Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

Estudo Citogenético em Tumores de Pele

unesp

1910000605

Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

576.3:575:616-006.6
O98e
Não catalogada

ESTUDO CITOGENÉTICO EM TUMORES DE PELE

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
605/93

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Genética no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP.

Orientadora: Profª. Drª. Elenara Helena Tajara da Silva

São José do Rio Preto - SP

1991

Orientador: Profª. Drª. Eloiza Helena Tajara da Silva

Este trabalho foi realizado 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 "Júlio de Mesquita Filho", com auxílio do CNPq, da FUNDUNESP e da bolsa da CAPES.

É preciso iniciar o que deve ser feito,
com vontade de ter êxito, mas sabendo que
os limites humanos nos trarão sempre uns
cinquenta por cento de fracassos.

T. SUAVET

Dedico

Ao meu Amor e companheiro Hitochi, pela paciência e renúncia em todos esses anos.

Ao Danilo, meu filhinho querido por todos os sacrifícios a que o submeti.

À minha família por ter possibilitado o meu ingresso no mundo da Ciência.

AGRADECIMENTO

Ao final de mais esta jornada da minha vida, agradeço à todos que de alguma forma colaboraram para sua execução e conclusão.

Agradeço em especial à minha orientadora e amiga Profª Drª Eloiza Helena Tajara pelos anos de orientação, pelos estímulos nos momentos mais difíceis e pela paciência que sempre demostrou ao nos receber.

À Profª Drª Marileila Varella Garcia por ter me iniciado na pesquisa em Citogenética Humana, sempre me incentivando e auxiliando nos momentos mais difíceis e também pela revisão e sugestões valiosas da pró-forma.

À Profª Drª Ângela Morgante pelo tempo dispensado à leitura e a entrevista da pró-forma, e por todas as sugestões.

À grande amiga e companheira de Pós-Graduação Mary Massumi Itoyama pelo trabalho de digitação da minha dissertação e por todos os favores que tem nos prestado, sempre solícita e incansável.

À Nilce Barril Gama, amiga e companheira em todos os momentos de implantação da técnica de cultivo de tumores sólidos e execução do projeto de pesquisa.

Aos professores do Departamento de Biologia, pela amizade e transmissão de conhecimento.

Aos Amigos de Pós-Graduação e estagiários do Departamento de Biologia pelo companheirismo, amizade e apoio em todas as horas.

Aos amigos Josué e Rosana pela ajuda técnica e pela amizade.

À Dna Luiza e ao Sidnei pelos bons momentos que nos proporcionaram durante a fase de análise microscópica.

Aos funcionários do Departamento de Biologia por todos os favores prestados.

Aos amigos da seção de Pós-Graduação, da Biblioteca, da Gráfica e da Computação, pela paciência e dedicação com que sempre me atenderam.

Aos médicos do Departamento de Cirurgia Plástica da FUNFARME pelo envio das amostras de tumores.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

I.1. Tumores de Pele: Definição e Classificação 1

I.2. Citogenética e Câncer 11

I.3. Genes e Câncer 17

I.4. Objetivos 23

II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Material 24

B. Métodos 24

III. RESULTADOS 29

IV. DISCUSSÃO 65

V. RESUMO 83

VI. SUMMARY 85

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

VIII. APÊNDICE 102

I. INTRODUÇÃO

I.1. Tumores de Pele: Definição e Classificação

Os tumores de pele são os neoplasmas que mais frequentemente afetam o homem e diferentes espécies de mamíferos. Os exemplos mais importantes desse grupo de doenças são o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular e o melanoma. Do mesmo modo que outras neoplasias, esses tumores compreendem massas anormais de tecido cujo crescimento é desordenado, ultrapassa o dos tecidos normais e persiste mesmo depois de terem cessado os estímulos desencadeantes do processo (ROBBINS et al., 1986). Do ponto de vista histológico, podem atingir qualquer um dos três componentes principais da pele, ou seja, o epitélio da superfície ou epiderme, o tecido conjuntivo ricamente vascularizado e inervado que constitui a derme e uma série de estruturas anexas, como os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (KLEIN-SZANTO, 1989).

A epiderme é um epitélio estratificado de origem ectodérmica, que se caracteriza pela renovação contínua da maioria dos elementos superficiais através da proliferação de sua amada mais profunda, a camada basal ou germinativa, constituída por células prismáticas ou cubóides. Tais células estão separadas da derme por uma fina lâmina de material protéico, a lâmina basal, e sua divisão, migração e diferenciação originam células suprabasais que constituem a camada espinhosa. Em consequência do processo de diferenciação, essas células perdem gradativamente suas organelas, tornam-se achatadas, com núcleos pequenos e condensados e adquirem grânulos citoplasmáticos ricos em filagrina, uma proteína que tem

importante papel na agregação e homogeinização dos filamentos de queratina. Constituindo a camada córnea, no estágio final da diferenciação e migração, estão células extremamente achatadas, mortas e sem núcleos, que mostram no citoplasma acúmulo de queratina, uma escleroproteína filamentosa formada por cadeias ricas em ligações dissulfeto. A epiderme, além das células epiteliais ou queratinócitos, contém células dendríticas como as de Langerhans, que são derivadas da medula óssea e envolvidas na resposta imune, as de Merkel, provavelmente de origem neuroectodérmica e com funções neuroendócrinas, e os melanócitos, que sintetizam o pigmento melanina e derivam da crista neural. Na porção mais profunda da pele, entre a epiderme e o tecido subcutâneo adiposo, fica a derme, um tecido conjuntivo frouxo, de origem mesodérmica, que contém os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas formados a partir de invaginações da epiderme, além de numerosos nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (KLEIN-SZANTO, 1989; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Vários estudos epidemiológicos mostraram evidências de uma relação direta entre a exposição à luz solar e alguns tipos de câncer de pele, como o carcinoma baso e espinocelular e, possivelmente, o melanoma. Por exemplo, a maioria desses tumores surge em regiões expostas do organismo, e as taxas de incidência e mortalidade observadas são inversamente proporcionais às latitudes terrestres. Além disso, indivíduos de pele clara ou que apresentam tendência para queimaduras solares são mais afetados, do mesmo modo que portadores de várias doenças hereditárias, como o albinismo, que possuem níveis menores de proteção à ação da luz solar (ELWOOD et al., 1989).

Diferentes estudos têm sugerido que os raios ultra-violeta (UV) são os principais responsáveis pelo desencadeamento do processo maligno nesses casos. Um dos mais fortes argumentos a favor dessa idéia provém de estudos em doenças com deficiências herdadas da capacidade de reparo das lesões do DNA induzidas por UV e grande susceptibilidade ao câncer de pele, como é o caso do xeroderma pigmentoso. Embora o processo da fotocarcinogênese se inicie com a absorção de energia pelo DNA da célula epidérmica e, provavelmente, com as lesões desencadeadas na molécula, os danos subsequentes causados no genoma e na expressão gênica não estão bem estabelecidos, do mesmo modo que sua influência sobre a competência imunológica que regula o aparecimento de células malignas (BURNS et al., 1989; FRY & LEY, 1989). Mecanismos análogos podem estar envolvidos no desenvolvimento de câncer de pele por radiação ionizante ou por agentes químicos, tais como o alcatrão e o arsênico (ELWOOD et al., 1989). Entretanto, independente da natureza do carcinógeno, os efeitos produzidos por eles provavelmente acumulam-se ao longo do tempo, o que deve ser responsável, em grande parte, pela incidência maior da doença entre os indivíduos idosos de diferentes populações (KLEIN-SZANTO, 1989).

De modo geral, as neoplasias cutâneas podem ser classificadas em benignas ou malignas, de acordo com o seu comportamento. Os tumores benignos geralmente apresentam um crescimento lento e são envoltos por uma cápsula fibrosa que impede sua disseminação para outras áreas do organismo. Em contraste, os neoplasmas malignos, mais conhecidos como cânceres, são caracterizados por um crescimento acelerado e suas células mostram superfície alterada de modo a permitir sua infiltração entre os

constituintes dos tecidos normais circundantes e a destruição dos mesmos, sua penetração nos vasos sanguíneos e linfáticos, e sua movimentação até locais distantes formando colônias secundárias ou metastáticas (ROBBINS et al., 1986; BOUTWELL, 1989).

A histogênese das neoplasias cutâneas tem sido inferida da arquitetura histológica da lesão e também de marcadores bioquímicos ou histoquímicos. Desse modo, supõe-se que os tumores com diferenciação sebácea surgem de glândulas sebáceas e aqueles com diferenciação pilosa surgem de folículos pilosos. Entretanto, no caso do carcinoma basocelular, apesar de seus constituintes se assemelharem à célula basal da epiderme, a maioria dos dermatologistas concorda que sua origem esteja na camada externa dos folículos, primeiramente porque nunca foi observado em áreas desprovidas de pêlo e, em segundo lugar, por conter citrulina, um aminoácido encontrado exclusivamente em tais estruturas anexas (KLEIN-SZANTO, 1989).

Os critérios usados para a nomenclatura dos tumores de pele são os mesmos aplicados em relação às outras neoplasias. A terminologia das lesões benignas é feita acrescentando-se o sufixo **oma** ao tecido que as constitui, como no caso dos lipomas e hemangiomas, que atingem as células gordurosas e os vasos sanguíneos da pele, respectivamente. Nos tumores benignos epiteliais, que são citologicamente semelhantes entre si, a classificação é variada e baseia-se algumas vezes na célula de origem, outras vezes no padrão histológico ou nas características macroscópicas. É o caso dos papilomas, que produzem projeções macro ou microscópicas em dedo de luva a partir do epitélio de superfície, e dos adenomas, que formam arranjos glandulares ou que derivam de glândulas. Os tumores

malignos originados de células epiteliais são chamados carcinomas, enquanto aqueles de origem mesenquimal recebem o sufixo **sarcoma** após a designação do tipo celular ou tecido envolvido, como o lipossarcoma, o fibrossarcoma e o angiossarcoma, entre outros (ROBBINS **et al.**, 1986).

A Tabela 1 mostra a classificação dos tumores benignos e malignos de pele e as estruturas atingidas, de acordo com KLEIN-SZANTO (1989), com modificações. Alguns exemplos desses tumores serão descritos a seguir.

O carcinoma ou epitelioma basocelular é a neoplasia cutânea mais comum e pode ocorrer em qualquer área do tegumento, mas é mais frequente na face (SMITH & IRONS, 1983; LOPES **et al.**, 1987). Em geral, apresenta-se como um nódulo ulcerado e afeta as pessoas idosas e de pele clara, provavelmente em virtude da exposição crônica à luz solar (KLEIN-SZANTO, 1989). Histologicamente é constituído por pequenas células arredondadas, semelhantes aos queratinócitos basais, que exibem núcleos alongados e volumosos e estão dispostas na periferia dos lóbulos tumorais formando um padrão de "paliçada" (ROBBINS **et al.**, 1986). Essas células apresentam pequeno pleomorfismo e raras mitoses, razão pela qual a lesão manifesta um crescimento destrutivo extremamente lento, raramente produz metástases e, em alguns casos, sofre regressão espontânea (ROBBINS **et al.**, 1986; KLEIN-SZANTO, 1989). O carcinoma basocelular pode ser classificado em várias entidades clínicas e patológicas dependendo da estrutura histológica predominante. Assim, pode ser subdivido nos tipos cístico, adenóide e queratinizante, com estrutura cística, glandular ou queratinosa, respectivamente, e no tipo sólido, que se caracteriza pela presença de células sem

Tabela 1. Classificação dos tumores benignos e malignos de pele e estruturas atingidas, segundo KEIN-SZANTO (1989), com modificações.

Componente da pele	Tumores	
	Benignos*	Malignos**
EPIDERME		
Queratinócitos	Papilomas Ceratose seborréica	Carcinoma espinocelular
Células de Langerhans	Histiocitose benigna	Histiocitose maligna
Melanócitos	Lentigo simplex	Melanoma maligno
Células de Merkel		Carcinoma das células de Merkel
ESTRUTURAS ANEXAS		
Folículos pilosos	Tricofoliculoma Tricoadenoma Tumor do infundíbulo folicular Ceratose Triquilemoma Pilomatricoma Cisto epidérmico	Tricoepitelioma Carcinoma basocelular
Glândulas sebáceas	Adenoma sebáceo	Carcinoma sebáceo
Glândulas sudoríparas	Poroma écrino Adenoma tubular Hidroadenoma Cistoadenoma Adenoma papilífero Siringoma	Carcinoma écrino Carcinoma apócrino
DERME		
Tecido conjuntivo	Fibroma, Lipoma, etc	Fibrossarcoma, Liposssarcoma, etc
Vasos sanguíneos	Hemangioma	Hemangiossarcoma
Vasos linfáticos	Linfangioma	Linfangiossarcoma
Nervos	Neurinoma	Schwannoma maligno
Melanócitos	Nevos	Melanoma maligno

* Incluindo tumores pré-malignos e ** de baixo grau de malignidade

qualquer padrão de diferenciação (BAKER & BERGGREN, 1983; LOPES et al., 1987; KLEIN-SZANTO, 1989).

O carcinoma espinocelular ou carcinoma epidermóide é o segundo câncer de pele em frequência e pode ocorrer em qualquer sítio do tegumento, preferencialmente na face, dorso das mãos, orelhas e mucosas de pessoas idosas. Apresenta-se geralmente como um nódulo duro e queratinizado, com a região central ulcerada e um diâmetro próximo a 2 cm. Vários fatores têm sido implicados em sua etiologia, tais como exposição crônica à luz solar, radiação ionizante, carcinógenos químicos, trauma e viroses. Na maioria das vezes desenvolve-se a partir de lesões pré-cancerosas, como a ceratose senil e as lesões do xeroderma pigmentoso, ou ainda de úlceras crônicas e cicatrizes de queimadura. Sua evolução é rápida, com potencial metastático baixo mas significativo. Histologicamente é composto de células escamosas ou queratinócitos atípicos, que substituem completamente a epiderme normal e invadem a derme e os tecidos vizinhos (HOLLAND & FREI III, 1982; ROBBINS et al., 1986; KLEIN-SZANTO, 1989).

O carcinoma espinocelular pode ser classificado em três grupos de acordo com a proporção de células diferenciadas e atípicas. No grupo bem diferenciado, a maioria das células está no último estágio de diferenciação e, às vezes, disposta em pequenas ilhotas com queratinização central conhecidas como pérolas córneas. No tipo moderadamente diferenciado, as células são semelhantes às das camadas basal e espinhosa, enquanto no tipo pouco diferenciado a maior parte delas é anaplásica e atípica. Um exemplo do último grupo é o carcinoma de células fusiformes da pele, que pode ser facilmente diagnosticado como sarcoma, ou mais comumente como fibroxantoma

atípico, em virtude de sua pequena diferenciação (KLEIN-SZANTO, 1989).

O melanoma maligno, ou simplesmente melanoma, é a neoplasia da célula produtora de melanina e, em consequência de sua alta taxa de mortalidade, constitui um dos mais temidos tumores de pele. É frequentemente observado na população branca adulta, em áreas do tegumento expostas à luz solar (BACK & BROWN, 1986; KLEIN-SZANTO, 1989, ELWOOD et al., 1989). Sua etiologia é provavelmente multifatorial e a luz solar, em particular a radiação UV, é considerada a principal causa, embora alguns fatores hereditários e endócrinos e a presença de nevos também sejam considerados agentes predisponentes (COCHRAN, 1985; CHANDA, 1986; ROBBINS et al., 1986; SWERDLOW & GREEN, 1987).

As lesões do melanoma compreendem geralmente nódulos de bordos irregulares, com coloração marrom escura quando possuem melanina, ou rósea quando são amelanóticos, e manifestam, às vezes, prurido e sangramento seguidos de dor local (McGOVERN et al., 1986; ROBBINS et al., 1986). Tais lesões afetam os melanócitos encontrados na pele, nas meninges, no trato uveal dos olhos e na mucosa ectodérmica, e são identificadas histopatologicamente pela presença de focos de proliferação de melanócitos atípicos na junção dermo-epidérmica (ELWOOD et al., 1989; REIS, 1990).

Algumas das lesões citadas como benignas na Tabela 1, incluem condições pré-malignas ou que esporadicamente malignizam e entre essas podem servir de exemplos os nevos, as ceratoses solares e os cistos epidérmicos (LEVER & SCHAUMBURG-LEVER, 1990; MACKIE, 1986; KLEIN-SZANTO, 1989).

Os nevos comuns são manchas ou nódulos pigmentados da pele decorrentes da proliferação benigna dos melanócitos epidérmicos. Costumam ser raros em recém nascidos caucasóides, mas crescem em número durante a infância e, em geral, logo depois da adolescência. O principal fator etiológico é a luz solar, porém alguns estudos mostram evidências de que a prevalência dos nevos diminui em indivíduos muito expostos, talvez porque a radiação solar permita o seu desenvolvimento mas, em situações extremas, promova o seu desaparecimento (ELWOOD et al., 1989; PAWLOWSKI & LEA, 1989).

A maioria dos nevos nunca sofre modificações e apenas uma pequena porcentagem evolui para lesões proliferativas chamadas hiperplasias melanocíticas lentiginosas, que podem adquirir atipia nuclear e originar os nevos displásicos (ELWOOD et al., 1989; KLEIN-SZANTO, 1989). Esses últimos constituem lesões pré-malignas, que normalmente manifestam-se em adolescentes ou adultos jovens sob a forma de manchas ou nódulos de contornos irregulares ou assimétricos, pigmentação escura e tamanhos variados. Histopatologicamente podem ser caracterizados pela presença de melanócitos em divisão, atipia citológica, hipercromasia nuclear e pela infiltração linfocítica na derme adjacente à lesão (BRIGGS, 1985; RUITTER et al., 1988; PAWLOWSKI & LEA, 1989). Um tipo é hereditário e constitui a síndrome do nevo displásico, que tem herança autossômica dominante e se caracteriza pela presença de nevos múltiplos e predisposição ao melanoma (CAPORASO et al., 1987; BALE et al., 1989; BRUNS & DRACOPOLI, 1990; SANDBERG, 1990). O gene dessa síndrome já foi mapeado no braço curto do cromossomo 1, na banda 1p36, próximo aos locos da pronatrodilatina e do grupo sanguíneo Rh (GREENE et al., 1983; CLARK, 1988; HECHT & HECHT, 1988;

BALE et al., 1989). Existem muitas evidências de que os nevos congênitos ou adquiridos, sejam eles comuns ou displásicos, apresentam riscos de evoluírem para melanoma maligno (SWERDLOW & GREEN, 1987; RIGEL et al., 1989; STOLZ et al., 1989).

As ceratoses solares, actínicas ou senis são outras lesões pré-malignas que surgem nas áreas expostas da pele de pessoas idosas que sofreram grande exposição aos raios UV, ou tratamento por radiação ou arsênico (KLEIN-SZANTO, 1989). Clinicamente apresentam-se como placas recobertas por escamas secas, pardacentas e ásperas, localizadas preferencialmente no dorso das mãos, ante-braços, face e cabeça de pessoas calvas (MORTON et al., 1990, REIS, 1990). Histologicamente mostram espessamento da camada córnea (hiperceratose) e da camada espinhosa (acantose) e infiltração da epiderme anômala na derme (ROBBINS, et al.,1986; LOPES et al., 1987). O desenvolvimento da lesão é crônico, podendo evoluir, em aproximadamente 25% dos casos, a carcinomas baso ou espinocelulares (MARKS et al., 1988; 1990; KLEIN-SZANTO, 1989).

Os cistos epidérmicos, também conhecidos como cistos de inclusão epidermóide, cistos sebáceos ou epiteliais, são processos benignos comuns da pele que se manifestam sob a forma de nódulos firmes e elásticos localizados na face, pescoço, tronco e couro cabeludo. Histologicamente são lesões revestidas por uma camada de células epidérmicas típicas com interior preenchido por material córneo. Na maioria das vezes os cistos surgem sem causa aparente, seu crescimento é lento e cessa após atingirem um tamanho de 1 a 5 cm de diâmetro. A degeneração maligna já foi descrita, mas é extremamente rara nesses casos (MACKIE, 1986; LEVER & SCHAUMBURG-LEVER, 1990).

Muitos outros tumores benignos e pré-malignos de pele poderiam ser referidos, além dos descritos. Para uma visão detalhada dos aspectos biológicos desses tumores recomendam-se as revisões de KLEIN-SZANTO (1989), LEVER & SCHAUMBURG-LEVER, (1990) e REIS (1990).

I.2. Citogenética e Câncer

A origem da citogenética do câncer data do fim do século XIX quando ARNOLD, em 1879, observou anomalias mitóticas em células tumorais (SANDBERG, 1990). HANSEMAN, em 1890, foi o primeiro a propor que as mitoses assimétricas, presentes em carcinomas estudados por ele, estavam envolvidas na origem e no desenvolvimento do processo neoplásico. Embora questionadas na época, suas idéias e as de outros autores foram reunidas na teoria da mutação somática do câncer, apresentada em 1914 por THEODOR BOVERI (HEIM & MITELMAN, 1987; 1989; SANDBERG, 1990). De acordo com essa hipótese, a célula primordial do processo maligno era uma célula somática com constituição anômala da cromatina, característica essa que levava à perda das propriedades celulares normais (CROCE & KOPROWSKI, 1978).

Por um longo tempo as idéias de BOVERI não puderam ser testadas em neoplasia humana porque, antes disso, era necessário definir o número exato de cromossomos nas células normais do homem, o que só foi possível quarenta anos mais tarde, com o trabalho de TJIO e LEVAN (HEIM & MITELMAN, 1987; SANDBERG, 1990). A partir dessa época, e graças às inovações metodológicas em cultura de tecidos, muitos estudos foram feitos em células cancerosas de mamíferos, inclusive do homem conforme revisto por HSU (1987), e os resultados obtidos sugeriram que as alterações cromossômicas realmente faziam

parte do processo tumoral (HEIM & MITELMAN, 1987).

O achado inicial mais importante foi a descoberta por NOWEL & HUNGERFORD (1960) de um pequeno cromossomo do grupo G, mais tarde conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph^1), em pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC). Essa foi a primeira alteração cromossômica consistente em uma neoplasia humana e, por isso, considerada a causa direta do processo maligno (HEIM & MITELMAN, 1987; ROWLEY, 1990). Entretanto, o entusiasmo inicial logo cedeu às evidências de que essa era uma situação única frente a todas as outras anomalias não específicas dos tumores até então estudados (HEIM & MITELMAN, 1987). Somente anos depois, a introdução das técnicas de bandamento de cromossomos metafásicos e de bandamento de alta resolução permitiu a identificação precisa de muitas alterações cromossômicas em doenças malignas e foi possível fazer associações consistentes entre elas e vários tipos de câncer (HEIM & MITELMAN, 198; 1989; ROWLEY; 1990; SANDBERG, 1990).

As informações acumuladas e o progressivo entendimento biológico do fenômeno neoplásico levaram à utilização dos achados cariotípicos no diagnóstico e prognóstico, bem como no controle da evolução dessas doenças, contribuindo para o sucesso das possíveis terapias (HEEREMA et al., 1985; LE BEAU & ROWLEY, 1986; NOWELL et al., 1986; MITELMAN et al., 1989; SANDBERG, 1990, entre outros). A análise citogenética mostrou-se valiosa, por exemplo, em casos de leucemia mielóide e linfoblástica agudas (LMA e LLA) cujos parâmetros hematológicos convencionais eram inconclusivos. Sua aplicação estendeu-se também à definição de subgrupos com características clínicas específicas, como na LMA associada à inversão do cromossomo 16, inv(16)(p13q22), que apresenta alto risco

de envolvimento do sistema nervoso central, e naquela com monossomia do cromossomo 7, que tem incidência elevada de hemorragia e infecções (SANDBERG, 1990).

Em relação às implicações prognósticas, a leucemia mielóide crônica oferece o melhor exemplo. Os pacientes Ph^1 positivos apresentam sobrevivência média maior que os Ph^1 negativos, além de uma resposta mais eficiente à quimioterapia e períodos significativamente maiores entre o diagnóstico e o desenvolvimento da fase blástica (SANDBERG, 1985; 1990; ROWLEY, 1990). Do mesmo modo, pode ser citado o tipo M2 da leucemia mieloblástica aguda, que mostra uma melhor evolução quando associado à translocação t(8;21) do que quando associado à translocação t(6;9). Os portadores de leucemias linfoblásticas agudas, por sua vez, possuem uma maior sobrevida nos casos com mais de 50 cromossomos nas células malignas, em comparação com aqueles em que são identificadas alterações estruturais (SANDBERG, 1985; 1990; YUNIS & BRUNNING, 1986; BITTER **et al.**, 1987).

A avaliação citogenética tem se mostrado importante também na escolha de uma terapia eficaz. Assim, o subgrupo de LMA com t(15;17) aumenta sua perspectiva de sobrevivência após uma terapia agressiva, enquanto aqueles com monossomia 5 permanecem com um prognóstico muito pobre, independente da intensidade das medidas adotadas (SANDBERG, 1990).

Os portadores de tumores sólidos, especificamente de carcinomas, apresentam índice de mortalidade mais altos que os portadores de neoplasias hematológicas (HEIM & MITELMAN, 1987; TRENT **et al.**, 1990b). Tais tumores possuem, portanto, grande importância clínica mas correspondem apenas a cerca de 21% dos 15.000 neoplasmas

estudados com as técnicas de bandamento cromossômico (MITELMAN, 1991). Isso se deve a vários fatores, como as dificuldades no cultivo de células malignas provenientes dessas lesões, a contaminação dos tecidos tumorais **in vivo** por bactérias, virus ou fungos, o que dificulta ou mesmo impossibilita seu crescimento **in vitro**, e a dificuldade na obtenção de metáfases de boa qualidade para análise (SANDBERG & TURC-CAREL, 1987). Nos tumores sólidos, é também difícil a identificação do evento cariotípico primário porque a maioria das investigações é realizada em estágios avançados da doença, ou frequentemente em lesões metastáticas, quando um grande número de alterações secundárias já ocorreu (HEIM & MITELMAN, 1987; TRENT **et al.**, 1990b). Além disso, as culturas de longa duração, quase sempre utilizadas, nem sempre são representativas do material **in vivo**, já que uma seleção de clones pode ocorrer durante o cultivo (SANDBERG, 1985; HEIM & MITELMAN, 1987).

Apesar dos problemas enfrentados, um grande número de anomalias cromossômicas em lesões sólidas benignas e malignas tem sido identificado, algumas especificamente associadas a um determinado tipo de neoplasia, como a deficiência parcial ou total do cromossomo 22 em meningioma, um tumor benigno do sistema nervoso (ROGATTO & CASARTELLI, 1988). Do mesmo modo que em doenças hematológicas, tem sido tentada a aplicação dos achados citogenéticos no diagnóstico e no prognóstico dessas doenças. Em câncer de bexiga, por exemplo, parece haver correlação entre a presença de cromossomos marcadores e aumento na recorrência do tumor (SANDBERG, 1986; BABU **et al.**, 1991). Também os neuroblastomas, em estágios avançados, mostram incidência maior de alterações no braço curto do cromossomo 1, além de regiões homogeneamente coradas (HSR)

e **double minutes** (DM) (BRODEUR & SEEGER, 1986). Em alguns casos, as alterações têm sido utilizadas para o diagnóstico de neoplasias de natureza indiferenciada, como o sarcoma de Ewing, o rabdomiossarcoma, o adenoma pleomórfico de glândula salivar, o linfoma ósseo e as efusões pleurais de causa desconhecida, nos quais a presença de determinados rearranjos pode auxiliar a sua caracterização (SANDBERG & TURC-CAREL, 1987; BULLERDIEK **et al.**, 1990). De qualquer maneira, o conhecimento na área da citogenética dos tumores sólidos, embora crescendo significativamente na última década, é menor que aquele das leucemias e linfomas, em decorrência principalmente dos problemas metodológicos de cultivo e obtenção de material, como exposto anteriormente (MITELMAN, 1985; 1991; HEIM & MITELMAN, 1987).

A situação dos cânceres de pele nesse contexto é especial. Há facilidade de acesso à lesão para diagnóstico e remoção, o que permite o estudo dos vários estágios da tumorigênese, particularmente os iniciais, quase nunca acessíveis em outros tipos de neoplasias. Além disso, alguns deles constituem os neoplasmas mais frequentes no homem, em especial nos indivíduos de pele clara que sofreram exposições crônicas à luz solar (KLEIN-SZANTO, 1989).

Os melanomas, por exemplo, são os mais estudados e os resultados já obtidos indicam o envolvimento preferencial de determinados cromossomos ou segmentos cromossômicos nesses tumores. As alterações recorrentes, reconhecidas pelo Committee on Chromosome Changes in Neoplasia (MITELMAN **et al.**, 1990), consistem no isocromossomo 6p e em rearranjos das bandas 1p11->p22, 1q11->q12, 6p11->q11, 6q11->q27 e 7q11. As aberrações estruturais do cromossomo 1 são as mais frequentes, apesar de não serem específicas (MITELMAN,

1985), e já foram observadas em linhagens celulares, culturas primárias ou preparações diretas do tumor ou de suas metástases (TRENT et al., 1989a; MITELMAN et al., 1990).

Depois do cromossomo 1, o cromossomo 6 é o mais consistentemente envolvido em anomalias estruturais no melanoma e, embora alguns casos mostrem alterações do braço curto (DASGUPTA et al., 1989; TRENT et al., 1989a), a maioria deles manifesta translocações e deficiências do braço longo (MEESE et al., 1989; TRENT et al., 1989a; b). As aberrações do cromossomo 7 são também muito comuns e detectadas não apenas nesse grupo de neoplasias mas em outros cânceres humanos (MITELMAN et al., 1990). Entretanto, a presença de cópias extras de homólogos normais e as alterações da região pericentromérica são, de certa forma, características do melanoma (TRENT et al., 1989a; MITELMAN et al., 1990).

No caso de processos melanocíticos benignos como os nevos comuns, tanto cariótipos normais foram encontrados como rearranjos cromossômicos clonais em lesões com sinais de alteração no crescimento. Entre os nevos displásicos, as anomalias detectadas são bastantes distintas e geralmente não coincidem com aquelas observadas em melanomas (BALABAN et al., 1986; RICHMOND et al., 1986; COWAN et al., 1988). Entretanto, um dos nevos displásicos descrito por PARMITER et al. (1988), mostrou uma translocação t(9;10) envolvendo a banda 10q24, que parece ser a mesma banda rearranjada em um dos nevos comuns estudados por RICHMOND et al. (1986) e em alguns melanomas citados na literatura (MITELMAN, 1985).

Um tumor de pele também muito estudado citogeneticamente é o lipoma, uma neoplasia benigna do tecido adiposo. Alguns subtipos

citogenéticos já foram bem caracterizados e mostram rearranjos preferenciais como, por exemplo, do segmento 12q13-q15 ou do segmento 13q12-q13 (DAL CIN & SANDBERG, 1989; ENEROTH et al., 1990; SREEKANTAIAH et al., 1990a;b).

Em relação a outros tumores cutâneos benignos e malignos, os estudos citogenéticos são ainda muito limitados e praticamente nada se sabe sobre as alterações que aparecem no desenvolvimento e progressão dessas lesões (HEIM & MITELMAN, 1987). Por exemplo, a revisão bibliográfica realizada mostrou apenas nove publicações com informações sobre carcinomas espinocelulares de pele (FITCHET et al., 1984; ALEDO et al., 1988; 1989a; b; HEIM et al., 1988; 1989a; b; c; SCAPPATICCI et al., 1989b) e três sobre carcinomas basocelulares (ALEDO, 1989b; SCAPPATICCI et al., 1989a; MERTENS et al., 1990). Quanto às sobre lesões benignas, exceção feita aos nevos e lipomas já citados, foram encontradas apenas três publicações sobre ceratoses seborréicas e solares e sobre ceratoacantoma (ALEDO et al., 1989b; MERTENS et al., 1989a; b) e uma sobre hidroadenoma (MARK-VENDEL et al., 1990). Os resultados nesses tumores de pele, tanto benignos quanto malignos, revelaram rearranjos estruturais diversos, aneuploidias e poliploidias, e uma parte considerável dos casos mostrou clones múltiplos citogeneticamente não relacionados.

I.3. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor

O reconhecimento de que o câncer é essencialmente uma doença genética está baseado em um grande número de evidências. Por exemplo, a maioria dos carcinógenos é mutagênica, isto é, altera o material genético, e doenças com predisposição herdada ao

desenvolvimento maligno, como o xeroderma pigmentoso, estão associadas a defeitos no processo de reparo do DNA (WEISS & MARSHALL, 1984; WARNER & PRICE, 1989). Os dados citogenéticos também mostram que alterações cromossômicas específicas ocorrem em determinados tipos de câncer (MITELMAN, 1985; HEIM & MITELMAN, 1987). Mesmo alguns tumores que são de origem viral dependem da integração do genoma do vírus próximo a um gene crítico do hospedeiro, contribuindo desse modo para uma mutação somática (KNUDSON, 1986). Assim, não é difícil concluir que a transformação neoplásica ocorre por modificação no funcionamento de genes relacionados com funções celulares essenciais, genes esses conhecidos como oncogenes, e cujos produtos, quando alterados, podem contribuir para o fenótipo neoplásico da célula e levar à transformação maligna em condições naturais ou experimentais (SCHWAB, 1989; CHIAO et al., 1990).

O conceito de genes transformantes surgiu dos estudos sobre retrovirus, que compreendem um grupo de virus de RNA capazes de provocar o desenvolvimento de neoplasias em muitas espécies de animais. O primeiro oncogene foi isolado do virus do Sarcoma de Rous e posteriormente também detectado em células normais de diferentes origens. Resultados similares foram observados com outros oncogenes virais, (v-onc), sugerindo que eles derivam de genes celulares ou proto-oncogenes (c-onc) incorporados pelo DNA viral por ocasião da infecção das células de vertebrados (GORDON, 1985; CLINE, 1987; WEBER & McCLURE, 1987). Atualmente mais de 50 oncogenes já foram identificados e muitos deles mapeados no genoma humano. Sua representação é feita quase sempre por três letras relacionadas com o nome do retrovírus no qual foi originalmente descrito (HECHT,

1988; McALPINE, et al., 1990).

A presença universal dos proto-oncogenes nos vertebrados e provavelmente em todos os metazoários bem como sua alta conservação durante o processo evolutivo indicam a importância biológica de seus produtos protéicos, entre eles, fatores de crescimento e seus receptores, enzimas citoplasmáticas do tipo quinase, proteínas que se ligam à guanosina trifosfato (GTP) ou ao DNA (MARX, 1984; WEISS & MARSHAL, 1984; PIMENTEL, 1985; CLINE, 1987). Embora a função detalhada da maioria dos produtos de oncogenes seja desconhecida, acredita-se que muitos deles estejam relacionados com o controle da proliferação e da diferenciação celular, envolvendo a reação dos fatores de crescimento com seus receptores presentes na membrana, a emissão de sinais ao núcleo através de proteínas citoplasmáticas e o consequente estímulo para a transcrição (CLINE, 1987; NISHIMURA & SERIYA, 1987; CHIAO et al., 1990). Durante a malignização, entretanto, a atividade do oncogene celular é modificada e o seu potencial tumorigênico é desencadeado. Vários mecanismos responsáveis por isso têm sido identificados e incluem rearranjos cromossômicos, mutações em ponto e amplificação gênica (GORDON, 1985; CLINE, 1987). Em alguns tumores animais já foi observado um quarto mecanismo, o da inserção de promotores, que ocorre mediada por retrovírus e em locais próximos a um proto-oncogene (CLINE, 1987; BOWDEN, 1990)

Os rearranjos cromossômicos, em particular as translocações recíprocas, são frequentes em neoplasias, como já citado anteriormente. Esses rearranjos são capazes de levar a mudanças qualitativas ou quantitativas dos produtos oncogênicos através de modificações na estrutura do gene ou no controle de sua

expressão. No linfoma de Burkitt, por exemplo, que em geral manifesta a translocação t(8;14)(q24;q32), o proto-oncogene MYC, localizado no cromossomo 8, é transferido para o cromossomo 14 próximo a sequências promotoras do gene da cadeia pesada da imunoglobulina, e isso resulta na sua desregulação (NOWELL & CROCE, 1986; BOEHM & RABBITTS, 1989). No caso da LMC, ocorre a translocação do proto-oncogene ABL, mapeado na banda 9q34, para uma região crítica do cromossomo 22 conhecida como bcr (break cluster region), e tal rearranjo leva à síntese de uma molécula híbrida com atividade quinase maior que a proteína normal (NISHIMURA & SEKIYA, 1987; ROWLEY, 1990).

Entre os tumores sólidos, mais especificamente os melanomas, a ativação do proto-oncogene MYB, mapeado no cromossomo 6 (6q22-23) já foi observada em lesões que manifestavam alteração citogenética desse segmento (DASGUPTA et al., 1989; McALPINE et al., 1990; MITELMAN et al., 1990; MILLIKIN et al., 1991). Também nos melanomas, modificações quantitativas do receptor do fator de crescimento epidérmico, mapeado em 7p12-13, parecem ocorrer em virtude da presença de cópias extras do cromossomo 7 (McALPINE et al., 1990). Tal aberração numérica e a consequente ativação desse gene, parecem confirir às células uma vantagem seletiva de crescimento (COWAN et al., 1988; LIMON et al., 1988; SOZZI et al., 1990) e um tempo menor de sobrevida ao paciente (BURGUESS et al., 1991).

As mutações em sequências codificadoras constituem um outro mecanismo de ativação de um oncogene resultando na produção de uma proteína alterada. Tais mutações podem surgir devido à ação de agentes mutagênicos, químicos ou físicos, ou devido a erros

casuais durante a duplicação do DNA na proliferação celular (CLINE, 1987). Esse mecanismo parece ter uma importância especial para os oncogenes da família RAS (H, K e NRAS) que, apesar de estarem localizados em diferentes cromossomos, codificam proteínas homólogas de peso molecular igual a 21 quilodaltons (Kd), denominadas por isso proteínas p21-ras (COROMINAS **et al.**, 1989; VAN DER SCHROEFF **et al.**, 1990). As proteínas p21-ras estão localizadas no lado citoplasmático da membrana celular e suas propriedades bioquímicas incluem a ligação ao GTP, o que indica seu papel na transmissão de sinais externos induzidos por fatores de crescimento (CHIAO et al., 1990; VAN DER SCHROEFF et al., 1990). Uma grande variedade de tumores malignos humanos apresenta um gene RAS ativado, por exemplo o NRAS detectado em melanomas e mapeado no cromossomo 1p13 (ALBINO, 1988; ALBINO **et al.**, 1989; SOZZI **et al.**, 1990), os oncogenes K e HRAS em carcinomas baso e espinocelulares (VAN DER SCHROEFF et al., 1990) e do oncogene HRAS em ceratoacantomas (COROMINAS **et al.**, 1989).

Alterações quantitativas dos proto-oncogenes, como a amplificação, também podem levar a um aumento dos seus produtos. Os mecanismos que acarretam tais alterações são pouco conhecidos e foram primeiramente identificados em linhagens celulares resistentes a drogas. O fenômeno pode ser visualizado citogeneticamente sob a forma de material genético extracromossômico, os **double minutes** (DM), e de regiões cromossômicas homogeneamente coradas (HSR) (KANDA, 1985; SCHWAB, 1989).

Como apenas uma minoria de tumores humanos está associada à amplificação de um oncogene específico, é possível que esse mecanismo represente apenas uma consequência de diferentes alterações genéticas ocorridas durante o processo de transformação

celular (KANDA, 1985). No entanto, certos cânceres humanos mostram alta frequência de amplificação de um determinado oncogene como, por exemplo, do MYCN em neuroblastomas e retinoblastomas. Vários estudos epidemiológicos e biológicos mostram que a amplificação do MYCN não é uma característica de todos ou mesmo da maioria dos neuroblastomas primários, e isso indica que a amplificação deve constituir um dos mecanismos envolvidos na progressão, mas não na iniciação desses tumores. Reforçando essa hipótese estão os dados obtidos em outros tipos de neoplasias, que também mostram amplificação gênica principalmente em estágios mais avançados da doença e, portanto, associada a um comportamento mais agressivo da lesão (HEIM & MITELMAN, 1987; NISHIMURA & SEKIYA, 1987; SCHWAB, 1989; SOMERS et al., 1990; BRODEUR et al., 1991).

Apesar do grande número de estudos mostrando alteração da expressão dos oncogenes em diferentes tipos de tumores, não existem evidências de que a ativação de um único alelo possa transformar uma célula diplóide normal em uma célula maligna. Esse processo parece exigir a participação de vários fatores, entre eles a perda de representantes de um outro tipo de genes, conhecidos como supressores de tumor (KNUDSON, 1986; LOUGHRAN et al., 1989; CHIAO et al., 1990)

O conceito de genes supressores do câncer foi proposto em consequência de experimentos com fusão de células normais e cancerosas nos quais os híbridos obtidos não mostravam o fenótipo alterado. Os resultados sugeriram que alguns locos cromossômicos eram capazes de reprimir as características malignas e deveriam, portanto, estar ausentes ou inativos nas células neoplásicas. Segundo essa hipótese, a perda de ambos os alelos supressores

resultaria na expressão ou na função anômala de um ou mais proto-oncogenes. A inativação de genes supressores parece realmente ter um importante papel no desenvolvimento do retinoblastoma, um tumor raro de retina, cujas células mostram ausência funcional dos alelos RB1 mapeados na banda 13q14 e, consequentemente do seu produto, que parece estar relacionado com o controle do ciclo celular (KLEIN & KLEIN, 1985; GREENE, 1988; CARNEY, 1990; CHIAO et al., 1990).

Os dados citogenéticos e moleculares sobre monossomias cromossômicas e sobre perda de heterozigose de marcadores de DNA em inúmeras neoplasias, como o tumor de Wilms e o câncer de pulmão, fornecem evidências de que outros genes supressores, além do RB1, devem estar envolvidos no desenvolvimento do processo maligno (MANNENS et al., 1990; CARNEY, 1990; CAVENEE et al., 1990; MILLIKIN et al., 1991; JENKINS et al., 1991, entre outros). No caso do melanoma, TRENT et al. (1989a) referiram a perda da heterozigose de alelos do cromossomo 6 em amostras investigadas através da técnica de Southern. Tais resultados e a observação da reversão do fenótipo maligno após a introdução do cromossomo 6 normal em células cancerosas sugerem a existência de genes supressores envolvidos no processo neoplásico desse tumor (TRENT et al., 1990a; MELTZER et al., 1991).

I.4. OBJETIVOS

Considerando a alta incidência de tumores de pele na população e a escassez de dados citogenéticos sobre neoplasias, propôs-se o presente trabalho que teve os seguintes objetivos:

1. Pesquisar a ocorrência de aberrações cromossômicas clonais e não clonais em tumores benignos e malignos de pele.
2. Comparar os achados citogenéticos observados nos dois grupos de tumores, benignos e malignos, e avaliar, quando possível, os seus efeitos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Material

No presente trabalho foram estudadas citogeneticamente 18 lesões de pele, 15 malignas, duas pré-malignas e uma benigna, colhidas anteriormente a tratamentos radio e quimioterápicos. As amostras foram enviadas pelo Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto e por clínicas particulares da cidade.

Os pacientes, de ambos os sexos, pele clara e com idade média de 58 anos, eram geralmente de classe social baixa ou média e pertenciam à população urbana e rural de São José do Rio Preto, SP, ou de municípios vizinhos, distantes até 100 Km dessa cidade.

B. Métodos

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

1. Colheita das Amostras

Uma amostra do tecido (cerca de 0,5 a 1 cm^3) foi obtida assepticamente e transferida para um recipiente estéril com solução salina de Hanks para transporte, suplementada com penicilina, estreptomicina e gentamicina. O material foi mantido à temperatura

ambiente ou a 5°C e enviado ao laboratório devidamente identificado e, sempre que possível, acompanhado de informações sobre a idade do paciente, profissão, exposição a carcinogênicos e mutagênicos e presença de outros casos de neoplasias na família. A fim de assegurar a viabilidade das células, o período entre a colheita e o processamento do material não ultrapassou 24 horas.

2. Processamento Inicial do Tecido

No laboratório, a amostra foi sempre manipulada em câmara asséptica (câmara de fluxo laminar vertical). Inicialmente, o tecido foi lavado em três banhos consecutivos de solução de Hanks com penicilina, estreptomicina, gentamicina e anfotericina e, em seguida, dissociado mecanicamente em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm^3, com o auxílio de tesoura e pinça. O material foi transferido para um frasco com 0,5 ml de colagenase (concentração final de 2000 U/ml) e 4,5 ml de meio de cultura completo, e permaneceu incubado a 37°C por um a quatro dias para desagregação enzimática. Após esse período, a suspensão celular foi centrifugada a 800 rpm e lavada uma vez com meio de cultura HAM F-10.

3. Cultivo das Células

O sedimento obtido foi distribuído em até quatro frascos plásticos descartáveis de 25 ml (Descarplast) contendo 4 ml de meio de cultura suplementado com 10% ou 20% de soro fetal bovino, antibióticos, insulina e glutamina. As réplicas, numeradas com algarismos romanos, foram incubadas a 37°C por períodos variáveis de

três ou mais dias. Após 24 horas da semeadura, o meio dos frascos com material necrótico foi substituído e o crescimento celular e a atividade mitótica foram avaliados diariamente em microscópio invertido.

As culturas que mostraram número suficiente de metáfases até sete dias após o seu início sofreram interrupção de cultivo com a adição de colcemide (concentração final de 0,02 ug/ml) por uma a quatro horas. Em alguns casos, esse bloqueio também foi realizado imediatamente após a sincronização da divisão celular com o uso de metotrexato (concentração final de 10^{-7}M) por 17 horas, seguido da adição da timidina (concentração final de 10^{-5} M) por cinco horas.

Nas amostras em que o crescimento celular não foi satisfatório após sete dias, o material foi mantido a 37°C, geralmente em meio de cultura suplementado com quantidades de soro fetal bovino inferiores à inicial (5% ou menos), o que permitiu a seleção de células malignas em detrimento das normais, normalmente predominantes após esse período (CHEN & SHAW, 1973; MIYAMOTO **et al.**, 1988).

4. Hipotonização, fixação e coloração do material

Após o bloqueio descrito, o sobrenadante foi substituído por 8 ml de solução hipotônica pré-aquecida e o frasco foi reincubado por 30 minutos a 37°C. As células foram, então, delicadamente destacadas com o auxílio de um raspador ("scrapper") e a suspensão foi centrifugada por oito minutos a 800 rpm. Posteriormente, o material foi fixado em solução de metanol-acético e montado em lâminas geladas e úmidas, que foram flambadas e aquecidas em estufa a 90-92°C por 20 minutos, e submetidas à técnica

de bandamento GTG segundo GROUCHI & TURLEAU (1977), com modificações.

5. Análise cromossômica

A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico marca Carl Zeiss Jena, Modelo Jenamed 2. O material foi fotografado em microscópio Standard WL com equipamento fotográfico MC 63A (Carl Zeiss Oberkochen) com filme Panatomic X 32Asa ou Kodalith Orthofilm 6556, type 3 (Kodak). Para revelação do filme utilizou-se revelador Kodak D-72, em diluição 1:1 por dois minutos e meio a 20°C, e as cópias foram feitas em papel Kodabromide F3 e Kodabrome Print RC F3.

A nomenclatura utilizada na classificação dos eventos cariotípicos detectados foi feita de acordo com a Paris Conference (1971; 1975) e a ISCN (1978). As alterações foram consideradas como clonais quando o rearranjo estrutural ou as hiperdiploidias estavam presentes em pelo menos duas metáfases provenientes de réplicas diferentes da mesma cultura. No caso das hipodiploidias, a clonalidade só foi considerada quando a aberração foi vista em três ou mais células provenientes de mais do que uma réplica da cultura. A poliploidia e a endorreduplicação, mesmo obedecendo os critérios acima não foram consideradas anomalias clonais (MILTELMAN, 1985; MERTENS **et al.**, 1989a; SANDBERG, 1990).

A análise de metáfases coradas com bandamento G foi considerada total quando todos os cromossomos da célula puderam ser identificados e parcial quando pelo menos sete pares cromossômicos foram identificados. A análise após coloração usual foi realizada em metáfases cujos cromossomos, mesmo após a utilização da técnica adequada, não apresentaram bandas.

III. RESULTADOS

No presente estudo foram processadas e cultivadas amostras de 61 tumores benignos e malignos de pele, das quais 27 não exibiram crescimento celular, 24 provavelmente em virtude de contaminação por fungos ou bactérias ocorridas nas fases iniciais do cultivo. As outras 34 mostraram crescimento celular entre elas 21 com proliferação celular satisfatória, porém apenas 18 com metáfases passíveis de análise após cultivo por períodos variáveis de 3 a 36 dias. Duas dessas amostras (caso 503 e 510) também apresentaram contaminação por bactérias mas, apesar disso, foram submetidas ao tratamento para interrupção da divisão celular. O bloqueio do cultivo foi feito com a adição de colcemide por duas horas, com exceção do caso 707, que foi tratado com a metade da concentração usual da droga por um período de quatro horas, e de dois casos (510 e 529) que foram submetidos à sincronização da divisão celular com metotrexato e timidina, anteriormente ao bloqueio. Os tratamentos especiais realizados nas amostras 707, 510 e 529 foram consequência da pequena proliferação celular observada.

Os tumores analisados citogeneticamente foram provenientes de 10 pacientes do sexo masculino e oito do sexo feminino, todos de pele clara e idades variando de 28 a 85 anos (X= 58 anos). As lesões foram identificadas histopatologicamente como 11 carcinomas basocelulares (casos 543, 550, 561, 595, 606, 607, 612, 614, 618, 623 e 659), quatro carcinomas espinocelulares (casos 510, 567, 599 e 707), duas ceratoses solares (casos 503 e 508) e um cisto epidérmico ou de inclusão epidermóide (caso 603). Os dados relativos a idade e sexo dos pacientes, tipos de tumores e período de cultivo das

Tabela 2. Resultados relativos ao crescimento de células de tumores de pele, após cultivo segundo técnica descrita por LIMON et al. (1986).

Caso	Amostra*	Sem crescimento		Com crescimento	
		sem contaminação	com contaminação	sem metáfases	com metáfases
484	Tu pele		x		
487	Tu pele				x
492	Lesão de pele		x		
494	Ca basocelular			x	
498	Ca basocelular			x	
499	Tu pele		x		
500	Ca espinocelular			x	
503	Tu pele				x[a]
508	Ca espinocelular				x
510	Tu pele				x[a]
529	Ca basocelular				x
530	Tu pele	x			
531	Tu pele			x	
532	Tu pele		x		
543	Tu pele				x
544	Ca espinocelular		x		
549	Tu pele				x
550	Ca basocelular				x
557	Ca espinocelular		x		
560	Ca espinocelular		x		
561	Ca basocelular				x
567	Ca basocelular				x
568	Ca basocelular	x			
575	Ca basocelular			x	
576	Ca basocelular			x	
577	Ca basocelular		x		
587	Ca espinocelular	x			
591	Ca basocelular		x		
593	Tu pele		x		
595	Ca basocelular				x
597	Tu pele		x		
599	Ca basocelular				x
600	Ca basocelular			x	
603	Cisto dermoide				x
606	Ca basocelular				x
607	Ca basocelular				x
612	Ca basocelular				x
614	Ca basocelular				x
618	Ca basocelular				x
623	Ca basocelular				x
629	Ca basocelular		x		
636	Ca basocelular			x	
638	Ca basocelular			x	
641	Ca basocelular		x		
642	Tu subcutâneo		x		
643	Tu pele		x		
659	Ca basocelular				x
667	Ca basocelular		x		
673	Tu pele		x		
674	Tu pele		x		
675	Tu pele		x		
676	Tu pele		x		
677	Tu pele		x		
678	Melanoma		x		
679	Ca basocelular		x		
685	Ca espinocelular			x	
686	Tu pele			x	
696	Nevo celular			x	
698	Tu pele			x	
705	Tu pele		x		
707	Ca basocelular				x
		3	24	13	21
Total 61		27(44%)		34(56%)	

* Designação dos tipos de tumores conforme dados enviados pelo médico cirurgião

[a] Com contanimação

Tabela 3. Dados relativos a idade e sexo dos pacientes portadores de tumores estudados citogeneticamente e períodos de cultivos das amostras. (Ca= carcinoma).

Caso	Idade	Sexo	Tipo de tumor*	Período de cultivo da amostra (dias)
543	70	M	Ca basocelular	34
550	56	F	Ca basocelular	3-10
561	77	F	Ca basocelular	9
595	64	M	Ca basocelular	12
606	74	M	Ca basocelular	7-9
607	77	F	Ca basocelular	7
612	54	M	Ca basocelular	11
614	52	F	Ca basocelular	16
618	58	M	Ca basocelular	7
623	49	M	Ca basocelular	30
659	72	M	Ca basocelular	18
510	77	M	Ca espinocelular	8
567	78	F	Ca espinocelular	15
599	68	F	Ca espinocelular	25
707	85	F	Ca espinocelular	36
503	56	F	Ceratose solar liquenóide	4
508	69	M	Ceratose solar hipertrófica	7-9
603	28	M	Cisto epidérmico	9

* Designação dos tipos de tumores conforme resultados de exame histopatológico.

amostras são apresentados na Tabela 3.

Em todos os casos estudados, o crescimento celular foi observado já na fase de desagregação enzimática ou 24 horas após a semeadura. As células apresentaram um ou dois núcleos e morfologia epitelióide nos casos 503 e 567, ou epitelióide e fibroblastóide nos demais casos (Figura 1). Na maioria das amostras, quando a cultura atingia crescimento confluente, as células adquiriam morfologia fibroblastóide.

Os resultados citogenéticos das culturas com crescimento celular e metáfases passíveis de análise estão resumidos nas Tabelas 4 a 9, e apresentados detalhadamente a seguir.

1. Carcinomas Basocelulares

CASO 543

O paciente, de 70 anos de idade e fumante, procurou o serviço de cirurgia plástica com queixa de lesão na face, identificada histopatologicamente como um carcinoma basocelular sólido. Próximo a ela, outros dois tumores do mesmo tipo já haviam sido retirados alguns meses antes da consulta.

Uma amostra do material obtido na cirurgia foi processada e cultivada em quatro réplicas. Foram obtidas 38 metáfases, 21 delas com cromossomos passíveis de contagem, oito que permitiram a análise parcial e sete que foram completamente analisadas. O número cromossômico foi diplóide na maioria delas, uma célula apresentou constituição poliplóide com aproximadamente 92 cromossomos e outra apresentou endorreduplicação (Tabela 4).

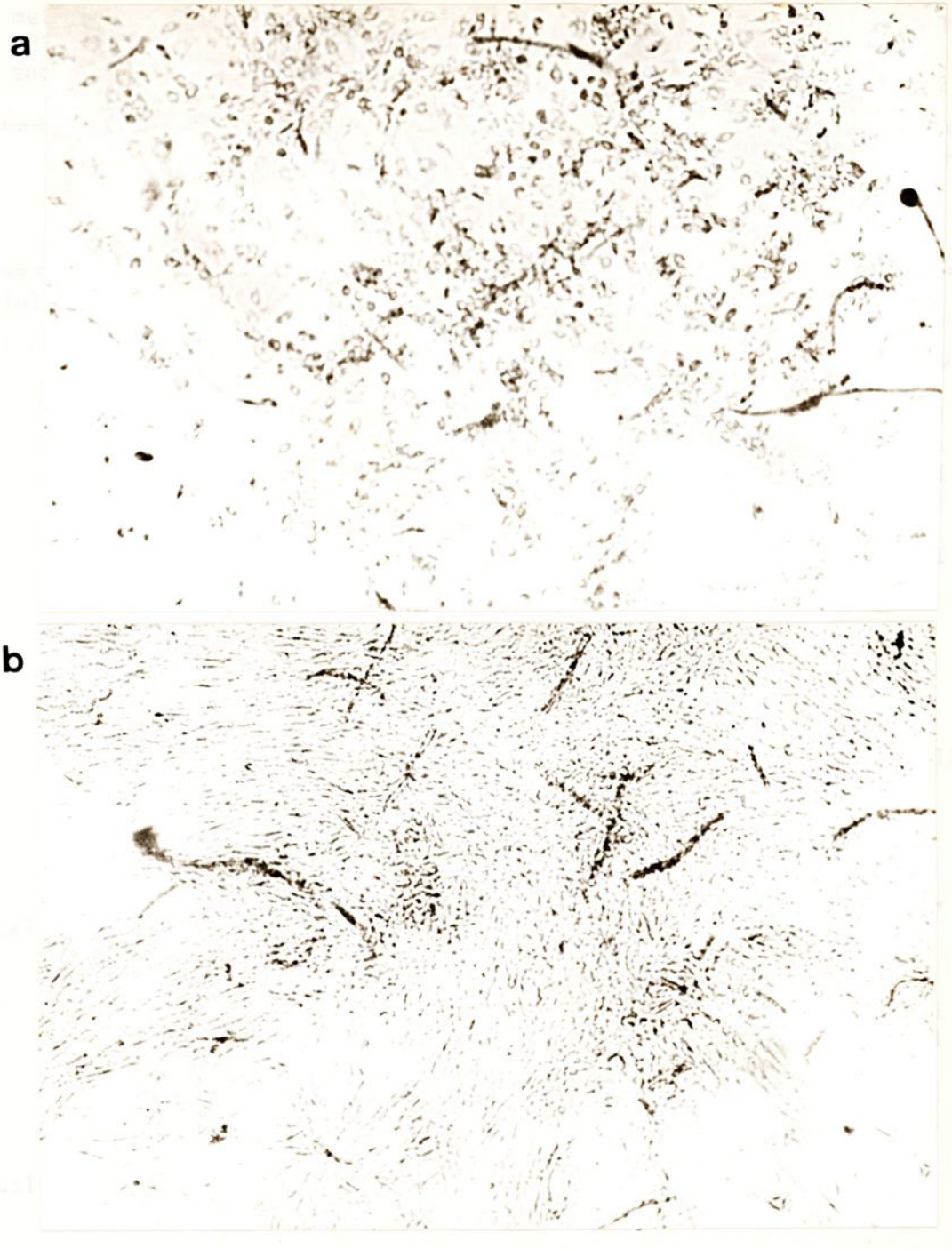


Figura 1. Fotomicrografias obtidas da cultura 636 mostrando células com morfologia epitelióide (a) e fibroblastóide (b). Aumentos de 18X e 24X, respectivamente .

Tabela 4. Tipos e frequências das aberrações cromossômicas observadas em metáfases dos casos 503, 508, 510, 543, 567, 599, 603, 606, 612, 614, 623, 659, 684 e 707 e identificação das réplicas onde foram encontradas. (Ca= carcinoma).

Tumor	Caso	Total de metáfases obtidas	Aberrações cromossômicas		Réplica
			Tipo	Nº de células afetadas	
Ca Basocelular					
	543	38	Endorreduplicação	1	I
			Poliploidia	1	IV
	595	22	46,XY,Dq⁻	1	I
			46,XY,+D,-E	1	I
			46,XY,-E,-E,+F,+G	1	II
	606	38	46,XY,-10,+?20	1	I
			46,XY,+E	1	II
			Poliploidia	1	
	612	35			
	614	9	Poliploidia	1	I
	623	38	46,XY,-2,-E,+mar,+mar	1	III
			Poliploidia	1	I
	659	25	45,XX,+5,-C,-19	1	I
			47,XX,+C	1	V
			Poliploidia	2	I, IV
Ca Espinocelular					
	510	56	Poliploidia	2	I
	567	23	46,XX,-7,+9	1	II
			Poliploidia	2	II
	599	10			
	707	3	Poliploidia	1	I
Ceratose solar					
	503	22	Poliploidia	1	I
	508	176	46,XY,-2,,+C,2p+	1	II
			46,XY,Cp-,Dq⁺	1	II
			47,+?D ou +?E	1	II
			92,XXYY,t(2;2)(p23;q13or14)	1	II
			Poliploidia	8	I, II
Cisto epidérmico					
	603	12	46,XX,-C,+F	1	II
			47,XX,+?	1	II
			Poliploidia	1	II

O paciente retornou recentemente ao hospital e foi submetido a nova exérese de um carcinoma basocelular da região dorso-nasal.

CASO 550

A paciente, de 56 anos de idade e não fumante, apresentava verruga na região nasal com aproximadamente 15 anos de evolução. O exame macroscópico revelou lesão brancacenta de superfície elevada e granulosa e consistência elástica. O tumor foi retirado e histopatologicamente identificado como um carcinoma basocelular do tipo sólido.

Das quatro réplicas semeadas foi obtido um total de 151 metáfases, 46 das quais foram apenas submetidas à contagem do número cromossômico, três foram observadas em coloração usual, 74 foram parcialmente analisadas e 29 completamente analisadas após utilização de técnica de bandamento G. O número cromossômico na maioria delas foi diplóide ou próximo ao diplóide e sete células de duas réplicas diferentes, uma delas com endorreduplicação, mostraram um rearranjo clonal complexo envolvendo os cromossomos 4 e 14 com cariótipo 46,XX, t(4;14) (4qter->4q25::4p14->4q25::14p11->14pter;14qter->14p11::4p14->4pter) (Figura 2). Outras células apresentaram alterações cariotípicas numéricas ou estruturais não clonais, que consistiram em três translocações, t(1;15)(p21;p26), t(12;?) e t(X;15)(q21;p11), em uma trissomia 7 (as duas últimas anomalias ilustradas na Figura 3), em aberrações numéricas não identificadas e em perdas cromossômicas aparentemente casuais. Duas células mostraram endorreduplicação e 11 eram poliplóides. Esses dados estão

apresentados na Tabela 5.

CASO 561

A paciente, de 77 anos de idade e não-fumante, procurou o hospital com queixa de lesões nodulares e papulosas localizadas na região nasal. Os tumores foram submetidos à exérese e histopatologicamente identificados como carcinomas basocelulares. Uma amostra de um dos tumores foi processada e cultivada em quatro réplicas.

Foi obtido um total de 337 metáfases, 60 das quais foram submetidas apenas à contagem do número cromossômico, 16 foram examinadas em coloração usual, 121 foram parcialmente analisadas após bandamento G e 140 receberam análise completa. Do total de metáfases encontradas, 14 apresentaram endorreduplicação e 35 poliploidia, com números cromossômicos variando de 81 a 151. Nas demais, o número cromossômico modal foi diplóide e 65 mostraram alterações cariotípicas numéricas ou estruturais. Foram observados cinco clones (Tabela 6), presentes em duas ou três réplicas da mesma cultura, com os cariótipos 46,XX, t(9;14)(q12or13;p11); 46,XX,del (1)(q2); 47,XX,+5; 47,XX,+7 e 45,X (Figura 4).

As 37 alterações cariotípicas não clonais (Tabela 7) compreenderam 13 translocações identificadas, cinco delas envolvendo o cromossomo 15, quatro afetando o cromossomo 1, quatro o cromossomo 12 e duas o cromossomo 7. Compreenderam também trissomias, tetrassomias e monossomias totais ou parciais, associadas ou não a outros rearranjos e a presença de cromossomos marcadores (Figura 5). As alterações não clonais foram vistas em frequências

Tabela 5. Tipos e frequências das aberrações cromossômicas observadas em 151 metáfases do caso 550 (carcinoma basocelular) e identificação das réplicas onde foram encontradas.

Aberrações cromossômicas		Réplicas
Tipo	Nº de células afetadas	
46,XX,t(4;14)(4qter->4q25::4p14->4q25::14p11->14pter;14qter->14p11::4p14->4pter), uma delas com endorreduplicação	7	III, IV
46,XX,t(1;15)(p21;p26)	1	II
45,XX,-7,-10,-12,-17,-19,t(12;?),+mar,+mar,+mar,+mar	1	IV
46,X,t(X;15)(q21;p11)	1	III
47,XX,+7	1	IV
46,XX,+B,-8,-8,+mar	1	II
46,-B,+C,+C,-D	1	II
46,-C,-C,+D,+D	1	II
48,XX,+mar,+mar	1	II
45,XX,-4	1	IV
45,XX,-5	1	III
45,XX,-6	1	II
45,XX,-7	1	III
45,XX,-15	1	IV
45,XX,-22	1	II
44,XX,-16,-17	1	III
45,-C	1	III
Endorreduplicação	2	III
Poliploidia	11	II, III

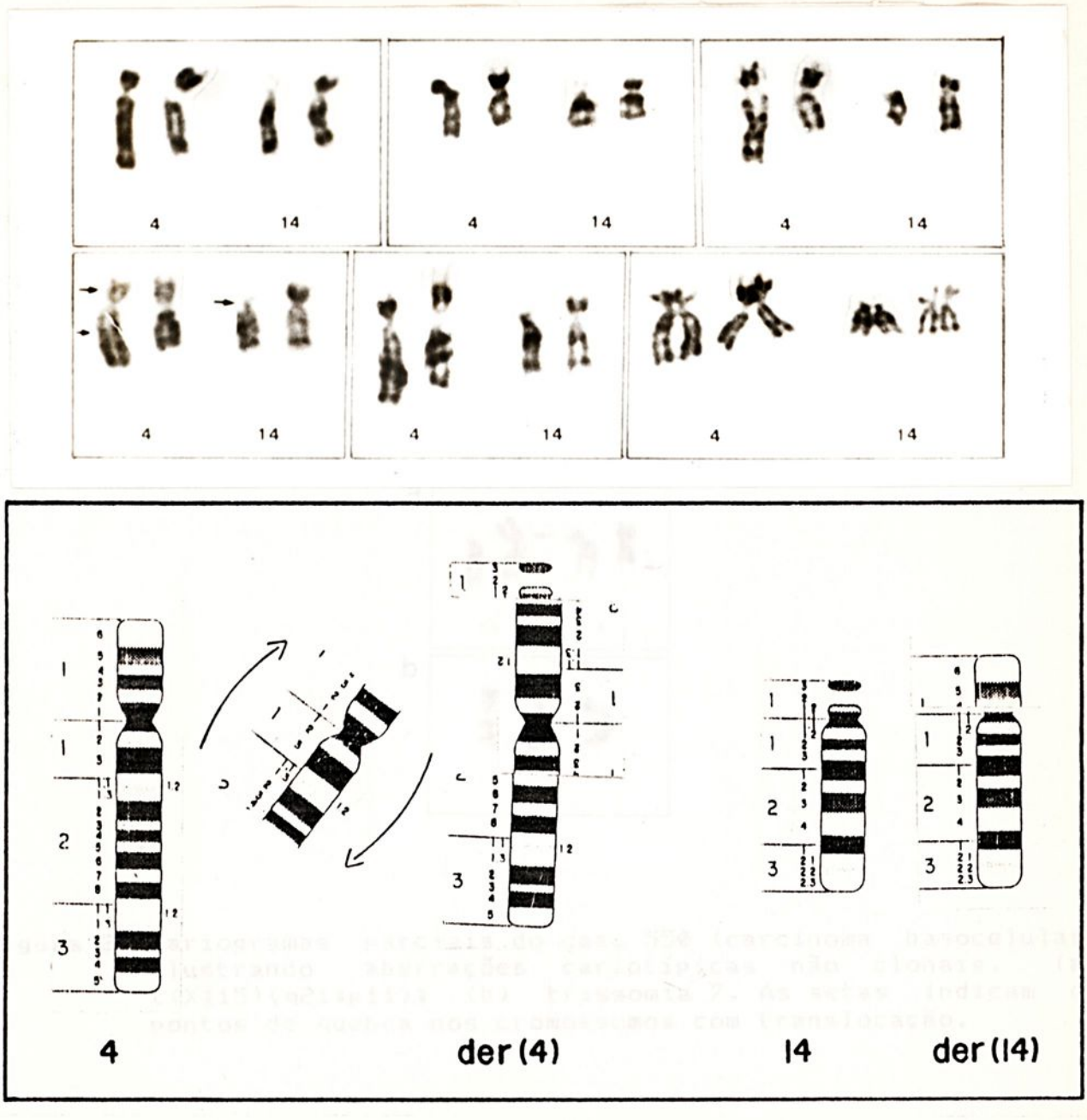


Figura 2. (a) Cariogramas parciais do caso 550 (carcinoma basocelular) mostrando um rearranjo clonal complexo envolvendo os cromossomos 4 e 14, com cariótipo 46,XX,t(4;14)(4qter→4q25::4p14→4q25::14p11→14pter;14qter→14p11::4p14→4pter). (b) Representação esquemática dos cromossomos 4 e 14 normais e alterados. As setas indicam os pontos de quebra.

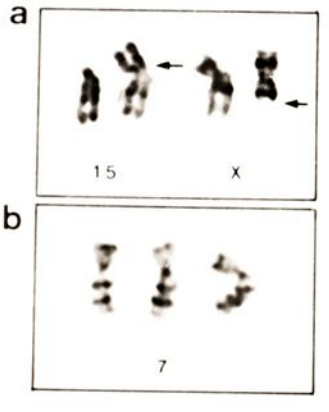


Figura 3. Cariogramas parciais do caso 550 (carcinoma basocelular) ilustrando aberrações cariotípicas não clonais. (a) t(X;15)(q21;p11); (b) trissomia 7. As setas indicam os pontos de quebra nos cromossomos com translocação.

Tabela 6. Tipos e frequências das aberrações cromossômicas clonais observadas em 337 metáfases do caso 561 (carcinoma basocelular) e identificação das réplicas onde foram encontradas.

Aberrações cromossômicas		Réplicas
Tipo	Nº de células afetadas	
46,XX,t(9;i4)(q12or13;p11)	4	I, II
46,XX,del(1)(q23or25)	3	I, II, III
47,XX,+5	7	I, II, IV
47,XX,+7; 46,XX,+7,-14	7	I, II
45,X	5	I,II, IV

Tabela 7. Tipos e frequências de outras aberrações cromossômicas não clonais observadas em 337 metáfases do caso 561 (carcinoma basocelular) e identificação das réplicas onde foram encontradas.

Aberrações cromossômicas		Réplicas
Tipo	Nº de células afetadas	
45,X,t(1;12)(q25;q11)	1	I
46,XX,t(1;7;12)(p32;q32;q11)	1	III
46,XX,t(1;15)(p3;p11)	1	I
92,XXXX,t(1;17)(p31;q25)	1	I
46,XX,t(2,11)(q14or21;q13)	1	III
46,XX,t(3;5)(q21;q35)	1	II
46,XX,t(7;8;15)	1	I
46,XX,t(10;19)	1	I
46,XX,t(11;20)(q13;p13)	1	IV
46,XX,t(12;13)	1	I
46,XX,t(12;15)(q15or21;p11)	1	I
46,XY,t(X;15)(q28;q21or22)	1	II
46,XX,t(14;15)(q13;p1)	1	III
46,XX,14q$^-$	1	I
46,XX,del(16)(q13)	1	I
46,XX,19p$^-$	1	II
47,XX,+3,6q-	1	I
47,XX,-B,+C,+E,Dq$^-$	1	I
47,XX,+mar	1	IV
47,XX,14q$^-$,+mar	1	II
46,XX,-7,+mar	1	II
45,X,-12,+mar	1	II
46,XX,-13,+mar	1	I
46,XX,-14,+mar	1	I
44,X,-17,-19,+mar	1	I
47,XX,-8,+mar,+mar	1	III
46,XX,-1,-6,+mar,+mar	1	II
45,XX,-4	1	I
45,XX,-7	2	I, II
45,XX,-21	2	I, III
47,XX,+6	1	IV
47,XX,+9	1	III
47,XX,+14	1	II
47,XX,+18	1	I
47,XX,+C	1	I
48,XX,+2,+3	1	I
48,XX,+12,+12	1	II
Poliploidia	35	I, II, III, IV
Endorreduplicação	14	I, II, III, IV

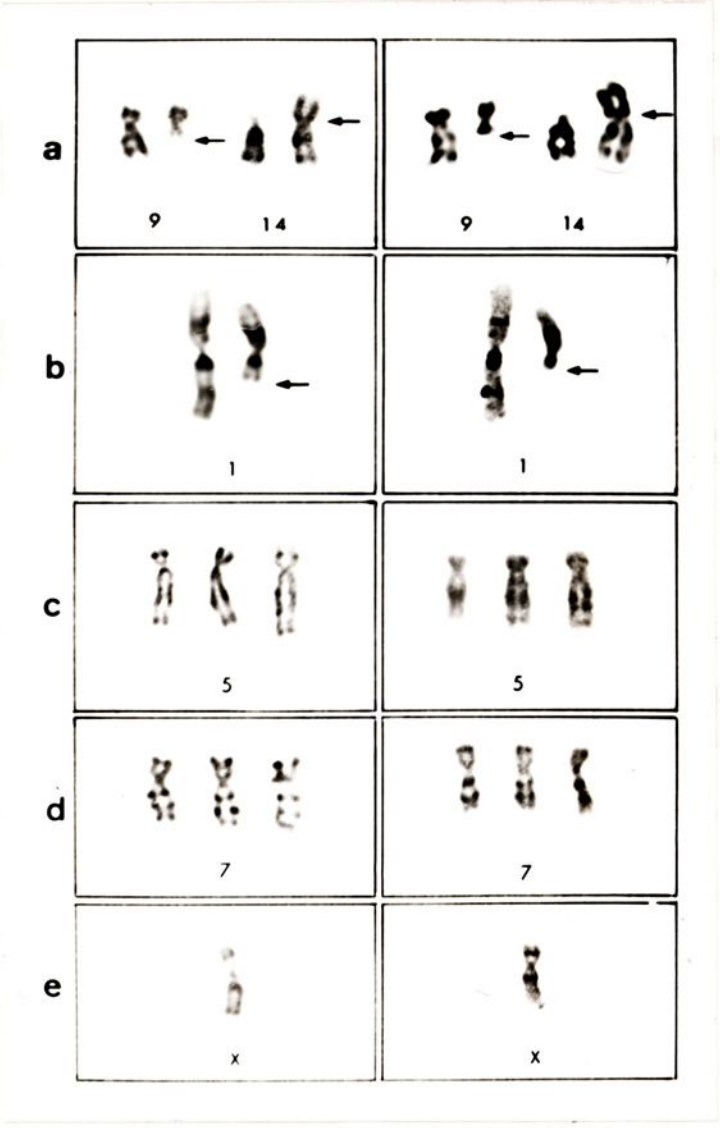


Figura 4. Cariogramas parciais do caso 561 (carcinoma basocelular) ilustrando as aberrações cariotípicas clonais. (a) t(9;14)(q12or13;p11); (b) del(1)(q2); (c) trissomia 5; (d) trissomia 7; (e) monossomia X. As setas indicam os pontos de quebra nos cromossomos com translocação.

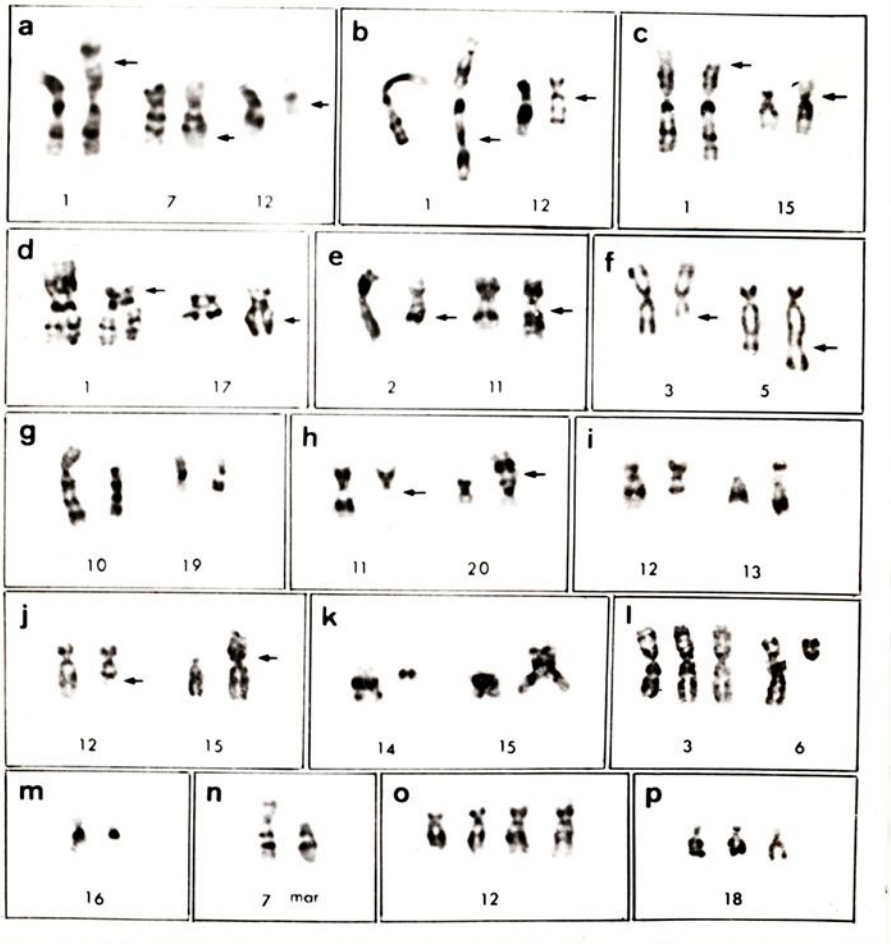


Figura 5. Cariogramas parciais do caso 561 (carcinoma basocelular) mostrando as aberrações cariotípicas não clonais. (a) t(1;7;12); (b) t(1;12); (c) t(1;15); (d) t(1;17); (e) t(2;11); (f) t(3;5); (g) t (10;19); (h) t(11;20); (i) t(12;13); (j) t(12;15); (k) t(14;15); (l) +3,6q^{+}; (m) del(16)(q13); (n) -7,+mar; (o) +12,+12; (p) +18. As setas indicam os pontos de quebra nos cromossomos com translocação.

aproximadamente iguais nas quatro réplicas cultivadas.

CASO 595

O paciente, de 64 anos de idade e fumante, referiu o aparecimento, aproximadamente um ano antes da consulta, de duas lesões na região cervical. A princípio, elas apresentaram-se como manchas avermelhadas assintomáticas, porém aumentaram de tamanho e evoluíram para uma ulceração com prurido e dor local e, após exérese, foram identificadas como carcinomas basocelulares.

A amostra de uma das lesões foi processada e cultivada em quatro réplicas, mas apenas duas delas, que apresentavam índice mitótico satisfatório, sofreram interrupção de cultivo. Foi obtido um total de 22 metáfases, seis das quais permitiram somente a contagem do número cromossômico e as outras 16 foram analisadas em coloração usual. O número cromossômico modal foi 46, quatro células tinham perdas cromossômicas casuais e três revelaram cariótipos 46,XY,Dq-; 46,XY,+D,-E e 46,XY,-E,-E,+F,+G (Tabela 4).

CASO 606

O paciente, de 74 anos de idade, trabalhador rural e não-fumante, manifestou por aproximadamente um ano lesão nódulo-ulcerativa na face, de crescimento lento e progressivo e sangramento esporádico. Uma amostra do tumor, histopatologicamente identificado como carcinoma basocelular, foi enviada ao laboratório e submetida à desagregação enzimática e cultivada em quatro réplicas.

Foram obtidas 38 metáfases, em 16 das quais só foi possível a contagem do número cromossômico, e nas restantes foi feita a análise em coloração usual ou bandamento G. Foram encontradas, além de células aparentemente normais, cinco células com perdas cromossômicas casuais, uma trissomia E, uma trissomia 20 associada à monossomia 10, além de uma metáfase poliplóide (Tabela 4). O número cromossômico modal foi 46.

CASO 607

A paciente, de 78 anos de idade e não-fumante, referiu o aparecimento de lesões tumorais localizadas na região nasal e malar cerca de quatro meses antes da consulta. O exame macroscópico revelou tumorações com pápula central verrucosa, histopatologicamente identificadas como carcinomas basocelulares.

Uma amostra da lesão malar foi processada e cultivada em quatro réplicas, das quais foi possível a obtenção de 409 metáfases. Dessas, 34 foram submetidas apenas à contagem do número cromossômico, oito foram examinadas em coloração usual, 137 foram parcialmente analisadas após bandamento G e 230 receberam análise completa. Do total de metáfases encontradas, duas apresentaram endorreduplicação (Figura 6) e 33 eram poliplóides (Figura 7), com números cromossômicos variando de 90 a 92, e uma célula poliplóide mostrou também endorreduplicação. Nas demais, o número cromossômico modal foi diplóide e 75 células possuíam alterações cariotípicas numéricas ou estruturais. Foi identificado um clone em sete células de réplicas diferentes da mesma cultura, que exibiu trissomia do cromossomo 18 associada ou não a outras alterações (Figura 8). Uma

outra aberração cromossômica, a translocação t(10;14)(q24;q11) (Figura 9), foi observada em duas células da mesma réplica porém, em virtude dos critérios adotados, não foi considerada clonal, embora tal possibilidade não possa ser excluída.

As 68 anomalias cariotípicas não clonais compreenderam 27 translocações envolvendo principalmente os cromossomos 1, 3 e 14, além de trissomias ou tetrassomias e monossomias totais ou parciais, associadas ou não a outros rearranjos e presença de cromossomos marcadores (Figura 9). Esses dados estão apresentados na Tabela 8.

CASO 612

O paciente, de 54 anos de idade, procurou o serviço de cirurgia plástica com queixa de reaparecimento de um nódulo ulcerado, localizado no tronco, identificado após a biópsia como carcinoma basocelular. O indivíduo referiu que, cerca de oito anos antes da consulta, havia manifestado no mesmo local uma lesão papulosa, com sangramento periódico e de diagnóstico semelhante, que já havia recidido uma vez.

Parte do material retirado na exérese foi processada e cultivada em quatro réplicas, três delas com índice mitótico satisfatório. Foram obtidas 35 metáfases em condições pouco favoráveis à análise citogenética, dez das quais permitiram apenas a contagem do número cromossômico e sete uma análise parcial em bandamento G. Não foi identificado qualquer tipo de alteração cariotípica nessas células e o número cromossômico modal foi diplóide.

Tabela 8. Tipos e frequências das aberrações cromossômicas observadas em 409 metáfases do caso 607 (carcinoma basocelular) e identificação das réplicas onde foram encontradas.

Aberrações cromossômicas		Réplicas
Tipo	Nº de células afetadas	
46,XX,t(1;2)(p36;q21)	1	I
45,XX,-1,-5,+t(1;5)	1	IV
46,XX,t(1;?8)(q44,q13)	1	III
46,XX,t(1;14)(p32;q13)	1	I
46,XX,t(1;20)(p33.4;q13)	1	I
44,XX,-1,-5,-19,-22,+t(1;?),+mar	1	IV
47,XX,t(?2;?11),+mar	1	I
46,XX,t(2;?)	1	II
46,XX,t(2;?) ou inv(2)(?;?)	1	IV
46,XX,t(3;4;10)(p21;p12;q26)	1	I
45,-C,t(3;5)(q23;q35)	1	I
46,XX,t(3;15)(q28;q15)	1	II
46,XX,t(3;16)(q13;q24)	1	IV
46,XX,t(3;?)(p21;?)	1	I
46,XX,t(4;8)(p16;q13)	1	IV
46,XX,t(?6;12)(q21;p13)	1	IV
45,X,t(7;15)(p11;p11)	1	II
46,XX,t(8;?)	1	I
46,XX,t(9;12)(q21or22;q22or23)	1	I
46,XX,t(10;14)(q24;q11)	2	IV
46,XX,t(10;14)(q23;q32)	1	II
46,XX,t(11;15)(p23;p11)	1	II
46,XX,t(11;17)(p1;p1)	1	II
46,X,t(X;8)(q11.2;q11)	1	III
46,X,t(X;14)(q24;q13)	1	III
45,XX,-20,t(14;20)(q11.2;p11.2)	1	I
46,XX,t(15;19)(p11;p13.1)	1	III
47,XX,i(1p),+der(1q)	1	I
46,XX,-12,del(1)(p11),+mar	1	IV
92,XXXX,del(2)(p13),del(2)(p13)	1	III
47,XX,+?13,del(2)(q11)	1	IV
46,XX,2p-	1	II
47,XX,?del(3)(p25),del(7)(p11),+mar	1	I
47,XX,+18,del(6)(q11or12)	1	II
45,XX,-16,del(10)(q23)	1	II
46,XX,?11q^{-}	1	I
46,X,del(X)(q13or21)	1	IV
46,XX,del(14)(q24)	1	I
46,XX,18q^{-}	1	I
46,XX,6q+	1	III
45,XX,-5,15p^{+}	1	III
46,XX,-2,+G,10q+,+ace	1	IV
46,XX,-6,+?mar	1	I

Continuação da Tabela 8

Aberrações cromossômicas		Réplicas
Tipo	Nº de células afetadas	
46,X,-i0,+mar,+mar	1	IV
46,-C,-C,+mar,+mar	1	IV
48,XX,-2,-4,+?i0,+mar,+mar,+mar	1	III
46,XX,?+ace	1	I
46,XX,-5,+C,+ace,+ace	1	IV
47,XX,+7	1	IV
47,XX,+8	1	IV
47,XX,+i6	1	II
47,XX,+i8	6	II, III, IV
47,XX,+20	1	IV
47,XXX	1	I
47,XX,+C	1	I
48,XX,+i0,+i0	1	I
49,XX,+3,+D,+E	1	II
49,X,+1,+4,+i2,+20	1	II
45,XX,-4	1	IV
45,XX,-5	1	I
45,XX,-i3	2	II
45,XX,-i6	1	II
45,XX,-i8	1	II
45,XX,-i9	1	II
45,XX,-2i	1	IV
45,X	2	I, III
44,XX,-i2,-22	1	II
47,XX,-7,+i5,+i8	1	III
Poliploidia	33	I, II, III, IV
Endorreduplicação	2	II, IV
Poliploidia/endorreduplicação	1	II

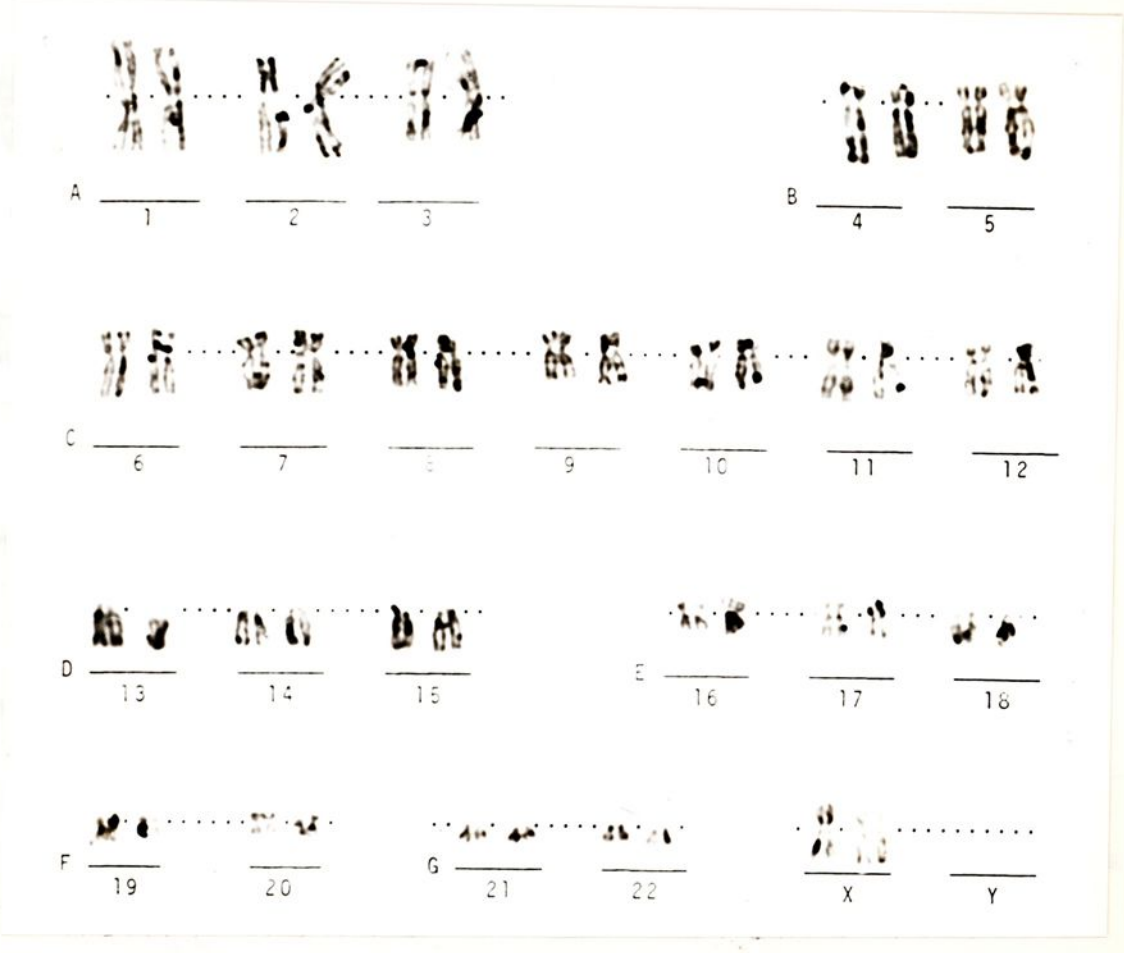


Figura 6. Cariograma de uma célula com endorreduplicação do caso 607 (carcinoma basocelular).

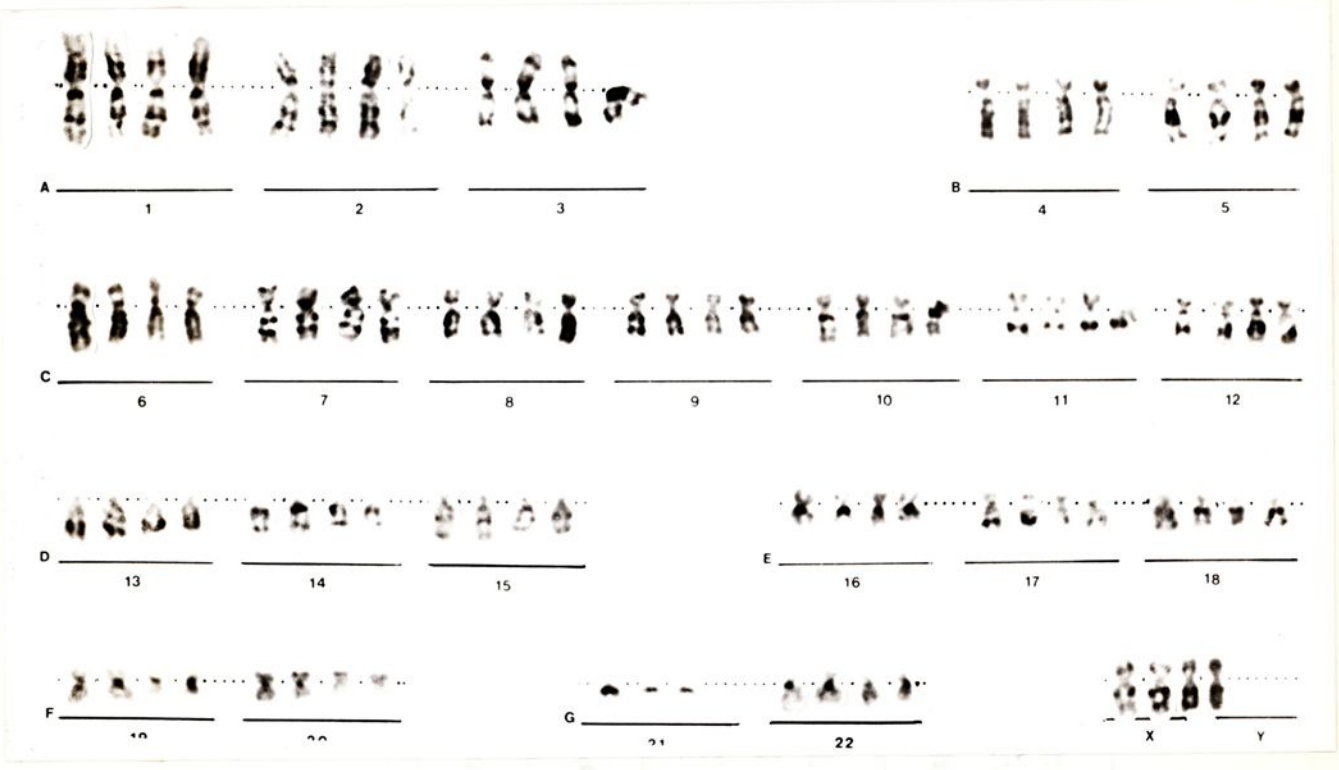


Figura 7. Cariograma de uma célula poliplóide do caso 607 (carcinoma basocelular).

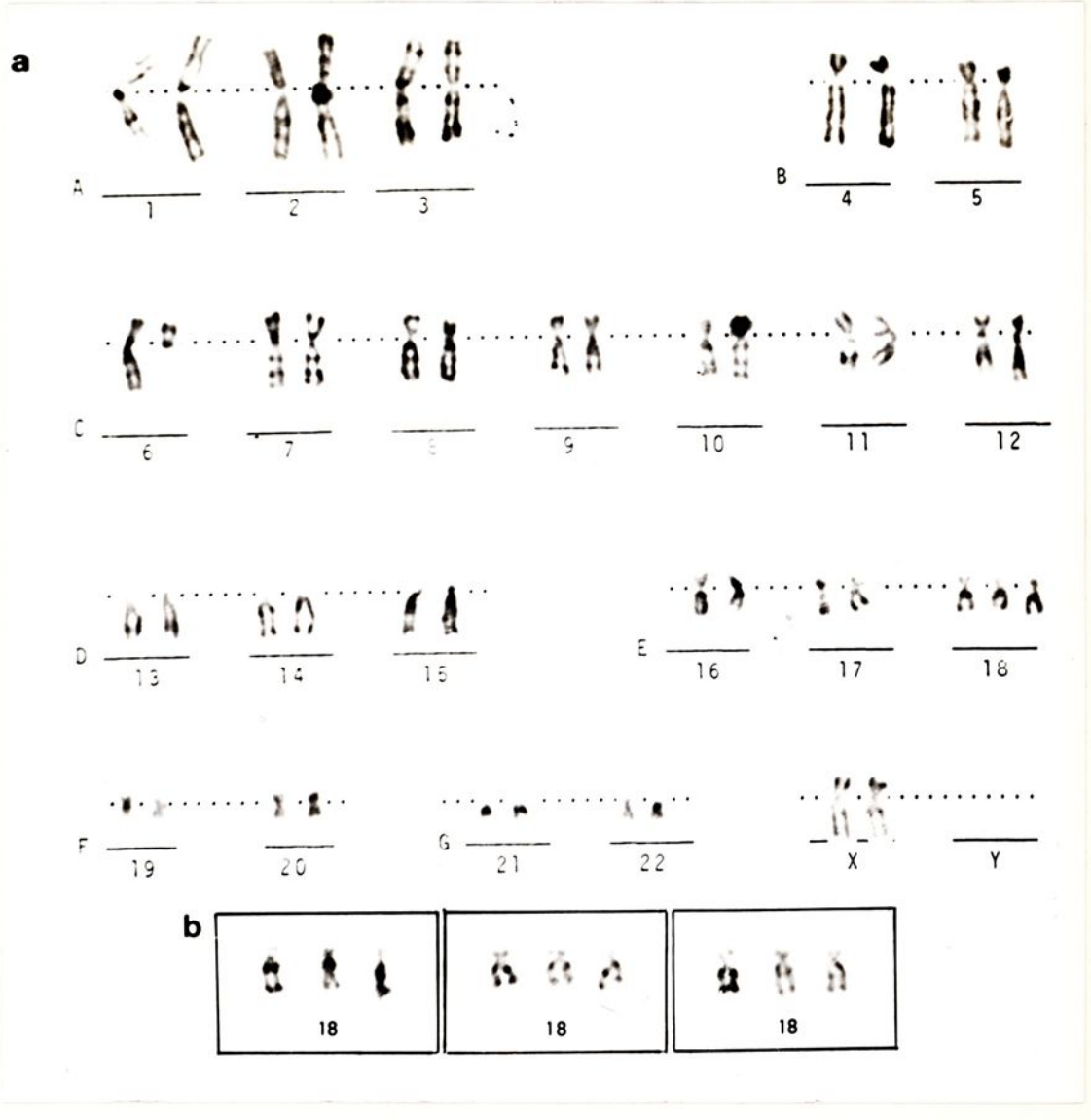


Figura 8. (a) Cariograma de uma célula do caso 607 (carcinoma basocelular) com trissomia 18 e del(6)(q11or12). (b) Cariogramas parciais ilustrando a trissomia 18.

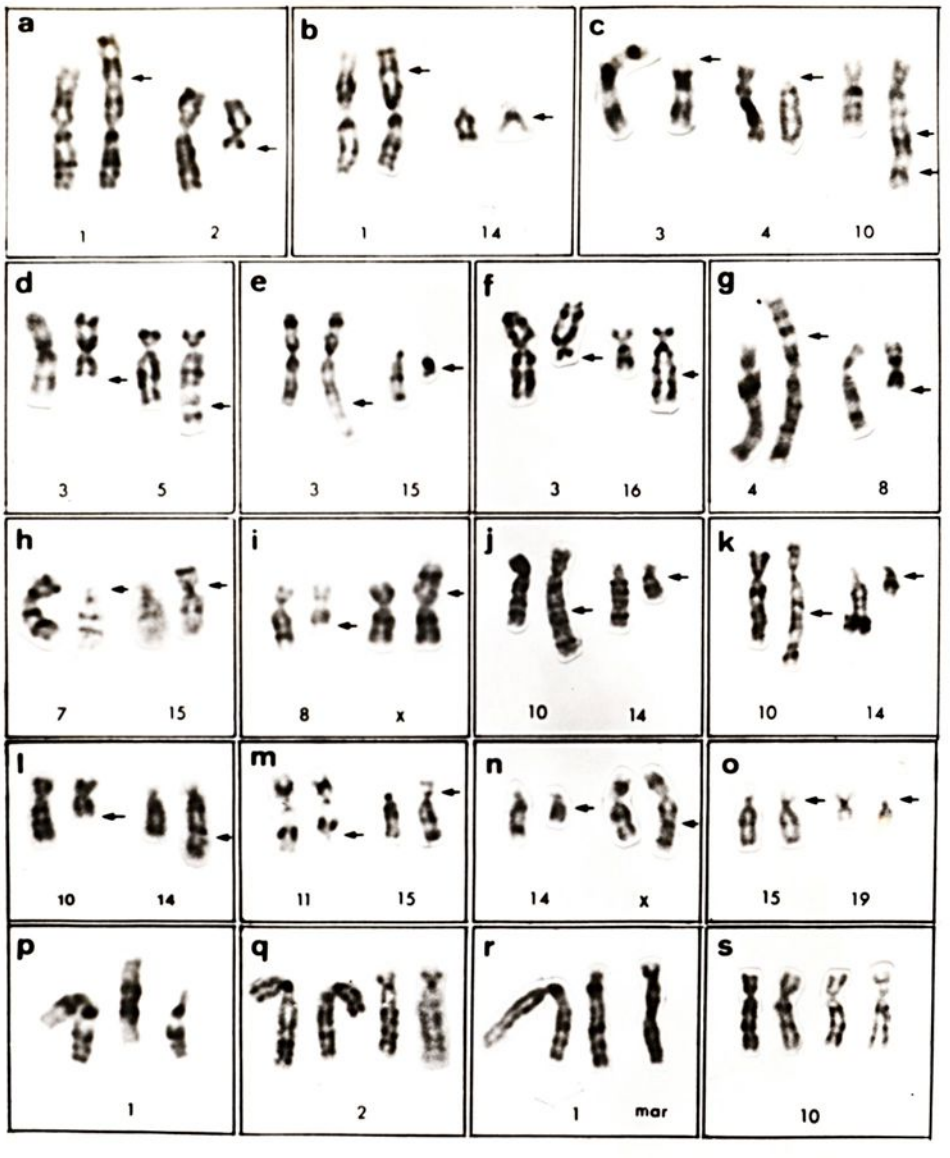


Figura 9. Cariogramas parciais do caso 607 (carcinoma basocelular) mostrando aberrações caritípicas não clonais. (a) t(1;2); (b) t(1;14); (c) t(3;4;10); (d) t(3;5); (e) t(3;15); (f) t(3;16); (g) t(4;8); (h) t(7;15); (i) t(X;8); (j) t(10;14); (k) t(10;14); (l) t(10;14); (m) t(11;15); (n) t(X;14); (o) t(15;19); (p) i(1),+der(1q); (q) del(2), del(2); (r) del(1),+mar; (s) +10,+10. As setas indicam os pontos de quebra nos cromossomos com translocação.

CASO 614

A paciente, de 54 anos de idade e não-fumante, manifestava um nódulo ulcerativo localizado no canto interno do olho esquerdo, de aproximadamente seis meses de evolução, crescimento progressivo e sangramento esporádico. Uma amostra do material, histopatologicamente identificado como um carcinoma basocelular, foi processada e cultivada em duas réplicas. Foram obtidas somente nove metáfases e, entre as seis que puderam ter seus cromossomos contados e que foram parcialmente analisadas, uma era poliplóide e as demais eram aparentemente normais (Tabela 4).

CASO 618

O paciente, de 58 anos de idade, procurou o hospital em virtude do aparecimento de um nódulo ulcerativo na região nasal ocorrido aproximadamente dois anos antes da consulta. A lesão, que apresentou inicialmente superfície descamativa de difícil cicatrização e que piorava quando exposta ao sol, evoluiu para um nódulo ulcerativo, endurecido e crostoso. Foi realizada a exérese e o exame histopatológico revelou carcinoma basocelular.

Uma amostra do material foi enviada ao laboratório, processada e cultivada em quatro réplicas que, apesar de apresentarem índices mitóticos satisfatórios, não permitiram a obtenção de preparações de boa qualidade após a coloração com bandamento G. Das 128 metáfases observadas, dez permitiram apenas contagem do número cromossômico, 84 foram analisadas em coloração usual, 30 foram parcialmente analisadas em banda G e apenas quatro

foram totalmente analisadas. Na maioria delas o número cromossômico foi diplóide ou próximo ao diplóide, duas células apresentaram endorreduplicação, cinco eram poliplóides e uma mostrou poliploidia e endorreduplicação. A perda do cromossomo Y foi observada em três células de dois diferentes frascos (I e IV) e foi por isso considerada clonal. Foram detectadas também duas células com a translocação t(13;14)(q14;q32) e uma terceira, em coloração usual, com monossomia D, trissomia G e um cromossomo Dq+, alterações essas que poderiam ser resultantes de uma translocação t(D;D) (Figura 10). As três células pertenciam à mesma réplica (I) e as alterações não foram, por isso, consideradas clonais, embora tal possibilidade não possa ser excluída. Outras 10 metáfases mostraram alterações cromossômicas numéricas ou estruturais (Tabela 9).

CASO 623

O paciente, de 49 anos de idade e não-fumante, apresentava um tumor localizado na região nasal com cerca de quatro anos de evolução, superfície granulosa-amarelada e consistência elástica. Parte do material, histopatologicamente identificado como carcinoma basocelular, foi processada e cultivada em três réplicas. Foram observadas 38 metáfases, das quais uma foi submetida apenas a contagem do número cromossômico, 26 foram analisadas em coloração usual e 11 foram parcialmente analisadas em bandamento G. A análise cariotípica mostrou uma célula com 46,XY,-2,-E,+mar,+mar (Figura 11), uma célula poliplóide e quatro células com perdas cromossômicas casuais (Tabela 4). O número cromossômico modal observado foi diplóide.

Tabela 9. Tipos e frequências das aberrações cromossômicas observadas em 128 metáfases do caso 618 (carcinoma basocelular) e identificação das réplicas onde foram encontradas.

Aberrações cromossômicas		Réplica
Tipo	Nº de células afetadas	
46,XY,t(13;14)(q14;q32)	2	I
46,XY,-D,+G,Dq^{+} ou t(D;D)	1	I
46,XY,-15,del(7)(q32),del(9)(q21or22), +mar ou 46,XY,t(?7;15),del(9)(q21or22)	1	I
45,XY,+?C,-D,-D,?1q-	1	II
47,-C,?2p-,+mar,+mar	1	I
46,XY,-C,+mar	1	I
46,X,-C,+mar,+mar	1	I
47,XY,-D,+mar,+mar	1	I
45,XY,-1,+ace,+ace	1	I
45,XY,-2	1	I
45,XY,-14	1	I
45,X	3	I, IV
46,XY,+?3,-C	1	I
Poliploidia	5	I
Endorreduplicação	2	I, IV
Poliploidia/endorreduplicação	1	I

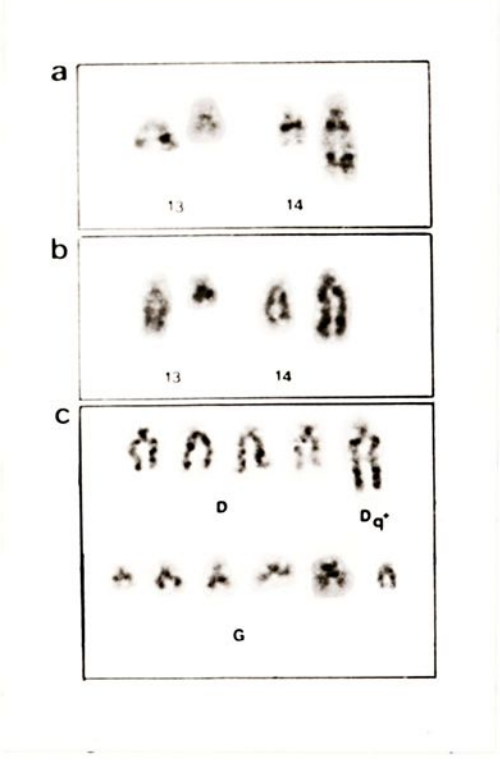


Figura 10. (a e b) Cariogramas parciais do caso 618 (carcinoma basocelular) mostrando a t(13;14)(q14;q32); e (c) cariograma parcial da metáfase 46,XY,-D,+G,Dq^{+}. As setas indicam os pontos de quebra nos cromossomos com translocação.

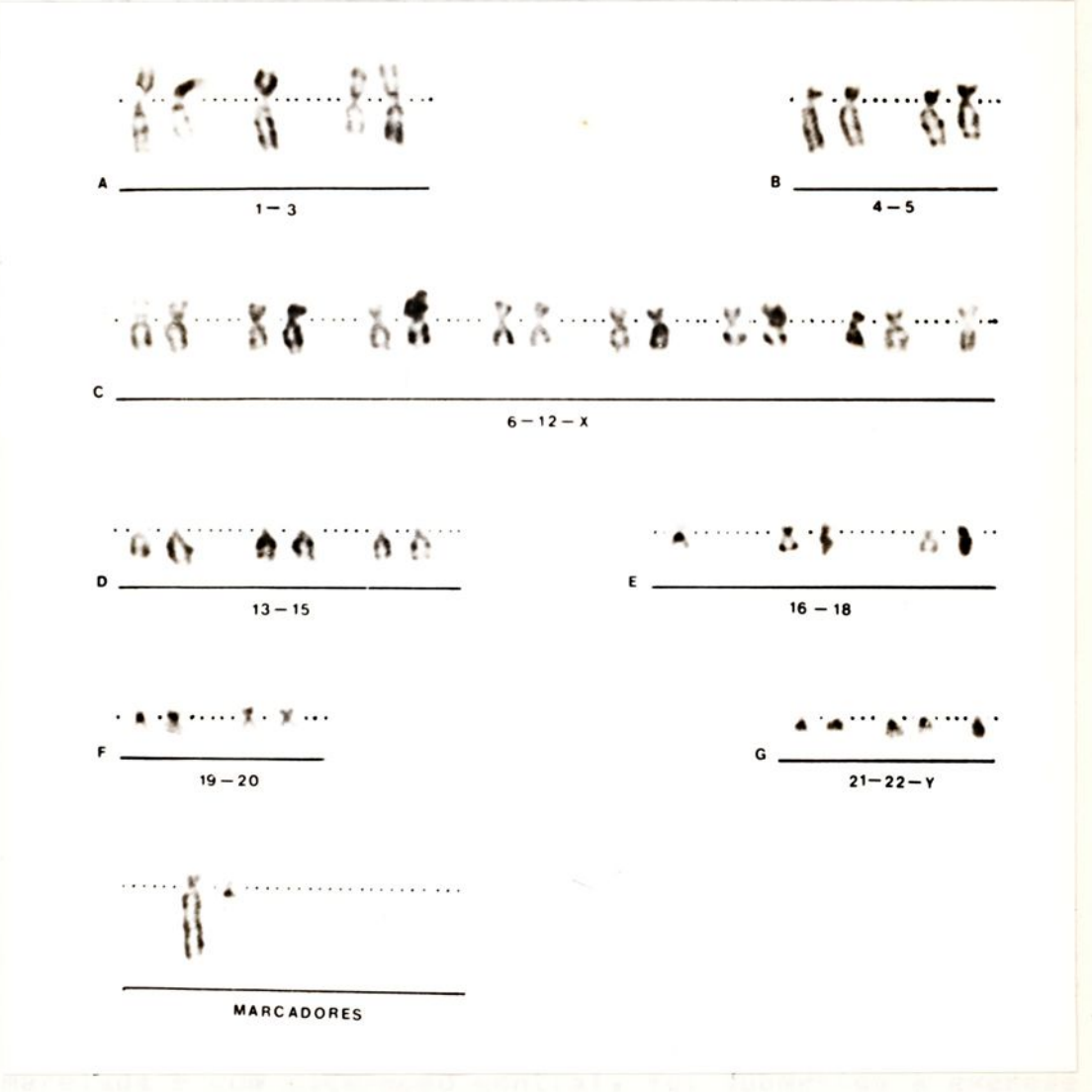


Figura 11. Cariograma de uma célula do caso 623 (carcinoma basocelular) com cariótipo 46,XY,-2,-16,+mar,+mar.

CASO 659

O paciente, de 72 anos de idade e não-fumante, manifestava uma lesão localizada na região retro-auricular esquerda, com cerca de um ano de evolução. O tumor, com superfície granulosa, brancacenta e de consistência elástica, apresentava crescimento progressivo com períodos de secreção e dor local. Foi realizada a extirpação cirúrgica e o resultado histopatológico revelou um carcinoma basocelular queratinizante. Uma amostra do tecido foi processada e cultivada em cinco réplicas, das quais foram obtidas 25 metáfases. Dessas, sete permitiram apenas a contagem do número cromossômico e 18 foram examinadas em coloração usual. Duas células apresentaram constituição poliplóide, e duas mostraram cariótipos 45,XX,+5,-C,-19 e 47,XX,+C (Tabela 4). O núnero cromossômico modal foi 46.

2. Carcinomas espinoceluares

CASO 510

O paciente, de 77 anos de idade e fumante, procurou o hospital por apresentar um tumor no pavilhão auricular, de crescimento lento e progressivo. A lesão, apresentando superfície granulosa amarelada e com ulceração central, foi submetida à exérese e identificada como um carcinoma espinocelular ou fibroxantoma atípico.

Uma amostra do tumor foi cultivada em três réplicas por oito dias, no final dos quais sofreu sincronização da divisão celular contaminando-se durante o processo com bactérias. Apesar da

contaminação, foi realizado o bloqueio com colcemide e foram obtidas 56 metáfases que, devido à qualidade da coloração, não permitiram uma investigação citogenética satisfatória. Cinco células mostraram números cromossômicos iguais a 46 e duas outras eram poliplóides com aproximadamente 92 cromossomos (Tabela 4).

CASO 567

A paciente, de 72 anos de idade e não-fumante, apresentava uma lesão na região temporal direita com cerca de seis meses de evolução. O exame macroscópico revelou uma ulceração com superfície áspera e descamativa, que foi retirada cirurgicamente e diagnosticada histopatologicamente como carcinoma espinocelular bem diferenciado e invasivo. Uma amostra do material foi submetida à desagregação enzimática e cultivada em quatro réplicas, mas apenas três apresentaram número satisfatório de mitoses e sofreram bloqueio da divisão celular.

Foi observado um total de 23 metáfases, sendo que em quatro delas só foi possível a contagem do número cromossômico. Do restante, oito foram examinadas em coloração usual, oito foram parcialmente analisadas e três completamente analisadas após bandamento G. O número cromossômico na maioria delas foi 46, duas mostraram poliploidia com números cromossômicos iguais a 89 e 90, e uma célula exibiu monossomia 7 e trissomia 9 (Tabela 4).

CASO 599

A paciente, de 68 anos de idade e não-fumante, manifestava manchas acastanhadas de aspecto cicatricial na face e tumor papulóide na região nasal com cerca de um ano de evolução. Foi realizada a biópsia e posterior exérese de ambas as lesões, sendo o tumor da região nasal identificado histopatologicamente como carcinoma epidermóide invasivo ou carcinoma espinocelular, e a lesão da face como resultante de uma degeneração do colágeno.

Uma amostra do tumor nasal retirado na exérese foi processada e cultivada em três réplicas, duas da quais com número de mitoses satisfatório. Das dez metáfases obtidas, duas permitiram apenas a contagem do número cromossômico, sete foram analisadas em coloração usual e uma foi completamente analisada após bandamento G. Com exceção de perdas cromossômicas casuais, nenhuma outra alteração foi observada (Tabela 4).

CASO 707

A paciente, de 85 anos de idade e não-fumante, procurou o hospital apresentando a quarta recidiva de carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado, localizado na região retro-auricular direita. O tumor primário, que teve evolução muito rápida, foi retirado um ano antes da consulta e possuía ao seu redor outras formações semelhantes e de menor tamanho.

Uma amostra da lesão foi processada e cultivada em três réplicas, duas das quais apresentaram crescimento celular. Como o índice mitótico era baixo, foram submetidas a tratamento com colcemide com a metade da concentração usada nas demais culturas,

durante quatro horas. Apesar do artifício utilizado, apenas três metáfases foram obtidas, sendo que destas, uma possibilitou apenas a contagem do número cromossômico, uma foi examinada em coloração usual e a outra mostrou constituição poliplóide. Nas duas primeiras o número cromossômico foi igual a 46 (Tabela 4).

3. Ceratoses

CASO 503

A paciente, de 56 anos de idade, não fumante e que trabalhou por muitos anos na lavoura, procurou o serviço de cirurgia plástica por apresentar uma mancha avermelhada na região nasal cuja superfície era áspera e, quando exposta ao frio, formava fissuras. A lesão foi referida como sendo decorrente de uma queimadura por gordura ocorrida há cerca de 15 anos e já submetida à exérese nove meses antes da consulta. Naquela ocasião, o exame histopatológico identificou-a como uma ceratose solar liquenóide, diagnóstico esse confirmado na presente exérese.

Uma amostra do tumor foi cultivada em quatro réplicas por quatro dias. Apesar da cultura mostrar contaminação por bactérias em todos os frascos, como apresentava mitoses, sofreu bloqueio da divisão celular com colcemide e foi colhida em seguida. Foi obtido um total de 22 metáfases, quatro das quais tiveram seus cromossomos contados e apenas três permitiram uma análise parcial após bandamento G. O número cromossômico modal foi diplóide, e apenas uma célula possuia constituição poliplóide (Tabela 4).

CASO 508

O paciente, de 69 anos de idade, marceneiro aposentado e fumante, apresentava uma lesão nodular com região central recoberta por crostas, localizada no dorso da mão esquerda. O material retirado por ocasião da biópsia foi identificado histopatologicamente como um carcinoma espinocelular bem diferenciado e invasivo. Posteriormente, o nódulo foi submetido à exérese e, contrariando o primeiro resultado, o exame histopatológico realizado revelou uma ceratose solar hipertrófica.

Uma amostra obtida na exérese da lesão foi cultivada em quatro réplicas, três das quais com crescimento celular. Foi obtido um total de 176 metáfases, 31 com cromossomos passíveis de contagem, e dez que puderam ser parcialmente ou completamente analisadas após técnica de bandamento G. O número cromossômico modal observado foi diplóide, nove células eram poliplóides, uma delas com translocação t(2;2)(p23;q13or14) (Figura 12) e duas apresentaram cariótipo 46,XY,Cp-,Dq^{+} e 47,+?D ou +?E. Uma outra célula mostrou, em coloração usual, monossomia 2, trissomia C e um cromossomo 2p^{+}, alterações essas que poderiam ser resultantes de uma t(2;2). Nesse caso, duas células provenientes da mesma réplica (II) teriam o rearranjo citado que, de acordo com os critérios utilizados, não foi considerado clonal, embora tal possibilidade não possa ser excluída (Tabela 4).

Recentemente, o paciente retornou ao mesmo serviço devido ao aparecimento de múltiplas tumorações cutâneas localizadas na face. O exame histopatológico identificou vários tipos de lesões que incluíram carcinomas basocelulares, ceratoses solares e hiperplasias

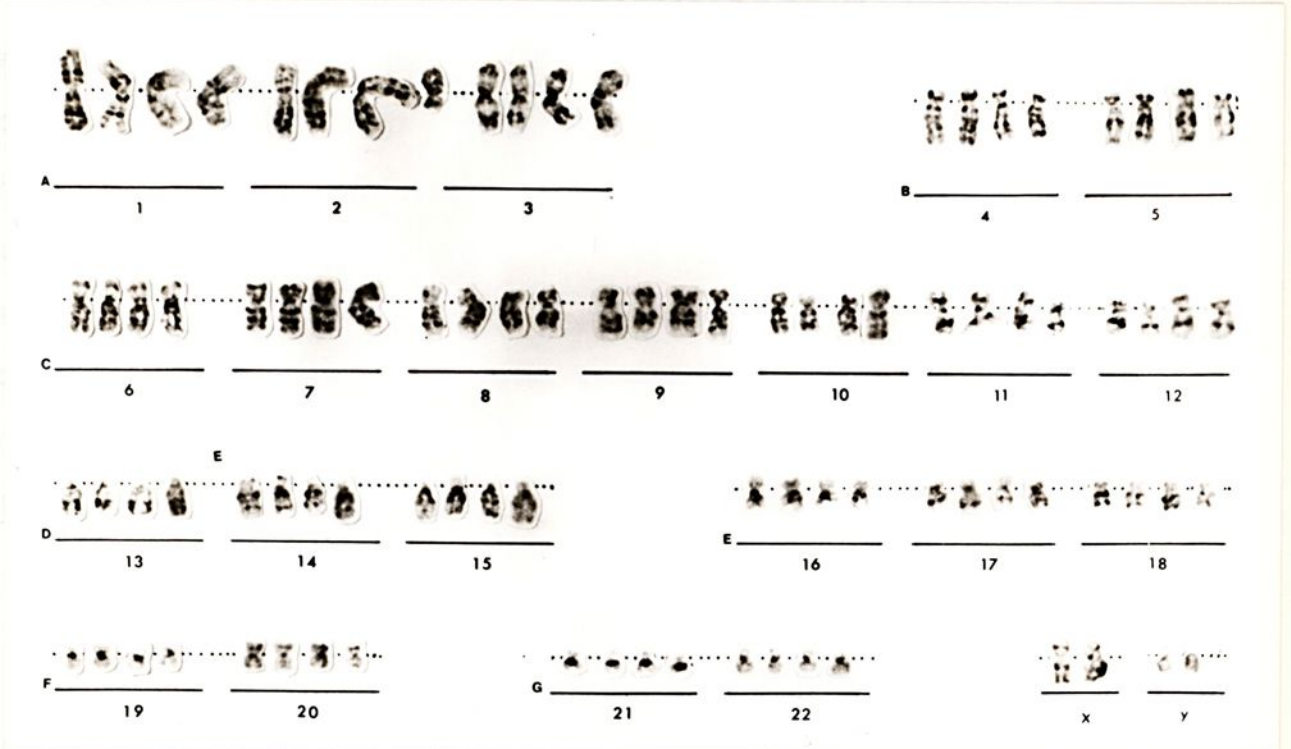


Figura 12. Cariograma de uma célula poliplóide do caso 508 (ceratose solar) mostrando a t(2;2)(p23;q13or14).

sebáceas. Essas lesões não foram submetidas ao cultivo celular.

4. Cisto Epidérmico

CASO 603

O paciente, de 28 anos de idade, carpinteiro e fumante, procurou o serviço de cirurgia plástica por apresentar tumoração na face, de crescimento lento e progressivo. Uma amostra do material, identificado como cisto epidérmico ou de inclusão epidermóide, foi processada e cultivada em duas réplicas, uma delas com crescimento celular satisfatório. Das 12 metáfases obtidas, oito permitiram apenas a contagem dos cromossomos e quatro foram analisadas em coloração usual. O número cromossômico na maioria delas foi 46, uma era poliplóide e duas mostraram cariótipo 46,XX,-C,+F e 47,XX,+? (Tabela 4).

IV. DISCUSSÃO

Durante a última década, um grande número de estudos citogenéticos em tumores ampliou significativamente o entendimento sobre o papel das alterações genéticas no processo maligno. O fato de que a maioria dos neoplasmas tem aberrações cromossômicas visíveis contribuiu para o reconhecimento da importância dessas modificações somáticas na tumorigênese. Além disso, a demonstração de que células de um dado tumor podem apresentar a mesma alteração ou alterações estreitamente relacionadas reforçou a hipótese de origem unicelular da lesão. Teve grande importância também a observação de que a complexidade cariotípica é maior em estágios mais avançados da doença, presumivelmente porque as anomalias que conferem à célula vantagem seletiva de crescimento são mantidas e permitem a expansão do clone maligno (NOWELL & CROCE, 1986).

Com o desenvolvimento da citogenética do câncer, um outro aspecto do problema foi revelado, ou seja, que determinados rearranjos cromossômicos estão consistentemente associados a tipos específicos de neoplasias ou, então, a todos os tipos de neoplasias. Tais achados sugeriram que os genes localizados em certos pontos do genoma são particularmente importantes na carcinogênese e forneceram indícios sobre os mecanismos envolvidos na alteração da função desses oncogenes (WEINBERG, 1989). Por exemplo, a análise da leucemia mielóide crônica e do linfoma de Burkitt mostrou que as alterações cromossômicas resultam na expressão alterada dos oncogenes celulares MYC, no linfoma, e ABL, na leucemia (JONG **et al.**, 1988; CHIAO **et al.**, 1990). Os neuroblastomas, por sua vez, apresentam **double minutes** e regiões homogeneamente coradas que são

manifestações citogenéticas da amplificação do oncogene MYCN (BRODEUR & SEEGER, 1986; CHIAO, 1990).

Embora a maioria dos achados com importância no entendimento da biologia tumoral seja resultado de investigações em doenças hematológicas, tem havido nos últimos anos um esforço crescente na caracterização das alterações cariotípicas de diferentes tumores sólidos. Apesar disso, o volume de informações continua sendo ainda muito inferior ao das leucemias e dos linfomas, principalmente em função das dificuldades técnicas para estudo, desde a retirada de uma amostra para cultivo até a obtenção de preparações cromossômicas adequadas.

No caso específico das lesões de pele, as análises realizadas são ainda em pequeno número e a maioria delas foi feita em melanomas malignos (SANDBERG, 1990). Nesse último grupo, apesar dos dados serem geralmente referentes a linhagens celulares estabelecidas ou a material proveniente de metástases, existem evidências indicando um padrão de aberrações cromossômicas que consistem principalmente em rearranjos dos cromossomos 1, 6 e 7 (TRENT et al., 1989a; TEYSSIER, 1989).

Embora as anormalidades cariotípicas em melanoma estejam até certo ponto caracterizadas, pouco se sabe sobre as aberrações cromossômicas que precedem ou que acompanham as modificações histopatológicas nessa neoplasia (HEIM & MITELMAN, 1987). As análises das lesões melanocíticas benignas são ainda em pequeno número e revelam cariótipos normais ou anomalias cromossômicas que, geralmente, não coincidem com aquelas observadas em melanomas e, portanto, não esclarecem as relações entre os processos pré-malignos e malignos (BALABAN et al., 1984; 1986; RICHMOND et al., 1986; COWAN

et al., 1988; HECHT & HECHT, 1988; PARMITER et al., 1988). Uma exceção deve ser citada, aquela referente a rearranjos da banda 10q24 observados em alguns nevos e melanomas (MITELMAN, 1985; RICHMOND et al., 1986; PARMITER et al., 1988) e que sugere a presença de um ou mais genes na região terminal do braço longo do cromossomo 10 relacionados com os estágios iniciais dos tumores melanocíticos (PARMITER et al., 1988).

Com relação à transformação neoplásica de outras lesões benignas de pele, os dados mais interessantes são provenientes de um dos subtipos do lipoma. O estudo desses tumores mostrou vários rearranjos envolvendo preferencialmente o segmento 12q13-q15, que também são descritos em seus correspondentes malignos, os lipossarcomas (FRIGERE et al., 1990; MITELMAN et al., 1990; SREEKANTAIAH et al., 1990a;b; TAIMI et al., 1990) e em outros tumores benignos como os leiomiomas e os adenomas pleomórfico de glândula salivar (SREEKANTAIAH & SANDBERG, 1991). A aparente coincidência de alterações em processos benignos e malignos parece indicar um padrão citogenético semelhante no desenvolvimento dessas condições, envolvendo genes provavelmente relacionados com o controle da divisão celular. Análises moleculares do segmento 12q13.3-q14.1 têm revelado padrões alterados de metilação nos lipossarcomas (PAULIEN et al., 1990) e estudos futuros poderão caracterizar os pontos exatos de quebra em diferentes lesões e determinar o seu papel na proliferação benigna e maligna (SREEKANTAIAH & SANDBERG, 1991). De qualquer modo, não é possível excluir o envolvimento de outros segmentos críticos no processo, dado que o rearranjo da banda 16p11 também parece ser necessária para a transformação neoplásica no caso dos lipossarcomas

(SREEKANTAIAH et al., 1990b).

Um outro subtipo de lipoma apresenta alterações das bandas 13q12-q13 e, em consequência, deficiência da banda 13q14 na qual o gene do retinoblastoma (RB1) foi mapeado. Esses achados indicam que a perda ou inativação dessa região pode ter efeitos pleiotrópicos no desenvolvimento de alguns tecidos e nem sempre levar à malignização, mas sua relação com os lipomas só poderá ser devidamente esclarecida através de técnicas moleculares (SREEKANTAIAH et al., 1989). Embora não existam ainda conclusões definitivas sobre os eventos que ocorrem durante seu desenvolvimento, não existem dúvidas de que os lipomas constituem um excelente material para investigação do papel das alterações cromossômicas nas proliferações benignas e também da possível relação entre tais alterações e a transformação maligna (SANDBERG, 1988).

As lesões de pele analisadas citogeneticamente pelo presente trabalho compreenderam 15 condições malignas (11 carcinomas basocelulares e quatro carcinomas espinocelulares), duas pré-malignas (uma ceratose solar liquenóide e uma ceratose solar hipertrófica) e uma benigna (um cisto epidérmico ou de inclusão epidermóide). Os tumores benignos foram em menor número que os malignos, provavelmente porque não trazem danos ao hospedeiro, com exceção de alguns problemas estéticos, e, por isso, não são motivos de procura ambulatorial.

A maioria das neoplasias foi proveniente de indivíduos idosos, o que está de acordo com o esperado, pois a incidência desses tipos de câncer aumenta proporcionalmente com a idade (KAESBERG & ERSHLER, 1989; NEWELL et al., 1989). A maioria dos autores acredita que esse aumento seja resultante da exposição contínua e prolon-

gada a certos agentes carcinogênicos ao longo da vida, e não devido a um efeito intrínsico da própria senescência (DIX, 1989, ; PITOT, 1989). É difícil, porém, esclarecer se o câncer e o envelhecimento são entidades interligadas ou independentes. Ambos têm pontos comuns e parecem ter origem em mutações que ocorrem em múltiplos passos e afetam a regulação normal dos genes. Os dois processos, entretanto, parecem tomar rumos diferentes a partir de um determinado ponto, um deles resultando em morte celular e, portanto, em envelhecimento, e o outro em modificações no controle da divisão celular que caracterizam o câncer (CUTLER & SEMSEI, 1989).

Os pacientes da amostra, sem exceção, eram de pele clara, fato esse que não surpreende pois a baixa proteção do tegumento à luz solar favorece a ocorrência de lesões causadas pelos raios UV na molécula de DNA, o que pode explicar as mutações somáticas necessárias para o desencadeamento do processo maligno (REDDY & FIALKOW, 1989).

Com exceção de quatro carcinomas basocelulares (550, 561, 607 e 618), todos os outros casos exibiram um pequeno número de metáfases, na maioria das vezes em condições desfavoráveis à análise citogenética. Isso provavelmente foi decorrente em parte das dificuldades de cultivo dessas lesões, da adequação do meio de cultura e sua suplementação e da eficiência ou validade dos reagentes utilizados. O próprio comportamento das células, determinado pela constituição genética ou por influências humorais recebidas *in vivo*, pode ter contribuído para esse resultado. Uma evidência disso foi o período variável de cultivo das amostras que, apesar das condições até certo ponto controladas, responderam diferentemente aos estímulos para proliferação, independente do tipo

histológico a que pertenciam ou das características clínicas dos pacientes.

Entre os 61 tumores recebidos, 26 exibiram contaminação, primariamente responsável pelo insucesso nesses casos. Embora a maioria das contaminações tenha ocorrido nas fases iniciais de cultivo, provavelmente consequente de condições não assépticas por ocasião da biópsia e semeadura, várias culturas contaminaram em fases posteriores, algumas delas quando já estavam estabelecidas. Duas dessas culturas (casos 503 e 510), colhidas após a detecção da presença de bactérias, resultaram em metáfases com qualidade e número muito aquém do esperado.

A fase do trabalho mais seriamente atingida pela contaminação ocorreu entre os meses de outubro de 1989 a abril de 1990, quando foram processados os tumores 641 a 685. Uma das explicações para esse fato poderia estar relacionada com a época do ano em questão, que, em virtude da temperatura ambiente elevada, facilitaria a multiplicação de fungos e bactérias nos espécimens em trânsito. A outra explicação, mais específica, seria referente à montagem de sete culturas (673 a 679), realizada num mesmo dia e cerca de 18 horas após a colheita das amostras. A presença de agentes patogênicos em um dos espécimens poderia ter aumentado a probabilidade de contaminação das outras amostras manuseadas no laboratório.

Do mesmo modo que o insucesso, os resultados positivos nem sempre puderam ser relacionados com fatores exógenos, tais como, época do ano ou período em trânsito da amostra. Os tumores 503 a 529 e 603 a 623, por exemplo, que mostraram crescimento satisfatório, foram processados no mesmo dia da colheita ou cerca de 18 horas

após, durante os meses de março a abril e julho a agosto, da mesma forma que os casos 530, 532 e 544 que apresentaram contaminação ou não resultaram em crescimento.

A análise citogenética de algumas amostras revelou a presença frequente de células com cariótipos diplóides, provavelmente em virtude de tais culturas terem permanecido em cultivo por um longo período em meio com altas concentrações de soro fetal bovino (20%). Tal fato teria permitido o crescimento de células normais provenientes do parênquima tumoral ou do tecido conjuntivo adjacente em lugar das células neoplásicas (CHEN & SHAW, 1973; MIYAMOTO **et al.**, 1988).

A poliploidia foi observada em 15 espécimens cultivados e tem sido referida por vários autores em diferentes tumores de pele (CHEN & SHAW, 1973; BECHER **et al.**, 1983; BALABAN **et al.**, 1984; OCHI **et al.**, 1984; PARMITER **et al.**, 1986; RICHMOND **et al.**, 1986; ALEDO **et al.**, 1988; COWAN **et al.**, 1988; LIMON **et al.**, 1988; TRENT **et al.**, 1989a; b; SOZZI **et al.**, 1990; ATKIN & BAKER, 1990). Sua ocorrência associada a anomalias cromossômicas adicionais não é rara e pode ser exemplificada pelas células com a translocação t(2;2)(p23;q13or14) no caso 508 e com a deficiência del(2)(p13) no caso 607. Embora não deva ser excluída a hipótese de que a poliploidia reflita apenas um efeito de condições **in vitro**, é possível que ela represente um evento comum nas culturas de lesões cutâneas e indique malignidade ou instabilidade genética relacionada com predisposição ao câncer (SVENDSEN **et al.**, 1990).

Um outro fenômeno, às vezes observado em análises de células tumorais, é a endorreduplicação, que segundo CHEN & SHAW (1973) predomina nas passagens iniciais da cultura, ao contrário da

poliploidia que aumenta com o número de repiques. No presente estudo, a endorreduplicação foi detectada em apenas cinco amostras (543, 550, 561, 607 e 618), num total de metáfases inferior ao de células poliplóides. Levando-se em conta que muitos espécimens permaneceram em cultivo por períodos de três a dez dias e nunca foram subdivididos, a observação de CHEN & SHAW (1973) não parece explicar o presente resultado, mais provavelmente decorrente de condições do processo de cultivo ou de características próprias do tumor. Do mesmo modo que as células poliplóides, as células endorreduplicadas também mostraram alterações cromossômicas adicionais, como o rearranjo cariotípico clonal envolvendo os cromossomos 4 e 14 no caso 550, e a translocação t(1;17)(p31;q25) no caso 561.

A análise dos tumores benignos e pré-malignos no presente estudo revelou a maioria das células com constituição normal, mas também algumas alterações cromossômicas esporádicas que incluíram células poliplóides, trissomias e anomalias estruturais. Uma das ceratoses solares estudadas apresentou uma provável aberração clonal, a translocação t(2;2)(p23;q13or14). O achado citogenético dessa lesão (caso 508), que havia sido previamente diagnosticada como carcinoma espinocelular, poderia indicar sua malignização. Entretanto, as ceratoses solares estudadas por ALEDO **et al.** (1989b) e por MERTENS **et al.** (1989a; b) também mostraram aberrações cromossômicas clonais, duas delas com envolvimento do braço longo do cromossomo 2. De qualquer modo, muitas outras lesões pré-malignas e mesmo benignas, como os nevos, os lipomas e os leiomiomas uterinos, apresentam anomalias cariotípicas recorrentes, que portanto não caracterizam o estado maligno (SREEKANTAIAH &

SANDBERG, 1991).

Em relação às lesões malignas, as alterações clonais foram detectadas em apenas quatro amostras mas, possivelmante, teriam sido também observadas em outros tumores estudados, se as metáfases obtidas tivessem sido em número e qualidade mais adequados à análise citogenética. Essas alterações compreenderam um rearranjo cariotípico complexo envolvendo os cromossomos 4 e 14 no caso 550, as t(9;14), del(1), trissomia 5, trissomia 7 e monossomia X no caso 561, a trissomia 18 no caso 607 e a monossomia Y no caso 618. Essas anomalias já foram descritas em diversos tumores que não os de pele, porém com diferentes pontos de quebra, no caso dos rearranjos estruturais (MITELMAN, 1985). Uma inversão inv(4)(p15q26), muito semelhante à do caso 550, foi vista em um carcinoma espinocelular da hipofaringe (JIN et al., 1988b), e diferentes translocações do braço longo do cromossomo 4 ou do 14 foram encontradas em carcinomas espinocelulares de pele (ALEDO et al., 1988; 1989a; b; HEIM et al., 1988; 1989b) e de língua (JIN et al., 1988a). Digno de nota é o fato dos proto-oncogenes SKI e ABLL estarem mapeados em 1q22-25 e do fator de crescimento epidérmico (EGF) ter sido mapeado em 4q25 (COX et al., 1989), bandas essas provavelmente envolvidas em rearranjos detectados nos carcinomas epiteliais citados (JIN et al., 1988b; caso 550 e 561), o que indica a possibilidade desses locos estarem relacionados com o processo maligno.

A monossomia do cromossomo Y, observada no caso 618, também tem sido detectada em diferentes leucemias e linfomas e em tumores sólidos como o meningioma e o carcinoma renal (SANDBERG, 1990). A mesma observação, porém, já foi feita em células normais de vários tecidos (LIMON et al., 1990) e mesmo em linfócitos provenientes de

pessoas idosas (POWELL et al., 1990). Em virtude desses achados, tal aberração nem sempre tem sido interpretada como uma anomalia específica de tumores mas como uma predisposição das células à perda desse cromossomo (LIMON et al., 1990) provavelmente em consequência de atraso na sua migração durante a anáfase, em situações que alteram a frequência ou a sequência da divisão celular (POWELL et al., 1990).

A presença de alterações cariotípicas clonais não relacionadas observadas na amostra 561 é compatível com os resultados já obtidos por diferentes autores em carcinomas basocelulares, espinocelulares e lesões benignas de pele (Tabelas 10 a 12). Além dos tumores cutâneos, outras neoplasias também têm sido descritas que manifestam a presença de vários clones com aberrações cromossômicas muito distintas. Como exemplos podem ser citados os carcinomas espinocelulares de língua (JIN et al., 1988a), de laringe (HEIM et al.,1989a; JIN et al., 1990a), de cavidade oral (HEIM et al., 1989a; JIN et al., 1990b) e um papiloma nasal (JIN et al., 1989). Esses achados foram explicados como reflexo da origem policlonal desse tipo de lesão neoplásica (HEIM et al., 1988).Tal interpretação supõe que as anomalias sejam primárias e não secundárias a algum rearranjo indetectável no nível estudado. Evidências para a hipótese de policlonalidade provêm de observações histológicas em carcinomas epiteliais com focos primários múltiplos, que sugerem uma predisposição geral do tecido à malignização. Considerando que a ação de um carcinógeno, se suficientemente longa e intensa, produz mudanças irreversíveis nas células, não parece improvável que o mesmo mecanismo possa agir em diferentes pontos de um epitélio e resultar em tumores múltiplos (SLAUGHTER et al.,

Tabela 10. Aberrações cromossômicas clonais em carcinomas espinocelulares de pele.

Cariótipo	Referências
- 46,XY,del(13)(pter->q14.1::q14.3->qter)	FITCHETT et al., 1984
- 84,XXX,-1,-1,-3,-8,-11,-13,-14,-14,-19,-21, -22,-22,+6,+i(1p),i(1q), +t(3q14q), del(9) (p23),del(9)(p23),+der(19)t(8;19)(q21;q11)	ALEDO et al., 1988
- 46,XY,t(8;15)(q23;q26),del(20)(p12),t(4;10;8) (q32;q23;q24.2)?/46,XY, t(2;10)(q32.3;q25)/ 46,XY,t(16;21)(pter;q21)	ALEDO et al., 1989b
- 46,XY,t(1;2;9;10)(p33;q35;q22.2;q2100)/46,XY, inv(1)(p35q3100)/46,XY,inv(1)(p21.1q31)/46, XY,t(1;5)(p21;q23)/ 46,XY, t(1;6)(p22;p12)/ 46,XY,t(2;6)(p12;q2?)/46,XY, t(3;20)(q13.3; q11.2)/46,XY,t(12;14)(q13.2;q32)/46,XY,-18, +der(18)t(18;?)(q22;?)	
- 46,XX,-1, +der(1)(pter->p22::q11->cen->p22:), -9,+der(9)t(1;9)(q11;p24)/46,XX,t(3;6)(q21; p21)/ 46,XX, t(5;14)(q13;q24), t(7;18)(q32; q11)/ 46,XX,t(8;11)(p22;q13)/ 46,XX,t(8;11) (p22;q13),t(15;17)(q13;q24)/ 46,XX,t(12;15) (q12;p11)	HEIM et al., 1988
- 46,XY,t(3;17)(p21;q21)/45,XY,-13,i(9q)/46,XY, -13,+21,i(9q)	HEIM et al., 1989b
- 47,XY,-1,-6,+7,-11,+der(1)t(1;6)(q21;p23),+der (6)t(1;6;11)(q21;p23q25;p15),+der(11)t(6;11) (q25;p15)/ 46,XY,del(2)(p21),del(4)(p13)/47, XY,+7/ 46,XY,t(7;14)(p11;p13)/ 46,XY,inv(11) (q13q21)	
- 46,XY,t(4;10)(p16;q11)/46,XY,t(4;10)(p16;q11), t(10;15)(q26;q14)	
- 46,XY,t(9;12)(q34;q21)	SCAPPATICCI et al., 1989b

Tabela ii. Aberrações cromossômicas clonais em carcinomas basocelulares de pele.

Cariótipo	Referência
- 46,XY,del(i5)(q25)	ALEDO et al., 1989b
- 46,XX,t(2;i3)(q2i;qi3),t(2;i5)(qi2;qii) ou t(2p;i5q)(2q;i5q)	
- 46,XX,t(3;3)(qi2;q29)/46,XX,t(i0;i0)(pii;q26)	SCAPPATICCI et al., 1989a
- 45,X,-Y	MERTENS et al., 1990
- 47,+7	
- oito tumores com rearranjos estruturais, quatro dos quais com dois ou mais clones não relacionados	

Tabela 12. Aberrações cromossômicas clonais em lesões benignas relacionadas com os carcinomas baso e espinocelulares de pele.

Cariótipo	Lesão/Nº	Referência
- 46,XY,t(8;18)(q24;q11.2) ou (q24;q10)	Ceratose solar/1	ALEDO et al., 1989b
- 46,XX,t(2;5)(q31;q31),t(8;15)(p21;q21)/46,XX,t(7;17)(p13;p13)/47,XX,t(3;20)(q12;p13),+7/46,XX,t(1;12)(p12;q13)	Ceratose seborréica/1	MERTENS et al., 1989a
- 46,XX,t(2;6;11)(q21;q27;p13)	Ceratose seborréica/1	MERTENS et al., 1989b
- 46,XX,der(2)(2pter->2p13::2p11->cen->2q37::5q33->5qter),der(2)(:2p13-> cen-> 2q37:: 6q23 -> 6qter),der(5)t(2;7;5)(q37;q11;q33),der(6)(6pter->cen->6q23::2p13-> 2pter), der(7) t(2;7;5)(q37;q11;q33),del(13)(q11q14)	Ceratoacantoma/1	MERTENS et al., 1989b

1953).

A hipótese de origem policlonal de alguns tumores de pele está, entretanto, em desacordo com o conceito monoclonal da carcinogênese. A idéia de que a maioria das neoplasias humanas surge de uma única célula é antiga e deriva de muitas observações. Por exemplo, as células de lesões provenientes de mulheres heterozigotas para a desidrogenase da glicose-6-fosfato expressam somente uma das variantes enzimáticas (WATSON et al., 1987). Esse resultado só pode ser explicado se tais células descenderem de uma única célula mãe com o mesmo X inativo. A mesma conclusão é obtida do estudo de tumores do sistema imune, que mostram apenas um tipo de imunoglobulina de superfície, provavelmente decorrente de somente um rearranjo do loco para a porção variável da cadeia protéica (AISENBERG & BLOCH, 1972). Finalmente, a demonstração da presença de aberrações cromossômicas idênticas em todas as metáfases analisadas de um neoplasma fala a favor da origem comum das células da lesão (SANDBERG, 1990).

Embora os dados a favor da monoclonalidade do câncer sejam convincentes, é importante lembrar que a maioria deles provém da análise de lesões hematológicas ou de tumores sólidos mesenquimais, ao contrário daqueles que sugerem origem multiclonal e são derivados de observações clínicas, histopatológicas e citogenéticas de carcinomas. Além disso, deve ser considerado o fato de que, na ocasião em que os neoplasmas são investigados, a população de células já evoluiu às vezes por vários anos e pode não ser representativa da condição inicial. No caso dos tumores de pele, a situação é diferente, conforme já proposto por MERTENS et al. (1989a), por duas razões. Em primeiro lugar porque o tecido está

constantemente exposto a agentes carcinogênicos, como os raios ultra violeta (UV), o que aumenta a probabilidade de diferentes células sofrerem transformação, e em segundo lugar, porque os tumores de pele são facilmente reconhecidos e possibilitam o estudo nas primeiras fases de seu desenvolvimento.

Na tentativa de esclarecer se a presença de múltiplos clones pode ser decorrente das condições de cultivo, HEIM **et al.** (1989c) analisaram a evolução cariotípica de uma linhagem celular de carcinoma espinocelular **in situ** (doença de Bowen). Os dados obtidos mostraram redução da complexidade genética proporcional ao aumento do número de repiques realizados, de modo que um único clone foi observado no final do experimento. O resultado indicou que as condições de cultivo não foram responsáveis pelo aparecimento de aberrações cromossômicas múltiplas mas, ao contrário, exerceram uma pressão seletiva sobre elas. Os autores sugeriram que, após essa fase de convergência genética, possa ocorrer um novo aumento na variabilidade, levando ao aparecimento de rearranjos secundários que caracterizam a progressão neoplásica.

A aparente ausência de um denominador cromossômico comum nos tumores de pele pode ser uma evidência de que um grande número de padrões genéticos existam na gênese desses carcinomas. Entretanto, não é possível excluir a hipótese de que algumas das anomalias clonais possam ter apenas um pequeno papel na tumorigênese e refletir somente modificações secundárias do parênquima tumoral, ou mesmo aberrações dos fibroblastos derivados do tecido conjuntivo adjacente ou de células epiteliais normais (MERTENS **et al.**, 1990). Nesse ponto, convém salientar a presença frequente de aberrações estruturais dos cromossomos do grupo D nas análises já realizadas.

Por exemplo, nos casos 550, 561, 607 e 618 foram detectadas muitas anomalias clonais e não clonais dos cromossomos 13, 14 e 15. HEIM **et al.** (1988) também descreveram um carcinoma **in situ** com três rearranjos diferentes dos cromossomos 14 e 15 e ALEDO **et al.** (1988) relataram várias translocações do cromossomo 14 em um carcinoma espinocelular de um paciente com xeroderma pigmentoso. A explicação para tais achados é difícil de ser feita no presente momento mas, quando um número maior de tumores for estudado, essas aberrações podem se mostrar consistentes entre as lesões de pele.

Um achado interessante da presente análise foi a frequência elevada de anomalias não clonais envolvendo praticamente todos os cromossomos, com exceção do cromossomo 21, em células das amostras 550, 561, 607 e 618. Possivelmente a mesma observação teria sido feita nas demais amostras se um número satisfatório de metáfases tivesse sido obtido. Tais rearranjos não são usuais na análise citogenética de diferentes tecidos normais ou tumorais (SANDBERG, 1990), mas já foram detectados em várias neoplasias cutâneas (Tabela 13). Segundo MERTENS **et al.** (1989b), essas anomalias podem refletir uma predisposição do campo epitelial ao câncer e na verdade representar células neoplásicas derivadas de clones menores que, em virtude do pequeno número de metáfases estudadas, não satisfazem o critério de clonalidade adotado. Se essa idéia for correta, o nível real de heterogeneidade cariotípica no grupo é notavelmente subestimado. Apesar da hipótese de predisposição da pele à malignização parecer provável, o presente trabalho não forneceu evidências para a presença de clones menores, uma vez que pelo menos em dois casos (561, 607)) o número de metáfases investigadas com bandamento G foi suficiente para

Tabela 13. Aberrações cromossômicas não clonais em tumores de pele. (Ca= carcinoma)

Cariótipo	Lesão/Nº	Referência
- diferentes translocações envolvendo a banda 14p11	Ca espinocelular/1	ALEDO et al., 1988
- 53% de dicêntricos, com envolvimento preferencial do 12q	Ca espinocelular/1	ALEDO et al., 1989a
- dicêntricos	Ca espinocelular/2	ALEDO et al., 1989b
- cinco aberrações estruturais	Ca espinocelular/1	HEIM et al., 1989b
- seis aberrações estruturais e uma numérica		
- 29 aberrações estruturais		
- 46,XY,t(2;12)(q21;q24); 46,XY,t(5;14)(q34;p11)	Ca espinocelular/1	SCAPPATICCI et al., 1989b
- dicêntricos	Ca basocelular/2	ALEDO et al., 1989b
- 45,XX,-18,t(5;7)(q23;q35); 45,XX,-19,t(X;5)(q28;p12); 45,XX, -16, t(1;16)(q44;q23),t(3;18)(p14;q23); 46,XX,t(10;18)(q26;q21); 47,XX,del(3)(p14),+ring(?); 45,XX,-14, t(12;14)(q24;q21); 46,XX, t(3;19)(p12;q12); 46,XX,del(5)(q11); 46,XX,15p^{+}	Ca basocelular/1	SCAPPATICCI et al., 1989a
- 16% das células com alterações estruturais não clonais	Ca basocelular/31	MERTENS et al., 1990
- dicêntricos	Ceratose solar/2	ALEDO et al., 1989b
- t(3;20)(p13;p13); t(3;9)(p12;q34); t(5;9)(p15;p13); del(1)(p32); 9p^{+}; 1q^{+}	Ceratose solar/1	MERTENS et al., 1989a
- 46,XXt(1;3)(p13;p11); 46,XX,del(6)(q21)	Ceratose seborréica/1	MERTENS et al., 1989b
- duas alterações numéricas		
- 46,XX, t(1;12)(q21;24); 46,XX,t(2;7)(p13;q36); 46,XX,t(2;13)(q37;q14); 46,XX, t(3;7;21)(q24;q21;p11), del(6)(23); 46,XX,t(5;10)(q13;q26); 46,XX, t(6;15)(q25;q26); 46,XX, t(6;22)(q21;q13); 46,XX,t(11;14)(q11;p11)	Ceratoacantoma/1	MERTENS et al., 1989b

detectar, com uma probabilidade de 95%, clones com frequência igual ou superior a 2 ou 3% (HOOK, 1977).

Uma explicação alternativa para o problema poderia se basear na característica de instabilidade cariotípica dessas lesões, muito embora falhas e quebras cromossômicas tenham sido eventos incomuns nas análises citogenéticas dessas lesões. WOLMAN (1986) E HOLLIDAY (1989), por exemplo, defendem a hipótese de que as aberrações cromossômicas múltiplas observadas em vários tumores são resultantes de uma alteração primária responsável pelo desequilíbrio do genoma. Uma mutação que levasse à perda ou modificação de um gene, envolvido no controle da estabilidade genômica, aumentaria a frequência de aberrações secundárias. Desse modo, uma ampla variedade de genótipos e fenótipos anormais seriam rapidamente produzidos, seguidos de seleção para crescimento rápido ou metástases. Se as alterações não clonais e mesmo as clonais detectadas em tumores cutâneos forem interpretadas segundo essa idéia, uma anomalia primária poderia ser responsável pelo aparecimento das diferentes aberrações observadas, o que estaria de acordo com a hipótese de origem monoclonal e não policlonal dessas neoplasias.

Para solução desse problema, a análise citogenética e molecular de um grande número de tumores de pele é necessária. Além disso, o estudo de células normais de indivíduos idosos provenientes de pele exposta ou não à luz solar, também poderia esclarecer se as aberrações cromossômicas ocorrem em células normais que sofreram a ação dos raios UV, e traria novos dados sobre a predisposição do campo epitelial à malignidade.

V. RESUMO

Nos últimos anos, a análise citogenética tem sido valiosa no diagnóstico, prognóstico e orientação da terapia de um grande número de doenças hematológicas. Entretanto, o mesmo não tem ocorrido no caso dos tumores sólidos, provavelmente em consequência as dificuldades metodológicas no cultivo e na obtenção de métafases de boa qualidade para análise. Em relação às neoplasias de pele, os dados disponíveis estão praticamente restritos aos melanomas, nevos e lipomas e a alguns carcinomas baso e espinocelulares e lesões benignas relacionadas.

O presente estudo investigou a ocorrência de aberrações cromossômicas em 18 neoplasmas benignos e malignos de pele. Eles compreenderam 11 carcinomas basocelulares (CaB), quatro carcinoma espinocelulares (CaE), duas ceratoses solares (CS) e um cisto epidérmico (CE). Os resultados da análise das lesões benignas e de algumas malignas mostraram a maioria das células com constituição normal, mas também poliploidia e rearranjos estruturais e numéricos esporádicos.

As alterações clonais observadas no presente estudo consistiram em um rearranjo cariotípico complexo envolvendo os cromossomos 4 e 14 em um CaB, das t(9;14), del(1), trissomia 5, trissomia 7 e monossomia X em outro caso de CaB, da trissomia 18 numa terceira amostra de CaB e na monossomia Y em uma quarta amostra de CaB.

Apesar da ausência de uma alteração cromossômica específica em tumores de pele, parece que as aberrações estruturais dos cromossomos D são mais frequentes que o esperado, e foram

observadas na presente amostra e em outras descritas por diferentes autores.

Os resultados mais interessantes do presente trabalho compreenderam as cinco alterações cariotípicas clonais não relacionadas observadas em um dos CaB estudado. Esses achados, compatíveis com os dados da literatura, reforçam a hipótese de origem policlonal de lesões epiteliais. Também interessante foi a frequência elevada de anomalias não clonais que possivelmente refletem a predisposição do campo epitelial ao câncer.

V.I. SUMMARY

Cytogenetic analysis has proven to be valuable for diagnosis, prognosis and therapeutic assessment of a growing number of hematologic malignancies. However, similar data on primary solid tumors are rare probably due to technical problems in obtaining good quality metaphases. In respect to skin tumors, available data are restricted to melanomas, nevi, lipomas, a few spinocellular and basal cell carcinomas, and some related benign lesions.

The present study investigated clonal and nonclonal chromosome abnormalities in short-term cultures initiated after collagenase disaggregation of biopsies from 18 benign and malignant skin neoplasms. These were 11 basal cell carcinomas (BCC), four spinocellular carcinomas (SCC), two solar keratosis (SK) and one epidermoid cyst (EC). Most showed normal karyotypes, polyploidy and sporadic structural and numerical rearrangements.

Clonal changes were found in three BCC. One had a t(4;14) and a concomitant inversion inv(4). Another showed five unrelated clonal abnormalities, a t(9;14), a del(1), a trisomy 5, a trisomy 7 and a monosomy X. The third case presented a trisomy 18.

In spite of the lack of a common cytogenetic denominators in skin tumors, it seems that structural aberrations of group D chromosomes, observed in the present study and by others authors, are more frequent than randomly expected.

The most interesting cytogenetic data in the present study were the multiple apparently unrelated abnormalities in one BCC. The most plausible explanation invokes multiclonal origin of this type of lesion. A high level of nonclonal structural changes was also

detected and may represent additional neoplastic clones or the proneness feature of the epithelial field to malignant transformation.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISENBERG, A.C. & BLOCH, K.J. (1972). Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. **N Engl J Med, 287:** 272-276.

ALBINO, A.P. (1988). The status of oncogenes in malignant melanoma. **In: Adv Pig Cell Res,** Alan R Liss, p 361-390.

ALBINO, A.P.; NANUS, D.M.; MENTLE, I.R.; CORDON-CARDO, C.; McNUTT, N.S.; BRESSLER, J.; ANDREEFF, M. (1989). Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. **Oncogene, 4:** 1363-1374.

ALEDO, R.; AURIAS, A.; CHRÉTIEN, B.; DUTRILLAUX, B. (1988). Jumping translocation of chromosome 14 in a skin squamous cell carcinoma from a xeroderma pigmentosum patient. **Cancer Genet Cytogenet, 33:** 29-33.

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

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

ATKIN, N.B. & BAKER, M.C. (1990). Cytogenetic studies of basal cell carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet, 49:** 281-282.

BABU, V.R.; TILLEY, B.; WIKTOR, A.; DRUMHELLER, T.; MILES, B.J. (1991). Is karyotype an independent prognostic indicator in bladder cancer? *In:* INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. 17.

BACK, L. & BROWN, A.S. (1986). Metastatic melanoma, or is it? **Plastic Reconstr Surg, 77:** 138-139.

BAKER, P.B. & BERGGREN, R. (1983). Metastatic basal cell carcinoma: Review and report of a case. **Ann Plast Surg, 11:** 428-430.

BALABAN, G.M.; HERLYN, M.; GUERRY IV, D.; BARTOLO, R.; KOPROWSKI, H.; CLARK, W.H.Jr; NOWELL, P.C. (1984). Cytogenetic of human malignant melanoma and premalignant lesions. **Cancer Genet**

Cytogenet, 11: 429-439.

BALABAN, G.M.; HERLYN, M.; CLARK, W.H.Jr; NOWELL, P.C. (1986). Karyotipic evolution in human malignant melanoma. **Cancer Genet Cytogenet, 19:** 113-122.

BALE, S.J.; DRACOPOLI, N.C.; TUCKER, M.A.; CLARK, W.H.Jr; FRASER, M.C.; STANGER, B.Z.; GREEN, P.; DONIS-KELLER, H.; HOUSMAN, D.E.; GREENE, M.H. (1989). Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma -dysplastic nevus to chromosome 1p. **N Engl J Med, 320:** 1367-1371.

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

BERTRAND, S.; NGUYEN, M.J.; DORÉ, J.F. (1990). Cytogenetic abnormalities in 2 primitive and 18 metastatic human melanomas. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07-01/08, 1990. **Abstracts.** Center for Human Genetics - University of Leuven. P1.

BITTER, M.A.; LE BEAU, M.M.; ROWLEY, J.D.; LARSON, R.A.; GOLOMB, H.M.; VARDIMAN, J.W. (1987). Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias. **Hum Pathol, 18:** 211-225.

BOEHM, T. & RABBITTS, T.H. (1989). A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man. **Eur J Biochem, 185:** 1-17.

BOUTWELL, R.K. (1989). Model systems for defining initiation, promotion and progression of skin neoplasms. In: **Skin Carcinogenesis: Mechanisms and Human Relevance.** Alan R Liss, p.3-15.

BOWDEN, G.T. (1990). Oncogene activation during multi-stage carcinogenesis. **Prog Clin Biol Res, 340D:** 1-12.

BRIDGE, J.A.; SHAFFER, B.; NEFF, J.R.; SANGER, W.G. (1988). A complex translocation involving chromosome 12 and 16 in a metastatic myxoid liposarcoma. **Cancer Genet Cytogenet, 34:** 119-120.

BRIGGS, J.C. (1985). Melanoma precursor lesions and borderline melanomas. **Histopathol, 9:** 1251-1262.

BRODEUR, G.M. & SEEGER, R.C. (1986). Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implications.

Cancer Genet Cytogenet, 19: 101-111.

BRODEUR, G.M.; AZAR, C.; BROTHER, M.; HEIMSTRA, J.; KAUFMAN, B.; MARSHALL, H.; MOLEY, J.; NAKAGAWARA, A.; NOVACK, N.; SAYLOR, R.; SCHNEIDER, S.; WASSON, J.; WHITE, P.; SEEGER, R.; LOOK, T.; CASTLEBERRY, R. (1991). Molecular biology and genetics of neuroblastoma. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. 10.

BRUNS, G.A. & DRACOPOLI, N.C. (1990). Report of the committee on the genetic constituition of chromosome 1. **Cytogenet Cell Genet, 55:** 77-85.

BULLERDIEK, J.; BARTNITZKE, S.; WOBST, G.; MEYER-BOLTE, K. (1990). The main cytogenetic groups correspond to clinical data and histology in pleomorphic adenomas. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07-01/08, 1990. **Abstracts.** Center for Human Genetics - University of Leuven. P16.

BURGESS, A.C.; THOMPSON, F.H.; OLSON, S.; LEONG, S.P.L.; SALMON, S.E.; TRENT, J.M. (1991). Detailed description of abnormal cytogenetic findings in 32 patients with metastatic melanoma. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. B10.

BURNS, F.J.; ALBERT, R.E.; GARTLE, S.J. (1989). Radiation-induced cancer in rat skin. In: CONTI, C.J. **et al., Skin tumors: Experimetal and Clinical Aspects.** New York, Raven Press, p. 293-319.

CAPORASO, N.; GREENE, M.H.; TSAI, S.; PICKLE, L.W.; MULVIHILL, J.J. (1987). Cytogenetics in hereditary malignant melanoma and dysplastic nevus syndrome: is dysplastic nevus a chromosome instability disorder? **Cancer Genet Cytogenet, 24:** 229-314.

CARNEY, D.N. (1990). Molecular genetics of lung cancer. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07-01/08, 1990. **Abstracts.** Center for Human Genetics - University of Leuven. A9.

CASPERSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, G. (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp Cell Res,**

60: 315-319.

CAVENEE, W.K.; SCRABLE, H.J.; ARDEN, K.C.; GRUNDY, P.; KOUFOS, A.; GENNET, I. (1990). Beckwith-wiedemann syndrome and its associated tumors. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07-01/08, 1990. **Abstracts**. Center for Human Genetics-University of Leuven. A29.

CHANDA, J.J. (1986). The clinical recognition and prognostic factors of primary cutaneous malignant melanoma. **Med Clin North Am, 70**: 39-55.

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

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

CLARK, W.H.Jr. (1988). The dysplastic nevus syndrome. **Arch Dermatol, 124**: 1207-1210.

CLINE, M.J. (1987). The role of proto-oncogenes in human cancer: Implications for diagnosis and treatment. **Int J Rad Oncol Biol Phys, 13**: 1297-1301.

COCHRAN, A.J. (1985). Markers for malignant melanoma. **Disease Markers, 3**: 65-81.

COROMINAS, M.; KAMINO, H.; LEON, J.; PELLICER, A. (1989). Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): Is HRAS involved in differentiation as well as proliferation? **Proc Natl Acad Sci USA, 86**: 6372-6276.

COX, D.R.; MURRAY, J.C.; BUETOW, K.H. (1989). Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 4. **Cytogent Cell Genet, 51**: 121-136.

COWAN, J.M.; HALABAN, R.; FRANCKE, U. (1988). Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. **J Nat Cancer Inst, 80**: 1159-1164.

COWAN, J.M.; JAFFE, D.R.; BECKETT, M.A.; WEICHSELBAUM, R.R. (1991). Characterization of 3 cell lines derived from a squamous cell carcinoma. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts**. The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. B38.

CROCE, C.M. & KOPROWSKI, H. (1978). La geneticia del cancer humano. **Investigacion Ci**, (19): 68-77.

CUTLER, R.G. & SEMSEI, I. (1989). Development, cancer and aging: possible common mechanisms of action and regulation. **J Gerontol: Biol Sci**, 44: 25-34.

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

DASGUPTA, P.; LINNENBACH, A.J.; GIACCIA, A.J.; STAMATO, T.D.; REDDY, E.P. (1989). Molecular cloning of the breakpoint region on chromosome 6 in cutaneous malignat melanoma: evidence for deletion in the c-myb locus and translocation of a segment of chromosome 12. **Oncogene**, 4: 1201-1205.

DIX, D. (1989). The role of aging in cancer incidence: an epidemiological sutudy. **J Gerontol: Biol Sci**, 44: 10-18.

ELWOOD, J.M.; WHILTEHEAD, S.M.; GALLAGHER, R.P. (1989). Epidemiology of human malignant skin tumors special reference to natural and artificial ultraviolet radiation exposures. In: CONTI, C.J. **et al. Skin tumors: Experimental and Clinical Aspects**, New York, Raven Press, p. 55-84.

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

FITCHET, M.; DOWNING, R.G.; HOPKISON, D.A; BAYLEY, A.C. (1984). Interstitial deletion of chromosome band 13q14 associated with squamous cell carcinoma. **J Med Genet**, 21: 399.

FRIGERE, M.F.; MARK-VENDEL, E. HANS, O.; COINDRE, J.M.; TERRIER, P.; COLLIN, F.; MUGNERET, F.; TURC-CAREL, C. (1990). Chromosomal studies in a series of 13 liposarcomas. Del(6)(q14q24) as nonrandom secondary change associated with mixoid subtype. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07- 01/08, 1990. **Abstracts**. Center for Human Genetics - University of Leuven. P68.

FRY, R.J.M. & LEY, R.D. (1989). Ultraviolet radiation-induced skin cancer. In: CONTI, C.J. **et al. Skin tumors: Experimental and Clinical Aspects**. New York, Raven Press, p.321-335.

GORDON, H. (1985). Oncogenes. **Mayo Clin Proc, 60:** 697-712.

GREENE, A.R. (1988). Recessive mechanisms of malignancy. **Br J Cancer, 58:** 115-121.

GREENE, M.H.; GOLDIN, L.R.; CLARK, W.H. Jr; LOURIENS, E.; KRAEMER, K.H.; TUCKER, M.A.; ELDER, D.E.; FRASER, M.C.; ROWE, S. (1983). Familial cutaneous malignant melanoma: Autossomal dominat trait possibly linked to the Rh locus. **Proc Natl Acad Sci USA, 80:** 6071-6075.

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

HECHT, F. (1988). Solid tumor breakpoint update. **Cancer Genet Cytogenet, 31:** 129-131.

HECHT, F. & HECHT, B.K-M. (1988). Chromosome rearrangements in dysplastic nevus syndrome presisposing to malignant melanoma. **Cancer Genet Cytogent, 35:** 73-78.

HEEREMA, N.A.; PALMER, C.G.; BAEHNER, R.L. (1985). Karyotipic and clinical finding in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet, 17:** 165-179.

HEIM, S. & MITELMAN, F. (1987). **Cancer Citogenetics.** New York, Alan, R. Liss. Inc., p.309.

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

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

HEIM, S.; JIN, Y-S.; MANDAHL, N.; MITELMAN, F. (1989a). Multiple cytogenetically unrelated clones in short-term cultures from squamous cell carcinomas. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 3, Tucson, 26/02-01/03, 1989. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. p. 30.

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

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

HOLLAND, J.F. & FREI III, E. (1982). **Cancer Medicine,** 2ª. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p. 2465.

HOLLIDAY, R. (1989). Chromosome error propagation and cancer. **TIG,** 5(2): 42-45.

HOOK, E.B. (1977). Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limites and comments on use. **Am J Hum Genet, 29:** 94-97.

HSU, T.C. (1987). A historical outline of the development of cancer cytogenetics. **Cancer Genet Cytogenet, 28:** 5-26.

ISCN (1978): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978). **Cytogenet Cell Genet, 21:** 309-404.

JENKINS, R.B.; RANSOM, D.T.; RITLAND, S.R.; MOERTEL, C.A.; DAHL, R.J.; O'FALLON, J.R.; SCHEITHAVER, B.; KELLY, P.J.; KIMMEL, D.W. (1991). Correlation of cytogenetic and loss of heterozigosity studies of chromosome 10 in gliomas. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. 23.

JIN Y-S.; HEIM, S.; MANDAHL, N.; BIORKLUND, A.; WENNERBERG, J.; MITELMAN, F. (1988a). Multiple apparently unrelated clonal chromosome abnormalities in a squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer Genet Cytogenet, 32:** 93-100.

JIN, Y-S.; HEIM, S.; MANDAHL, N.; BIOKLUND, A.; WENNERBERG, J.; MITELMAN, F. (1988b). Inversion inv(4)(p15;q26) in a squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Cancer Genet Cytogenet, 36:** 233-234.

JIN, Y-S.; HEIM, S.; MANDAHL, N.; BIORKLUND, A.; WENNERBERG, J.; WILLÉN, R.; MITELMAN, F. (1989). Two unrelated clonal chromosome rearrangements in a nasal papilloma. **Cancer Genet Cytogenet, 39:** 29-34.

JIN, Y-S.; HEIM, S.; MANDAHL, N.; BIORKLUND, A.; WENNERBERG, J.; MITELMAN. F. (1990). Multiple clonal chromosome aberrations in squamous cell carcinomas of the larynx. **Cancer Genet Cytogenet,**

44: 209-216.

JONG, D.; VOE TDIJK, B.; BEVERSTOCK, G.C.; VAN OMMEN, G.J.B.; WILLEMZE, R.; KLUIN, P.M. (1988). Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. **N Engl J Med, 318**: 1373-1378.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. (1990). **Histologia Básica.** 7ª. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, p. 1-388.

KAESBERG, P.R. & ERSHLER, W.B. (1989). The importance of immunescence in the incidence and malignant properties of cancer in hosts of advenced age. **J Gerontol: Biol Sci, 44**: 63-66.

KANDA, N. (1985). Oncogenes and chromosome aberrations in human cancer. **Acta Haematol Jap, 48**: 188-197.

KLEIN, G. & KLEIN, E. (1985). Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. **Nature, 315**: 190-195.

KLEIN-SZANTO, A.J.P. (1989). Pathology of human and experimental skin tumors. In: CONTI, C.J. **et al. Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects.** New York, Raven Press, 19-53.

KNUDSON, A.G.Jr. (1986). Genetics of human cancer. **Ann Rev Genet, 20**: 231-251.

LE BEAU, M.M. & ROWLEY, J.D. (1986). Chromosomal abnormalities in leukemia and limphoma: clinical and biological significance. **Adv Hum Genet, 15**: 1-54.

LEVER, W.F. & SCHAUMBURG-LEVER, G. (1983). Tumors and cysts of the epidermis. In: **Histopathology of the skin**, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, p. 473-521.

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

LIMON, J.; DAL CIN, P.; SAIT, S.N.J.; KARAKOUSIS, C.; SANDBERG, A.A. (1988). Chromosome changes in metastatic human melanoma. **Cancer Genet Cytogenet, 30**: 201-211.

LIMON, J.; MRÓZEK, K.; HEIM, S.; ELFVING, P.; NEDOSZYTKO, M.; BABINSKA, M.; MANDAHL, N.; LUNDGREN, R.; MITELMAN, F. (1990). On the significance of trisomy 7 and sex chromosome loss in renal cell carcinoma. **cancer Gent Cutogenet, 49**: 259-263.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P.; TAFURI, W.L. (1987). **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan SA., p. 1141.

LOUGHRAN, A.; JOHNSON, B.; TIERNEY, J.; VIOLA, M.V. (1989). Protooncogene structure in the cancer family syndrome. **Cancer Genet Cytogenet, 38:** 75-82.

MACKIE, R.M. (1986). Tumors of the skin. In: ROOK, A. **et al. Texbook of Dermatology, 3,** 4ª. ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 2375-2479.

MANNENS, M.; HOOVERS, J.; BLEEKER-WAGEMAKERS, L.; BLIEK, J.; REDEKER, B.; JOHN, R.; LITTLE, P.; VOUTE, P.A.; HEYTING, C.; SLATER, R.M.; WESTERVELD, A. (1990). Molecular, cytogenetic and linkage analysis of chromosome 11p regions involved in Wilms' tumour and associated congenital diseases. In: INTERNATIONAL HUMAN GENETICS SUMMER COURSE, 4, Leuven, 23-28/07, 1990. **Manual.** University of Leuven. p.663.

MARKS, R.; RENNIE, G.; SELWOOD, T.S. (1988). The relationship of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma to solar keratoses. **Arch Dermatol, 124:** 1039-1042.

MARKS, R.; JOLLEY, D.; LECTSAS, S.; FOLEY, P. (1990). The role of childhood exposure to sunlight in the development of solar keratoses and non-melanocytic skin cancer. **Med J Aust, 152:** 62-66.

MARK-VENDEL, E.; MUGNERET, F.; COINDRE, J.M.; TROJANI, M.; TURC-CAREL, C. (1990). Translocation t(6;22)(p22;q12) in malignant clear cell hidradenoma (sweat gland carcinoma). In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2 Leuven, 30/07-01/08, 1990. **Abstracts.** Center for Human Genetics - University of Leuven. P15.

MARX, J.L. (1984). What do oncogene do? **Science, 223:** 673-677.

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

McCULLOCH, P.B.; DENT, P.B.; HAYES, P.R.; LIAO, S-K. (1976). Common and individually specific chromosomal characteristics of human melanoma. **Cancer Res, 36:** 398-404.

McGOVERN, V.J.; COCHRAN, A.J.; VAN DER ESCH, E.P.; LITTLE, J.H.; MAcLENNAN, R. (1986). The classification of malignant melanoma,

its histological reporting and registration: A review of the 1972 Sydney Classification. **Pathology, 18:** 12-21.

MEESE, E.; MELTZER, P.S.; WITKOWSKI, C.M.; TRENT, J.M. (1989). Molecular mapping of the oncogene MYB and rearrangements in malignant melanoma. **Genes, Chromosomes Cancer, 1:** 88-94.

MELTZER, P.; GUAN, X.Y.; MEESE, E.; TRENT, J. (1991). Chromosome microdissection of a region of chromosome 6 frequently deletd in malignant melanoma. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOME IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. 8.

MERTENS, F.; HEIM, S.; JIN, Y-S.; JOHANSSON B.; MANDAHL, N.; BIORKLUND, A.; WENNERBERG, J.; JONSSON, N.; MITELMAN, F. (1989a). Basosquamous papilloma. A benign epithelial skin tumor with multiple cytogenetic clones. **Cancer Gent Cytogenet, 37:** 235-239.

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

MERTENS, F.; HEIM, S.; MANDAHL, N.; MITELMAN, F.(1990). Cytogenetic analysis of basal cell carcinoma. In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07-01/08, 1990. **Abstracts.** Center for Human Genetics - University of Leuven. A3.

MILLIKIN, D.M.; WITKOWSKI, C.M.; MEESE, E.U.; TRENT, J.M. (1991). Loss of constitutional heterozigozity for loci on chromosome 6q in human malignant melanoma. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. A16.

MITELMAN, F. (1985). **Catalogue of Chromosome Aberrations in Cancer. vol 5,** 2ª. ed., New York, Alan R. Liss. Inc., p.1-707.

MITELMAN, F. (1991). The cancer chromosome registry - solid tumors. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN SOLID TUMORS, 4, Tucson, 24-26/02, 1991. **Abstracts.** The Arizona Cancer Center & The National Cancer Institute. 15.

MITELMAN, F.; HEIM, S.; ROWLEY, J.D.; LE BEAU, M.M. (1989). Genes, chromosomes & cancer: A new forum for research in cancer

genetics. **Genes, Chromosomes & Cancer, 1**: 1-2.

MITELMAN, F.; KANEKO, Y.; TRENT, J.M. (1990). Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. **Cytogenet Cell Genet, 55**: 358-386.

MIYAMOTO, M.; SUGAWA, H.; MORI, T.; HASE, K.; KUMA, K.; IMURA, H. (1988). Epidermal growth factor receptor on cultured neoplastic human thyroid cells and effects of epidermal growth factor and thyroid stimulating hormone on their growth. **Cancer Res, 48**: 3652-3656.

MORTON, D.L.; COCHRAN, A.J.; LAZAR, G. (1990). Melanoma and skin cancer. IN: HASKELL, C.M. **Cancer Treatment**, 3ª. ed, Philadelphia, W.B. Sanders Company. p 500-512.

NEWELL, G.R.; SPITZ, M.R.; SIDER, J.G. (1989). Cancer and age. **Sem Oncol, 16**: 3-9.

NISHIMURA, S. & SEKIYA, T. (1987). Human cancer and cellular oncogenes. **Biochem J, 243**: 313-327.

NOWELL, P.C. & HUNGERFORD, D.A (1960). A double minutes chromosome in human cronic granulocytic leukemia. **Science, 132**: 1497.

NOWELL, P.C. & CROCE, C.M. (1986). Chromosomes, genes, and cancer. **Ann J Pathol, 125**: 8-15.

NOWELL, P.C.; VONDERHEID, E.C.; BESA, E.; HOXIE, J.A.; MOREAU, L.; FINAN, J.B. (1986). The most common chromosome change in 86 chronic B cell or T cell tumors: a 14q32 translocation. **Cancer Genet Cytogenet, 19**: 219-227.

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

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

PARIS CONFERENCE (1971) SUPPLEMENT (1975): **Standardization in human cytogenetics. Birth defects, 11**, 1975.

PARMITER, A.H.; BALABAN, G.; HERLYN, M.; CLARK, W.H.Jr; NOWELL, P.C. (1986). A t(1;19) chromosome translocation in three cases of human malignant melanoma. **Cancer Res, 46**: 1526-1529.

PARMITER, A.H.; BALABAN, G.; CLARK, W.H.Jr; NOWELL, P.C. (1988). Possible involvement of the chromosome region 10q24 --) q26 in

early stages of melanocytic neoplasia. **Cancer Genet Cytogenet, 30:** 313-317.

PATHAK, S. (1990). Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity. **Cancer Metastasis Rev, 8:** 299-138.

PAULIEN, S.; TURC-CAREL, C.; DAL CIN, P.; SANDBERG, A.A.; GEMMIL, R. (1990). Mapping studies around the 12q13-q14 region in adipose tissue tumors. In: EUROPEAN WHORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07-01/08, 1990. **Abstracts.** Center for Human Genetics-University of Leuven. A28.

PAWLOWSKI, A. & LEA, P.J. (1989). Human melanoma xenografts. In: CONTI, C.J. **et al. Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects**, New York, Raven Press. p. 103-132.

PIMENTEL, E. (1985). Oncogenes and human cancer. **Cancer Genet Cytogenet, 14:** 347-368.

PITOT, H.C. (1989). Aging and cancer: some general thoughts. J **Gerontol: Biol Sci, 44:** 5-9.

POWELL, I.; TYRKUS, M.; KLEER, E. (1990). Aparent correlation of sex chromosome loss and disease course in urothelial cancer. **Cancer Genet Cytogenet, 50:** 97-101.

REDDY, A.L. & FIALKOW, P.J. (1989). Development of murine skin neoplasia studied with enzymes used as cell markers. IN: CONTI **et al. Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects**, New York, Raven Press. p 213-226.

REIS, V.M.S. (1990). Tumores cutâneos malignos. IN: CUCÉ, L.C. & FESTA NETO, C. **Manual de Dermatologia**, Rio de Janeiro, Livraria Ateneu Editora. p. 447-453.

RICHMOND, A.; FINE, R.; MURRAY, D.; LAWSON, D.A.; PRIEST, J.H. (1986). Growth factor and cytogenetic abnormalities in cultured nevi malignant melanomas. **J Invest Dermatol, 3:** 295-302.

RIGEL, D.S.; RIVERS, J.K.; KOPF, A.W.; FRIEDMAN, R.J.; VINOKUR, A.F.; HEILMAN, E.R.; LEVENSTEIN, M. (1989). Dysplastic nevi-markers for increased risk for melanoma. **Cancer, 63:** 386-389.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAN, V. (1986). **Patologia Estrutural e Funcional**, 3ª. ed. Rio de Janeiro, Guanabara, p. 1-1404.

ROGATTO, S.R. & CASARTELLI, C. (1988). Cytogenetic analysis of human meningiomas. **Rev Brasil Genet, 11**(3): 729-744.

ROWLEY, J.D. (1990). Molecular cytogenetics: Rosetta stone for understanding cancer - twenty-ninth GHA clowes memorial award lecture. **Cancer Res, 50**: 3816-3825.

RUITER, D.J.; STEIJLEN, W.; BERGMAN, W.; SCHEFFER, E. (1988). Premalignant and boderline melanocytic lesions. **Eur J Cancer Clin Oncol, 24**: s15-s22.

SANDBERG, A.A. (1980). **The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia**, New York, Elsevier North Holland.

SANDBERG, A.A (1985). Application of cytogenetics in neoplastic deseases. **CRC Crit Rev Lab Sci, 22**: 219-274.

SANDBERG, A.A. (1986). Chromosome changes in bladder cancer: clinical and other correlation. **Cancer Genet Cytogenet, 19**: 163-175.

SANDBERG, A.A. (1988). The cytogenetic route of benign tumours. **Cancer Genet Cytogenet, 32**: 11-12.

SANDBERG, A.A. (1990). **The chromosomes in human cancer and leukemia**. 2ª. ed, New York, Elsevier, p. 1-1315.

SANDBERG, A.A. & TURC-CAREL, C. (1987). The cytogenetic of solid tumors. **Cancer, 59**: 387-395.

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

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

SCHWAB, M. (1989). Genes and chromosomes in cancer. **Interdisc Sci Rev, 14**: 216-220.

SLAUGHTER, D.P.; SOUTHWICK, H.W.; SMEJKAL, W. (1953). "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. **Cancer, 6**: 963-968.

SMITH, J.M. & IRONS, G.B. (1983). Metastatic basal cell carcinoma: Review of the literature and report of three cases. **Ann Plast Surg, 11**: 551-553.

SOMERS, K.D.; CARTWRIGHT, S.L.; SCHECHTER, G.L. (1990). Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous

cell carcinomas. **Oncogene, 5:** 915-920.

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

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

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

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

SREEKANTAIAH, C. & SANDBERG, A.A. (1991). Clustering of aberration to specific chromosome regions in benign neoplasms. **Int J Cancer, 48:** 194-198.

STOLZ, W.; SCHMOECKEL, C.; LANDTHALER, M.; BRAUN-FALCO, O. (1989). Association of malignant melanoma with nevocytic nevi. **Cancer, 63:** 550-555.

SVENDSEN, L.B.; THORUP, J.; LARSEN, J.K.; BULOW, S.; HORN, T. (1990). Correlation between **in vitro** tetraploidy in skin fibroblasts and development of sporadic colorectal carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet, 50:** 139-148.

SWERDLOW, A.J & GREEN, A. (1987). Melanocytic naevi and melanoma and epidemiological perspective. **Br J Dermatol, 117:** 137-146.

TAIMI, A.; GREGOIRE, M.J.; BARLIER, C.; DEBARD, R.; CHERY, M.; GILGENKRANTZ, S. (1990). A new case of myxoid lioposarcoma with complex rearrangement including the t(12;16)(q13;p11). In: EUROPEAN WORKSHOP ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, 2, Leuven, 30/07- 01/08, 1990. **Abstracts.** Center for Human Genetics - University of Leuven. P69.

TEYSSIER, J.R. (1989). The chromosomal analysis of human solid tumors. **Cancer Genet Cytogenet, 37:** 103-125.

TJIO, J.H. & LEVAN, A. (1956). The chromosomal number of man. **Hereditas, 42:** 1-6.

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

TRENT, J.M.; LEONG, S.P.L.; MEYSKENS, F.L. (1989a). Chromosome alterations in human malignant melanoma. In: CONTI, C.J. et al. **Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects.** New York, Raven Press. p. 165-186.

TRENT, J.M.; THOMPSON, H.; MEYSKENS, L.Jr. (1989b). Identification of a recurring translocation site involving chromosome 6 in human malignant melanoma. **Cancer Res, 49:** 420-423.

TRENT, J.M.; STANBRIDGE, E.J.; McBRIDE, H.L.; MEESE, E.U; CASEY, G.; ARAUJO, D.E.; WITKOWSKI, C.M.; NAGLE, R.B. (1990a). Tumorigenicity in human melanoma cell lines controled by introduction of human chromosome 6. **Science, 247:** 568-571.

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

VAN DER SCHROEFF, J.G.; EVERS, L.M.; BOOT, A.J.M.; BOS, I.L. (1990). Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinoma of human skin. **J Invest Dermatol, 94:** 423-425.

YUNIS, J.J. (1976). High resolution of human chromosomes. **Science, 191:** 1268-1270.

YUNIS, J.J. & BRUNNING, R.D. (1986). Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukemias and myelodysplastic syndrome. **Clin Haematol, 15:** 597-620.

WARNER, H.R. & PRICE, A.R. (1989). Involvement of DNA repair in cancer and aging. **J. Gerontol., 44:** 45-54.

WATSON, J.D.; HOPKINS, N.H.; ROBERTS, J.W.; STEITZ, J.A.; WEINER, A.M. (1987). **Molecular Biology of the gene, vol 2.** 4ª ed. Menlo Park, The Benjamin/Cummings. p. 1058-1096.

WEBER, J. & McCLURE, M. (1987). Oncogenes and cancer. **Br Med J, 294:** 1246-1248.

WEINBERG, R.A. (1989). Positive and negative controls on cell growth. **Biochemistry, 28:** 8263-8269.

WEISS, R.A. & MARSHALL, C.J. (1984). Oncogenes. **Lancet, 2:** 1138-1142.

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

VIII. APÊNDICE

Meios de Cultura e Soluções

1. Meio de cultura completo

- 100ml de meio HAM F-10 (CULTILAB) com penicilina/estreptomicina em concentrações finais de 125 U/ml:125 ug/ml
- 20ml, 10 ml ou 5 ml de soro fetal bovino (CULTILAB)
- 1ml de L-glutamina em solução de 200 mM
- 20ul de solução de insulina

Após o preparo, o meio completo foi mantido a 4°C por um período de até 30 dias.

2. Solução de Hanks sem Ca e Mg

- 1000ml de água desionizada
- 8,0g de NaCl
- 0,4g de KCl
- 1,0g de glicose
- 60ml de KH_2PO_4
- 47,5mg de Na_2HPO_4
- 17,0mg de vermelho de fenol

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

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

até seis meses.

2.1. Para transporte

- 100ml de solução de Hanks sem Ca e Mg
- 2ml de solução de penicilina/estreptomicina, concentração final 250 U/ml:250 ul/ml
- 0,2ml de sulfato de gentamicina, concentração final de 0,04 mg/ml

2.2. Para lavagem de tecido

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

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

A solução de uso foi obtida a partir de:

- 0,5ml de solução mãe de penicilina com concentração 1.000.000 U/ml, preparada a partir da solução comercial dissolvida em água desionizada estéril
- 1ml de solução mãe de estreptomicina com concentração 500.000 ug/ml, preparada a partir da solução comercial diluida em água desionizada estéril
- 38,5ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

As soluções mãe e de uso foram estocadas a -20°C, por um período de um ano e seis meses.

4. 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 filtragem, foi estocada em alíquotas de 1ml a -20°C por períodos de até 1 ano.

5. Solução de insulina (BIOBRÁS U-40)

A solução comercial possui concentração de 40 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada em alíquotas de 1ml a 4°C.

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

A solução comercial possui concentração de 20 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada a 4°C.

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

A solução de anfotericina B foi preparada diluindo-se:

- 50mg de anfotericina B em
- 10ml de água desionizada estéril

A solução foi estocada a -20°C.

8. Solução de colagenase (Collagenase-C-6885-GIBCO-Tipo II) (2000 U/ml)

A solução de colagenase foi obtida dissolvendo-se essa substância em meio de cultura incompleto, ou seja, sem soro e

demais suplementos, numa concentração final de 2000 U/ml. Após seu preparo, a solução foi mantida em banho-maria a 37°C por duas horas e, em seguida, a 4°C por 12 a 14 horas. A solução foi, então, esterilizada por filtração e guardada em alíquotas de 0,5ml a -20°C por dois a três meses.

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

A solução de metotrexato foi preparada a partir de:

- 0,954mg de metotrexato em 20ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução mãe 10^{-4}M, estocada em alíquotas de 1ml a -20°C após filtragem).
- 1ml da solução mãe em 9ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução de uso 10^{-5}M, estocada em alíquotas de 0,5ml a -20°C).

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

A solução de timidina foi obtida diluindo-se:

- 5 mg de timidina em
- 20ml de solução de Hanks sem Ca e Mg ou água desionizada

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

11. Solução de colcemide (Delmecolcine-D6279-SIGMA) (2 ug/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 10 ug/ml, estocada a -20°C após filtração).

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

12. Solução hipotônica

A solução hipotônica compreendeu uma solução aquosa de citrato de sódio 0,8%, estocada em temperatura ambiente ou a 4°C por dois a três meses.

13. Fixador

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

- 3 partes de metanol
- 1 parte de ácido acético

14. Solução de tripsina para bandamento cromossômico

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

15. Tampão Sorensen, pH 6,8

Solução A: 14,196g de difosfato de sódio (Na_2PO_4) dissolvidas em 500ml de água desionizada

Solução B: 13,61g de monofosfato de potássio (KH_2PO_4) dissolvidas em 500ml de água desionizada

Solução final: 49ml da solução A e 51ml da solução B diluídas em 200ml de água desionizada

A estocagem das três soluções foi feita a 4°C por seis meses.

16. Solução salina de PBS

O PBS foi preparado dissolvendo-se inicialmente em 500ml de água desionizada:

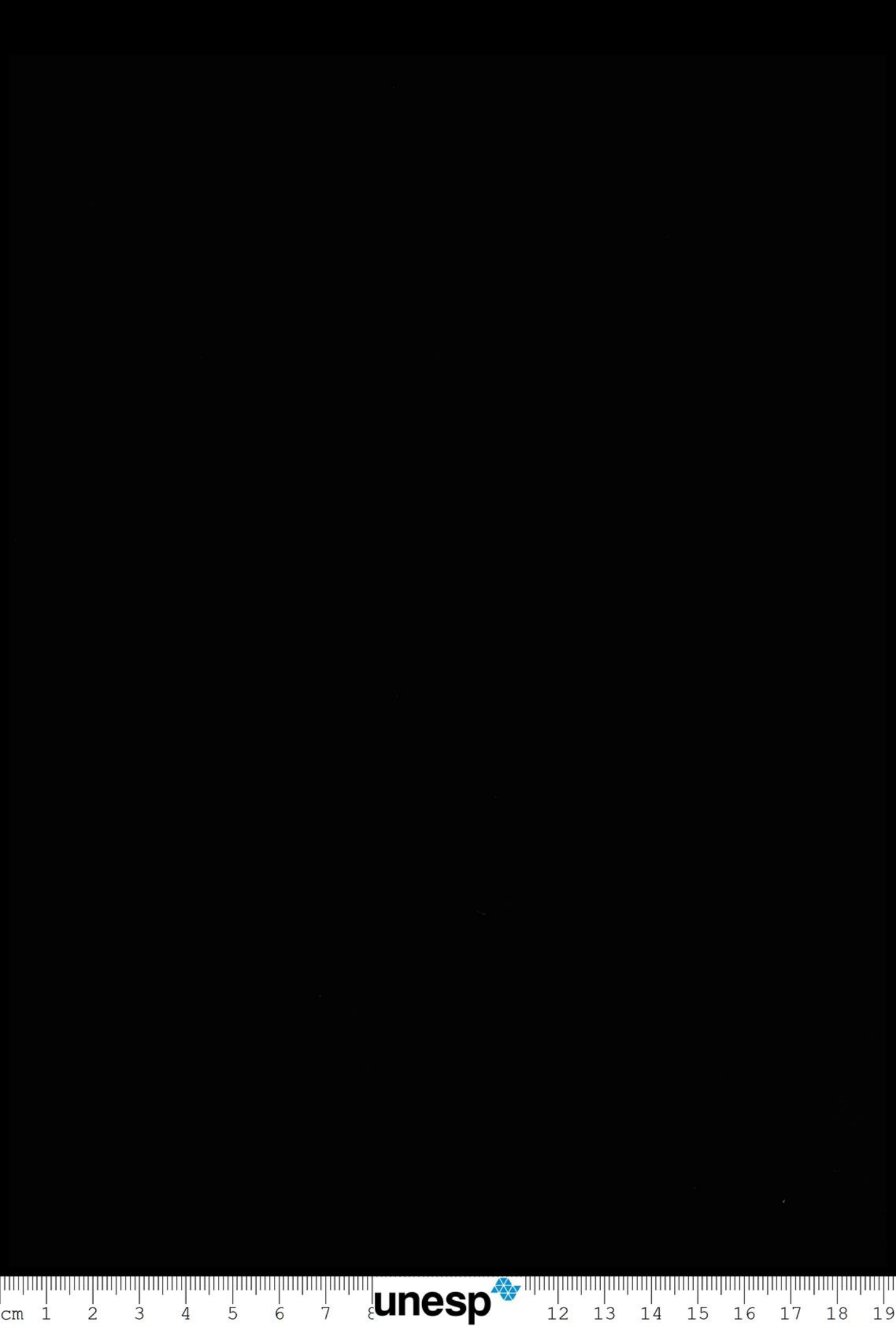
- 8g de cloreto de potássio (KCl)
- 1,15g de difosfato de sódio (Na_2HPO_4)
- 0,2g de monofosfato de potássio (KH_2PO_4)

A solução foi completada para um litro e mantida a 4°C por no máximo seis meses.

17. Solução de Giemsa (MERCK)(2%)

A solução mãe foi obtida dissolvendo-se 0,5g de Giemsa em 33ml de glicerina durante aproximadamente duas horas a 60°C em banho-maria. Após o esfriamento, foram adicionados 33ml de metanol e a solução foi mantida em vidro escuro, por cerca de 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.


cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
unesp