múltiplas em crianças e jovens, porém únicas em adultos. Esses tumores são causados por alguns dos papilomavírus humanos, entre eles o HPV-11 (Cotran **et al.**, 1991, Tsuchiya **et al.**, 1991) e o HPV-6 (Tsuchiya **et al.**, 1991), e foi documentado que a transformação maligna desses papilomas pode ser induzida pela radiação (Watts **et al.**, 1991).

Os carcinomas de laringe, em sua maioria, ocorrem diretamente nas cordas vocais, mas também podem ser encontrados abaixo ou acima das mesmas, na epiglote, nas dobras ariepiglóticas e nos seios piriformes (Cotran **et al.**, 1991).

Os tumores ou as lesões pseudotumorais do ouvido externo incluem cistos cutâneos, papilomas de células escamosas, nevos e carcinomas de células basais e escamosas e melanoma maligno. As neoplasias específicas derivam das glândulas sudoríparas apócrinas modificadas, secretantes de cerume nos canais auditivos externos. O colesteatoma é o tumor mais frequente encontrado no ouvido médio ou na área da mastóide, que pode ser considerado uma condição pós-inflamatória não neoplásica. O neuroma acústico é uma neoplasia das células de Schwann, originando-se no 8º nervo craniano. As lesões localizam-se geralmente na área do canal auditivo externo e na região do ângulo cerebelopontino e causam compressão do nervo vestibular, resultando em surdez. Esses tumores precisam ser reconhecidos precocemente, a fim de evitar a lesão permanente do nervo (Cotran **et al.**, 1991).

Os carcinomas orais são associados etiologicamente a agentes infecciosos (cf. Tsuchiya **et al.**, 1991, Watts **et al.**, 1991). Aproximadamente 60% dos carcinomas de certos sítios de cabeça e pescoço investigados por Watts **et al.**(1991), particularmente de

unesp

assoalho bucal, língua, faringe, seios piriformes e laringe, foram positivos para o DNA viral episomal de HPV-6, 11, 16 e 18. Essa alta frequência pode estar associada ao hábito de fumar, o qual pode, de alguma forma, oferecer uma predisposição à infecção por HPV. Embora tal infecção seja frequente na cavidade oral, esses autores destacaram que a possível função do HPV na etiologia multifatorial da carcinogênese de cabeça e pescoço merece ser melhor investigada.

O desenvolvimento de câncer na cavidade oral pode, algumas vezes, ser associado a lesões pré-cancerosas, como a leucoplasia e a eritroplasia. A causa da leucoplasia, também conhecida como espessamento epitelial ou placa branca é desconhecida, contudo as características dessa lesão variam de natureza benigna a alterações celulares atípicas e pré-cancerosas. O mesmo é válido para a eritroplasia ou leucoplasia displásica, composta de áreas vermelho-aveludadas, que tende a ter uma maior atipia epitelial e apresentar um risco mais elevado de transformação maligna, porém admite-se que o atrito crônico, o fumo, o abuso do álcool e a exposição persistente a irritantes potenciais possam contribuir para essa transformação (Cotran **et al.**, 1991).

Os CCE podem ocorrer em qualquer parte da cavidade oral, mas o fazem preferencialmente nos lábios (principalmente inferior), na região anterior do assoalho bucal, na língua móvel, no palato e na parte posterior da língua, em ordem decrescente. Há predominância em homens, com a proporção sexual variando de 8:1 nos lábios até 1:1 na gengiva. Os contribuintes etiológicos são o fumo, o uso do tabaco sem queima e a irritação crônica, provocada, entre outras coisas, por dentaduras mal ajustadas. Cotran **et al.** (1991) referiram que as infecções dentárias e bucais crônicas, a exposição à luz solar (para os lábios), o calor (fumo do caximbo) e a exposição a radiações também contribuem para o carcinoma do lábio inferior . Uma influência predisponente regional é o hábito de mascar sementes de "betel" na Índia e em partes da Ásia.

De acordo com Cotran **et al.** (1991), as neoplasias das glândulas salivares correspondem a cerca de 3 5% de todos os tumores de cabeça e pescoço, sendo que a maior parte tem origem na glândula parótida. O adenoma pleomorfo é uma lesão benigna que surge em qualquer idade, principalmente entre as quarta e sexta décadas de vida, sendo mais frequente em mulheres. Sua excisão é difícil, pela proximidade do nervo facial e pela emissão de projeções, as quais podem ser a causa das lesões recidivantes. A partir do adenoma pleomorfo podem aparecer carcinomas, ou na neoplasia primária ou nas recidivas, e há indicações de que a persistência prolongada de um adenoma pleomorfo aumenta o risco de transformação maligna. Outro tumor benigno que acomete as glândulas salivares é o cistoadenoma papilífero linfomatoso ou tumor de Warthin que, ao contrário do anterior, é mais comum no sexo masculino e em faixa etária mais avançada,

unesp

acima da quinta década de vida. Raramente apresenta recidivas e não tem sido observada transformação maligna (Rocha & Rocha Júnior, 1989).

O tumor mucoepidermóide é composto de células escamosas ou mucosecretoras ou compreende híbridos intermediários, ocorre mais frequentemente nas parótidas, no sexo feminino, durante a quarta e quinta décadas de vida e varia de benigno a declaradamente maligno, sendo que na área intermediária encontram-se as neoplasias de comportamento indeterminado. Os tumores mucoepidermóides malignos metastatizam-se nos gânglios regionais, ossos, pulmões e cérebro (Cotran **et al.**, 1991).

Os tumores de células acinares apresentam crescimento lento e podem recidivar, mas raramente formam metástases. São lesões pequenas, que muitas vezes apresentam-se encapsuladas, surgem em qualquer idade e apresentam preponderância no sexo feminino. Os carcinomas adenóides císticos ou cilindromas são neoplasias raras, de crescimento lento porém recidivantes, e também mais frequentes em mulheres. Apresentam forte propensão para invadir os nervos e para a disseminação através dos vasos sanguíneos, enviando metástases usualmente para os ossos, fígado e cérebro (Cotran **et al.**, 1991).

As glândulas salivares podem apresentar lesões benignas designadas como sialoadenites, que correspondem a infecções frequentes de origem bacteriana ou viral. Problemas secretórios e excretórios da saliva e processos alérgicos também predispõem a glândula à sialoadenite (Müller, 1989).

Por outro lado, a tireóide pode exibir lesões benignas designadas como bócios, cuja etiologia está relacionada ao suprimento dietético de iodo, aos níveis do hormônio estimulante da tireóide (TSH) e de globina de conjugação da tireóide (TBG). De acordo com Cotran **et al.** (1991), a produção de um bócio pode ser devida ao excesso ou perda de qualquer um desses fatores, por alterar a estrutura e função dessa glândula. Os bócios podem ser classificados como bócio colóide multinodular e bócio não-tóxico difuso, entre outros, os quais são lesões proliferativas múltiplas ou isoladas, que apresentam hiperplasia e causam um aumento do volume da glândula. Embora apresentem um caráter benigno, alguns experimentos em ratos demostraram que uma terapia indutora de bócio pode levar ao desenvolvimento de nódulos e adenomas e, posteriormente, carcinomas (Wynford-Thomas & Williams, 1989, para revisão, Roque **et al.**, 1993a).

Em relação aos tumores da tireóide, eles se apresentam sob a forma de nódulos ou massas, e os benignos ou adenomas são classificados como papilares, foliculares e atípicos, sendo os dois primeiros mais frequentes (Cotran **et al.**, 1991). Os tumores benignos são lesões encapsuladas, derivadas do epitélio da tireóide e possuem um pequeno potencial cancerígeno. Os adenomas foliculares produzem padrões glandulares

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

simples ou acinares, podem ocorrer em qualquer faixa etária, mais comumente em adultos. Por outro lado, os adenomas papilares são bastante variáveis e incluem lesões aparentemente benignas, bem diferenciadas e ordenadas, mas também algumas vezes podem apresentar recidivas após tratamento e disseminar-se aos gânglios regionais. No grupo dos adenomas atípicos são incluídos aqueles que não se encaixam em qualquer dos padrões acima mencionados.

Os tumores malignos da tireóide podem ser classificados, de acordo com os aspectos histopatológicos e comportamento clínico, em carcinomas originados do epitélio folicular e carcinomas originados das células C ou parafoliculares (Wartofsky & Ingbar, 1991). Esses últimos são denominados carcinomas medulares que, em alguns casos, estão associados a determinadas síndromes geneticamente determinadas como a síndrome de Sipple ou neoplasia endócrina múltipla (MEN), que apresenta um padrão de herança autossômica dominante, com penetrância completa, com o gene mapeado no braço longo do cromossomo 10.

Os carcinomas originados do epitélio folicular da tireóide são subdivididos em papilar, folicular e anaplásico ou indiferenciado. Os carcinomas papilares constituem a forma mais comum de câncer da tireóide, são mais frequentes em mulheres e apresentam tamanho variável, desde focos microscópicos encontrados na glândula e em linfonodos cervicais até nódulos com cerca de 10cm de diâmetro. São facilmente curáveis pela excisão do lobo tireoideano afetado ou da tireóide e dos linfonodos comprometidos. Os carcinomas foliculares são caracterizados por folículos bem desenvolvidos em alguma porção do tumor e pela ausência de estruturas papilares bem diferenciadas. Exibem crescimento lento e também são facilmente curáveis, contudo tendem a se disseminar pela corrente sanguínea e o prognóstico e a sobrevivência dos pacientes com esses neoplasmas dependem da extensão da lesão dentro da glândula e da disseminação (Cotran **et al.**, 1991). Os carcinomas anaplásicos ou indiferenciados constituem uma categoria altamente maligna, que incidem nas sétima e oitava décadas de vida e encontram-se entre os neoplasmas mais agressivos no homem.

I.4. Alterações Citogenéticas Em Lesões Neoplásicas E Não-Neoplásicas De Cabeça E Pescoço

Em relação às lesões neoplásicas e não-neoplásicas de cabeça e pescoço, foram obtidas informações citogenéticas em várias publicações, as quais indicam uma forte heterogeneidade, isto é, foram observadas alterações em praticamente todos os cromossomos, o que dificulta o entendimento do seu significado.

Os carcinomas de células escamosas (CCE) constituem aproximadamente 95% de todos os cânceres de cabeça e pescoço, os quais representam cerca de 4% de todos os tumores malignos. Entretanto, os estudos citogenéticos dessas neoplasias ainda são raros (Tharapel & Lester, 1990; Osella **et al.**, 1992). Os dados até então obtidos, entre eles os de Van Dyke **et al.** (1994), revelaram anormalidades em praticamente todos os cromossomos e não foi observada alteração consistente em bandas específicas, sugerindo um padrão de evolução genética em CCE de cabeça e pescoço que parece ser independente do sítio anatômico.

Na avaliação citogenética realizada por Zaslav **et al.** (1991), em 10 tumores malignos primários de cabeça e pescoço, foram observados "hotspots" de rearranjos nos cromossomos 11, 13 e 14, sugerindo que as anormalidades nesses cromossomos não são casuais, e podem estar envolvidas na tumorigênese primária desses tumores.

Sandberg (1990) reviu as informações citogenéticas de tumores da região do trato aerodigestivo superior e concluiu que eles não mostravam alterações cromossômicas específicas, mas comumente apresentaram hiperdiploidia em seus fibroblastos dérmicos. Contudo, poucos casos haviam sido examinados. Entre esses casos, estão os carcinomas de nasofaringe provocados por Epstein Barr Virus (EBV), que se caracterizaram por cariótipos complexos, exibiram um cromossomo marcador, o 3q+, e também aumento na frequência de hiperdiploidia. Os tumores malignos de glândula salivar mostraram o 6q- como um marcador frequente, mas outras alterações estruturais e numéricas, como -Y, +8 e 11q- também foram recorrentes.

Em um caso de estesioneuroblastoma, foram encontradas células pseudotetraplóides, com todos os autossomos representados pelo menos três vezes e o cromossomo 5 em múltiplos de oito; anormalidades estruturais clonais incluíram 2q+ e 5q+ e múltiplos "Double minutes"; outras anomalias estruturais envolveram os cromossomos 1, 11 e 12 (Castañeda **et al.**, 1991). Em CCE do seio maxilar, as anomalias cromossômicas numéricas encontradas envolveram os cromossomos 3, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 19 e X e as anomalias estruturais afetaram os cromossomos 4, 8, 11 e 12 (Zaslav **et al.**, 1991). A análise de uma paciente com CCE de epiglote mostrou apenas anomalias numéricas dos cromossomos 3, 5 e 7 (Pejovic **et al.**, 1990).

Zaslav **et al.** (1991) referiram, em CCE de corda vocal, somente anomalias estruturais clonais, as quais envolveram os cromossomos 8, 9, 11, 13 e 14. Já as alterações estruturais clonais encontradas nos CCE dos seios piriformes ocorreram nos cromossomos 4, 7 e 8 e a única anomalia numérica envolveu o cromossomo X (Osella **et al.**, 1992).

Foram analisados cinco casos de CCE da laringe e as diversas anormalidades estruturais foram observadas nos cromossomos 1, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 21, 22 e X. "Double minutes" e cromossomos pulverizados foram comuns e a única alteração numérica ocorreu com o cromossomo 20. Somente uma das anormalidades estruturais observadas, del(5)(p13), foi coincidente em dois casos (Zaslav **et al.**, 1991).

Em um caso de CCE da amígdala foram verificadas anomalias cromossômicas clonais numéricas dos cromossomos 1, 17 e 20 e estruturais nos cromossomos 4, 5, 8, 13, 14 e 16 (Zaslav **et al.**, 1991).

Nove carcinomas de laringe analisados citogeneticamente por Allegra **et al.** (1992) mostraram alterações cromossômicas clonais, contendo populações hipodiplóides e hiperdiplóides, algumas células poliplóides e com endorreduplicação e monossomia dos cromossomos 3 e 11. A anormalidade estrutural mais frequente foi a deficiência do braço curto do cromossomo 3, mas também foram encontrados rearranjos estruturais nos cromossomos 9 e 16.

Ravindran **et al.** (1990) analisaram CCE da cavidade oral de 12 pacientes, dos quais um apresentou cariótipo normal e em onze estavam presentes anomalias cromossômicas numéricas variadas, envolvendo todos os grupos cromossômicos, exceto o cromossomo Y, sendo que o cariótipo modal variou nesses onze casos, e em apenas três casos foi detectado um cromossomo marcador.

De acordo com Sandberg (1990), em CCE de língua foram demonstradas várias anormalidades cromossômicas, aparentemente não relacionadas, o que levou à sugestão de que tais carcinomas podem ter origem multiclonal.

Tharapel & Lester (1990) encontraram anomalias cromossômicas estruturais nos cromossomos 2, 6, 18 e 19 em um caso de carcinoma de células escamosas da base da língua. Posteriormente, em CCE de língua e gengiva, Osella **et al.** (1992) destacaram alterações cromossômicas estruturais afetando praticamente todos os cromossomos.

Stenman **et al.** (1989) referiram em adenomas pleomorfos trissomia dos cromossomos 7 e 8 e anomalias estruturais dos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 17, 18 e X, tendo sido os cromossomos 3, 8 e 12 os mais frequentemente envolvidos. Em tumores malignos de glândula salivar esses autores verificaram alterações numéricas dos cromossomos 13, 15 e Y e estruturais envolvendo os cromossomos 5, 6, 7, 9, 13 e 17.

Diferentes tipos de alterações cromossômicas numéricas e estruturais já foram descritas em estudos citogenéticos de adenomas tireoideanos. Antonini **et al.** (1989) descreveram a t(7;10)(q35;q21) em adenoma papilar. Outras alterações cromossômicas estruturais envolvendo os cromossomos 1, 2, 3, 7, 8, 10, 14 e 19 e alterações numéricas dos cromossomos 7, 12 e 17 foram detectadas em adenomas foliculares da

tireóide por Belge **et al.** (1992), Cariani **et al.** (1992), Hermann **et al.** (1991) e Bartnitzke **et al.** (1989).

Sandberg (1990) havia ressaltado a possibilidade da região 10q21-22 estar envolvida no processo de transformação neoplásica da tireóide, pois rearranjos nesse cromossomo estão presentes em adenomas e carcinomas tireoideanos. De acordo com Roque **et al.** (1992b), o estudo citogenético de adenomas tireoideanos revelou padrões cromossômicos que sugerem a existência de três subgrupos distintos: um apresentando cariótipo normal, outro mostrando hiperdiploidia com números cromossômicos modais que variam de 50 a 70, trissomia dos cromossomos 5, 7 e 12 e polissomia dos cromossomos 4, 9, 14, 16 e 17 e um terceiro mostrando cariótipo próximo ao diplóide.

Em relação aos tumores malignos da tireóide, há dados citogenéticos sobre os carcinomas papilares, estudados por Antonini **et al.** (1992b) e Roque **et al.** (1992a), nos quais foram observadas alterações estruturais dos cromossomos 1, 7, 8, 9, 10, 11 e 17 e numéricas dos cromossomos 17, 19 e 20. Em carcinomas foliculares, conforme Antonini **et al.** (1993), Roque **et al.** (1992a e 1993b) e Sozzi **et al.** (1992), foram observadas anomalias estruturais nos cromossomos 2 e 3.

Tommerup & Lothe (1992), relacionaram a presença de um cromossomo 10 em anel com carcinoma folicular de tireóide, em apenas um dos dez casos verificados. Mark **et al.** (1987), correlacionaram alterações do braço longo do cromossomo 13, entre outras, ao carcinoma indiferenciado de tireóide.

Os estudos moleculares em espécimens de tumores de cabeça e pescoço referem-se à amplificação e expressão elevada do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico, **EGFR** (Ishitoya **et al.**, 1989, Weichselbaum **et al.**, 1989, Kearsley **et al.**, 1991b, Leonard **et al.**, 1991, Haugen **et al.**, 1993) e de outros genes, como os oncogenes **BCL1** (Berenson **et al.**, 1989, Leonard **et al.**, 1991, Gussack, 1992, Vokes **et al.**,1993), **MYC** (Field **et al.**, 1989, Merrit **et al.**, 1990, Riviére **et al.**, 1990, Leonard **et al.**, 1991, Haugen **et al.**, 1993) e **INT2** (Somers **et al.**, 1990, Leonard **et al.**, 1991, Muller **et al.**, 1991, Vokes **et al.**, 1993). Há, também, referências às mutações e expressão elevada do gene supressor de tumor **TP53** em pacientes fumantes (Field **et al.**, 1991, Field **et al.**, 1993). Anwar **et al.** (1993b) avaliaram os níveis de expressão da proteína p53 em pacientes com tumores da laringe e verificaram que em tumores benignos ela estava ausente, mas que cerca de 65% dos carcinomas desse órgão foram positivos para a proteína p53 mutante. Gaspariny et al (1993) verificaram em pacientes com carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, que 57% desses tumores expressavam a proteína p53 mutante e, ainda, que os pacientes positivos apresentavam uma incidência de metástases significativamente maior, do que os negativos.

unesp

Di Renzo **et al.** (1992), verificaram a expressão elevada do oncogene **METC** em carcinomas papilares da tireóide, sugerindo sua possível contribuição para a progressão maligna desses carcinomas, através da aquisição de um comportamento mais agressivo. Por outro lado, mutações no gene **TP53** estão restritas a carcinomas indiferenciados ou pouco diferenciados da tireóide (Donghi **et al.**, 1993, Fagin **et al.**, 1993). Esses resultados são concordantes com observações prévias de que mutações no gene **TP53** representam um evento genético tardio na carcinogênese da tireóide e também sugerem que a inativação do gene **TP53** é responsável pela progressão à forma mais maligna desta doença. Um estudo imuno-histoquímico, realizado por Dobashi **et al.** (1993), avaliou a expressão elevada de formas mutantes da proteína p53 que foi encontrada somente nas neoplasias malignas, e sugeriu que ela tem papel importante nos subtipos mais agressivos de carcinomas tireoideanos.

A ativação do oncogene **RAS** tem sido descrita em carcinomas foliculares da tireóide e em bócios multinodulares (Sozzi **et al.**, 1992) e há indicações de que mutações em **RAS** e **GSP** constituem um evento iniciador importante na carcinogênese tireoideana. Estudos moleculares e imuno-histoquímicos demonstraram a ativação do protoncogene **RET** em carcinomas papilares da tireóide. Esta ativação pode ocorrer pela fusão do domínio da tirosina quinase com diferentes genes devido a vários mecanismos que promovem rearranjos gênicos (Fabien **et al.**, 1992, Lanzi **et al.**, 1992, Bongarzone **et al.**, 1993). A inversão paracêntrica do braço longo do cromossomo 10, inv(10)(q11.2q21), resulta, por exemplo, no rearranjo entre **RET** e **H4**, gerando uma sequência quimérica, dita ptc, que é um produto oncogênico (Pierotti **et al.**, 1992, Roque **et al.**, 1992a, Soares **et al.**, 1992). Sozzi **et al.** (1994), relataram que a t(10;17)(q11.2;q23) justapõe o domínio da tirosina quinase do protoncogene **RET** (#10) ao gene **RIA** (#17), gerando outra sequência quimérica, ptc2.

Stenman **et al.** (1989) avaliaram a expressão dos oncogenes **RAS** em tumores benignos e malignos de glândula salivar e verificaram que a proteína p21 apresentou níveis de expressão elevada substancialmente maiores em tumores benignos, que em malignos e correlacionou esse achado com rearranjos no cromossomo 8, especialmente na banda q12, a qual deve estar envolvida na regulação da expressão do gene **RAS**. Por estes dados, a ativação do gene **RAS** parece ser mais frequente e ter maior importância em tumores benignos de glândula salivar, estando, pelo menos em parte, relacionada à diferenciação celular e, provavelmente, nos tumores malignos outras alterações devem responder pela malignização.

Sheng **et al.** (1990) mostraram que o gene **c-Ha-RAS** não está envolvido na progressão tumoral dos CCE dessa região, mas é importante na iniciação da

carcinogênese. Por outro lado, Anwar **et al.** (1993a) verificaram a infecção por HPV, em níveis decrescentes, em carcinomas de laringe recorrentes, primários e metastáticos, e também mutações nos genes **RAS**, que foram significativamente maiores em tumores metastáticos, que em primários e recorrentes. Esses autores sugeriram que a ativação dos genes da família **RAS**, especialmente **NRAS,** e a infecção por HPV são fatores importantes na carcinogênese da laringe e, ainda, que a mutação em **RAS** pode estar associada com a habilidade do tumor em emitir metástases. Tais estudos são considerados de importância fundamental na indicação de fatores prognósticos aos pacientes com tumores de cabeça e pescoço.

Além da análise citogenética, a avaliação do conteúdo de DNA celular também tem sido levada em conta, nos últimos anos, no prognóstico da evolução de tumores de cabeça e pescoço. Assim, tem sido considerado que a presença de clones celulares aneuplóides é sugestiva de uma maior agressividade da lesão e, portanto, de menor tempo de sobrevida ao seu portador, e também tem sido significantemente alta nos tumores pouco diferenciados (Kearsley **et al.**, 1991a). A incidência de aneuploidia e o índice de DNA tiveram valores aumentados no grupo de pacientes com recorrência (Chen, 1989, Williams **et al.**, 1990) ou que morreram (Chen, 1989). Um estudo de pacientes com carcinomas dessa região em estágios terminais, submetidos ao tratamento quimioterápico com cisplatina, mostrou que a sobrevivência média dos pacientes com tumores aneuplóides foi significantemente maior (aumento de seis meses em relação aos não-tratados), do que a dos pacientes com tumores diplóides (aumento de seis semanas em relação aos não-tratados) (Cooke **et al.**, 1990).

A região de cabeça e pescoço inclui uma variedade de sítios anatômicos, cujos estudos citogenéticos e moleculares das lesões benignas e malignas tem demonstrado uma forte heterogeneidade genética. Tais resultados indicam a necessidade de pesquisas adicionais que promovam uma maior correlação entre os dados cariotípicos e moleculares, na intenção de esclarecer o seu significado no desenvolvimento dos tumores de cabeça e pescoço e contribuir mais eficazmente no diagnóstico, prognóstico e tratamento dessas doenças.

I.5. Objetivos

Na intenção de contribuir para o esclarecimento das relações entre as alterações cromossômicas e o processo neoplásico, o presente trabalho objetivou pesquisar as anomalias cromossômicas presentes em células cultivadas de lesões de natureza benigna de tireóide e glândula salivar e comparar os achados citogenéticos com os dados da literatura.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material

A. Pacientes

O estudo foi desenvolvido com amostras de lesões tumorais ou não-tumorais provenientes de 10 pacientes, cujas idades variaram de 22 a 64 anos. Nove eram caucasóides e um mongolóide, sete eram do sexo feminino e três do sexo masculino. Foram cultivadas 11 amostras, contudo em quatro delas não foram obtidas metáfases passíveis de análise e uma não apresentou metáfases. Entre as amostras cultivadas, cinco provieram de tumores benignos ou malignos primários, diagnosticados como carcinoma mucoepidermóide (um caso), tumor de Warthin (um caso) e adenoma pleomorfo de glândula salivar (três casos). As seis amostras restantes provieram de lesões benignas, sendo cinco extraídas de bócio colóide multinodular de tireóide e uma extraída de sialoadenite de glândula salivar. Os dados relativos ao tipo de tecido coletado, sexo e idade dos pacientes estão apresentados na Tabela 2.

As amostras das lesões, obtidas por cirurgia, foram cedidas por dois médicos cirurgiões de cabeça e pescoço de São José do Rio Preto, Dr. José Victor Maniglia do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina e Dr. Emílio Juste Júnior do Hospital Sociedade Portuguesa de Beneficência e pelo médico patologista Luis Vitor de Lima Salomão, do laboratório Salomão e Zoppi Patologistas Associados, de São Paulo. De cada paciente foram obtidas informações sobre idade, sexo, profissão, ascendência étnica, antecedentes de doenças no paciente e na família, hábitos de fumar ou beber. Foram também obtidos os dados anatomo-patológicos do material biopsiado, meio de diagnóstico, tipo e origem do tumor.

De todos os pacientes estudados, apenas um era fumante e apresentava história de câncer familial.

II.2. Métodos

As técnicas utilizadas incluíram diversas soluções rotineiramente usadas no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Biologia do Ibilce-UNESP (Varella-Garcia & Tajara, 1991), cujas concentrações e técnicas de preparo são descritas no Apêndice.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

TABELA 2. INFORMAÇÕES SOBRE OS PACIENTES.

CASO	TIPO DE LESÃO	LOCAL DA BIÓPSIA	IDADE	SEXO	CÂNCER/FAMÍLIA
	Lesões Benignas				
1149	Bócio colóide multinodular	Tireóide	28	F	Não
1152*	Bócio colóide multinodular	Tireóide	45	F	Sim (Câ Mama)
1173	Bócio colóide multinodular	Tireóide	27	F	Não
1178	Bócio colóide multinodular	Tireóide	64	F	Não
1214	Bocio colóide multinodular	Tireóide	40	F	Não
1167	Sialoadenite	Gl. submandibular	22	M	Não
	Tumores Benignos				
1151*	Adenoma pleomorfo	Gl. submandibular	45	F	Sim (Câ Mama)
1159	Adenoma pleomorfo	Gl. parótida	34	M	Não
1218	Adenoma pleomorfo	Gl. parótida	22	F	Não
1222	Tumor de Warthin	Gl. parótida	63	M	Não
	Tumor Maligno				
1180	Carcinoma mucoepider-móide	Gl. parótida	31	F	Não

* amostras provenientes de um mesmo paciente.

A. Coleta e Transporte das Amostras

De cada paciente, foi retirada uma amostra da lesão com aproximadamente 0,5 a 1,0cm^3, no campo cirúrgico. O material foi transferido para um tubo de centrífuga estéril, devidamente etiquetado, contendo solução salina balanceada de Hanks para transporte, e encaminhado ao Laboratório de Citogenética para o processamento, juntamente com a ficha do paciente.

Na intenção de se obter melhores condições de cultivo celular, maior índice mitótico e preparações metafásicas mais satisfatórias, o material foi processado, no máximo, até 24 horas após a coleta da amostra.

B. Assepsia da Biópsia, Dissociação Celular e Semeadura das Culturas

Em câmara de fluxo laminar horizontal, a amostra passou por 4 a 6 banhos sucessivos em solução salina balanceada de Hanks para lavagem, e depois foi transferida para uma placa de Petri, contendo cerca de 2ml de solução salina balanceada de Hanks, onde foi dissociada em pequenos fragmentos com o auxílio de uma tesoura de ponta fina,. O material foi então centrifugado nessa solução durante 10 minutos a 1000 rpm. Ao sedimento foram acrescentados 5ml de meio incompleto e, após ressuspensão, o material foi centrifugado novamente. Parte desses fragmentos foi transferida para 1 a 2 frascos plásticos de cultura descartáveis (Descarplast ou Costar), de acordo com a técnica de cultivo celular por explante primário, proposta por Freshney (1987), com algumas modificações. Aos frascos foram acrescentados 2ml de meio de cultura completo (20% de Soro Bovino Fetal), pré-aquecido, que foram substituídos por 5ml após 3 dias. O restante dos fragmentos foi submetido à técnica de desagregação enzimática proposta por Limon **et al.** (1986), também com modificações. Esses fragmentos foram colocados em 4,5ml de meio completo e transferidos para um frasco plástico descartável com 0,5ml de colagenase (concentração de 2000U/ml). A seguir, o material foi incubado a 37ºC por 24 horas para a desagregação enzimática. Após esse período, a suspensão celular foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta, para melhor separação das células e centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi lavado com 5ml de solução salina balanceada de Hanks, posteriormente com 5ml de meio de cultura incompleto e foi distribuído em 2 a 8 frascos com cerca de 2ml de meio de cultura completo contendo 20% de soro fetal bovino. Em geral, após 3 a 4 dias de incubação a 37ºC o meio com material necrótico foi substituído por meio novo. Quando houve excesso desse material, o meio de cultura foi trocado após 24 horas de incubação.



C. Desenvolvimento das Culturas

Todos os frascos foram examinados diariamente ao invertoscópio, para avaliação do índice mitótico e crescimento celular. O meio de cultura dos frascos foi substituído, em média, 2 vezes por semana. O início do crescimento celular **in vitro** dos espécimes submetidos à desagregação enzimática aconteceu após 24 horas a 4 dias da semeadura, e o desenvolvimento das culturas se processou por 5 a 21 dias. Por outro lado, nos espécimes processados por desagregação mecânica, o início do crescimento celular **in vitro** aconteceu após 3 a 13 dias e as culturas foram desenvolvidas durante 9 a 44 dias de cultivo. Os dados relativos a cada amostra constam da Tabela 3.

O bloqueio da divisão celular foi realizado com adição de 50μl de colcemide (concentração-final de 0,02μg/ml) por frasco, durante 1:30 a 2:00 horas ou 0,1ml de colquicina (concentração-final de 0,33μg/ml), durante 3:00 horas, quando houve um número apreciável de metáfases. Em alguns casos, quando algumas réplicas apresentaram baixo índice mitótico, foram acrescentados 25μl de colcemide (concentração-final de 0,01μg/ml), por 16 horas. A Tabela 4 contém informações sobre o agente usado e o tempo de exposição para o bloqueio da divisão celular das amostras que apresentaram resultado citogenético.

D. Hipotonização, Fixação e Coloração

Completado o tempo de ação do colcemide, o meio de cultura dos frascos foi descartado e substituído por 8 a 10ml de solução hipotônica de citrato de sódio 1%, pré-aquecida, e os frascos incubados por 30 minutos a 37ºC. Decorrido esse período, as células foram removidas com auxílio de um raspador e a suspensão celular de cada frasco transferida para tubos de centrífuga correspondentes, e centrifugada a 1000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante de cada frasco foi descartado e o sedimento fixado em 10ml de solução de metanol-ácido acético (3:1), a qual foi trocada 2 vezes e a suspensão estocada, em geladeira, no terceiro fixador por algumas horas. A suspensão celular foi gotejada em lâminas geladas e úmidas, as quais foram em seguida flambadas. As lâminas foram estocadas em geladeira até serem submetidas à técnica de bandamento GTG e, quando necessário, às técnicas de bandamento NSG e CBG.

Foi utilizada a técnica de bandamento G de acordo com Selden **et al.** (1975), pela qual as lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina/EDTA diluída em solução salina balanceada de Hanks (6:50), durante 1 a 3 minutos e, em seguida, lavadas em solução salina balanceada de Hanks com 20% de soro fetal bovino (5:1) e coradas com solução tamponada de Giemsa 2% por 6 minutos.

unesp

TABELA 3. Início de crescimento celular e período de cultivo das réplicas após desagregação mecânica e enzimática (IC = início do crescimento, PC = período de cultivo, em dias).

Tipo de amostra	Caso	Desagreg. mecânica		Desagreg. enzimática	
		IC	PC	IC	PC
Bócio colóide multinodular	1149	13	44	1	8
	1152	6	41	2	5
	1173	3	14	3	8 e 14
	1178	4	9 e 14	2	9 e 10
	1214	3	27	1	7
Adenoma pleomorfo	1159	6	36	4	19 e 21

TABELA 4. Dados relativos ao bloqueio da divisão celular nas amostras estudadas citogeneticamente.

Caso	Tipo de Desagregação	Nº de Frascos	Colquicina 0,1ml/3horas	Colcemide 50µl/1:30-2horas	Colcemide 20µl/16horas
1149	mecânica	01		01	
	enzimática	02		02	
1152	mecânica	01		01	
	enzimática	02		02	
1173	mecânica	01	01		
	enzimática	05	01	04	
1178	mecânica	02	02		
	enzimática	08	04	04	
1214	mecânica	01	01		
	enzimática	04		04	
1159	mecânica	01			01
	enzimática	04		04	

A técnica de bandamento CBG empregada foi a proposta por Sumner (1972) com algumas modificações. As lâminas foram mergulhadas em HCl 0,2N durante 15 minutos e lavadas em água desionizada gelada. Posteriormente, foram tratadas com solução de hidróxido de bário 5% a 37ºC, por um período que variou de 15 a 25 minutos e lavadas em água desionizada. Em seguida, foram mergulhadas em 2xSSC à temperatura ambiente durante 10 minutos e a 60ºC por 60 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água desionizada gelada e desidratadas em 2 banhos consecutivos em álcool 70% e dois em álcool 90%, durante cinco minutos cada. Finalmente, as lâminas foram coradas com solução tamponada de Giemsa 2%.

A marcação das regiões organizadoras nucleolares (RONs) foi realizada pelo bandamento NSG ("Nucleolus Silver Giemsa"), segundo a técnica proposta por Howell & Black (1980), com modificações. As lâminas foram hidrolisadas em HCl 1N a 60ºC, durante dez minutos, e lavadas em água desionizada gelada. Em cada uma das extremidades das lâminas foram depositadas uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina, 50ml de água desionizada e 0,5ml de ácido fórmico) e outra de solução aquosa de nitrato de prata (Merck) a 50%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 50-60ºC, durante aproximadamente 7 minutos e, quando adquiriram coloração marron-dourada, foram lavadas em água destilada e submetidas à coloração com Giemsa 2% durante oito minutos.

E. Análise Cromossômica

A análise citogenética foi realizada em metáfases provenientes de duas ou mais réplicas e as alterações cromossômicas estruturais e numéricas foram anotadas. A determinação de clonalidade foi realizada conforme os critérios propostos pelo International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1985 e 1991 suppl.), que consideram clonais as anomalias estruturais ou ganho de cromossomos que ocorrem em pelo menos duas células, provenientes de réplicas diferentes, e as perdas cromossômicas que forem encontradas em, no mínimo, três células oriundas de réplicas diferentes. A identificação e classificação dos eventos citogenéticos foi realizada de acordo com o ISCN (1985 e 1991, suppl.).

O estudo citogenético foi realizado em microscópio óptico Carl Zeiss Jena, modelo Jenaval. Para documentação ou esclarecimento de dúvidas, o material foi fotografado em microscópio modelo standard WL (Carl Zeiss Oberkochen) com filme Ilford PanF 50 ASA. Foi utilizado o revelador Kodak D-72, em diluição de 1:1 à 20ºC para revelação dos negativos e as fotos foram feitas em papel Kodabrome Print RC F2 e F3.

unesp

A análise de metáfases coradas após o bandamento G foi considerada completa quando todos os cromossomos foram identificados, e parcial quando pelo menos sete pares cromossômicos foram identificados. Em algumas metáfases, mesmo após o tratamento com tripsina, os cromossomos não apresentaram bandas visíveis e foram analisadas em coloração clássica com Giemsa.

Em dois casos, 1149 e 1159, foi realizada a análise de linfócitos do sangue periférico objetivando investigar se as alterações encontradas no estudo citogenético dessas lesões eram constitucionais ou não. A técnica empregada foi a descrita por Moorhead **et al.** (1970), com modificações, segundo protocolos adotados pelo Laboratório de Citogenética Humana (Varella-Garcia & Tajara, 1991) do Departamento de Biologia desta Instituição.

III. RESULTADOS

As amostras recebidas foram colhidas a partir de tumores benignos primários, ou de recidivas, e malignos primários e de lesões proliferativas de natureza benigna. Das onze culturas com adesão ao substrato, quatro não mostraram crescimento celular em uma (1167, 1159, 1180) ou mais réplicas (1151). Os casos 1151, 1180, 1167, 1218 e 1222 apresentaram réplicas com metáfases sem condições de análise, juntamente com réplicas sem metáfases e/ou sem crescimento celular. Esses casos, portanto, não puderam ser analisados. Seis culturas foram analisadas citogeneticamente, das quais apenas duas em todas as réplicas obtidas. Os dados relativos ao cultivo das amostras estão sumarizados na Tabela 5.

As amostras estudadas citogeneticamente derivaram de lesões diagnosticadas como bócio colóide multinodular de tireóide (1149, 1152, 1173, 1178, 1214) e adenoma pleomorfo de glândula salivar (1159) e os achados citogenéticos são apresentados a seguir.

Em todos os casos, as culturas mostraram células com morfologia epitelióide e/ou células com morfologia fibroblastóide (Figura 1). Foram observadas células poliplóides e com endorreduplicação com frequência variável de zero a 5,1% e de zero a 3%, respectivamente. A separação centromérica precoce foi observada somente em um caso (1152), em cerca de 7% das células. O cálculo dessas frequências foi realizado a partir do número de metáfases obtidas, ao passo que a frequência dos outros tipos de aberrações cromossômicas foi calculada sobre o total de metáfases analisadas. Quebras e falhas cromatídicas e cromossômicas foram observadas em três casos (1152, 1178, 1214), nas frequências de 7%, 2,3% e 1%, respectivamente (Tabela 6).

III.1. Pacientes com Bócio Colóide Multinodular

Caso 1149

A paciente, de 28 anos de idade, não era tabagista, nem etilista e não apresentava história de câncer na família. Pelo exame clínico suspeitou-se da presença de um bócio, o qual foi extirpado e teve amostras enviadas para exames histopatológicos e citogenético. O diagnóstico histopatológico revelou um bócio colóide multinodular com hiperplasia folicular.

unesp

TABELA 5. Dados relativos ao cultivo celular das amostras recebidas (metáf. = metáfases).

Caso	Tipo de amostra	Nº de réplicas iniciadas	Tipo de desagregação	S/crescimento	C/crescimento	
					s/metáf.	c/metáf.
	Lesões benignas					
1149	Bócio colóide multinodular	03	mecânica			01
			enzimática			02
1152*	Bócio colóide multinodular	03	mecânica			01
			enzimática			02
1173	Bócio colóide multinodular	06	mecânica			01
			enzimática		03	02
1178	Bócio colóide multinodular	10	mecânica		01	01
			enzimática		05	03
1214	Bócio colóide multinodular	05	mecânica		01	
			enzimática			04
1167	Sialoadenite	06	mecânica	01		
			enzimática		03	01
	Tumores benignos					
1151*	Adenoma pleomorfo	05	mecânica	01	01	
			enzimática	03		
1159	Adenoma pleomorfo	06	mecânica	01	01	
			enzimática			04
1218	Adenoma pleomorfo	05	mecânica		01	
			enzimática		02	02
1222	Tumor de Warthin	07	mecânica		01	
			enzimática		03	03
	Tumor maligno					
1180	Carcinoma mucoepidermóide	04	mecânica	01		
			enzimática		02	01

* Amostras provenientes de um mesmo paciente.

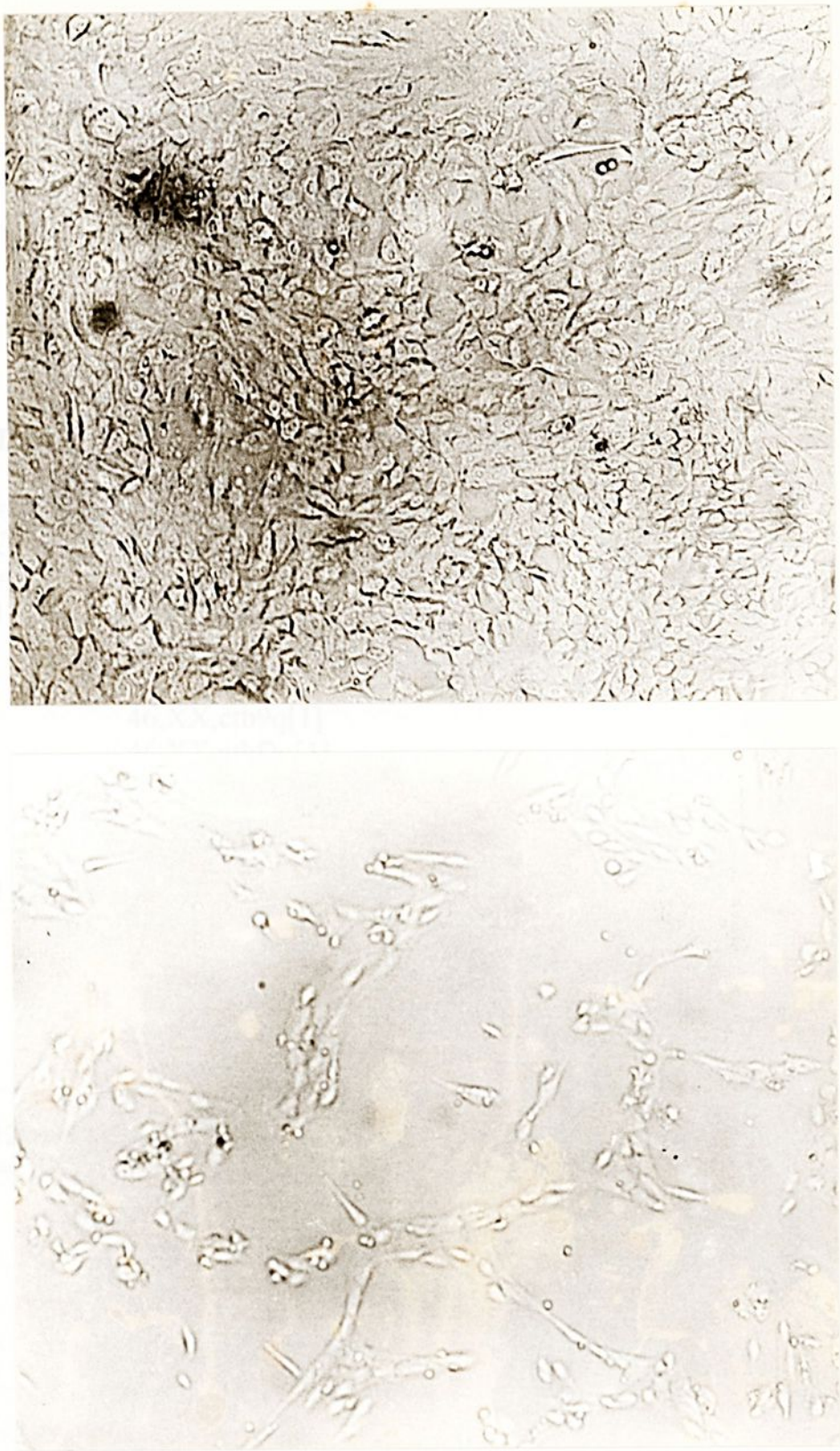


Figura 1. (A) Células com morfologia epitelióide (caso 1159) e (B) fibroblastóide (caso 1149).

TABELA 6. Quebras e falhas observadas nos casos de bócio colóide multinodular.

Caso	Achado citogenético[nº de células]
1152	47,XX,csg3p,+C,+F,-B[1]
	46,XX,csb1q32[1]
	46,XX,csg2cen[1]
	46,XX,ctb9q[1]
	46,XX,ctbDq[1]
	45,XX,csb2p11,+16,-17,-21[1]
	45,XX,csb9q22,-18[1]
1178	46,XX,ctb1p,+16,-17[1]
	46,XX,csb2p11[1]
	46,XX,csb5q[1]
	46,XX,csb6p12[1]
	46,XX,csbCq[1]
	46,XX,csg16cen[1]
1214	46,XX,ctb18q[1]

A amostra foi recebida para a realização do estudo citogenético 24 horas após a ressecção, quando foi semeado um frasco por explante (A) e dois após 24 horas de tratamento com colagenase (B1 e B2).

As duas réplicas iniciadas após desagregação enzimática mostraram início de crescimento celular após 24 horas e foram colhidas com 8 dias da semeadura. A réplica obtida por explante primário iniciou o crescimento celular com 13 dias e foi colhida com 44 dias.

Os resultados da análise de 63 metáfases estão resumidos na Tabela 7. Dezoito metáfases foram analisadas com bandamento CBG, 4 com bandamento GTG e NSG sequencial e 24 analisadas completa ou parcialmente após bandamento GTG. Dezessete metáfases foram analisadas em coloração usual. Todas as metáfases apresentaram um rearranjo estrutural complexo envolvendo quatro cromossomos dos pares números 1, 4, 9 e 13 (Figura 2).

Como o rearranjo foi encontrado nos dois frascos originados por desagregação enzimática e no frasco obtido por desagregação exclusivamente mecânica, ficou configurado que se constituia em um clone celular.

Com base no conjunto de metáfases analisadas, concluiu-se que o rearranjo era não-balanceado, e a especificação mais provável dos quatro cromossomos derivados está apresentada na Tabela 8, conforme as normas de nomenclatura da ISCN (1991, suppl.). O derivado do cromossomo 1 é submetacêntrico, tendo perdido a região p33->ter e recebido a região q34->ter do cromossomo 13. O cromossomo derivado do 4 perdeu a região q31.3 ->ter, que foi translocada para a região 13q33, e recebeu a região 1p33->ter, tornando-se um cromossomo com braço longo aumentado. O cromossomo derivado do 9 é um pequeno acrocêntrico, formado pelo braço curto deste cromossomo acrescido do satélite do cromossomo 13: a região 9q22.3->ter foi translocada para a região 13p11.1 e a região 9q11-22 parece ter sido perdida. O derivado do cromossomo 13 é submetacêntrico, formado por 9qter->q22.3::13p11.1->cen ->13q33::4q32->4qter.

Os esquemas de cada cromossomo normal e derivado e as fotos ilustrativas estão representados na Figura 3. Através da análise do padrão de marcação da heterocromatina constitutiva, visualizado pelo bandamento CBG, foi confirmada a perda do segmento 9q11-q22, pois a heterocromatina presente nessa região não foi encontrada em qualquer outro cromossomo (Figura 4). O cromossomo acrocêntrico marcador foi identificado como o braço curto do cromossomo 9, acrescido do satélite do cromossomo 13 pela utilização da técnica para visualização das regiões organizadoras do nucléolo (Ag-NOR).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

TABELA 7. Dados citogenéticos observados em 63 metáfases analisadas do caso 1149.

Característica	Achado citogenético [número de células]	Réplica
Com rearranjo complexo	46,XX,der(1)t(1;13)(p32;q34),der(4)t(1;4)(p33;q31.3), der(9)t(9;13)(q11;p12),der(13)t(9;13)(q22;q11)t(4;13) (q32;q33)[48]*	A, B1 e B2
Com rearranjo complexo e alterções numéricas	45,XX,der(1),der(4),-C,der(9),der(13)[5]	A e B1
	45,XX,der(1),der(4),-der(9),der(13)[1]	B1
	43,XX,der(1),der(4),-Cx3,der(9),der(13)[4]	B1
	40,XX,der(1),-B,der(4),-Cx3,der(9),der(13),-Gx2[1]	B1
	40,XX,der(1),-2x2,der(4),-Cx4,der(9),der(13)[1]	B1
	92,XXXX,der(1)x2,der(4)x2,der(9)x2,der(13)x2[1]	A
	No. cromossômico < 40[2]	B1

* Todas as metáfases analisadas mostraram o mesmo rearranjo aqui especificado.

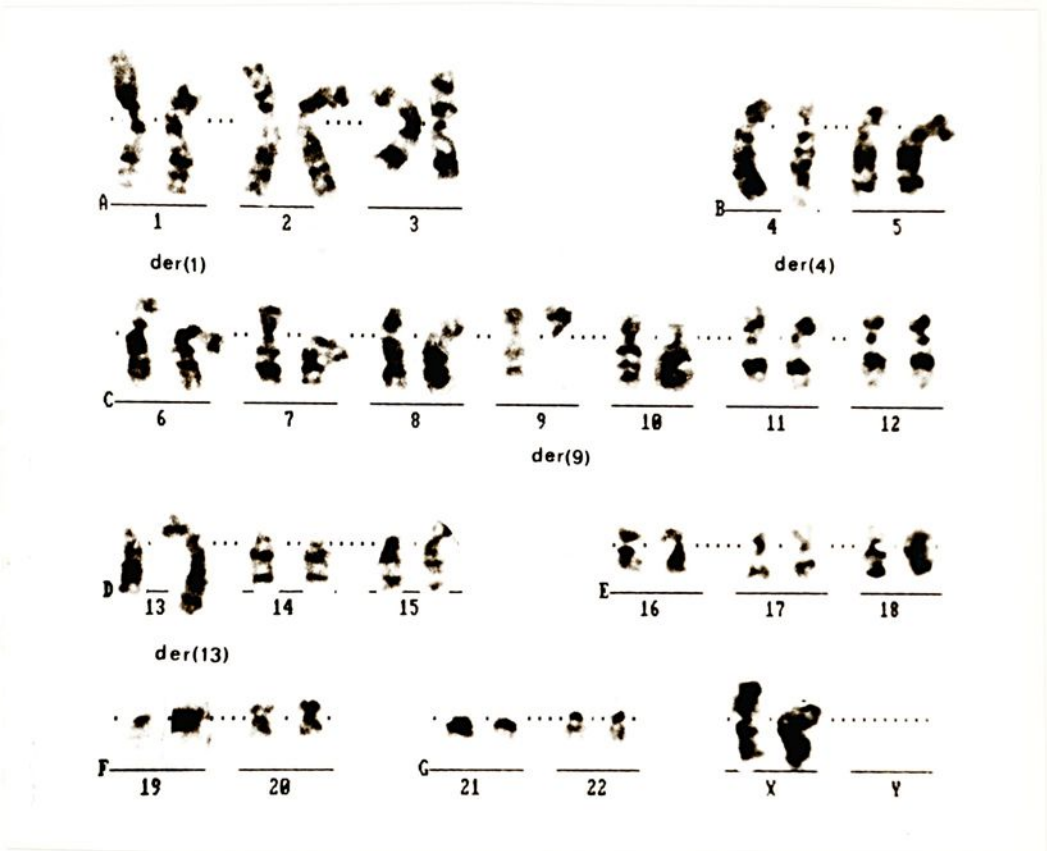


FIGURA 2. Cariótipo de uma metáfase analisada do caso 1149, indicando os cromossomos derivados.

TABELA 8. Identificação dos quatro cromossomos derivados de rearranjo múltiplo complexo do caso 1149.

Composição proposta	Especificação proposta
der(1) t(1;13)(p32;q34)	13qter-->13q34::1p32-->cen-->1qter
der(4) t(1;4)(p33;q31.3)	4pter-->cen-->4q31.3::1p33-->1pter
der(9) t(9;13)(q11;p12)	9pter-->cen-->9q11::13p12-->13pter
der(13) t(9;13)(q22;q11)t(4;13)(q32;q33)	9qter-->9q22.3::13p11.1-->cen-->13q33:: ::4q32-->4qter

unesp

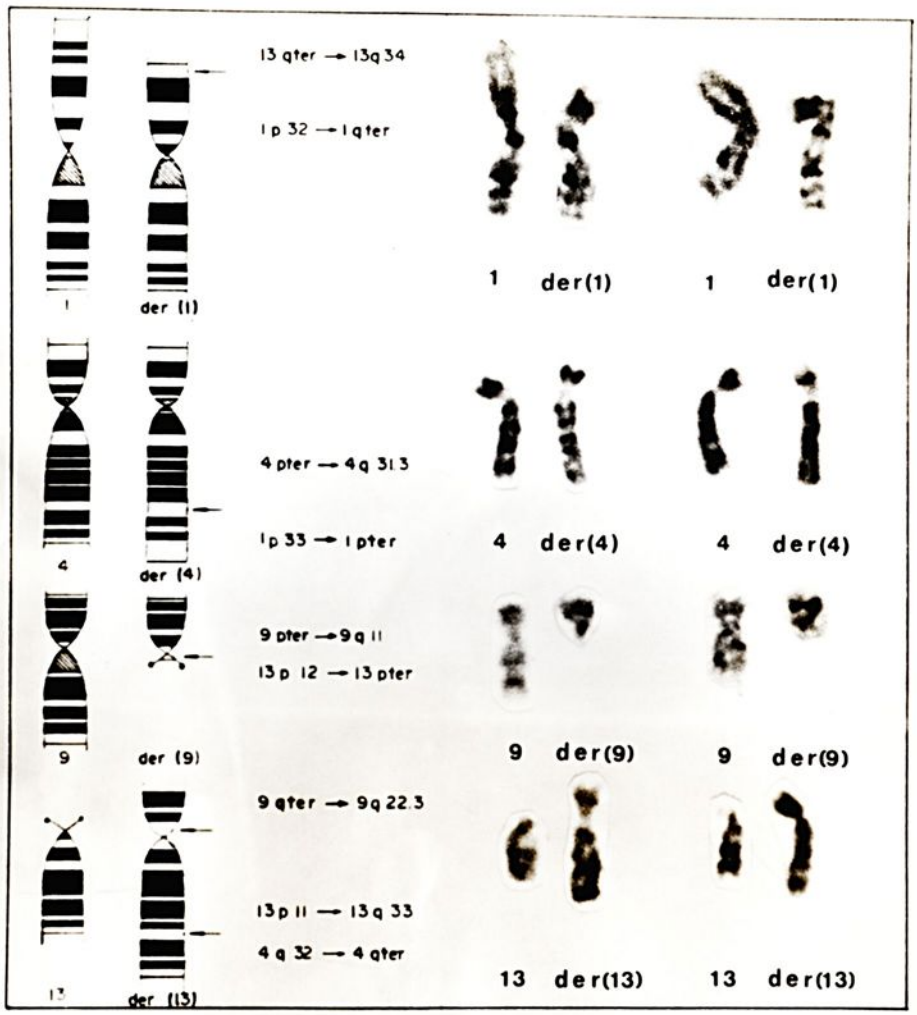


FIGURA 3. Esquemas ilustrativos e fotos representativas dos cromossomos normais e derivados 1, 4, 9 e 13 do caso 1149. As setas indicam os pontos de quebra.

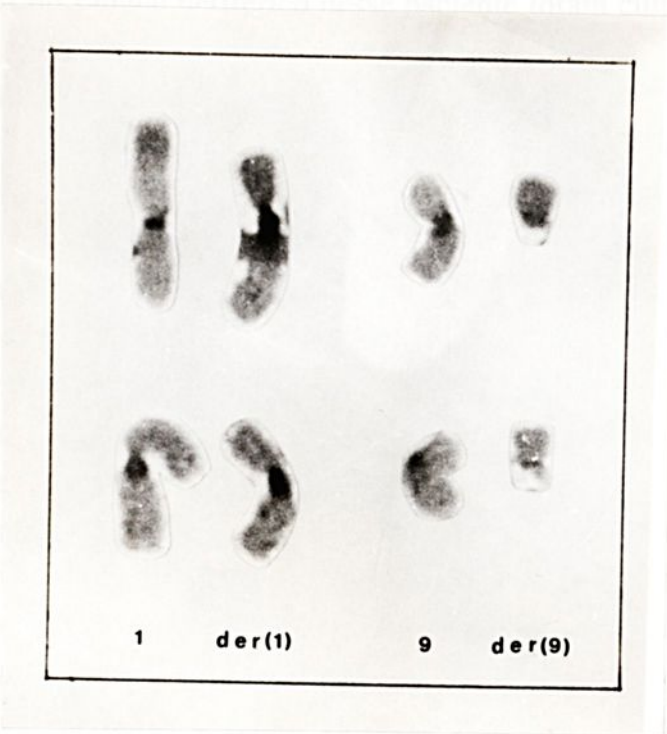


FIGURA 4. Ilustração do cromossomos der(1) e der(9) e dos homólogos normais do caso 1149, após bandamento C.

Além da presença desse rearranjo, algumas metáfases também mostraram perdas cromossômicas, com número cromossômico variando de 40 a 45. O cariótipo 45,XX,der(1),der(4),der(9),der(13),-C foi encontrado em 5 metáfases provenientes dos três frascos analisados. Foi também observada uma frequência aproximada de 2% de células poliploides e 1% de células com endorreduplicação.

Linfócitos do sangue periférico desse paciente foram cultivados e analisados citogeneticamente, tendo mostrado cariótipo normal (46,XX) em análise de 13 metáfases com bandamento GTG.

Caso 1152

A paciente, de 45 anos de idade, doméstica e tabagista, procurou os serviços médicos por apresentar aumento de volume no pescoço e nódulos na mama. Foram realizadas punções aspirativas em nódulos cervicais e na tireóide, indicando a presença de um bócio colóide multinodular e também de um adenoma pleomorfo de glândula salivar. Esta paciente apresentava antecedentes familiais com câncer, tendo perdido uma irmã com câncer de mama. Durante a cirurgia foram extirpados o bócio e o adenoma pleomorfo, cujos resultados histopatológicos confirmaram os diagnósticos citados anteriormente.

A amostra de bócio foi processada para o estudo citogenético, tendo sido semeada uma réplica por explante primário (A) e duas por desagregação enzimática (B1 e B2). As duas réplicas obtidas por desagregação enzimática mostraram início de crescimento celular após 48 horas e foram colhidas com cinco dias da semeadura. A réplica obtida por explante primário iniciou crescimento com seis dias da semeadura, o qual foi lento até trinta e cinco dias de cultivo, quando passou a crescer rapidamente e foi colhido com quarenta e um dias da semeadura.

Foram analisadas 41 metáfases, todas obtidas dos frascos submetidos à desagregação enzimática, 15 com identificação de todos os cromossomos por bandamento G, 13 com identificação de alguns cromossomos pelo padrão de bandas e outros somente por forma e tamanho e 13 em coloração usual. Vinte e quatro metáfases eram normais. Foi encontrada uma frequência de 3% de células com endorreduplicação e de 7% de células com separação centromérica precoce. Os achados citogenéticos deste caso estão sumarizados na Tabela 9.

Caso 1173

A paciente, auxiliar de serviços gerais, de 27 anos de idade, negou tabagismo, etilismo e história familial de câncer. Desenvolveu um bócio colóide

unesp

TABELA 9. Dados citogenéticos em células analisadas de quatro casos de bócio colóide multinodular.

Caso	Nº de metáfases analisadas	Achado citogenético [nº de células]	Réplica
1152	41	46,XX[25]	B1 e B2
		47,XX,-B,+C,+F[1]	B2
		46,XX,-5,-15,+mar1,+mar2[1]	B1
		46,XX,Bq+[1]	B2
		46,XX,7q-[1]	B2
		46,XX,del(8)(p12)[1]	B1
		46,XX,+C,-18[1]	B1
		46,XX,-D,+20[1]	B2
		46,XX,del(18)(q21-qter)[1]	B1
		45,XX,+16,-17,-21[1]	B1
		45,XX,del(3)(p23),-C[1]	B1
		45,XX,-C[1]	B1
		45,XX,-18[2]	B1
		45,XX,18p$^-$,-22[1]	B1
		45,XX,-20,ace[1]	B2
		44,XX,-B,-C[1]	B2
1173	5	46,XX[4]	B1 e B3
		43,XX,-4,-10,-12,-13,+22[1]	B3
1178	36	46,XX[22]	A1, B1, B2 e B4
		46,XX,+16,-17[1]	B4
		46,XX,-B,-B,+mar1,+mar2[1]	B4
		45,XX,-B,-B,+mar[1]	B1
		45,XX,del(6)(q24),-19[1]	B1
		45,XX,-C[1]	B1
		45,XX,-D[1]	B4
		45,XX-16[1]	A1
		45,XX,-F[1]	A1
		45,XX,-G[1]	B1
		45,XX,-22[1]	B4
		44,X,-X,-14[1]	B1
		44,XX,-2,-12[1]	B4
		44,XX,-4,-18[1]	A1
		43,XX,-1,-18,-F[1]	B1
1214	19	46,XX[14]	B1, B2, B3 e B4
		45,XX,dic(4;6)(q21;q15)[1]	B2
		45,XX,?dic(6;14)(q15;p11.1)[1]	B2
		45,XX,-F[1]	B3
		45,XX,-G,ace[1]	B1
		42,XX,-8,-11,-17,-20[1]	B1



multinodular de tireóide e procurou orientação médica alguns meses após detectá-lo. Parte dessa lesão foi cultivada, uma réplica foi processada por explante primário (A) e cinco foram obtidas após desagregação enzimática (B1, B2, B3, B4 e B5). Três dias após a semeadura, todos os frascos iniciaram crescimento, e quatro frascos obtidos por desagregação enzimática foram colhidos com oito dias da semeadura. O frasco obtido por explante primário e o quinto obtido por desagregação enzimática cresceram mais lentamente e foram colhidos com quatorze dias da semeadura. Somente em dois frascos foram observadas metáfases em condições de análise.

Foram analisadas cinco metáfases, três em coloração usual e duas em bandamento G, das quais quatro eram normais e uma apresentou apenas alterações numéricas mostrando o cariótipo 43,XX,-4,-10,-12,-13,+22. Foi observado 0,3% de células poliplóides.

Caso 1178

A paciente, de 64 anos de idade, doméstica, negou tabagismo, etilismo e história de câncer na família. Alegou apresentar um caroço no pescoço há mais de trinta anos. Tal lesão foi diagnosticada como bócio colóide multinodular. O processamento da amostra forneceu duas réplicas por explante primário (A1 e A2), cujo início do crescimento celular ocorreu após quatro dias da semeadura, e oito por desagregação enzimática (B1 a B8), que iniciaram crescimento celular com dois dias de cultivo. Um frasco obtido por desagregação mecânica e quatro por desagregação enzimática foram colhidos após nove dias da semeadura e o outro explante com quatorze dias. As demais réplicas, obtidas por desagregação enzimática, foram colhidas com dez dias da semeadura. Dessas, uma das geradas por desagregação mecânica e cinco por enzimática não apresentaram metáfases.

Trinta e seis metáfases foram analisadas, sendo 10 com bandamento GTG, 10 parcialmente com bandamento GTG e 16 em coloração usual. Do total, vinte e duas células eram citogeneticamente normais e o resultado da análise citogenética está descrito na Tabela 9. A Figura 5 ilustra alterações esporádicas encontradas nos casos 1152 e 1178. Células poliplóides e com quebras e falhas (Figura 6) foram observadas numa frequência de 3,4% e 2,3%, respectivamente. A Figura 7 ilustra uma célula poliplóide contendo 92 cromossomos.

Caso 1214

A paciente, de 40 anos de idade, diabética, professora, nega tabagismo, etilismo e história de câncer na família. Procurou orientação médica por apresentar

unesp

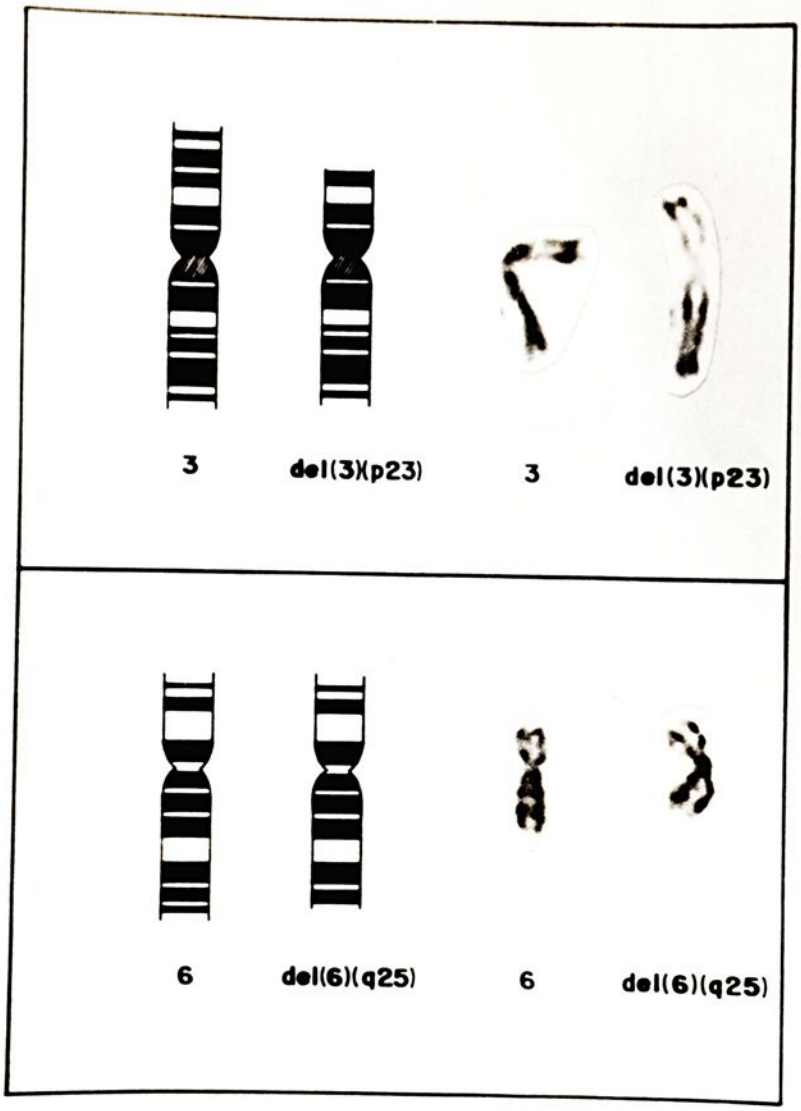


FIGURA 5. Ilustrações de alterações cromossômicas esporádicas observadas nos casos analisados de bócio colóide multinodular. Em (A) del(3)(p23) (caso 1152) e em (B) del(6)(q25) (caso 1178).

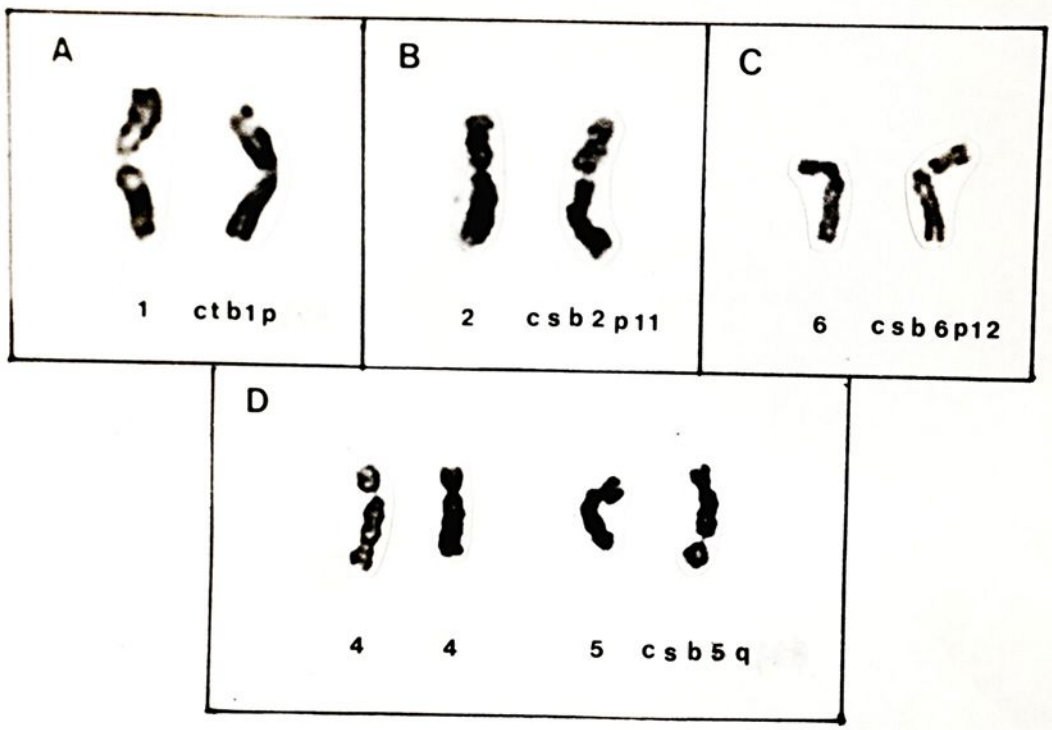


Figura 6. Ilustração das quebras encontradas no caso 1178. Em (A) ctb1p, (B) csb2p11, (C) csb6p12 e (D) csb5q.

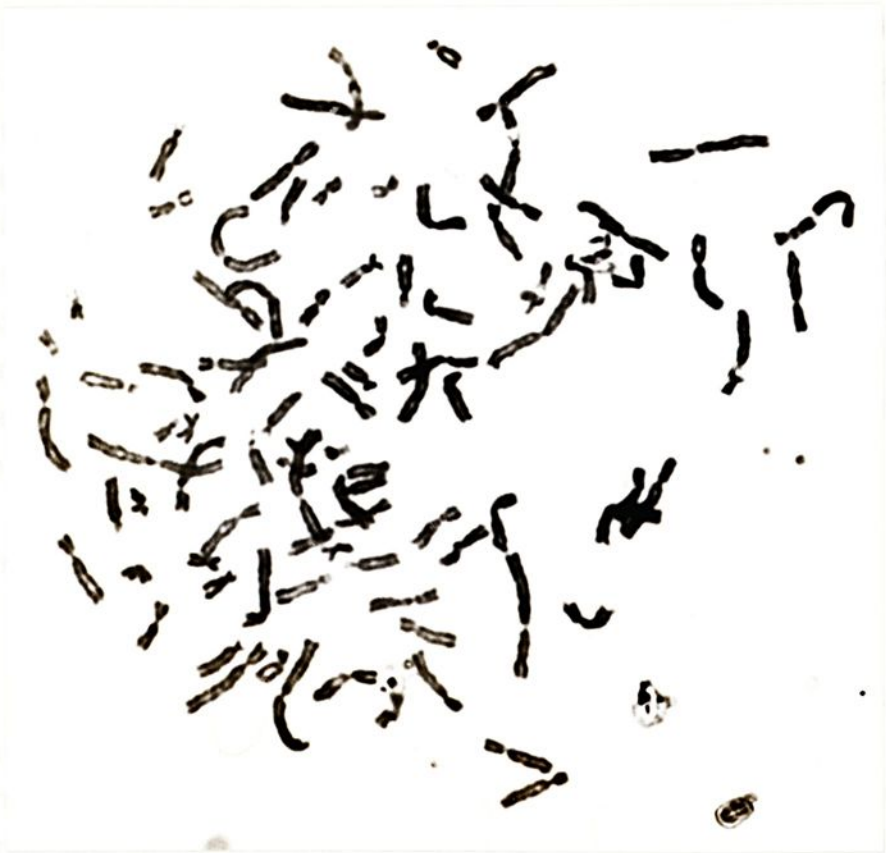


FIGURA 7. Metáfase poliplóide do caso 1178.

novamente um aumento de volume no pescoço, pois foi operada há vários anos para ressecção de um nódulo na tireóide.

O diagnóstico histopatológico da recidiva foi bócio colóide multinodular. Foram obtidas, após processamento do material, quatro réplicas por desagregação enzimática (B1, B2, B3 e B4) e uma por mecânica (A). As réplicas obtidas por desagregação enzimática iniciaram crescimento celular após 24 horas da semeadura e foram colhidas após sete dias. A outra réplica cresceu mais lentamente e foi colhida com 27 dias da semeadura.

Dezenove metáfases foram analisadas, sendo 7 em bandamento G, 1 parcialmente em bandamento G e 11 em coloração usual. Dessas, 14 eram citogeneticamente normais e, entre as demais, uma teve perda de um cromossomo do grupo F, outra perdeu um cromossomo do grupo G, mas mostrou um fragmento acêntrico (45,XX,-G,ace) e uma terceira apresentou perda dos cromossomos 8, 11, 17 e 20. Em uma célula foi observado um cromossomo dicêntrico associado às perdas dos cromossomo 4 e 6 [45,XX,dic(4;6)(q21;q15)] e em outra um possível cromossomo dicêntrico envolvendo os cromossomos 6 e 14 [45,XX,?dic(6;14)(q15;p11)] (Figura 8). Os achados citogenéticos deste caso também estão descritos na Tabela 9. Quebras e falhas ocorreram em 1% das células e não foi observada poliploidia ou endorreduplicação.

III.2. Paciente com Adenoma Pleomorfo de Glândula Salivar

Caso 1159

O paciente, de 34 anos de idade, funcionário público, negou tabagismo, etilismo e história familial de câncer. Há 11 anos retirou pela primeira vez um tumor da glândula parótida. Após, o paciente foi submetido a três cirurgias, todas para retirada de recidivas, tendo sido apenas a última realizada pelo cirurgião que forneceu as amostras. O diagnóstico histopatológico foi adenoma pleomorfo de glândula salivar. O processamento da amostra originou um frasco por explante primário (A) e quatro por desagregação enzimática (B1, B2, B3 e B4). Os frascos obtidos por desagregação enzimática iniciaram o crescimento celular após quatro dias da semeadura, sendo que três foram colhidos com dezenove dias e o quarto com vinte e um dias de cultivo. O frasco obtido por explante iniciou o crescimento celular com seis dias de cultivo e foi colhido com trinta e seis dias da semeadura.

Foram analisadas dezoito metáfases, das quais 6 em bandamento G, 3 parcialmente em bandamento G e 9 em coloração usual. Todas as metáfases apresentaram uma translocação balanceada entre os cromossomos 3 e 8 e uma inversão pericêntrica do

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

mesmo cromossomo 8 [der(3)t(3;8)(p21;q12or13),der(8)t(3;8)(p21;q12or13) inv(8)(p12q11)], caracterizando uma alteração clonal. Três dessas metáfases também apresentaram alterações numéricas não relacionadas.

A Tabela 10 resume os resultados citogenéticos deste caso. A Figura 9 mostra o rearranjo e o esquema representativo dos cromossomos envolvidos, indicando os pontos de quebra. Além dessas alterações, foram observados 5,1% de células poliplóides e 1,3% com endorreduplicação. A figura 10 ilustra uma célula com endorreduplicação do caso 1159.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

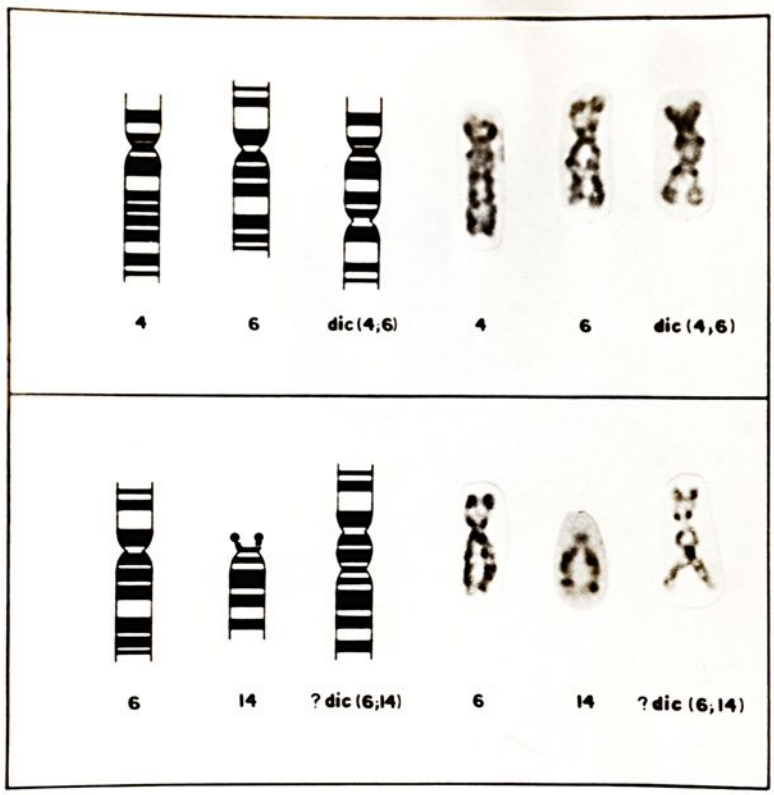


FIGURA 8. Ilustração dos cromossomos dicêntricos observados no caso 1214. Em (A) dic(4;6)(q21;q15) e em (B) ?dic(6;14)(q15;p11.1). As setas assinalam os pontos de quebra.

TABELA 10. Dados citogenéticos do caso de adenoma pleomorfo.

Nº de metáfases analisadas	Achado citogenético [nº de células]	Réplica
18	46,XY,der(3)t(3;8)(p21;q12ou13),der(8) t(3;8)(p21;q12ou13)inv(8)(p12q11)[8]	B1, B2 e B3
	46,XY,der(3)t(3;8)(p21;q12or13),der(8)t(3;8) (p21;q12ou13)inv(8)(p12q11),+17,-18[1]	B1
	46, XY,t(3p+;Cq$^-$)[5]	B1, B2 e B3
	46,XY,Bq$^-$,t(3p+;Cq$^-$)[1]	B2
	45,XY,-B,t(3p+;Cq$^-$)[1]	B1
	45,XY,t(3p+;Cq$^-$),-F[1]	B1
	45,XY,3p+,-C[1]	B2

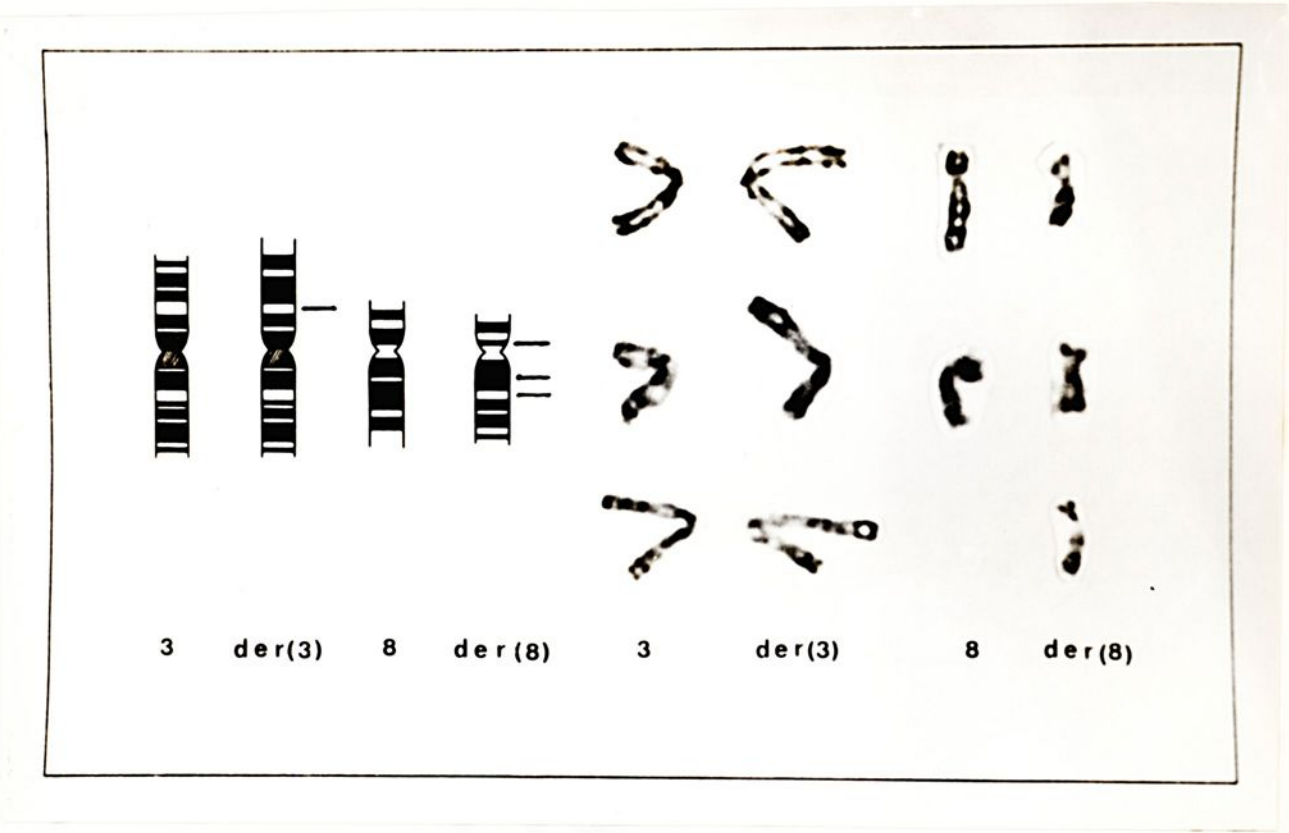


FIGURA 9. Cariogramas parciais e esquemas representativos dos cromossomos der(3)t(3;8)(p21;q12or13) e der(8)t(3;8)(p21;q12or13)inv(8)(p12q11) e dos homólogos normais em células do caso 1159. As setas assinalam os pontos de quebra.

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



FIGURA 10. Metáfase com endorreduplicação do caso 1159.

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Bócio colóide multinodular

Neste estudo, foram realizadas análises citogenéticas em células obtidas de lesões da tireóide, ressecadas de cinco pacientes, que revelaram alterações estruturais e numéricas classificadas como não-clonais em todos os cinco casos e a presença de um rearranjo estrutural complexo clonal, não-balanceado, em um caso.

As réplicas obtidas por desagregação mecânica apresentaram um período de cultivo, em geral, muito superior àquelas obtidas por desagregação enzimática e apenas em dois casos mostraram metáfases passíveis de análise. Apesar da amostra ter sido pequena, nestes casos, podemos inferir que a técnica por desagregação enzimática foi mais eficiente, pois apresentou início de crescimento mais precoce, bem como crescimento confluente em poucos dias de cultivo.

Tem sido documentado que a instabilidade cromossômica pode resultar em desequilíbrios gênicos, que conferem vantagens proliferativas às células portadoras, devido à perda da heterozigose de genes supressores de tumor ou à ativação ou amplificação de oncogenes (Weinberg, 1989, Solomon **et al.**, 1991). Euploidias, como poliploidia e endorreduplicação, aneuploidias e aberrações cromossômicas estruturais são resultados dessa instabilidade, que frequentemente está associada ao câncer (Sandberg, 1990).

As frequências médias de poliploidia e endorreduplicação, observadas nos cinco casos de bócio estudados, foram de 1,4% e 0,8%, respectivamente. Conforme Chen & Shaw (1973), o fenômeno da endorreduplicação ocorre principalmente nos períodos iniciais de cultivo, ao passo que a poliploidia aumenta com o número de repiques. Tais valores são relativamente baixos e, provavelmente, o são como resultado da ausência de repiques e apesar das culturas, em geral, terem sido colhidas com poucos dias de cultivo.

Um interessante fenômeno observado foi a separação precoce de centrômero, em 7% das células do caso 1152. Esse evento citogenético tem sido associado à exposição prolongada ou a doses elevadas do bloqueador mitótico colcemide (Atkin & Baker, 1992). Contudo, essa amostra foi submetida à ação de 50µl de colcemide por uma hora e meia e, assim, torna-se difícil inferir sobre as causas e consequências desse achado.

Um grande número de células das lesões estudadas exibiram aneuploidias esporádicas, sendo mais frequentes as monossomias. Embora essas aneuploidias tenham sido caracterizadas como não-clonais, chama a atenção a perda dos cromossomos 17 e 18, observada nos casos 1152, 1178 e 1214, pelo fato de que a perda da heterozigose de segmentos desses cromossomos ou de genes supressores de tumor, especialmente do 17,

unesp

tem sido associada a diferentes neoplasias, inclusive de tireóide (Dobashi **et al.**, 1993, Fearon, 1994, Kelley & Johnson, 1994). Além disso, o cromossomo 18 se mostrou envolvido em rearranjos estruturais nos casos 1152 e 1214.

Em dois casos, 1152 e 1178, foi verificada a presença de cromossomos marcadores, de forma não-clonal. Os cromossomos marcadores encontrados em células tumorais devem surgir devido à instabilidade genética, podendo resultar em rearranjos cujos efeitos não são facilmente avaliados. Provavelmente, tais rearranjos confiram vantagens proliferativas às células, tendo importância no início ou na progressão neoplásica (Atkin & Baker, 1988).

A presença de cromossomos dicêntricos, formados pelos cromossomos 4 e 6, dic(4;6)(q21;q15), em uma célula, e provavelmente entre os cromossomos 6 e 14, ?dic(6;14)(q15;p11), em outra foi observada no caso 1214. Conforme o HGM 11 (1991), na região 4q21 foram mapeados os oncogenes **FGF5** e **GRO1** e em 6q15 há o sítio frágil fra(6)(q15). Saltman **et al.** (1989) observaram que cromossomos com dois ou mais centrômeros frequentemente apresentam somente um ativo, o que pode possibilitar que eles não sejam eliminados por seleção. Em dois casos, 1152 e 1214, foi verificada a presença de um fragmento acêntrico, associado à monossomia do cromossomo 20 e de um cromossomo do grupo G, respectivamente.

Quebras e falhas, cromatídicas e cromossômicas, foram observadas em três casos, 1152, 1178 e 1214, afetando em média 3% das células e envolvendo diferentes cromossomos. Estas frequências não se diferenciam significativamente das encontradas em tecidos normais cultivados **in vitro** (Rümmelein **et al.**, 1992). É interessante ressaltar que a investigação de quebras cromossômicas induzidas por substâncias clastogênicas específicas em células normais de pacientes com câncer tem sugerido uma predisposição constitucional à instabilidade genética e à neoplasia (Hsu **et al.**, 1989, Rümmelein **et al.**, 1992).

Um achado interessante observado no caso 1149, foi um rearranjo estrutural complexo não-balanceado (Tabelas 7 e 8, Figuras 3, 4, 5 e 6), que envolveu quatro cromossomos dos pares 1, 4, 9 e 13, com pontos de quebra propostos em 1p32, 4q31.3, 9q11 e 9q22.2, 13p11.1 e 13q33. Esse rearranjo estava presente em todas as células analisadas, proveniente das três réplicas estudadas, constituindo uma anomalia clonal. Contudo, rearranjos altamente complexos, como o deste caso, ainda não foram referidos em bócios tireoideanos.

No braço curto do cromossomo 1 encontram-se vários oncogenes e fatores de crescimento, os quais podem contribuir para a proliferação descontrolada em lesões benignas, contudo os mecanismos de ação precisam ser melhor investigados (Sreekantaiah



& Sandberg, 1991). Por outro lado, anormalidades no cromossomo 1 são frequentemente encontradas em tumores malignos e parecem representar alterações secundárias associadas mais com a progressão do câncer, que em sua iniciação (Sandberg, 1990). Um dos pontos de quebra encontrado nesta lesão, o 1p32, é coincidente com aquele observado em adenomas tireoideanos por Teyssier & Ferre (1989). Nesta mesma banda localizam-se um sítio frágil, o fra(1)(p32) e foram mapeados vários oncogenes, como **MYCL1**, **TAL1**, **BLYM**, **JUN** (HGM 11, 1991). Tal alteração pode ter afetado apenas os mecanismos que controlam o crescimento celular e, assim, relacionar a lesão aqui estudada com os adenomas tireoideanos.

Outras bandas envolvidas nesse rearranjo também possuem oncogenes nelas mapeados, como **MLR** e **TDO2**, em 4q31 (HGM 11, 1991). A região perdida do cromossomo 9, 9q11-22, contém o gene supressor de tumor **MLM**, mapeado em 9q21 (Knudson, 1993) e o sítio frágil fra(9)(q22.1) (HGM 11, 1991).

Esses achados levantam interessantes questões em relação ao caso 1149, pois rearranjos altamente complexos são normalmente encontrados em lesões malignas e relacionados à progressão do câncer. Dessa forma, será que tais alterações cromossômicas estruturais observadas indicariam, pelo menos, um estágio pré-maligno dessa lesão benigna da tireóide? Ou, então, poderiam tais resultados configurar indícios da presença de rearranjos altamente complexos nessas lesões? Neste caso, tais rearranjos poderiam afetar genes envolvidos unicamente na proliferação celular e não necessariamente na transformação maligna. Por outro lado, poderia o diagnóstico deste caso estar incorreto e a lesão ser um tumor benigno ou maligno? A reavaliação clínica e histopatológica foi realizada e os diagnósticos não foram alterados.

Situação semelhante à essa foi encontrada por Vayego (1993) em um caso de cisto ósseo solitário, que é uma lesão benigna não-tumoral, o qual apresentou um rearranjo estrutural complexo balanceado e clonal, envolvendo sete cromossomos (cromossomos 4, 6, 8, os dois cromossomos 12, o cromossomo 16 e o 21). Assim, torna-se evidente a importância dos estudos citogenéticos em lesões consideradas não-tumorais com o intuito de confirmar a presença dessas alterações cromossômicas e, se possível, inferir seu significado, além de procurar esclarecer o papel dos genes envolvidos, que pode ter relevância em processos proliferativos benignos ou em lesões pré-malignas.

Em bócios multinodulares foram descritas trissomias dos cromossomos 1, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 20 e monossomias dos cromossomos 1 e 22 (Gama **et al.**, 1991, Roque **et al.**, 1993). Esses autores ressaltaram que tais alterações são semelhantes às encontradas em certos adenomas tireoideanos, o que sugere que na glândula tireóide há, pelo menos nesses dois casos, uma relação biológica entre hiperplasia e neoplasia e

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

também que ganhos cromossomicos devem desempenhar funções importantes na patogenia de lesões benignas proliferativas desse órgão.

IV.2. Adenoma pleomorfo de glândula salivar

O caso de adenoma pleomorfo incluído nesse estudo mostrou alterações citogenéticas não clonais, como deficiência do braço longo de um comossomo do grupo B e monossomia de cromossomos dos grupos B e F, associadas à translocação balanceada entre os cromossomos 3 e 8 e inversão deste cromossomo 8 [der(3)t(3;8)(p21;q12ou13), der(8)t(3;8)(p21;q12ou13)inv(8p12q11)]. Esse rearranjo, envolvendo os cromossomos 3 e 8, foi encontrado em todas as células analisadas, provenientes de quatro réplicas estudadas, constituindo um clone celular.

Os pontos de quebra 3p21 e 8q12 têm sido frequentemente envolvidos na t(3;8) observada nesse tipo de neoplasia benigna, que se correlaciona com um prognóstico ruim (Teyssier, 1989). O achado deste caso deve ser sugestivo de um mau prognóstico ou então estar relacionado com estágios mais avançados da doença, pois o paciente há onze anos apresenta esse tipo de tumor, tendo sido submetido a quatro cirurgias da glândula parótida, três para exérese de recidivas. Além disso, em 8q11 situa-se o oncogene **MOS**, que pode ter sido ativado no caso analisado, como resultado da inv(8)(p12q11) presente em todas as células analisadas.

Inúmeras publicações com resultados da análise citogenética em adenoma pleomorfo são citadas por Mitelman (1991), indicando que a maioria apresenta a t(3;8) ou outras translocações envolvendo um desses dois cromossomos em combinações com outros cromossomos, por exemplo o 1, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 18. Esses achados sugerem que os cromossomos 3 e 8 estão, de fato, associados aos adenomas de glândula salivar. Fato interessante é que esse mesmo autor indica apenas uma publicação com dados de tumores malignos de glândula salivar que apresentam alterações nos cromossomos 3 e 8, que foram as monossomias desses cromossomos em adenocarcinoma e a t(3;17)(p24;p13) em carcinoma **in situ**. Assim, resultados de estudos citogenéticos em lesões de glândula salivar que apresentam alterações nos cromossomo 3 e 8 parecem ser úteis, tanto para o diagnóstico, quanto para o prognóstico dessas lesões.

De acordo com Yokota **et al.** (1991) os locos cromossômicos mostram perda de heterozigose variada entre tumores humanos, sugerindo que há diversos genes supressores no genoma humano e que genes críticos para o desenvolvimento de cada tipo de tumor podem ser diferentes.

unesp

Rommel **et al.** (1991) não detectaram associação de HPV em dezoito adenomas pleomorfos, mesmo apresentando rearranjos em 3p21, que é um sítio de integração do HPV 16. Estudos cariotípicos e moleculares de vários tumores sólidos têm sugerido a presença de diversos genes supressores de tumor no braço curto do cromossomo 3, nas regiões 3p13-14, 3p21 e 3p25. Estas regiões têm sido alvos de deleções ou perda de heterozigose envolvidos em muitos cânceres, entre eles carcinoma renal, de pulmão, de mama e de cabeça e pescoço (para revisão, Smith & Alonso, 1993, Kelley & Johnson, 1994). Ainda não está bem definido se um mesmo gene supressor de tumor está associado a diferentes malignidades, porém já se sabe que a região 3p21 contém um ou mais genes que realizam uma função essencial no controle do crescimento e/ou diferenciação das células epiteliais do trato aerodigestivo e genito-urinário (Maestro **et al.**, 1993).

Stenman **et al.** (1989) detectaram uma associação entre os níveis elevados de expressão da proteína p21 e rearranjos no cromossomo 8, e sugeriram que um provável gene localizado na banda 8q12 estaria envolvido na regulação da expressão dos genes **RAS**. Além disso, Azuma **et al.** (1992) citaram que a perda de um possível gene supressor de tumor, localizado em 8q12, seja responsável pela indução de adenomas pleomorfos.

A anormalidade genética mais frequentemente observada em cânceres humanos é a mutação do gene **TP53** (Azuma **et al.**, 1992, para revisão, Adamson **et al.**, 1994, Fearon, 1994). O produto normal deste gene é a fosfoproteína p53, que exerce função reguladora crítica no crescimento celular e age como um fator de transcrição. O gene **TP53** garante a integridade do genoma e estudos recentes têm sugerido que a proteína p53 deve também regular a expressão de genes que reparam os danos no DNA. Há dados sugestivos de que a perda da função normal da proteína p53 pode gerar instabilidade genética nas células e resultar numa frequência aumentada de amplificação gênica e até mesmo outras alterações genéticas, como por exemplo aneuploidias, nas células tumorais (para revisão, Fearon, 1994, Kelley & Johnson, 1994).

Formas mutantes da proteína p53 foram detectadas em adenoma pleomorfo por Azuma **et al.** (1992) e Soini **et al.** (1992). Esses autores sugeriram que mutações no gene **TP53** devem estar envolvidas no desenvolvimento desses tumores. Soini **et al.** (1992) aventaram a possibilidade de que o acúmulo de proteínas p53 mutantes em adenoma pleomorfo pode ser devido a algum mecanismo desconhecido, não necessariamente mutações no gene **TP53**.

Nossos resultados confirmam a importância de estudos citogenéticos em lesões proliferativas de natureza benigna, e sugerem a necessidade de pesquisas adicionais com o mesmo enfoque e correlacionadas com pesquisas em genética molecular, visando esclarecer as bases genéticas dessas condições.

unesp

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Muitas neoplasias humanas apresentam alterações cromossômicas consistentes associadas, que são responsáveis pela ativação ou perda funcional de genes específicos, o que acaba resultando na transformação e progressão neoplásica. A identificação dessas anomalias tem sido feita, tanto em neoplasias hematológicas como em tumores sólidos, e tem sido muito utilizada na definição do diagnóstico da condição e no estabelecimento do prognóstico para o paciente, além de auxiliar na monitorização dessas neoplasias. Um achado interessante, mais recente, foi o de que lesões proliferativas de natureza benigna, neoplásicas ou não, também podem apresentar alterações cromossômicas. As glândulas salivares e a tireóide são frequentemente afetadas por lesões proliferativas benignas, mas há poucos dados citogenéticos disponíveis e a importância da análise citogenética no seu diagnóstico e prognóstico ainda não é significativa.

O presente trabalho buscou investigar as anomalias cromossômicas presentes em células cultivadas dessas lesões. Os estudos citogenéticos foram realizados em células provenientes de seis lesões benignas, submetidas à cultura de curta duração, sendo cinco casos de bócio colóide multinodular de tireóide e um caso de adenoma pleomorfo de glândula salivar.

No adenoma pleomorfo foi encontrada uma anomalia estrutural clonal, a t(3;8)(p21;q12ou13)inv(8)(p12q11), que se repetiu em todas as dezoito células analisadas. Alterações cromossômicas estruturais e numéricas foram também observadas, mas não em situação de clonalidade. A translocação t(3;8)(p21;q12) tem sido consistentemente associada a esses adenomas pleomorfos de glândula salivar, principalmente da parótida, e considerada indicativa de um mau prognóstico. O paciente deste estudo também tem história de recorrência da condição, já tendo sido submetido a quatro cirurgias na parótida, três das quais para retirada de recidivas.

Quatro, dos cinco casos de bócio colóide multinodular, mostraram perdas e ganhos cromossômicos casuais e anomalias estruturais não-clonais. Em um dos casos, contudo, foi encontrado um rearranjo comossômico complexo e clonal, presente em todas as células estudadas. Tal rearranjo era provavelmente não-balanceado, e envolvia quatro cromossomos de diferentes pares (1, 4, 9 e 13). Além disso, também foram encontradas perdas provavelmente casuais. A presença de um rearranjo cromossômico tão complexo em uma lesão proliferativa benigna não-tumoral levanta questões acerca da interessante possibilidade de que este evento esteja indicando a ocorrência de transformação celular, ainda sem expressão em nível histológico ou que tal alteração esteja relacionada a genes envolvidos unicamente na proliferação celular.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Em conclusão, os achados deste estudo confirmam a importância da avaliação citogenética em lesões proliferativas de natureza benigna, e sugerem a necessidade de pesquisas adicionais com o mesmo enfoque. Assim, poderão ser identificadas as regiões cromossômicas afetadas nessas lesões, e estas poderão ser alvo para estudos moleculares que venham contribuir para o esclarecimento as bases biológicas da iniciação e transformação neoplásica.

VI. SUMMARY

Several human neoplasias are specifically related to particular chromosome aberrations. These aberrations determine activation or suppression in gene functions, which can be related to the neoplastic initiation or progression. Chromosome abnormalities relevant to hematological and solid tumors were largely reported, and the presence of a particular abnormality has been applied to the diagnosis and prognosis, as well as the follow-up of patients. More recently, chromosome abnormalities have been reported in benign proliferative lesions, either neoplastic or non-neoplastic. Thyroid and salivary glands are commonly affected by benign proliferative lesions, but cytogenetic data available in these conditions are still rare. Thus, the contribuition of cytogenetics information to patients with these conditions are currently worthless.

The present study, aimed to help resolve this problem, by searching for chromosome abnormalities in cells derived from thyroid and salivary gland proliferative lesions. Cytogenetic evaluation was performed in short-term cell cultures from five thyroid colloidal multinodular goiter and one pleomorphic adenoma specimen.

A clonal abnormality, t(3;8)(p21;q12ou13)inv(8)(p12q11) was found in eighteen cells of the parotid pleomorphic adenoma. Several sporadic numerical aberrations were also observed. A t(3;8)(p21;q12) was previously referred in this condition, associated with a poor prognosis. Interestingly, this patient had a previous history of four surgeries for tumor resections in this same site.

Four patients with thyroid colloidal multinodular goiter expressed only non-clonal chromosome gain and losses and rearrangements. However, the fifth patient, besides displaying aneuploidies also presented a clonal complex chomosome translocation in all the cells analyzed. Four chromosomes (#1, #4, #9 e #13) were involved in an apparently unbalanced rearrangement. The occurrence of a complex rearrangement in a benign non-neoplastic lesion raises questions both on the accuracy of the diagnosis of the lesion and on the association between this cytogenetic event and the cell transformation process.

In conclusion, these findings confirm the importance of the cytogenetic evaluation in benign proliferative lesions. Additional research is also necessary in order to identify consistent chromosome breakpoints associated with these conditions. Them, the target chromosome sites must be molecularly analyzed for a better understanding of the biological basis in the neoplastic process.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, R., JONES, A.S., FIELD, J.K. Loss of heterozygosity studies on chromosome 17 in head and neck cancer using microsatellite markers. **Oncogene**, v.9, p.2077-2082, 1994.

ALLEGRA, E., GAROZZO, A., GRILLO, A., CATALANO, G.B. Cytogenetic alterations in laryngeal carcinomas. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.118, p.1320-1322, 1992.

ANDERSON, M.L.M. & SPANDIDOS, D.A. Onco-suppressor genes. In: **SLUYSER, M. Molecular biology of cancer genes.** Ellis Horwood Limited. New York - London. p. 62-81, 1990.

ANDERSON, M.W., REYNOLDS, S.H., YOU, M., MARONPOT, R.M. Role of protoncogene activation in carcinogenesis. **Environ. Health Perspect.**, v.98, p.13-24, 1992.

ANTONINI, P., LÉVY, N., CAILLOU, B., VÉNUAT, A.M., SCHLUMBERGER, M., PARMENTIER, C., BERNHEIM, A. Numerical aberrations, including trissomy 22 as the sole anomaly, are recurrent in follicular thyroid adenomas. **Gene Chromosome Cancer**, v.8, n.1, p.63-66, 1993.

ANTONINI, P., VÉNUAT, A.M., CAILLOU, B., SCHLUMBERGER, M., PARMENTIER, C., BERNHEIM, A. Cytogenetic studies of 36 cases of thyroid adenomas. In: **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.134, 1992a.

ANTONINI, P., VÉNUAT, A.M., CAILLOU, B., SCHLUMBERGER, M., PARMENTIER, C., BERGER, R., BERNHEIM, A. Cytogenetic studies of 19 cases of thyroid papillary carcinomas. In: **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.134, 1992b.

ANTONINI, P., VÉNUAT, A. M., CAILLOU, B., SCHLUMBERGER, M., BERGER, R., PARMANTIER, C. Cytogenetic characterization of a new permanent cell line (Glag 66) from a human papillary thyroid carcinoma. In: **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.134, 1992c.

ANTONINI, P., VÉNUAT, A.M., LINARES, G., CAILLOU, B., BERGER, R., PARMANTIER, C. A translocation (7;10)(q35;q21) in a differentiated papillary carcinoma of the thyroid. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.41, p.139-144, 1989.

ANWAR, K., NAKAKUKI, K., NAIKI, H., INUZUKA, M. RAS gene mutations and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 53, n.1, p.22-28, 1993a.

ANWAR, K., NAKAKUKI, K., IMAI, J., NAIKI, H., INUZUKA, M. Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.53, n.6, p. 952-956, 1993b.

ATKIN, N.B. & BAKER, M.C. Small metacentric marker chromosomes, particulary isochromosomes in cancer. **Hum. Genet.**, v.79, p.96-102, 1988.

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

AZUMA, M., KASAI, Y., TAMATANI, T., SATO, M. Involvement of p53 mutation in the development of human salivary gland pleomorphic adenomas. **Cancer Lett.**, v.65, p.61-71, 1992.

BARTNITZKE, S., HERMANN, M. E., ZUSCHNEID, W., NEUHAUS, P., BULLERDIEK, J. Cytogenetics findings on eight follicular thyroid adenomas including on with a t(10;19). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.39, p.65-68, 1989.

BAUER, J. SOKOL, L., STRIBRNA, J., KREMEN, M., DRAJSOVA, I, JAUSNER, P., HEJNAR, P. Amplification of N-MYC oncogene in human melanoma cells. **Neoplasma**, v.37, p.233-238, 1990.

BELGE, G., THODE, B., BARTNITZKE, S. Cytogenetic analysis of 75 benign thyroid tumors. In: **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.133, 1992.

BERENSON, J.R., YANG, J., MICKEL, R.A. Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. **Oncogene**, v.4, p.1111-1116, 1989.

BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenes. **Cell**, v.64, p. 235-248, 1991.

BONGARZONE, I., MONZINI, N., BORRELLO, M.G., CARCANO, C., FERRARESI, G., ARIGHI, E., MONDELLINI, P., DELLA PORTA, G., PIEROTTI, M.A. Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and regulatory subunit RI*a* of cyclic AMP-dependent protein kinase **A. Mol. Cell. Biol.**, v.13, p.358-366, 1993.

BOWN, N.P. Chromosome studies of solid tumors. **J. Clin. Pathol.**, v.45, p.556-560, 1992.

BUYS, C.H.C.M. Overview and prospects. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.52, p.207-213, 1991.

unesp

CARBONE, D.P. & MINNA, J.D. Antioncogenes and human cancer. **Annu. Rev. Med.**, v.44,p.451-464, 1993.

CARIANI, C. T., SOZZI, G., MIOZZO, M., BONGARZONE, I., PILOTTI, S., PIEROTTI, M.A., DELLA PORTA, G. In: **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours**, Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.136, 1992.

CASARTELLI, C., ROGATTO, S.R., BARBIERI-NETO, J. Karyotipic evolution of human meningioma: Progression through malignancy. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.40, p.33-45, 1989.

CASTAÑEDA, V.L., CHEAH, M.S.C., SALDIVAR, V.A., RICHMOND, C.M., PARMLEY, R.T. (1991). Cytogenetic and molecular evaluation of clinically aggressive esthesioneuroblastoma. **Amer. J. Pediat. Hematol. Oncol.**, v.13, p.62-70, 1991.

CHEN, R.-B. Flow cytometric analysis of benign and malignant tumors of the oral and maxillofacial region. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.47, p.596-606, 1989.

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

CHEN, S.J., CHEN, Z., GRAUSZ, J.D., HILLION, J., D'AUREOL, L., FLANDIN, G., LARSEN, C.J., BERGER, R. Molecular cloning of a 5' segment of the genomic ph1 gene defines a new breakpoint cluster region (bcr2) in philadelphia-positive acute leukemia. **Leukemia**, v.2, p.634-641, 1988.

CHIAO, P.J., BISCHOFF, F.Z., STRONG, L.C., TAINSKKY, 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.

COOKE, L.D., COOKE, T.G., BOOTZ, F., HELLIWELL, T.R., SPILLER, E., STELL, P.M. Ploidy as a prognostic indicator in end stage squamous cell carcinoma of the head and neck region treated with cisplatinum. **Br. J. Cancer**, v.61, p.759-762, 1990.

COROMINAS, M., KAMINO, H., LEON, J., PELLICER, A. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): Is HRAS involved in differentiation as well as proliferation? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.6372-6376, 1989.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional.** 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1402p.

DAL CIN, P., SNEYERS, W., SAYED ALY, M., SEGERS, A., OSTIJN, F., VAN DAMME, B., VAN DEN BERGUE, H. Involvement of 19q13 in follicular thyroid adenoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.60, p.99-101, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

DAVIDSON, B.J., HSU, T.C., SCHANTZ, S.P. The genetics of tobacco-induced malignancy. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.119, p.1198-1205, 1993.

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.

DI RENZO, M.F., OLIVERO, M., FERRO, S., PRAT, M., BONGARZONE, I., PILOTTI, S., BELFIORE, A., COSTANTINO, A., VIGNERI, R., PIEROTTI, M.A., COMOGLIO, P.M. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. **Oncogene**, v.7, p.2549-2553, 1992.

DOBASHI, Y., SAKAMOTO, A., SUGIMURA, H., MERYEI, M., MORI, M., CLYANA, T., MACHINAMI, R. Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.17, p.375-381, 1993.

DONGHI, R., LONGONI, A., PILOTTI, S., , MICHIELI, P., DELLA PORTA, G., PIEROTTI, M.A. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.1753-1760, 1993.

DUTRILLAUX, B. & MULERIS, M. Induction of increased salvage pathways of nucleotide synthesis by dosage effect due to chromosome unbalances may be fundamental in carcinogenesis: The example of colorectal carcinoma. **Ann. Genetics**, v.29, p.11-15, 1986.

FABIEN, N., PAULIN, C., SANTORO, M., BERGER, N., GRIECO, M., GALVAIN, D., BARBIER, Y., DUBOIS, P.M., FUSCO, A. Detection of RET oncogene activation in human papillary thyroid carcinomas by **in situ** hybridisation. **Br. J. Cancer**, v.66, p.1094-1098, 1992.

FAGIN, J.A., MATSUO, K., KARMAKAR, A., CHEN, D.L., TANG, S.-H., KOEFFLER, P. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.179-184, 1993.

FEARON, E.R. Molecular genetic studies of the adenoma-carcinoma sequence. **Adv. Intern. Med.**, v.39, p.123-147, 1994.

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 - Área de Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1992.

FIELD, J.K., SPANDIDOS, D.A., STELL, P.M., VAUGHAN, E.D., EVAN, G.I., MOORE, J.P. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous carcinoma. **Oncogene**, v.4, p.1463-1468, 1989.

FIELD, J.K., SPANDIDOS, D.A., MALLIRI, A., GOSNEY, J.R., YIAGNISIS, M., STELL, P.M. Elevated P53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Br. J. Cancer**, v.64, p.573-577, 1991.

FIELD, J.K., PAVELIC, Z.P., SPANDIDOS, D.A., STAMBROOK, P.J., JONES, A.S., GLUCKMAN, J.L. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.119, p.1118-1121, 1993.

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

GAMA, N.B., GAMA, R., THOMÉ, F.A., TAJARA, E.H. Cytogenetic analyses of one multinodular goiter of thyroid. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.55, p.73-77, 1991.

GAPANY, M., PAVELIC, Z.P., KELLEY, D.J., PAVELIC, L., GAPANY, S.R., CRAVEN, J.M., STAMBROOK, P.J., GLUCKMAN, J.L. Immunohistochemical detection of c-myc protein in head and neck tumors. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.120, p.255-259, 1994.

GASPARINI, G., WEIDNER, N., MALUTA, S., POZZA, F., BORACCHI, P., MEXXETTI, M., TESTOLIN, A., BEVILACQUA, P. Intratumoral microvessel density and p53 protein correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.55, n.5, 1993.

GODDARD, A.D, & SOLOMON, E. Genetic aspects of cancer. In: **HARRIS, H. & HIRSCHHORM, K. Adv. Hum. Genet.**. Plenum Press, New York-London, p.321-376, 1993.

GROFEN, J., STEPHENSON, J.R., HEISTERKAMPS, N., DE KLEIN, A., BARTRAN, C.R., GROSVELD, G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. **Cell**, v.36, p.93-99, 1984.

GROUCHY, J.D.E., TURLEAU, C. **Atlas des Maladies Cromosomiques.** Paris, Expansion Scientifique Française, 1977.

GUSSACK, G.S. Oncofetal antigen expression in head and neck carcinoma. **Laryngoscope**, v.102, p.168-176, 1992.

HACKFORD, A.W. Biochemical markers for colorectal cancer. Diagnostic and therapeutic implications. **Surg. Clin. North Am.**, v.73, p.85-102, 1993.



HAUGEN, D.R.F., AKSLEN, L.A., VARHAUG, J.E., LILLEHAUG, J.R. Demonstration of a TGF-a-EGF-Receptor autocrine loop and c-myc protein over-expresseion in papillary thyroid carcinomas. **Int. J. Cancer**, v.55, n.1, p.37-43, 1993.

HANSEN, M.F. Molecular genetic considerations in osteosarcoma. **Clin. Orthop.**, v.270, p.237-246, 1991.

HEIM, S. & MITELMAN, F. Primary chromosome abnormalities in human neoplasia. **Adv. Cancer Res.**, v.52, p.1-43, 1989.

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

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

HERRMANN, M.E., MOHAMED, A., TALPOS, G., WOLMAN, S.R. Cytogenetic study of a papillary thyroid carcinoma with a rearranged chromosome 10. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.57, p.231-236, 1991.

HERRMANN, M.E. & LALLEY, P.A. Significance of trisomy 7 in thyroid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.62, p.144-149, 1992.

HERRMANN, M.E., LINDEN, M., LATIF, N.A., LALLEY, P.A., LANE, M.A. Expression of mutant p53 in thyroid tumors. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours**, Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p. , 1992.

HERMANN, M.A., HAY, I.D., BARTELT, D.H., SPURBECK, J.L., DAHL, R.J., GRANT, C.S., JENKINS, R.B. Cytogenetics of six follicular thyroid adenomas including a case report of an ozyphil variant with t(8;14)(q13;q24.1). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.56, p.131-135, 1991a.

HERMANN, M.A., HAY, I.D., BARTELT, D.H., RITLAND, S.R., DAHL, R.J., GRANT, C.S., JENKINS, R.B. Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. **J. Clin. Invest.**, v.88, p.1596-1604, 1991b.

HöFFLER, H., RUHRI, C., PÜTZ, B., WIRNSBERGER, G. HAUSER, H. Oncogene expression in endocrine pancreatic tumors. **Virchows Arch.**, v.55, p.355-361, 1988.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolar organizers regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experimentia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

HSU, T.C., JOHNSTON, D.A., CHERRY, L.M., RAMKISSOON, D., SCHANTZ, S.P., JESSUP, J.M., WINN, R.J., SHIRLEY, L., FURLONG, C. Sensitivity to genotoxic

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, v.43, p.403-409, 1989.

HUANG, D.P., LO, K-W., CHOI, P.H.K., NG, A.Y.T., TSAO, S-Y., YIU, G.K.C., LEE, J.C.K. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.54, p.91-99, 1991.

HUMAN GENE MAPPING 11. London Conference, 1991. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.58, 2200p., 1991.

HUNTER, T. Cooperation between oncogenes. **Cell**, v.64, p.249-270, 1991.

ISCN: **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature** (1985). HARDEN, D.C., PATH, F.R.C., KLINGER, H.P. (eds.). Karger, Basel, 117p.

ISCN: **Guidelines for Cancer Cytogenetic Supplement to an International System for Human Cytogenetic Nomenclature** (1991). MITELMAN, F. (ed.). Karger, Basel, 96p.

ISHITOYA, J., TORIYAMA, M., OGUCHI, N., KITAMURA, K., OHSHIMA, M., ASANO, K., YAMAMOTO, T. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Br. J. Cancer**, v.59, p.559-562, 1989.

ISSING, W.J., WUSTROW, T.P., HEPPT, W.J. Oncogenes related to head and neck cancer. **Anticancer Res.**, v.13, p.2541-2551, 1993.

KAMB, A., GRUIS, N.A., WEAVER-FELDHAUS, J., LIU, Q., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S.V., STOCKERT, E., DAY III, R.S., JOHNSON, B.E., SKOLNICK, M.H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science**, v.264, p.436-440, 1994.

KEARSLEY, J.H., BRYSON, G., BATTISTUTTA, D., COLLINS, R.J. Prognostic importance of cellular DNA content in head-and-neck squamous-cell cancers. A comparison of retrospective and prospective series. **Int. J. Cancer**, v.47, p.31-37, 1991a.

KEARSLEY, J.H., LEONARD, J.H., WALSH, M.D., WRIGHT, G.R. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Pathology**, v.23, p.189-194, 1991b.

KELLEY, M.J. & JOHNSON, B.E. Genetic mechanisms of solid tumor oncogenesis. **Adv. Intern. Med.**, v.39, p.93-122, 1994.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res.** v.45, p.1437-1443, 1985.

KNUDSON, A.G. Antioncogenes and human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.10914-10921, 1993.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

KOVACS, C. & BRUSA, P. Clonal chromosome aberrations in normal kidney tissue from patients with renal cell carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.37, p.289-290, 1989.

KOWALSKI, L.P. & FRANCO, E.L. Epidemiologia do câncer no Brasil e no Mundo. In: SCHWARTSMANN e Cols. **Oncologia Clínica: Princípios e Prática.** Porto Alegre: Artes Médicas. Capítulo 1, p.19-30, 1991.

LANZI, C., BORRELLO, M.G., BONGARZONE, I., MIGLIAZZA, A., FUSCO, A., GRIECO, M., SANTORO, M., GAMBETTA, R.A., ZUNINO, F., DELLA PORTA, G., PIEROTTI, M.A. Identification of the product of two oncogenic rearranged forms of the RET protoncogene in papillary thyroid carcinomas. **Oncogene**, v.7, p.2189-2194, 1992.

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

LATIF, F., FIVASH, M., GLENN, G., TORY, K., ORCUTT, M.L., HAMPSCH, K., DELISIO, J., LERMAN, M., COWAN, J., BECKETT, M., WEICHSELBAUM, R. Chromosome 3p deletions in head and neck carcinomas: statistical ascertainment of allelic loss. **Cancer Res.**, v.52, p.1451-1456, 1992.

LEE, J.S., PATHAK, S., HOPWOOD, V., TOMASOVI, B., MULLINS, T.D., BAKER, F.L., SPITZER, G., NEIDHART, J.A. Involvment of chromosome 7 in primary lung tissue. **Cancer Res.**, v.47, p.6349-6352, 1987.

LEE, W.H., BOOKSTEIN, R., HONG, F., YOUNG, L.J., SHEW, J.Y., LEE, E.Y.H.P. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. **Science**, v.235, p.1394-1399, 1987.

LEONARD, J.H., KEARSLEY, J.H., CHENEVIX-TRENCH, G., HAYWARD, N.K. Analysis of gene amplification in head-and-neck squamous-cell carcinomas. **Int. J. Cancer**, v.48, p.511-515, 1991.

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

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.

LOTHE, R.A., FOSSLI, T., DANIELSEN, H.E., STENWIG, A.E., NESLAND, J.M., GALLIE, B., BORRESEN,A.L. Colorectal tumours examined for genetic changes at chromosomes 13 and 17, with specia reference to the RB1 and TP53 genes. In: **3rd European Workshop on Cytogenetics and Moleculaar Genetics of Human Solid Tumors, 3, 1992, Porto/Espino-Portugal.** Programme and Abstracts. Porto/Espino, p.20, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

MAESTRO, R., GASPAROTTO, D., VUKOSAVLJEVIC, T., BARZAN, L., SULFARO, S., BOIOCCHI, M. Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. **Cancer Res.**, v.53, p.5775-5779, 1993.

MARK, J., EKEDAHL, C., DAHLENFORS, R., WEDELL, B. Cytogenetical observations in five human anaplastic thyroid carcinomas. **Hereditas**, v.107, p.163-174, 1987.

MARK, J., DAHLENFORS, R., STENMAN, G., BENDE, M., MELÉN, I. Cytogenetical observations in two cases of polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands. **AntiCancer Res.**, v. 12, p. 1195-1198, 1992.

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.**, v58, p.5-102, 1991.

MERRITT, W.D., WEISSLER, M.C., TURK, B.F., GILMER, T.M. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the Head and Neck. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.116, p.1394-1398, 1990.

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

MITELMAN, F. (1985). **Catalogue of chromosome aberrations in cancer**. 2.ed. New York: Alan R. Liss, 1985. 5v., 701p.

--- **Catalogue of chromosome aberrations in cancer.** 4.ed. New York: Wiley-Liss, 1991, 2v., 1987p.

--- Patterns of chromosome variation in neoplasia. In: **Chromosomal aberrations.** Obe, G. Natarajan, A.T. (Ed.) New York: Springer-Verlag, p.86-100, 1990.

MITELMAN, F. & HEIM, S. Consistent involvement of only 71 of the 329 chromosomal bands of the human genome in primary neoplasia-associated rearrangements. **Cancer Res.**, v.48, p.7115-7119, 1988.

MOORHEAD, P.S. Virus effects on host chromosomes. **In: Genetics concepts and neoplasia**, The Williams and Wilkins Company, p.282-306, 1970.

MÜLLER, O.B. Processos inflamatórios e outras lesões das glândulas salivares. In: BRANDÃO, L.G. & FERRAZ, A.R. **Cirurgia de Cabeça Pescoço.** Volume I - Princípios Básicos. Livraria Roca, São Paulo, p.249-256, 1989.

MÜLLER, D., BREATHNACH, R., ENGELMANN, A., MILLON, R., BRONNER, G., FLESCH, H., DUMONT, P., EBER, M., ABECASSIS, J. Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. **Int. J. Cancer**, v.48, p.550-556, 1991.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

NAGATA, Y., ABE, M., KOBAYASHI, K., YOSHIDA, K., ISHIBASHI, T., NADE, T., NAKAYAMA, E., SHIKU, H. Glycine to aspartic acid mutations at codon 13 of the c-K-ras gene in human gastrointestinal carcers. **Cancer Res.**, v.50, p.480-482, 1990.

NAMBA, H., YAMASHITA, S., PEI, H.C., ISHIKAUWA, N., VILLADOLID, M.C., TOMINAGA, T., KIMURA, H., TSURUTA, M., YOKOYAMA, N.N. Lack of ptc gene (ret protoncogene rearrangement) in human thyroid tumors. **Endocrinol. Jnp.**, v.38, p.627-632, 1991.

NORDENSON, I., BECKMAN, L., LIDÉN, S., STJERNBERG, N. Chromosomal aberrations and cancer risk. **Hum. Herd.**, v.34, p.76-81, 1984.

NORDKVIST, A., EDSTROM, S., MARK, J., STENMAN, G. Multiple unrelated chromosome abnormalities in a metastatic mucoepidermoid carcinom of the parotid gland. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.61, p.158-161, 1992.

OSELLA, P., CARLSON, A., WYANDT, H., MILUNSKY, A. Cytogenetic studies of eight squamous cell carcinomas of the head and neck: Deletion of 7q, a possible primary chromosomal event. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.59, p.73-78, 1992.

OTTO, R.A., BOWES, A.K. Neck asses: benign or malignant? **Postgrad. Med.**, v.88, p.199-204, 1990.

PARISE-JÚNIOR, O, BRANDÃO, L.G., FERRAZ, A.R. Epidemiological aspects of the nasopharyngeal carcinoma. **Rev. Bras. Cirur. Cabeça Pesc.**, v.16, p.31-34, 1992.

PEJOVIC, T., HEIM, S., ORNDAL, C., JIN, Y., MANDAHL, N., WILLEN, H., MITELMAN, F. Simple numerical chromosome aberrations in well-differentiated malignant epithelial tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.49, p.95-101, 1990.

PIEROTTI, M.A., SOZZI, G., BONGARZONE, I., GRECO, A., DELLA PORTA, G. (1992). Chromosome rearrangements and oncogene activation in thyroid tumors. **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.133, 1992.

RAVINDRAN, A., VIJAYAKUMAR, T., SUDHA, L., REMANI, P., VASUDEVAN, D.M., STEPHEN, J., KRISHAN NAIR, M. Chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the human oral cavity. **Neoplasma**, v.37, p.191-197,1990.

RIVIÉRE, A., WILCKENS, C., LÖNING, T. Expression of c-erbB-2 and c-myc in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck and the lower female genital tract**. J. Oral Pathol. Med.**, v.19, p.408-413, 1990.

ROCHA, P. & ROCHA-JÚNIOR, P. Tumores benignos das glândulas salivares maiores. In: BRANDÃO, L.G. & FERRAZ, A.R. **Cirurgia de Cabeça Pescoço.** Volume I - Princípios Básicos. Livraria Roca, São Paulo, p.217-230, 1989.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

ROGATTO, S.R. & CASARTELLI, C. Cytogenetic analysis of human meningiomas. **Rev. Bras. Genet.**, v.11, p.720-744, 1988.

ROQUE, L., SOARES, P., GOMES, P., CORREIA, C., CARRELO, C., CLODE, A., CASTEDO, S., SOARES, J. Cytogenetic study of 20 malignant thyroid tumors. **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.135, 1992a.

ROQUE, L., SOARES, P., GOMES, P., CORREIA, C., CARRELO, C., CLODE, A., CASTEDO, S., SOARES, J. Thyroid adenomas: evidence for the existence of at least 3 cytogenetic subgroups. **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.136, 1992b.

ROQUE, L., SOARES, P., GOMES, P., CORREIA, C., CARRELO, C., CLODE, A., CASTEDO, S., SOARES, J. Thyroid nodular hyperplasia: chromosomal studies in 14 cases. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.69, p.31-37, 1993a.

ROQUE, L., CASTEDO, S., CLODE, A., SOARES, J. Deletion of 3p25->pter in a primary follicular thyroid carcinoma and its metastasis. **Gene Chromosome Cancer**, v.8, p.199-203, 1993b.

RÜMMELEIN, B., DRIESCHNER, O., EHLERT, U., WEICHENTHAL, M., BRITBART, E.W., RÜDIGER, H.W. Increased mutagen sensitivity in human cultured fibroblasts with constitutively high micronucleus levels. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.58, p.186-190, 1992.

SALTMAN, D., ROSS, F.M., FANTES, J.A., ALLSHIRE, R., TURNER, G.E., EVANS, H.J. Telomeric assosiations in a lymphoblastoide cell line from a patient with B-cell follicular lymphoma. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.50, p.230-233, 1989.

SANDBERG, A.A. Aplication of cytogenetics in neoplastic diseases. **CRC: Critical Rev. Clin. Lab. Science**, v.22, p.219-274, 1985.

--- Chromosome changes in bladder cancer: Clinical and other correlations. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.19, 163-175, 1986.

--- Chromosomal lesions and solid tumors. **Hosp. Pract.**, v.23, p.93-106, 1988.

--- **The chromosomes in human cancer and leukemia.** 2.ed., New York: Elsevier, 1990, 1315p.

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

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

SCHANTZ, S.P. & HSU, T.C. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. **Head & Neck**, v.11, p.337-342, 1989.

SCHANTZ, S.P., HSU, T.C., AINSLIE, N., MOSER, R.P. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. **JAMA**, v.262, p.3313-3315, 1989.

SCULLY, C. Oncogenes, tumour suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v.22, p.337-347, 1993.

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.

SHENG, Z.M., BARRIOS, M., KLIJANIENKO, J., MICHEAU, C., RICHARD, J.M., RIOU, G. Analysis of the c-Ha-ras-1 gene for deletion, mutation, amplification and expression in lymph node metastases of human head and neck carcinomas. **Br. J. Cancer**, v.62, p.398-404, 1990.

SMITH, D.I. & ALONSO, M.del M. Cloning of tumor suppressor genes involved in solid tumor development. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.119, p.1210-1216, 1993.

SOARES, P., ROQUE, L., WYNFORD-THOMAS, D., CASTEDO, S., SOARES, H., SOBRINHO-SIMÕES, M. Rearrangements of ret protoncogene in papillary thyroid carcinomas. **3rd Europeam Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours,** Porto/Espino (Portugal), April 1992. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.63, p.136, 1992.

SOINI, Y., KAMEL, D., NUORVA, K., LANE, D.P., VAHAKANGAS, K., PAAKKO, P. Low p53 protein expression in salivary gland tumours compared with lung carcinomas. **Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.**, v.421, p.415-420, 1992.

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

SOMERS, K.D., CARTWRIGHT, S.L., SCHECHTER, G. Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. **Oncogene**, v.5, p.915-920, 1990.

SOZZI, G., MIOZZO, M., CARIANI, T.C., BONGARZONE, I., PILOTTI, S., PIEROTTI, M.A., DELLA PORTA, G. A t(2;3)(q12-13;p24-25) in follicular thyroid adenomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.64, p.38-41, 1992.

SOZZI, G., BONGARZONE, I., MIOZZO, M., BORRELLO, M.G., BUTTI, M.G., PILOTTI, S., DELLA PORTA, G., PIEROTTI, M.A. A t(10;17) translocation creates the RET/PTC2 chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. **Gene Chromosome Cancer**, v.9, p.244-250, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

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

STENMAN, G., SAHLIN, P., MARK, J., CHAGANTI, R.S.K., KINDBLOM, L.-G., AMAN,P. The 12q13-15 translocation breakpoints in pleomorphic adenoma and clear-cell sarcoma of tendons and aponeuroses are different from that myxoid lipossarcoma. **Gene Chromosome Cancer**, v.7, p.178-180, 1993.

STENMAN, G., SANDROS, J., MARK, J., NORDKVIST, A. High p21ras expression levels correlate with chromosome 8 rearrangements in benign human mixed salivary gland tumors. **Gene Chromosome Cancer**, v.1, p.59-66, 1989.

SUMNER, A.T. A sample technique for demonstrating centromeric heterocromatin. **Exptl. Cell Res.**, v.75, p.304-306, 1972.

TEYSSIER, J.R. The chromosomal analysis of human solid tumors: A triple challenge. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.37, p.103-125, 1989.

TEYSSIER, J.R. & FERRE, D. Frequent clonal chromosomal changes in human non-malignant tumors. **Int. J. Cancer**, v.44, p.828-832, 1989.

THARAPEL, S.A. , LESTER, E.P. Two simple translocations in a primary squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.47, p.131-134, 1990.

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

TOMMERUP, N. & LOTHE, R. Constitucional ring chromosomes and tumour suppressor genes. **J. Med. Genet.**, v.29, p.879-882, 1992.

TRENT, J.M., KANEKO, Y., MITELMAN, F. Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.51, p.533-562, 1989.

TSUCHIYA, H., TOMITA, Y., SHIRASAWA, H., TANZAWA, H., SATO, K.,SIMIZU, B. (1991). Detection of human papillomavirus in head and neck tumors with DNA hybridization and ammunohistochemical analysis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.71, p.721-725, 1991.

VAN DYKE, D.L., WORSHAM, M.J., BENNINGER, M.S., KRAUSE, C.J., BAKER, S.R., WOLF, G.T., DRUMHELLER, T., TILLEY, B.C., CAREY, T.E. Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region. **Gene Chromosome Cancer**, v.9, p.192-206, 1994.

VARELLA-GARCIA, M. & TAJARA, E.H.. **Métodos para Análise de Cromossomos Humanos: Manual Básico de Protocolos.** IBILCE-UNESP. 60p., 1991.

VAYEGO, S.A. **Estudo cromossômico em células cultivadas de lesões ósseas.** São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1993. 82p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP, 1993.

VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Tig April**, v.9, p.138-141, 1993.

VOKES, E.E., WEIXHSELBAUM, R.R., LIPPMAN, S.M., HONG, W.K. Head and Neck cancer. **N. Engl. J. Med.**, v.328, p.184-194, 1993.

VONSOVER, A., RECHAVI, G., KESLER, A., RAPAPORT, Y., BROK-SIMONI, F., MILEGUIR, F., RAMOT, B., GOTLIEB-STEMATSKY, T. EBV genome and immunoglobulin gene rearrangement in the differential diagnosis of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma. **Med. Pediat. Oncol.**, v.19, p.246-252, 1991.

WARTOFSKY, L. & INGBAR, S.H. Diseases of thyroid. In: **Harrison's principles of internal medicine**. Edt Wilson JD, 12a. Ed., New York, Mcgraw-Hill Inc, p.1692-1712, 1991.

WATTS, S.L., BREWER, E.E., FRY, T.L. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.,** v.71, p.701-707, 1991.

WEICHSELBAUM, R.R., DUNPHY, E.J., BECKETT, M.A., TYBOR, A.G., MORAN, W.J., GOLDMAN, M.E., VOKES, E.E., PANJE, W.R. Epidermal growth factor receptor gene amplification expression in head and neck cancer cell lines. **Head & Neck**, v.11, p.437-442, 1989.

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

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

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

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

YOKOTA, J., SUGIMURA, T., TERADA, M. Chromosomal localization of putative tumor-suppressor genes in several human cancers. **Environ. Health Perspect.**, v.93, p.121-123, 1991.

YOUNG, R.C. Cancer prevention. **Arch. Otolaryngol. Head and Neck Surg.**, v.119, p.732-734, 1993.

ZANG, K.D. & SINGER, H. Chromosomal constituition of meningiomas. **Nature**, v.216, p.84-85, 1967.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

ZASLAV, A-L., STAMBERG, J., STEINBERG, B., LIN, Y. J., ABRAMSON, A. Cytogenetic analysis of head and neck carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.56, p.181-187, 1991.

VIII. APÊNDICE

VIII.1. Meios de cultura e soluções utilizadas

a. Meios de cultura

a1. Meio Ham F-10 incompleto (SIGMA)

- 9,8g do pó de meio de cultura e 0,6g de bicarbonato de sódio diluídos em 1000ml de água desionizada autoclavada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada em volumes de 100ml a 4ºC por um período aproximado de 30 dias.

a2. Meio Ham F-10 incompleto (CULTILAB)

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

a3. Meio Ham F-10 completo

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

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

b. Solução salina de Hanks sem Ca e Mg

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

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

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 4ºC, por períodos de até seis meses.

b1. Para transporte das amostras



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

b2. Para lavagem das amostras

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

c. Antibióticos

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

A solução de uso foi obtida a partir de:
- 0,5ml de solução-mãe de penicilina (concentração de 1.000.000U/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril
-1ml de solução-mãe de estreptomicina (concentração de 500.000ug/ml)preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril
- 38,5ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

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

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

A solução de uso foi obtida a partir de:
- 0,5ml de solução-mãe de penicilina (concentração de 1.000.000U/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril
- 0,5ml de solução-mãe de quemicetina (concentração de 40.000ug/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril
- 39ml 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.

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

A solução de L-glutamina foi obtida diluindo-se:
- 2,92g de L-glutamina em 100ml de solução de Hanks sem Ca e Mg
Após a esterilização por filtração, foi estocada a -20ºC por 1 ano.

e. Solução de insulina (BIOBRÁS U-40)

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

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

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

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

A solução de anfotericina foi preparada diluindo-se:
- 50mg de anfotericina B em 10ml de água desionizada estéril
A solução foi estocada a -20ºC por um período aproximado de 6 meses.

h. Solução de colagenase (GIBCO-TIPO II) (2000U/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 37ºC por duas horas e, em seguida, a 4ºC por 12 a 14 horas. A solução foi, então, esterilizada por filtração e estocada a -20ºC por dois a três meses.

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

- 1,0mg de colquicina (uma pérola)
- 60ml de água desioniozada estéril
A solução foi distribuída em frascos escuros, que foram autoclavados por 30 minutos e estocados a 4ºC por até seis meses.

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

A solução de colcemide foi preparada a partir de :
- 100ug de colcemide em 10ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução-mãe 10ug/ml).Foi estocada a -20ºC após filtração, por um período aproximado de um ano.
- 2ml de solução-mãe de colcemide em 10ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução de uso 2ug/ml). Foi estocada a 4ºC por um período aproximado de seis meses.

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

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

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

l. Fixador

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

Foi preparada minutos antes do uso.

m. Tampão Sorensen, pH 6,8

Foi preparado a partir de :
- 49ml de solução A
- 51ml de solução B
- 200ml de água desionizada

Foi mantido a 4°C por no máximo seis meses

m1. Solução A

- 14,196g de difosfato de sódio (Na_2PO_4)
- 500ml de água desionizada

m2. Solução B

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

n. Soluções de tripsina

n.1. Solução de tripsina (BIOBRÁS ou DIFCO) para bandamento cromossômico (1mg/ml)

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

n.2. Solução de tripsina/EDTA (CULTILAB) para repique de culturas e para bandamento cromossômico.

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

o. Solução salina de PBS

A solução foi preparada dissolvendo-se:
- 8g de NaCl
- 0,2g de KCl
- 1,15g de difosfato de sódio (Na_2HPO_4)
- 0,2g de monofosfato de potássio (KH_2PO_4)
- 1000ml de água desionizada

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

p. Solução salina 2 x SSC

- 8,765g de NaCl
- 4,41g de $C_6H_5Na_3O_7$
- 500ml de água desionizada

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

q. Solução de hidróxido de bário (5%)

- 3,0g de $Ba(OH)_2.8H_2O$
- 60ml de água desionizada na temperatura de 50-60°C

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

r. Solução reveladora

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

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

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

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

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

t. Corante Giemsa (MERCK) (2%)

A solução- mãe foi obtida dissolvendo-se:

- 0,5g de Giemsa em 33ml de glicerina durante duas horas a 60°C em banho-maria. Após esfriamento, foram adicionados 33ml 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 0,5ml da solução-mãe em 24,5ml de tampão Sorensen, imediatamente antes do uso.

unesp


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
1 12 13 14 15 16 17 18