

Grasiela Dias de Campos Severi - Aguiar

Estudo Citogenético em Fibroblastos de
Indivíduos com Risco Aumentado
de Câncer de Pele



GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI-AGUIAR

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM FIBROBLASTOS DE INDIVÍDUOS
COM RISCO AUMENTADO DE CÂNCER DE PELE**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciências, 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 - UNESP.



632/94

São José do Rio Preto

1993



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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva



Dedico

Aos meus queridos pais, Milton e Darcy,

pela dedicação, amor e confiança e por
este trabalho foi realizado no Laboratório de Ciotogenética
me ensinarem a amar o trabalho e as
Humana do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências,
responsabilidades,
Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade
do meu esposo, Wallace, pelo carinho e
Estadual Paulista - UNESP, com auxílio financeiro da CAPES,
estímulo em todas as horas que me
FAPESP e FUNDUNESP.

fizeram prosseguir.



Dedico

Aos meus queridos pais, Milton e Darcy,
pela dedicação, amor e confiança e por
me ensinarem a amar o trabalho e as
responsabilidades.

"Des. Ao meu esposo, Wallace, pelo carinho e
inve. estímulo em todas as horas que me
mult. fizeram prosseguir. ter recebido todo o
credito por ter deixado uma trilha, nos
quando oho o desenvolvimento subsequente.
eu percebo que o mérito pertence também aos
outros".

Alexander Graham Bell

(1847-1922)

AGRADECIMENTOS

Ao ver concluída uma das etapas do projeto de vida que se propõe desenvolver não posso deixar de agradecer a todos aqueles envolvidos na sua execução, que direta ou indiretamente contribuíram para a sua conclusão. Dessa forma agradeço:

A Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva que pela sua integridade e sabedoria é exemplo de mestre e, ao mesmo tempo, de amiga, por quem terei sempre imensa admiração.

As Profas. Dras. Nívea D. T. Conforti Froes e Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno pela presteza na leitura da pré-forma e pelas valiosas sugestões que tanto contribuíram para a finalização dessa Dissertação.

A Profa. Dra. Marilândia Varella-Garcia a quem devo parte de minha formação universitária e que propiciou esse

grande aprendizado "Descobertas e aperfeiçoamentos importantes

invariavelmente envolvem a cooperação de muitas mentes. Eu posso ter recebido todo o crédito por ter deixado uma trilha, mas quando olho o desenvolvimento subsequente,

eu percebo que o mérito pertence também aos outros".

A todos os que fizeram acreditar na profissão que escolhi

ao Prof. Dr. Wislâm J. Tadei e à Profa. Dr. (1847-1922) B. C. Silva pelo apoio recebido e pela gentileza com que sempre me trataram.

Alexander Graham Bell

AGRADECIMENTOS

Ao ver concluída uma das etapas do projeto de vida que me propus desempenhar não posso deixar de agradecer a todos aqueles envolvidos na sua execução, que direta ou indiretamente contribuíram para a sua conclusão. Dessa forma agradeço:

A Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva que pela sua integridade e sabedoria é exemplo de mestre e, ao mesmo tempo, de amiga, por quem terei sempre imensa admiração.

As Profas. Dras. Nívea D. T. Conforti Froes e Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno pela presteza na leitura da pró-forma e pelas valiosas sugestões que tanto contribuíram para a finalização dessa Dissertação.

A Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia a quem devo parte de minha formação universitária e que propiciou esse grande aprendizado em citogenética.

A Profa. Dra. Maria Astride Saad Corradi, se apenas auxiliaram e por terem juntas aprendido a aproveitar as vitórias e as derrotas, eu não sei, mas por quem tenho enorme carinho e que ocupa um lugar especial em meu coração.

A todos os professores do Departamento de Biologia que participaram da minha vida acadêmica e que, acima de tudo, me fizeram acreditar na profissão que escolhi. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Wladimir J. Tadei e à Profa. Dra. Adelina B. C. Silva pelo apoio recebido e pela gentileza com que sempre me trataram.

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto por oferecer condições materiais necessárias ao desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, da Base de São José do Rio Preto que sempre me atenderam com Secção de Pós Graduação, da Biblioteca e do Centro de Microscopia que não deixaram de cumprir a tarefa diária e me proporcionaram condições de trabalhar tranquila.

As secretárias Olga Brizotti Pelicer e Simone Carvalho das amostras estudadas contribuindo não somente para o meu desenvolvimento científico mas com o conhecimento humano.

Ao amigo Josué Rodrigues dos Santos que serviu sempre com boa vontade e para quem eu deixo um agradecimento especial.

Aos colegas, pós graduandos e estagiários do Departamento de Biologia que tudo fizeram para que o ambiente de trabalho fosse alegre e agradável.

As amigas Érika Cristina Pavarino e Sheila Adami Vayego por dividirem comigo os bons e os maus momentos, por me auxiliarem e por termos juntas aprendido a aproveitar as vitórias e as derrotas.

A Profa. Nilce Barril que muito me ajudou nas fases finais da análise citogenética e a quem eu desejo o melhor que a vida pode oferecer.

Ao Prof. Marcelo Ferreira Lourenço que sempre se mostrou disponível em atenuar as dificuldades relacionadas à informática.



Aos meus pais por me terem fornecido condições de estudar a fim de que eu possa edificar um futuro melhor e que, juntamente com os meus pais, possam viver e construir.

Aos médicos do Serviço de Dermatologia e aos funcionários do Ambulatório de pequenas cirurgias do Hospital de Base de São José do Rio Preto que sempre me atenderam com respeito e colaboraram imensamente para a realização desse trabalho.

A Deus e à espiritualidade amiga, sobretudo, que permitiram o convívio com todas essas pessoas e me fizeram das amostras estudadas contribuindo não somente para o meu desenvolvimento científico mas com o conhecimento humano.

A equipe do Serviço de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto que facilitou muito o trabalho de colheita das amostras e que estava sempre pronta a servir.

Ao senhor João Antonio Seco Pinhel pela confecção da foto colorida que consta na forma definitiva.

Aos Profs. Drs. Carlos Daghljan e James R. Coleman pela revisão do "summary".

As amigas Fernanda Mani e Rubiani de Cássia Pagotto que ajudaram na obtenção da revisão bibliográfica em Ribeirão Preto e na definição da nova etapa a ser realizada.

Aos amigos Maria Ermínia e Valdir Gusmão que, além de amizade, me ofereceram subsídios técnicos na execução desse trabalho.

Aos meus pais por me fornecerem condições de estudar a fim de que eu possa edificar um futuro melhor e que, juntamente com os meus irmãos e sobrinhos tão queridos, me fazem acreditar na família, no amor e na vida.

Ao companheiro Wallace por ter escolhido a mim para com ele viver e construir.

A Deus e à espiritualidade amiga, sobretudo, que permitiram o convívio com todas essas pessoas e me fazem confiante para cumprir a minha tarefa.

.....	1
A. Teorias genéticas	2
A.1. Teoria do envelhecimento programado	2
A.2. Teoria da mutação somática	4
B. Teorias da origem das células cancerígenas	11
B.1. Teoria dos radicais livres	11
B.2. Teoria das ligações cruzadas	13
B.3. Teoria do acúmulo	16
C. Teorias fisiológicas	16
C.1. Teoria imunológica	16
C.2. Teoria neurológica	17
I.2. Envelhecimento e Câncer	22
I.3. Objetivos	31
II. MATERIAL E MÉTODOS	32
II.1. Material	32
II.2. Métodos	32
II.2.1. Colheita das amostras	32
II.2.2. Processamento inicial do tecido	33
II.2.3. Cultivo celular	33
II.2.4. Bloqueio, hipotônização, fixação e coloração do material	36
II.2.5. Análise cromossômica	35

III. RESULTADOS	37
III.1. Amostras de lesões por queratose	41
INDICE	
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Envelhecimento: Considerações gerais	1
A. Teorias genéticas	2
A.1. Teoria do envelhecimento programado	2
A.2. Teoria da mutação somática	4
A.3. Teoria do erro	8
A.4. Teoria do erro na síntese protéica	9
B. Teorias não genéticas	11
B.1. Teoria dos radicais livres	11
B.2. Teoria das ligações cruzadas	15
B.3. Teoria do acúmulo	16
C. Teorias fisiológicas	16
C.1. Teoria imunológica	16
C.2. Teoria neurológica	17
I.2. Envelhecimento e Câncer	22
I.3. Objetivos	31
II. MATERIAL E MÉTODOS	32
II.1. Material	32
II.2. Métodos	32
II.2.1. Colheita das amostras	32
II.2.2. Processamento inicial do tecido	33
II.2.3. Cultivo celular	33
II.2.4. Bloqueio, hipotonização, fixação e coloração do material	35
II.2.5. Análise cromossômica	35

III. RESULTADOS	37
1. INTRODUÇÃO	
III.1. Amostras de lesões de poroqueratose	41
III.2. Amostras de pele provenientes de regiões do	
1.1. ENVELHECIMENTO: CONSIDERAÇÕES GERAIS	
corpo expostas à luz solar	48
III.2.1. Indivíduos com idade superior a 40 anos ...	48
III.2.2. Indivíduos com idade inferior a 40 anos ...	57
III.3. Amostras de pele provenientes de regiões do	
corpo não expostas à luz solar	57
III.3.1. Indivíduos com idade superior a 40 anos ...	57
III.3.2. Indivíduos com idade inferior a 40 anos ...	60
IV. DISCUSSÃO	62
IV.1. Amostras de lesões de poroqueratose	66
IV.2. Amostras de pele proveniente de regiões do	
corpo exposta à luz solar	71
IV.3. Amostras de pele proveniente de regiões do	
corpo não expostas à luz solar	74
V. CONCLUSÕES	81
VI. RESUMO	83
VII. SUMMARY	85
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
IX. APÊNDICE	108

I. INTRODUÇÃO

I.1. ENVELHECIMENTO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

O envelhecimento foi definido como sendo o resultado de processos progressivos e irreversíveis que, sob condições normais, começam ou se aceleram após o crescimento e o desenvolvimento normais em todos os membros de uma população. É de uma sequência de eventos codificada no genoma, assim como uma propriedade da maioria dos seres vivos, com exceção das bactérias, anêmonas e certos tipos de peixes, que parecem não envelhecer, ou pelo menos não passam pelo programa de envelhecimento tradicionalmente conhecido (Kirkland, 1989). Como o processo afeta todos os componentes do organismo, inclusive em nível molecular, é geralmente confundido com sintomas de um mal (Merry, 1987; Kirkland, 1989). Os genes responsáveis pelo distúrbio patológico presente. Apesar de sua característica universal, os dados experimentais resultantes do seu estudo são limitados, ao contrário das especulações teóricas que tentam explicar seus mecanismos (Merry, 1987).

As teorias sobre o assunto são atualmente agrupadas em três categorias principais: teorias genéticas, não genéticas e fisiológicas. As teorias genéticas supõem que a vida média dos organismos de uma espécie é determinada por um programa codificado no DNA que ativa genes do envelhecimento, ou é resultado das lesões sofridas pelo DNA. As teorias não genéticas e fisiológicas focam outras causas, e mais convincente, sem dúvida, é salientam as modificações químicas ou estruturais das moléculas após sua síntese e as teorias fisiológicas do envelhecimento concentram sua atenção na perda de comunicação entre as células,

tecidos e órgãos, dando ênfase ao papel regulador do sistema neuro-endócrino (Merry, 1987). Essas teorias serão abordadas a seguir e os principais pontos de cada uma delas serão destacados.

A. Teorias genéticas

A.1. Teoria do envelhecimento programado

Essa teoria propõe que o envelhecimento é o resultado de uma sequência de eventos codificada no genoma, assim como uma determinada sequência do desenvolvimento é controlada pela expressão gênica. Os exemplos mais óbvios de senescência programada ocorrem em espécies que têm uma alta fecundidade por um período curto de tempo, como o salmão que sobe as correntezas dos rios para realizar a desova e, em pouco tempo, envelhece e morre (Merry, 1987; Kirkland, 1989). Os genes responsáveis pelo processo parecem ter efeitos pleiotrópicos, expressando-se desfavoravelmente na velhice através de deterioração fisiológica e probabilidade maior de morte, mas garantindo sucesso reprodutivo em fases mais precoces da vida. É o caso, por exemplo da exposição crônica da mulher a estrógenos, que são essenciais para a fertilidade mas podem predispor, na velhice, ao desenvolvimento de diferentes neoplasias de mama (Rusting, 1992).

Muitas evidências para a teoria do envelhecimento programado foram obtidas mas, a mais convincente, sem dúvida, é a observação da capacidade finita de divisão "in vitro" das células normais humanas e animais (Schneider, 1979; Merry, 1987). Por exemplo, fibroblastos de embrião humano cultivados



sob condições favoráveis sofrem aproximadamente 50 divisões e então morrem. Se congelados por volta da 20ª divisão e depois recolocados em cultura, realizam no máximo mais 30 divisões. Os fibroblastos de adultos normais, por sua vez, mostram apenas 14 a 29 divisões "in vitro" (Hayflick, 1979), enquanto aqueles de pacientes com síndromes de envelhecimento precoce nunca atingem 20 duplicações em cultura (Holliday, 1990; Wang et al., 1990). Fazem exceção os linfócitos de pacientes com síndrome de Down, síndrome essa que também apresenta características de envelhecimento precoce. Nesse caso, quando as células são analisadas quanto aos níveis de proliferação e índice mitótico, os resultados não revelam diferenças significativas daqueles de indivíduos normais da mesma idade (Takeshita et al., 1992).

Os experimentos de transplantes seriados de células normais em hospedeiros isogênicos mostram que o número limitado de divisões também ocorre "in vivo". Os dados já obtidos exibem uma relação inversa entre a idade do doador e a capacidade de proliferação das células no receptor (Hayflick, 1979).

Deve ser salientado, nesse ponto, que muitas linhagens celulares, como a HeLa, mostram imortalidade e perdem o limite para duplicação. Não há dúvidas, porém, que elas são anormais em uma ou mais características como, por exemplo, no número e na morfologia dos seus cromossomos, que diferem muito daqueles do tecido de origem (Hayflick, 1979). Como a imortalidade é um dos passos amplamente aceitos da carcinogênese, a restrição na divisão das células diplóides normais pode ser uma defesa contra a proliferação descontrolada, típica do estado neoplásico (Holliday, 1990).



Assumindo que existam mecanismos que controlam o número de divisões celulares, parece razoável supor que eles podem agir direta ou indiretamente sobre a atividade gênica (Holliday, 1990). A favor de uma relação direta de genes específicos sobre a capacidade proliferativa, existem indicações de que as células param de se dividir porque produzem um inibidor da iniciação da síntese de DNA, que as mantém irreversivelmente em G1 sem todavia levá-las à morte (Holliday, 1990). Um desses inibidores pode ser a interleucina alfa-1, presente em grandes concentrações nas células senescentes. Tal suposição deriva da observação de que tais células, quando tratadas com um repressor dessa proteína, recuperam a capacidade proliferativa (Maier et al., 1990).

A idéia de que o envelhecimento é um processo programado do desenvolvimento é frequentemente confundida com a idéia de que o envelhecimento está sob controle genético, sobre o que não existem dúvidas. Todas as teorias que são citadas a seguir estão relacionadas com genes envolvidos em diferentes processos. Entretanto, isso não implica que as alterações progressivas de funções, que caracterizam o envelhecimento, sejam programadas como um benefício adaptativo para o organismo ou para a espécie (Bernstein & Bernstein, 1991).

A.2. Teoria da mutação somática

Essa teoria, em alguns pontos interligada com a anterior, tem como conceito principal o acúmulo de danos mutacionais no DNA de células somáticas, responsável por prejuízos fisiológicos característicos do envelhecimento.



Realmente, os cromossomos humanos retidos em híbridos, derivados de linfócitos de indivíduos idosos e células de roedores, apresentam maior instabilidade e maior sensibilidade a efeitos clastogênicos para algumas drogas que aqueles de indivíduos jovens. Tal achado é explicado como sendo resultante de mutações em sítios específicos do DNA (Esposito *et al.*, 1989) e está de acordo com a observação do aumento na frequência de aberrações cromossômicas com a idade (Slagboom & Vijg, 1991). Outro argumento a favor do acúmulo de danos mutacionais é que a radiação ionizante, um mutagênico potente, diminui a vida média de animais experimentais, provavelmente por causar alterações no material genético. Todavia, a baixa frequência de mutações espontâneas, que seria insuficiente para levar ao envelhecimento, e a existência de mecanismos de reparo parecem contrapor-se a essa teoria (Kirkwood, 1989), a menos que alguns fatores alterem essa situação.

Um desses fatores poderia compreender a ação dos transposons (Tps), que são sequências de DNA capazes de se mover de forma casual de um local para outro do genoma e, eventualmente, se inserir em uma região de genes estruturais ou reguladores resultando em inativação gênica. Parece lógico supor que, se muitos genes forem afetados em consequência da inserção de Tps, a célula provavelmente entrará em senescência e morrerá. Como os Tps são duplicados em cada ciclo de transposição, um grande período de tempo é necessário antes que eles atinjam número suficiente para promover mutações com efeitos fenotípicos significativos, o que parece de acordo com o processo progressivo do envelhecimento (Kirkwood, 1989; Murray, 1990).



Driver & McKechnie (1992), em seus experimentos com *Drosophila*, obtiveram indicações de que a transposição somática ou germinativa realmente pode resultar em características do envelhecimento e, além disso, responder a agentes ambientais como a dieta.

Outros fatores que levam a modificações importantes no DNA compreendem os agentes epigenéticos, cuja ação resulta na perda ou ganho de grupos metila por determinadas bases nitrogenadas, principalmente a citosina (Catania & Fairweather, 1991). Os padrões de metilação do DNA são herdados pelas células e interferências nesse mecanismo podem gerar mudanças estáveis na expressão gênica e constituir um fator causal não apenas no envelhecimento como também em doenças como o câncer (Vijg *et al.*, 1985). Evidências da redução nos níveis de metilação do DNA de linfócitos de indivíduos idosos em comparação com aqueles de indivíduos jovens já foram obtidos por Drinkwater *et al.* (1989). Do mesmo modo, Catania & Fairweather (1991) observaram que os níveis de metilação decaem durante o envelhecimento celular "in vitro" e, pelo menos em bovinos, ocorrem extensivamente em sítios CCGG do DNA satélite (Hornsby *et al.*, 1992).

Em geral, a redução na metilação de um gene resulta no aumento do seu nível de expressão. Um aumento de metilação relacionado com a idade nos genes do cromossomo X inativo foi detectado por Wareham *et al.* (1987), que demonstraram a reativação desses genes em animais mais velhos. A regulação gênica durante o envelhecimento parece, portanto, ser menos efetiva (Hornsby *et al.*, 1991).



portadores. Em relação às atividades do sistema de reparo do DNA, há sugestões de que a eficiência dos seus mecanismos diminui com o tempo resultando num aumento da frequência de eventos deletérios na molécula e consequente alteração da função celular (Rao & Loeb, 1992; Wei et al., 1993). Muitos autores, entretanto, não encontraram resultados que favoreçam essa idéia. Por exemplo, Vijg et al. (1985) mediram a quantidade de bases do DNA que permaneceram lesadas após irradiação com raios ultravioleta (UV) e verificaram uma pequena diferença entre as células cultivadas de ratos jovens e velhos. As células desses últimos repararam menos os danos, todavia essa diferença foi tão pequena que, segundo os autores não seria capaz de produzir efeitos biológicos dramáticos. Ao contrário, Nierdermuller (1985), na análise do reparo por excisão, que tem grande importância na manutenção da integridade genômica e na prevenção do câncer através da correção de quebras uncatenárias na molécula de DNA, observou atividade reduzida desse mecanismo em ratos idosos. câncer e placas ateroscleróticas. Embora tais

lesões. A contradição nos resultados dos estudos já realizados pode ser devida às dificuldades técnicas encontradas nesse tipo de investigação (Warner & Price, 1989), embora alguns dados sugiram que o declínio ou a preservação do reparo na senescência dependa do tecido ou do animal estudado e do tipo de análise empregada (Nakatsuru et al., 1989; Mulaart et al., 1990).

é interessante que a mesma controvérsia é verificada no estudo de células de indivíduos que apresentam características de envelhecimento precoce, como é o caso dos



portadores de síndromes progeriformes. Lehmann (1987), Lipman et al. (1989) e Wang et al. (1990), por exemplo, verificaram que as células de pacientes com a síndrome de Hutchinson-Gilford ou progéria e com a síndrome de Cockayne apresentam capacidade reduzida para reparar danos do tipo dímeros de pirimidina causados por raios UV. Stefanini et al. (1989), por sua vez, analisando linfócitos de pacientes com síndrome de Werner, que também se caracteriza por envelhecimento prematuro, além de instabilidade cromossômica e predisposição a neoplasias, verificaram que, apesar da frequência aumentada de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, a capacidade de reparar danos produzidos por UV permanece normal.

Do exposto acima, parece que muitas evidências experimentais refutam o papel da mutação somática no envelhecimento. Apesar disso, alguns aspectos do conceito básico são atrativos. Por exemplo, mutações somáticas podem se acumular em tecidos que se dividem rapidamente e levar a lesões focais como úlceras, câncer e placas ateroscleróticas. Embora tais lesões não sejam a causa primária do envelhecimento em mamíferos, elas podem contribuir muito para esse processo (Bernstein & Bernstein, 1991).

A.3. Teoria do erro

De acordo com essa teoria, que é derivativa da anterior, repetições seletivas de certos genes fornecem um mecanismo protetor contra danos em sequências vitais do DNA, pois lesões em uma ou algumas cópias serão menos importantes que lesões em sequências únicas. Desse modo, o processo do



envelhecimento será mais lento quanto maior for o número de repetições em genes que controlam o metabolismo geral. Todavia, contrariando essa idéia está a observação de que machos haplóides e diplóides de vespas (*Habrobracon*) apresentam tempos de vida semelhantes. Além disso, não tem sido relatada correlação entre redundância de genes ribossômicos e longevidade em mamíferos, apesar de que a redundância média de genes que transcrevem RNAm no cérebro de camundongos e no homem parece estar correlacionada com maior sobrevida (Merry, 1987).

A.4. Teoria do erro na síntese protéica

Essa teoria propõe que, no envelhecimento, há um decréscimo na fidelidade da síntese protéica, que poderia atingir proporções catastróficas em virtude da amplificação dos erros cometidos. Uma das consequências primeiras e mais importantes seria a síntese imprecisa do DNA (Merry, 1987).

Alguns experimentos mostram que não ocorre diferença na fidelidade da síntese do DNA em células de indivíduos jovens e idosos. Além disso, no que se refere a enzimas, as modificações observadas em muitas espécies animais ao longo da vida não estão relacionadas com substituições de aminoácidos mas com modificações que ocorrem subsequentemente à síntese protéica. Mais que isso, as evidências indicam que é a eficiência da síntese que declina (Bernstein & Bernstein, 1991).

Por exemplo, uma ampla investigação realizada por Eleftheriou *et al.* (1991), que pretendeu analisar alterações quantitativas e estruturais nas proteínas secretadas por fibroblastos humanos, verificou que muitas daquelas que integram



a matriz extracelular, como o colágeno e a elastina, são sintetizadas em menor escala durante o envelhecimento, o que resulta na diminuição da adesão celular, da estimulação por fatores de crescimento e, eventualmente, da própria capacidade proliferativa. A redução da síntese protéica em alguns casos pode ser devida à diminuição gradativa na produção do hormônio de crescimento (HC) pela pituitária (Corpas **et al.**, 1993) e nos níveis de IGF-I, um dos fatores de crescimento tipo insulina, que é produzido principalmente pelo fígado e serve de mediador periférico do HC (Yamamoto **et al.**, 1991). Inversamente ao citado, algumas proteínas são mais produzidas conforme a idade avança. É o caso da proteína beta-amilóide, cujo acúmulo progressivo é observado em células do cérebro de pessoas normais e mais consistentemente de pacientes com doença de Alzheimer e síndrome de Down, onde é responsável por muitas das consequências patológicas relacionadas com a senescência (Adler **et al.**, 1991).

Alterações na taxa de síntese protéica podem ser decorrentes de alterações no RNAm que codifica tais proteínas. Entretanto, um estudo realizado por Richardson **et al.** (1985) evidenciou que a idade não afeta o tamanho, a degradação e o processamento pós-transcricional de algumas espécies de RNAm do fígado de ratos, embora os níveis desses RNAs acompanhem os níveis das proteínas por eles codificadas. Por outro lado, embora sua estrutura seja mantida, a eficiência com que moléculas de RNA estimulam a síntese protéica parece decair conforme a idade aumenta (Sadjel-Sulkowska & Marotta, 1985). Condizentes com essa idéia estão os resultados relatados por



Furth (1991) de que os níveis de RNAm para o colágeno tipo I (alfa 1 e 2) são significativamente mais baixos em fibroblastos senescentes. Fujita *et al.* (1992) também observaram que a concentração de RNAm para um marcador protéico da senescência, o SMP30, encontrado nos rins e no fígado de ratos, está reduzida à metade.

Todos os exemplos citados reforçam a idéia de que é a quantidade, mas não a qualidade da proteína, que está alterada com a idade. Como o processo depende da produção do RNAm, é evidente que as lesões do DNA são os responsáveis primários pelo bloqueio da transcrição e da tradução. Tal conclusão reforça a hipótese de que o DNA sofre danos ao longo da vida e não favorece a teoria do erro na síntese protéica (Bernstein & Bernstein, 1991).

B. Teorias não genéticas

B.1. Teoria dos radicais livres

Essa teoria propõe que o acúmulo de radicais livres, ou seja, átomos ou moléculas altamente reativos, é capaz de iniciar uma cadeia de reações com moléculas estáveis gerando mais radicais livres. O oxigênio, apesar de ser indispensável para a vida aeróbica, apresenta tendência em formar tais radicais, os peróxidos de hidrogênio, os superóxidos e os radicais hidroxilas. A natureza reativa desses compostos leva a danos importantes, particularmente em componentes celulares como membranas mitocondriais e microssomais, colágeno, elastina, enzimas que contêm pontes S-H e no próprio DNA (Merry, 1987).



proteção A oxidação de proteínas e enzimas que ocorre ao longo da vida, por exemplo, leva à inativação dessas substâncias, à diminuição de sua degradação e consequente acúmulo. Como os processos de biossíntese e biodegradação estão estreitamente interligados, grandes quantidades de proteínas lesadas podem comprometer a integridade celular contribuindo dessa forma para a senescência (Stadtman, 1992). Além da senescência, as consequências da oxidação por radicais livres podem compreender patologias como doenças cardiovasculares e degenerativas do sistema nervoso central e o declínio do sistema imunológico. É possível que, em virtude desses compostos provocarem aberrações cromossômicas, também estejam relacionados com a etiologia do câncer (Martin *et al.*, 1985; Merry, 1987). Cutler, 1991; Holmes

et al., Há alguns sistemas celulares que protegem o organismo dos danos causados por radicais livres, como o das superóxido desmutases, o da catalase e o ciclo do glutatião, e impedem a formação de quebras unicatenárias na molécula de DNA e trocas entre cromátides irmãs (Gille *et al.*, 1989; Poot, 1991). Além desses sistemas, uma enzima descrita recentemente, a glicosilase do DNA, repara a 5-hidroximetiluracila produzida pela oxidação da timina por radiação ionizante e por uma variedade de agentes químicos (Ames *et al.*, 1985; Ganguly & Ducker, 1990). Embora existam relatos do declínio da atividade dessas enzimas antioxidantes com o avanço da idade, pelo menos em alguns experimentos isso não ocorre (Carrillo *et al.*, 1992). É interessante que pacientes com síndrome de Down mostram níveis aumentados da enzima superóxido desmutase dependente de cobre e zinco que, apesar de estar envolvida em mecanismos de



proteção contra os radicais de oxigênio, também age contrariamente catalisando a formação de peróxido de hidrogênio. Coincidentemente, o gene que codifica essa enzima já foi mapeado na parte distal do braço longo do cromossomo 21 e, portanto, está triplicado nessa patologia que, entre muitas outras alterações, manifesta envelhecimento precoce (Bernstein & Bernstein, 1991; Rao & Loeb, 1992).

Além dos sistemas naturais de proteção, já foi verificado que animais de laboratório apresentam tempo de vida maior quando alimentados com antioxidantes, como por exemplo selênio, beta-caroteno e vitaminas C e E, e que esses compostos são efetivos em provocar um atraso no desenvolvimento de patologias específicas (Ames et al., 1985; Cutler, 1991; Holmes et al., 1992). O principal resultado obtido com a sua administração foi a redução do peso dos animais, uma observação importante dado que a subnutrição é um modo clássico de aumentar a longevidade de espécies de laboratório (Merry, 1987).

O DNA é o alvo mais importante dos radicais livres e particularmente vulnerável porque, ao contrário das proteínas e RNAs, está presente na célula em quantidade muito menor e não é renovado. Tanto o DNA nuclear como o DNA mitocondrial (DNAm) são atingidos, embora o processo seja mais consistente sobre esse último. O DNAm é uma molécula circular encontrada em duas a cinco cópias por organela, que tem uma sequência conhecida de aproximadamente 16,6 Kb e participa exclusivamente dos processos de fosforilação oxidativa (Bunn & White, 1985; Nagley et al., 1992). Contém níveis maiores de bases danificadas oxidativamente que o DNA genômico, em decorrência de sua síntese ocorrer no



interior da mitocôndria próxima a sítios de formação de espécies reativas de oxigênio e, também, devido à sua capacidade limitada de reparo por excisão e recombinação (Miquell, 1992). Além disso, sua taxa de evolução é mais rápida do que a do DNA nuclear refletindo sua susceptibilidade aumentada às mutações (Arnheim e Cortopassi, 1992).

Muitos estudos realizados sobre o efeito do envelhecimento nas funções respiratórias e na fosforilação oxidativa da mitocôndria indicam decréscimo na taxa do consumo de oxigênio e nos níveis de ATP produzidos com o avanço da idade, o que pode estar relacionado com alterações no DNAm (Wallace, 1992). Confirmando essa idéia estão as observações feitas em linhagens senescentes de fungos, que mostram perturbações na função mitocondrial em virtude da amplificação desse DNA (Martin & Turker, 1988).

Na espécie humana, uma mutação em ponto (A → G), característica de um tipo de epilepsia mioclônica herdada materno, foi verificada por Munscher *et al.* (1993) no DNAm de células do músculo esquelético de indivíduos entre 74 e 89 anos de idade mas não em recém-nascidos e células HeLa. A importância desse achado se deve ao fato de que tal mutação parece ser a base molecular dessa doença, caracterizada por atividades reduzidas de enzimas respiratórias nas mitocôndrias dos músculos esqueléticos.

Um elevado número de deficiências no DNAm também já foi observado em vários tecidos de indivíduos idosos. Algumas foram encontradas somente em alguns tipos celulares enquanto outras são de localização mais geral. A deficiência de 7436 pb,



por exemplo, foi observada apenas no DNAm cardíaco de pessoas com aproximadamente 40 anos ou acima (Wei, 1992). A deficiência de 4977 pb, por sua vez, é a mais prevalente e abundante e seu aparecimento é detectado no início da terceira década de vida (Cortopassi & Arnheim, 1990; Yen et al., 1991). É importante

B.3. Teoria do acúmulo
Essa teoria propõe que, com o avanço da idade, há o acúmulo de vários produtos resultantes do metabolismo celular, mitocondrial (Arnheim & Cortopassi, 1992).

A proporção do DNAm deficiente em indivíduos idosos é relativamente baixa e as consequências patológicas podem não ser significativas. Entretanto, sua presença progressiva associada a mudanças nas membranas mitocondriais pode contribuir para o declínio da função dessa organela e também para o envelhecimento (Gadaleta et al., 1992; Wei, 1992).

C. Teorias fisiológicas

B.2. Teoria das ligações cruzadas

C.1. A teoria das ligações cruzadas sugere que muitas macromoléculas, como determinadas proteínas, podem se ligar covalentemente a outras moléculas, por exemplo o DNA, alterando sua estrutura e função e formando complexos resistentes ao processo catabólico.

Um dos exemplos a favor dessa teoria deriva das observações feitas com o colágeno extracelular. A perda de elasticidade dos tecidos, resultante das ligações cruzadas do colágeno, pode ter efeitos deletérios em muitos órgãos e constituir um dos primeiros passos do envelhecimento. Todavia, a falta de evidências de ligações cruzadas entre DNA e proteínas



intracelulares "in vivo" em níveis elevados e de uma relação entre a taxa de ligações desse tipo e a vida média dos diferentes animais são severas críticas a essa teoria (Merry, 1987).

B.3. Teoria do acúmulo

Essa teoria propõe que, com o avanço da idade, há o acúmulo de vários produtos resultantes do metabolismo celular, como a lipofuscina formada durante a peroxidação lipídica, e que isso pode contribuir para a senescência (Kirkland, 1989; Brunk et al., 1992). Não há, porém, qualquer evidência de que o acúmulo desses compostos altere o metabolismo celular. Além disso, o aumento da lipofuscina em animais com deficiência de vitamina E não resulta em envelhecimento precoce (Merry, 1987).

C. Teorias fisiológicas

C.1. Teoria imunológica

Essa teoria foi baseada nas observações do decréscimo da heteroimunidade e aumento da autoimunidade em indivíduos idosos e propõe que alterações no sistema imunológico estão diretamente associadas ao envelhecimento. Entretanto, a teoria não explica a senescência em organismos que não têm sistema imunológico semelhante ao de vertebrados. Além disso, como o sistema tem controle hormonal, seu desequilíbrio pode ter início dessas questões, alguns estudos têm sido feitos com diferentes em modificações neuro-endócrinas e dessa forma ser consequência e não causa do processo (Merry, 1987).

C.2. Teoria neurológica

Essa teoria postula que os processos de envelhecimento devem estar sob controle neuro-endócrino, do mesmo modo que o desenvolvimento, o crescimento e a maturação. Uma quebra na regulação desse controle seria resultado de eventos tais como perda de neurônios, deficiência de neurotransmissores, estresse, hipopituitarismo e hipotireoidismo, entre outros. Essa teoria pode ser vista como uma extensão da teoria do envelhecimento programado, entretanto, não tem aplicabilidade universal e não explica os eventos iniciais em nível molecular que resultam na desregulação do sistema neuroendócrino. Do mesmo modo, não leva em consideração que as modificações observadas podem também ser efeitos e não causa do envelhecimento (Hayflick, 1979).

Muito embora todas as teorias citadas tenham como alicerce observações realizadas em diversos experimentos, nenhuma delas, por si só, explica a etiologia do processo de senescência. Seria o envelhecimento um processo ativo, geneticamente controlado, ou seria consequência de alterações casuais, genéticas ou não, que ocorrem durante a vida de um indivíduo?

Na tentativa de oferecer subsídios para o entendimento dessas questões, alguns estudos têm sido feitos com diferentes componentes celulares e os seus resultados podem ser interpretados à luz de mais do que uma das teorias do envelhecimento.



Por se tratar do material genético, o DNA é o componente mais intensamente estudado. Essa molécula, tem comprimento superior a 1m e está confinada no núcleo, cujo diâmetro é aproximadamente 5 μ m. Em consequência, necessita de um arranjo elaborado de seus elementos para a criação de diferentes níveis de estrutura fundamentais para a expressão gênica. Sua análise revela que a densidade das fibras da cromatina decresce e o espaçamento entre elas aumenta conforme a idade do doador avança. Existem sugestões de que o declínio na densidade das fibras pode ser consequência de alterações tanto da cromatina quanto da estrutura onde a cromatina está ancorada. Por outro lado, o maior espaçamento entre elas pode corresponder a modificações do DNA que resultam na diminuição significativa da probabilidade do início da síntese da molécula e, em consequência, da proliferação celular (Macieira-Coelho & Puvion-Dutilleul, 1989).

Uma abordagem muito recente e bastante interessante tem sido feita sobre os telômeros e sua possível relação com a senescência. Essas estruturas correspondem às extremidades cromossômicas que protegem os cromossomos da degradação e fusão. Consistem de sequências repetidas ricas em guanina (TTAGGG) cujo número varia de cromossomo para cromossomo e de indivíduo para indivíduo, porém são altamente conservadas durante a evolução (Moyzis, 1991).

Em virtude da duplicação semiconservativa do DNA no sentido 5' $\rightarrow$ 3' e da necessidade de um "primer" de RNA para a polimerase, foi previsto que a cada ciclo de duplicação da cromatina não telomérica podem, assim, reduzir a capacidade



molécula deveria ocorrer uma diminuição das extremidades dos cromossomos e que, após um certo número de divisões, uma porção crítica seria perdida levando à deleção de genes essenciais, como por exemplo, o da alfa-globina ou mesmo à morte celular (Blackburn, 1991; Broccoli & Cooke, 1993). A favor dessa idéia estão os dados de Harley *et al.* (1990), que relataram o decréscimo do tamanho telomérico durante o envelhecimento "in vitro". Lindsey *et al.* (1991), estudando fibroblastos de 21 indivíduos de diferentes idades através de técnicas de hibridização com sondas específicas, observaram decréscimo significativo dos telômeros com a idade, equivalente à perda de 19,8 pb por ano. Do mesmo modo, Vaziri *et al.* (1993) observaram aumento na taxa de perda telomérica com a idade em linfócitos de indivíduos normais e, de forma mais acentuada, em pacientes com síndrome de Down, e concluíram que esse evento representa um biomarcador da imuno-senescência prematura.

A perda telomérica cíclica poderia ser aparentemente contrabalanceada pela elongação dos telômeros através da síntese das sequências repetidas pela polimerase do DNA dependente de RNA conhecida como telomerase (Broccoli & Cooke, 1993). A atividade dessa enzima, porém, foi verificada em células germinativas e transformadas, mas não em células somáticas. Em consequência, a perda gradual de DNA telomérico não deve ser reparada na maioria das células, provavelmente resultando em instabilidade cromossômica, morte celular e envelhecimento (Harley, 1991). Realmente, quebras na dupla hélice de DNA causam bloqueio no ciclo celular de alguns organismos e extremidades cromossômicas não teloméricas podem, assim, reduzir a capacidade



proliferativa das células (Broccoli & Cooke, 1993). Os dados já obtidos em alguns organismos como os fungos são consistentes com essa idéia. Entretanto, a explicação para o envelhecimento baseada no encurtamento dos telômeros não deve ser simples uma vez que tanto camundongos jovens quanto idosos mostram longos telômeros, 5 a 10 vezes maiores que aqueles observados na espécie humana (Blackburn, 1991).

Já é bem conhecido que o DNA se associa, além das proteínas histônicas e não histônicas, a uma rede protéica, a matriz nuclear, e que sua síntese tem início em sítios localizados preferencialmente entre a cromatina condensada e as áreas de intercromatina (Berezney & Coffey, 1975). Diferentes trabalhos têm indicado que movimentos celulares são propagados através do citoesqueleto para o núcleo fazendo com que a cromatina assuma conformação favorável para o início da síntese de DNA. Esse mecanismo parece ser danificado durante o envelhecimento celular devido a alterações no sistema de sustentação celular, ou seja, no citoesqueleto (Macieira-Coelho, 1991).

O citoesqueleto é reconhecido como um importante modulador de funções metabólicas celulares e alterações nele provocadas parecem realmente favorecer a senescência. Entre as proteínas que o compõe está a actina, uma das mais abundantes proteínas da célula, que participa de eventos ligados à regulação da proliferação e da diferenciação celular e de interações com as proteínas da matriz extracelular, com a membrana celular, com as enzimas citoplasmáticas e com o núcleo.



A polimerização alterada da actina já foi verificada em linfócitos do sangue periférico de pessoas idosas, e isso pode estar relacionado com anomalias nos mecanismos de transdução de sinais entre a membrana e o núcleo que ocorrem durante o processo do envelhecimento (Rao & Cohen, 1991). Observações semelhantes foram feitas com um outro constituinte do citoesqueleto, os microtúbulos, que são estruturas altamente dinâmicas capazes de se organizar muito rapidamente e que contribuem para a polaridade, movimento e divisão celulares. Esses elementos apresentam despolimerização centrífuga em culturas de tecido senescentes tratadas com várias concentrações de nocodazole e, ao contrário, quando presentes em células recém-cultivadas, mostram despolimerização centrípeta. Esses achados indicam que ocorrem alterações dos microtúbulos provocadas pelo envelhecimento que, em virtude da função desses elementos, podem afetar a dinâmica do ciclo celular (Raes, 1991).

Muitas outras observações experimentais sobre a senescência celular e dos organismos poderiam ser citadas e fornecer uma série de reflexões em torno do assunto. Porém, o entendimento dos mecanismos envolvidos quase sempre é obscuro. O envelhecimento parece representar o conjunto de todos os achados e seu estudo, muitas vezes, não permite reconhecer até que ponto eles constituem causa ou consequência desse processo.

1.2. CANCER E ENVELHECIMENTO

O câncer é uma doença de células somáticas e pode ter origem em fatores genéticos ou epigenéticos, ou seja, o estado maligno resulta de mudanças no genoma ou de alterações na expressão do genoma. Mudanças no genoma compreendem mutações que incluem perdas e rearranjos cromossômicos, modificações na sequência de DNA e integração de DNA viral. Alterações epigenéticas são pouco caracterizadas e incluem a associação de moléculas específicas com o DNA que leva a modificações na expressão gênica. A maioria das neoplasias apresenta anormalidades no genoma, visíveis geralmente como aberrações cromossômicas. Ao contrário, exemplos de câncer epigenético não são conhecidos na espécie humana, embora seja muito provável que fatores genéticos e epigenéticos operem juntos na carcinogênese (Knudson Jr., 1991).

Estudos recentes que combinam a citogenética à biologia molecular têm mapeado genes envolvidos nos processos de envelhecimento e câncer. Ambos apresentam muitos pontos em comum. Ambos parecem que predisponem ou que resultam no câncer e em suas alterações genéticas desencadeadas através de agentes característicos. Entre eles estão os oncogenes, que são genes capazes de induzir a transformação neoplásica em condições naturais ou experimentais e são resultantes de mutações em sequências normais denominadas protooncogenes e relacionadas com o ciclo celular (Gordon, 1985). Um outro grupo de genes, os supressores de tumor, parecem atuar como repressores da atividade dos oncogenes e podem desencadear o processo maligno através de alterações em seus dois homólogos e da consequente perda do seu papel regulador (Knudson, 1989).

As causas das mutações espontâneas que levam à transformação neoplásica não são claras mas a principal delas é provavelmente a instabilidade do DNA a 37°C, embora os metabólitos endógenos também desempenhem papel importante (Watson, 1987). Os agentes ambientais incluem a radiação ionizante e ultravioleta, certas substâncias químicas e vírus que, algumas vezes, produzem mutações mas, em outros casos, parecem atuar epigeneticamente. É o caso dos promotores químicos que afetam a cinética das células sem causar alterações no DNA (Knudson Jr., 1991). As mutações que desencadeiam o câncer também podem ser herdadas e, em virtude do caráter comum dessa patologia, sua análise genética é difícil de ser feita e o padrão de herança nem sempre pode ser estabelecido. Além disso, alguns tipos mais heterogêneos de susceptibilidade à doença envolvem interações entre fatores ambientais e hereditários, como é o caso dos tumores de pele (Schull, 1991).

Existem muitas evidências de que o câncer e o envelhecimento apresentam muitos pontos em comum. Ambos parecem surgir de alterações genéticas desencadeadas através de agentes similares, que culminam em processos de proliferação e perda de diferenciação característicos do estado neoplásico, ou resultam na degeneração e morte das células levando à senescência (Schneider, 1985). Por exemplo, produtos carcinogênicos de origem química, hormonal e radioativa aceleram a taxa de envelhecimento dos tecidos alvo bem como do organismo como um todo. Por outro lado, drogas ou fatores que promovem a longevidade em animais de laboratório alteram a carcinogênese



espontânea ou induzida. Alguns exemplos desse último grupo compreendem os antioxidantes, que protegem as células das lesões em macromoléculas, e a dieta com baixos teores calóricos, que normalizam parâmetros hormonais, metabólicos e imunológicos (Anisimov, 1991).

Além disso, a incidência da maioria dos tipos de neoplasias aumenta drasticamente com a idade, provavelmente porque os efeitos de agentes carcinogênicos se acumulam ao longo dos anos (Heim & Mitelman, 1987; Sandberg, 1990). Não se deve ao acaso o fato de que 55% dos indivíduos acima de 65 anos apresentam algum tipo de neoplasia (Yancik & Ries, 1991). Do mesmo modo, o envelhecimento é considerado o resultado do acúmulo de alterações em diversos componentes celulares, em especial no DNA (Bernstein & Bernstein, 1991). As velocidades com que as taxas de ambos os processos se desenvolvem também são semelhantes e dependem do animal considerado (Anisimov, 1991). Apesar dessas evidências, a associação do câncer com o envelhecimento constitui um problema difícil de ser estudado. Algumas situações, todavia, favorecem a sua análise. Por exemplo, a pele, que compreende o revestimento externo do organismo, sofre ao longo da vida a ação de diferentes agentes mutagênicos e permite que as alterações decorrentes sejam facilmente visualizadas, desde o seu início até o desenvolvimento de processos característicos do envelhecimento ou da malignização (Oyama, 1991).

Entre os principais agentes mutagênicos que afetam a pele está a radiação solar, em especial a luz ultra-violeta, cujo espectro varia de 200 a 400 nm e compreende três regiões de



absorção: UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) e UV-C (200-290 nm). Dado que os raios UV-C são filtrados pela camada de ozônio, são os raios UV-A e UV-B que atingem a terra, sendo os últimos amplamente relacionados com a origem de neoplasias cutâneas. As lesões no DNA provocadas por esses raios consistem em anéis de ciclobutano entre bases pirimídicas adjacentes que, num processo natural, são reparados por sistemas enzimáticos, mediados algumas vezes pela própria luz visível e pelos raios UV-A (Sutherland **et al.**, 1985; Hashimoto & Mehregan, 1990). Se tal reparo não ocorrer, as mutações podem ser fixadas e levar à morte celular ou à transformação neoplásica.

Realmente, existem muitas evidências de que a exposição à luz solar, em especial à luz UV, está envolvida no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer de pele. Por exemplo, indivíduos caucasóides ou procedentes de países temperados, que voluntariamente emigraram para outros locais mais ensolarados, mostram aumento na incidência de melanomas, carcinomas basocelulares e espinocelulares e de lesões benignas e pré-malignas correspondentes (Klein-Szanto, 1989; Marks **et al.**, 1990; Bell **et al.**, 1992). Do mesmo modo, pacientes com xeroderma pigmentoso, que é uma síndrome com deficiência no reparo de DNA e sensibilidade à luz solar, apresentam envelhecimento precoce e frequência elevada de câncer de pele. As células desses indivíduos manifestam grande número de quebras cromossômicas após exposição à UV, o que fornece forte evidência da ligação entre esse tipo de radiação, mutações não reparadas no DNA e câncer (Casati **et al.**, 1991). Outra observação a favor dessa hipótese provém de estudos que revelam deficiência em



mecanismos de reparo de fotoprodutos em fibroblastos de carcinoma espinocelular e de queratose actínica, um tipo de lesão benigna que predispõe a esse tipo de câncer (Hori et al., 1992).

Outras condições, como a poroqueratose, também manifestam instabilidade cromossômica e predisposição à malignização cutânea em regiões do organismo expostas à luz solar (Otsuka et al., 1988; Sandberg, 1990). Essa enfermidade é caracterizada por lesões de pele originadas de clones anormais da epiderme (Scappaticci et al., 1989c; Lever & Schaumburg-Lever, 1990) e é geralmente herdada como um traço autossômico dominante, embora existam descrições de casos esporádicos na literatura (Otsuka et al., 1989; Sandberg, 1990).

Existem cinco formas distintas dessa patologia. A poroqueratose **tipo placa**, originalmente descrita por Mibelli em 1889 (Reed & Leone, 1970), que manifesta uma única erupção de alguns centímetros de diâmetro, com borda elevada, e afeta preferencialmente as extremidades e a face de indivíduos acima de 40 anos de idade. O segundo tipo é a poroqueratose **actínica disseminada superficial**, que é o tipo mais comum e consiste de lesões múltiplas de pequeno diâmetro em áreas expostas ao sol. A forma **linear** envolve um único segmento do corpo ou tem distribuição generalizada e suas lesões frequentemente surgem a partir de nevos verrucosos. Um grande número de pequenas lesões que afetam principalmente as palmas das mãos e as plantas dos pés, mas que podem envolver outras áreas, são típicas da forma **plantaris, palmaris e disseminada**. Ao contrário, a forma **punctata** é restrita à palma das mãos e às plantas dos pés. De



modo geral, o aspecto histológico de todas as formas é muito semelhante, sendo marcado pela presença de colunas queratinizadas no centro de invaginações formadas pela epiderme, onde são encontrados núcleos picnóticos basófilos (Lever & Schaumburg-Lever, 1990).

Do ponto de vista molecular, o estudo de lesões de pele associadas com exposição à luz solar ou das células cutâneas submetidas natural ou artificialmente à ação dos raios UV, embora escasso, tem revelado alterações em oncogenes e em genes supressores de tumor. Por exemplo, já foi observada frequência elevada de mutações típicas da irradiação UV nos oncogenes RAS de tumores de pele provenientes de indivíduos normais ou portadores de xeroderma pigmentoso. Levando em consideração que a proteína ras é um transdutor dos sinais mitogênicos, tais mutações podem desestabilizar intensamente os mecanismos de regulação da divisão celular (Kahn & Graf, 1988; Daya-Grosjean *et al.*, 1993). Em relação ao protooncogene FOS, tem sido relatada sua expressão aumentada induzida por UV em queratinócitos de pessoas idosas. Esse fato pode ser responsável pelo estímulo da divisão celular levando a tumores "in vivo" ou a transformação maligna "in vitro", dado que esse oncogene parece estar envolvido na proliferação e diferenciação de células serem hipersensíveis aos efeitos letais do raios UV em queratinócitos de recém-nascidos em resposta a doses fisiológicas de UV (Garmyn *et al.*, 1993). No caso de genes supressores de tumor, já foram observadas mutações do tipo dímero de pirimidina no gene TP53 em carcinomas espinocelulares de pele. Esse achado está de acordo com a função protetora desse



gene, que mostra níveis aumentados em células epidérmicas após sua exposição à irradiação UV (Brash et al., 1991; Hall et al., 1993).

Em relação às análises citogenéticas de lesões de pele associadas com a exposição à UV, muitos resultados interessantes foram obtidos. Por exemplo, em relação à poroqueratose, os trabalhos já realizados referem diferentes aberrações cromossômicas clonais e não clonais, tanto estruturais como numéricas, muitas das quais são múltiplas e não relacionadas (Taylor et al., 1973; Machino et al., 1984; Otsuka et al., 1991). A análise de pele normal de pacientes com tal enfermidade também revelou a presença de alterações esporádicas e recorrentes, essas últimas com o envolvimento preferencial do cromossomo 3 (Scappaticci et al., 1989c), enquanto linfócitos desses pacientes e fibroblastos de indivíduos normais, usados como controles, não evidenciaram alterações cariotípicas. Otsuka et al. (1991) mostraram que a frequência das anormalidades cromossômicas é maior em fibroblastos e queratinócitos provenientes das lesões, seguida daquelas de pele aparentemente não afetada e de controles normais. Tais achados indicam instabilidade cromossômica nesses pacientes e, embora tal característica não tenha sido esclarecida, o fato de suas células serem hipersensíveis aos efeitos letais do raio X fala a favor de um defeito no sistema de reparo do DNA, que pode estar relacionado com o desenvolvimento da enfermidade e, mesmo, com a sua malignização (Otsuka et al., 1991).

No caso dos melanomas, a maioria dos estudos mostra comprometimento preferencial dos cromossomos 1, 6 e 7, embora os



mesmos achados não tenham sido verificados em alguns tipos de nevos que predispõem a esses tumores (Cowan **et al.**, 1988; Trent **et al.**, 1990).

Os carcinomas baso e espinocelulares e as neoplasias benignas e pré-malignas correspondentes apresentam, por sua vez, frequência elevada de alterações clonais simples ou múltiplas não relacionadas (Fitchett **et al.**, 1984; Heim **et al.**, 1988, 1989a, b, c; Mertens **et al.**, 1989a, b, 1991; Scappaticci, 1989a, b; Kawasaki **et al.**, 1991 a, b). Existem sugestões de que essas alterações indicam origem multicelular de tais neoplasias (Heim **et al.**, 1988). Além disso, as observações histológicas de neoplasias cutâneas revelam focos primários múltiplos, o que sugere uma predisposição geral do tecido à malignização e favorece a hipótese de policlonalidade. Levando-se em consideração que a ação da luz solar sobre o tegumento é ampla e, muitas vezes, longa e intensa, não seria surpreendente o aparecimento de tumores múltiplos em diferentes pontos do epitélio (Slaughter **et al.**, 1953).

Uma hipótese alternativa é de que a presença de clones não relacionados reflete condições de cultivo. Entretanto, Heim **et al.** (1989c) analisando a evolução cariotípica de uma linhagem celular de carcinoma espinocelular "in situ" mostraram redução da complexidade genética proporcional ao número de repiques realizados.

Outra observação interessante nesse grupo de tumores é a frequência elevada de rearranjos cromossômicos esporádicos que, à semelhança dos clonais, evidenciam instabilidade cromossômica dos tecidos envolvidos. Tais anomalias podem



sugerir a existência de pequenos clones que, devido ao número de metáfases analisadas, têm seus significados subestimados (Mertens et al., 1990).

A ausência de um denominador citogenético comum aos diferentes tipos histológicos de lesões de pele sugere a participação de inúmeros padrões genéticos na sua tumorigênese. Porém, ao contrário disso, as alterações detectadas também podem ter pouca importância na origem dos carcinomas cutâneos e representar modificações secundárias do parênquima tumoral ou mesmo aberrações pré-neoplásicas dos fibroblastos do estroma ou de células epiteliais adjacentes (Mertens et al., 1990). Sendo assim, parece importante investigar a presença de tais alterações em amostras de tecido cutâneo normal, proveniente de indivíduos jovens e idosos, a fim de verificar sua possível relação com a exposição prolongada a agentes mutagênicos, em especial à UV, avaliando sua importância na carcinogênese.

normal exposta ao sol proveniente de indivíduos jovens e idosos.

2 - Comparar os eventos citogenéticos encontrados nas lesões de porqueratose com os descritos em fibroblastos de pele normal dos pacientes.

3 - Comparar os achados citogenéticos de pele normal exposta e não exposta à luz solar de indivíduos jovens e idosos, entre si e com os dados da literatura.

4 - Fornecer subsídios, se possível, para o prognóstico das lesões incipientes detectadas.



II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material

I.3. OBJETIVOS

Com base nas considerações citadas, fica evidente a importância da pesquisa em células cutâneas de pacientes com lesões que predispõem ao câncer de pele como também daquelas de indivíduos idosos que estiveram ou não sujeitas à ação da irradiação solar.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1 - Investigar a ocorrência de alterações cromossômicas clonais e não clonais em fibroblastos de indivíduos com risco aumentado de desenvolverem câncer de pele, a saber, aqueles obtidos de lesões de poroqueratose e de pele normal exposta ao sol proveniente de indivíduos jovens e idosos.
- 2 - Comparar os eventos citogenéticos encontrados nas lesões de poroqueratose com os descritos em fibroblastos de pele normal dos pacientes.
- 3 - Comparar os achados citogenéticos de pele normal exposta e não exposta à luz solar, de indivíduos jovens e idosos, entre si e com os dados da literatura.
- 4 - Fornecer subsídios, se possível, para o prognóstico das lesões incipientes detectadas.



II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material

Foram analisadas 12 amostras de pele provenientes de lesões de quatro pacientes portadores de poroqueratose e de oito amostras de pele normal. Entre essas últimas, cinco eram provenientes de regiões do corpo expostas à luz solar e três de regiões não expostas à luz solar. As amostras foram enviadas pelo Serviço de Cirurgia Plástica e pelo Ambulatório de Dermatologia do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto. foi lavado em quatro banhos consecutivos.

Os pacientes, nove do sexo feminino e três do sexo masculino, tinham idades variando de 13 a 68 anos, eram caucasóides, de classe social média ou baixa e pertenciam à população rural e urbana da região de São José do Rio Preto.

II.2. Métodos

II.2.3. Cultivo celular

As culturas de células foram desenvolvidas segundo técnica descrita por Bird & Forrester (1981) e Freshney (1987) com modificações, descrita a seguir. Os meios de cultura e demais soluções utilizadas estão relacionados no Apêndice.

II.2.1. Colheita das amostras

As amostras, cerca de 0,5 a 1,0 cm³ de tecido, foram colhidas assepticamente após anestesia local e incisão com



bisturi e transferidas para um recipiente estéril contendo solução salina de Hanks e antibióticos. O material foi encaminhado ao laboratório acompanhado de uma ficha informativa sobre o paciente e foi mantido à temperatura ambiente ou a 5°C por um período de até 24 horas, a fim de assegurar a viabilidade das células.

II.2.2. Processamento inicial do tecido

Todas as amostras foram manipuladas em câmara de fluxo laminar vertical ou horizontal, previamente limpa com solução germicida e álcool 70%. O material foi lavado em quatro banhos consecutivos de solução de Hanks com antibióticos e fungicida. Em seguida, foi transferido para uma placa de Petri plástica contendo pequena quantidade de meio de cultura incompleto onde foi dissociado mecanicamente em fragmentos de 1 a 2 mm³, com auxílio de tesoura e pinça.

II.2.3. Cultivo celular

Algumas amostras foram submetidas à desagregação enzimática. Assim sendo, os fragmentos foram transferidos para um frasco estéril descartável (Descarplast) com 0,5 ml de colagenase (concentração final de 2000 U/ml) e 4,5 ml de meio completo e incubados a 37°C por 24 a 72 horas. Após esse período, a suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm e lavada em meio de cultura. O sedimento foi distribuído em dois



frascos plásticos com 4 ml de meio de cultura completo e reincubado por 24 horas. Em seguida, o meio foi substituído para eliminação do material necrótico.

Os fragmentos das amostras que não sofreram desagregação enzimática foram colocados diretamente em dois frascos estéreis descartáveis sobre um filme de soro fetal bovino. Com os frascos invertidos, foram adicionados 2 ml de meio completo de tal forma a não permitir que a solução entrasse em contato com os fragmentos e, assim, facilitar a sua fixação ao substrato. Após incubação a 37°C por 24 horas, os frascos voltaram à posição original, ficando então o material banhado pelo meio de cultura.

O acompanhamento diário do crescimento celular e da atividade mitótica, após a semeadura, foi feito em microscópio invertido e o meio foi substituído a cada dois ou três dias. Por ocasião da confluência celular, o meio foi completamente removido e o fundo do frasco lavado duas vezes com solução salina de Hanks, para retirada do excesso de soro que poderia prejudicar o processo subsequente. Em seguida, foram adicionados 1,5 ml de solução de tripsina/EDTA pré-aquecida, por dois a quatro minutos, para que as células se soltassem do substrato. Após a remoção da solução enzimática, 3 ml de meio completo foram adicionados e os frascos foram submetidos a intensa agitação, que causou descolamento e desagregação da camada celular.

Quando o número de focos de confluência celular era baixo, a suspensão celular obtida permaneceu no mesmo frasco. Entretanto, quando a densidade celular era muito alta, a



suspensão foi dividida em duas ou mais réplicas, posteriormente reincubadas a 37°C.

II.2.4. Bloqueio, hipotonização, fixação e coloração do material

No momento em que as culturas mostraram número satisfatório de células em divisão, a divisão celular foi interrompida com a adição de colcemide por duas a quatro e dezesseis horas (concentração final 2 ug/ml e 1 ug/ml, respectivamente). Após esse intervalo, o meio foi substituído por 8 ml de solução hipotônica pré-aquecida de citrato de sódio 1% e os frascos foram reincubados por 30 minutos. A suspensão celular foi centrifugada por 8 minutos a 1000 rpm e fixada com solução de metanol : ácido acético (3:1). O material foi gotejado em lâminas úmidas e geladas, que foram flambadas e mantidas a 90°C por 20 minutos e submetidas à técnica de bandamento G, segundo Selden **et al.** (1975) e Grouchi & Turleau (1977).

II.2.5. Análise cromossômica

A análise cromossômica foi realizada em microscópio marca Carl Zeiss JENA, modelos JENAVAL e JENAMED 2 e os eventos citogenéticos fotografados em microscópio Carl Zeiss OBERKÖCHEN, standard WL com equipamento fotográfico MC 63A, com filme ILFORD, 32 ASA. Os negativos foram revelados com revelador Kodak D-72, em diluição 1:1 por 2,5 minutos à temperatura de 20°C, e as cópias



foram feitas em papel Kodabromide F3 e Kodabrome Print RC F3.

Foi estudado o maior número possível de células de cada uma das réplicas cultivadas. A análise das metáfases foi considerada total quando permitiu a identificação de todos os seus cromossomos e parcial quando pelo menos sete pares cromossômicos puderam ser identificados. A investigação em coloração usual foi realizada em metáfases cujos cromossomos, após o tratamento com tripsina, não apresentaram banda.

A identificação e a classificação dos eventos citogenéticos foram feitas de acordo com a Conferência de Paris (Paris Conference, 1972; 1975) e com o ISCN (1978, 1985 e 1991). Foi considerada clonal a alteração estrutural ou hiperdiploidia observada em duas ou mais células de réplicas diferentes da mesma cultura (ISCN, 1991; Mertens et al., 1992). Em relação às hipodiploidias, a clonalidade só foi considerada quando a anomalia esteve presente em três células de duas ou mais réplicas da cultura. A frequência dos eventos do tipo poliploidia, endorreduplicação e separação de cromátides foi calculada com relação ao número de metáfases obtidas, enquanto as frequências de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, com exceção das anteriormente citadas, foram calculadas com base no número de metáfases analisadas.

Entre os 12 pacientes cujas amostras exibiram metáfases passíveis de análise, apenas um era fumante (926), um era diabético (940), um era hipertenso (931), um ingeria Tegreto e Talidomida (926) e um ingeria Puran T4 (944). Todos



III. RESULTADOS

Foram cultivadas amostras de pele de 61 indivíduos, 24 do sexo masculino e 37 do sexo feminino, com idades variando de 13 a 88 anos. Quarenta e três foram provenientes de regiões do corpo expostas à luz solar, 12 foram provenientes de regiões do corpo não expostas à luz solar e seis de lesões de poroqueratose. Os fragmentos de pele não exposta ao sol normalmente provieram das regiões axilar, clavicular, abdominal, da mama e da planta do pé; enquanto aquelas de regiões expostas ao sol provieram da pálpebra, lábio e outros segmentos faciais, pescoço, braço e dorso da mão. Ambos os tipos foram obtidos em cirurgias reparativas ou de outra natureza.

Do total, apenas 12 culturas (19,7%) tiveram sucesso uma vez que, entre as restantes, algumas sofreram contaminação bacteriana (19/61), por fungos (6/61) ou ambas (3/61), outras mostraram número insuficiente de metáfases para análise (10/61), ausência de crescimento (5/61), falta de adesão ao substrato (4/61) ou evidências de senescência e morte celular (2/61). Todas elas foram processadas segundo a técnica de explante, não sofreram desagregação enzimática e, em geral, levaram de sete a 27 dias para exibirem sinais de crescimento. A Tabela 1 contém os dados relativos ao material da biópsia, idade e sexo dos pacientes e às causas do insucesso de 49 culturas.

Entre os 12 pacientes cujas amostras exibiram metáfases passíveis de análise, apenas um era fumante (926), um era diabético (940), um era hipertenso (931), um ingeria Tegretol e Talidomida (926) e um ingeria Puran T4 (844). Todos

Tabela 1. Dados relativos ao material da biópsia, idade e sexo dos pacientes e causas do insucesso de 49 culturas.

Caso	Material	Idade	Sexo	Sem adesão ao frasco	Com adesão e contaminação			Com adesão sem contaminação		
					B	F	B/F	AC	MC	AM
714	PN	66	M					X		
715-1	PE	53	F					X		
717	PE	67	F					X		
718	PE	67	M							X
719-1	PE	77	M					X		
724-2	PE	64	M			X				
725	PE	58	F			X				
726-1	PE	59	M			X				
727	PE	87	F				X			
733-1	PE	64	M							X
734-1	PE	73	M							X
735-1	PE	62	M					X		
736	PE	55	M			X				
738-1	PE	48	F							X
740	PE	86	F			X				
741	PE	42	F		X					
744-1	PE	88	F			X				
846	PE	41	F	X						
853	PE	53	F	X						
854	PN	53	F	X						
862	PE	55	F						X	
863	PN	55	F						X	
886	PE	29	F							X
893	PE	49	F		X					
894	PE	64	M		X					
895	PN	57	F		X					
900	PN	66	M		X					
907	PE	76	F		X					
909	PE	41	M		X					
911	PN	43	F		X					
913	PE	13	M		X					
914	PO	13	M		X					
915	PN	46	F		X					
916	PO	46	F		X					
917	PE	46	F		X					
923	PE	60	M							X
927	PE	56	M							X
933	PN	57	F							X
936	PE	79	F				X			
944	PE	26	M							X
947	PE	26	M		X					
948	PE	57	M		X					
949	PE	27	F		X					
951	PE	47	F							X
952	PE	39	F		X					
956	PE	32	F				X			
958	PE	61	F		X					
966	PE	64	M	X						
987	PN	43	M		X					
49				4	19	6	3	5	2	10

PO => lesão de poroqueratose; P => pele; E => exposta à luz solar;
N => não exposta à luz solar; B => bacteriana; F => fúngica; B/F =>
bacteriana e fúngica; AC => ausência de crescimento; MC=> morte
celular e AM => ausência de metáfases em condições de análise.

os demais não referiram que faziam uso de qualquer droga. Cinco casos (926, 930, 931, 937 e 940) foram submetidos à exérese de algum tipo de lesão de pele, tendo um deles (926) recebido cobaltoterapia antes da retirada do material cutâneo. Três pacientes (844, 926 e 967) fizeram referência a outro tipo de neoplasia que não cutânea e dois (926 e 931) possuíam história de câncer familiar. Todos os indivíduos estudados, nove mulheres e três homens, eram caucasóides e com idades variando de 13 a 68 anos.

Quatro amostras analisadas eram de lesões de poroqueratose (946, 955, 957 e 964) e as demais eram peles normais provenientes de regiões do corpo expostas à luz solar (926, 930, 937, 940 e 963) ou não (844, 931 e 967). O período de cultivo das réplicas obtidas variou de 22 a 40 dias e o de bloqueio da divisão celular com solução de colcemide de duas a 16 horas. A Tabela 2 mostra os dados relativos às 12 amostras, idade e sexo dos pacientes, período de cultivo e de bloqueio da divisão celular.

De modo geral, o número de metáfases obtido foi pequeno, exceto no caso 930, ou os cromossomos apresentaram morfologia pobre dificultando a análise citogenética. Muitas vezes, a técnica de bandamento G não mostrou resultado satisfatório e os cromossomos foram estudados em coloração usual ou só foi realizada análise parcial com identificação de sete ou mais pares cromossômicos.

Para melhor compreensão dos resultados, os casos foram reunidos em três grupos principais: amostras provenientes de



lesões de poroqueratose e amostras de pele normal provenientes de regiões expostas ou não à luz solar. Esses dois últimos

grupos foram subdivididos em amostras de indivíduos com idade

Tabela 2. Dados relativos ao material da biópsia, idade e sexo dos pacientes, período de cultivo (dias) e de bloqueio da divisão celular (horas) e número de réplicas obtidas nos casos com metáfases passíveis de análise.

Caso	Material	Idade	Sexo	Período de cultivo (dias)	Período de bloqueio (horas)	Número de réplicas obtidas
844	PN	42	F	33	2	3
926	PE	46	M	27 - 36	16	3
930	PE	49	M	37	16	4
931	PN	54	F	30 - 39	2 - 16	5
937	PE	47	F	23	16	4
940	PE	68	F	30	2	4
946	PO	13	M	22	2	2
955	PO	32	F	37	4	4
957	PO	61	F	37	4	4
963	PE	36	F	35	16	2
964	PO	36	F	40	2	2
967	PN	18	F	36	2	2

PO => lesão de poroqueratose; P => pele; E => exposta à luz solar; com a adição de colcemide por duas horas.
N => não exposta à luz solar.

Nas 177 metáfases obtidas, a análise total só foi possível em uma célula e cinco permitiram a análise parcial após bandamento G, duas delas com cariótipo 45,XY,-17 e 46,XY,del(17)(q). Foi encontrada uma única célula com



lesões de poroqueratose e amostras de pele normal provenientes de regiões expostas ou não à luz solar. Esses dois últimos grupos foram subdivididos em amostras de indivíduos com idade superior ou inferior a 40 anos. As características clínicas e citogenéticas de cada caso serão descritas a seguir, essas últimas resumidas nas Tabelas 3 e 4. obtidas (MO) e analisadas (MA) nos casos de poroqueratose.

III. Amostras de lesões de poroqueratose

CASO	ABERRAÇÃO CROMOSSOMICA	MO	MA
------	------------------------	----	----

CASO 946

946	46,XY,del(17)(q) [1]	177	5
-----	----------------------	-----	---

Um garoto de 13 anos de idade, estudante e não fumante, apresentava desde os sete meses de vida manchas assintomáticas na face, com crescimento lento e progressivo, características da poroqueratose tipo placa ou de Mibelli (Figura 1). Referiu que uma tia materna (caso 964 e 963) apresentava o mesmo quadro clínico e diagnóstico.

964	45,XY,-C,-F [2]		
	Poliploidia [3]		

Foi iniciada a cultura de uma pequena amostra dessas lesões em duas réplicas. Uma delas (B) não apresentou crescimento celular e foi descartada e a outra (A) começou a proliferar após dez dias de cultivo. O conteúdo celular foi subdividido em duas novas réplicas (A1 e A2) que, passados 22 dias de cultivo, tiveram suas atividades mitóticas interrompidas com a adição de colcemide por duas horas.

Nas 177 metáfases obtidas, a análise total só foi possível em uma célula e cinco permitiram a análise parcial após bandamento G, duas delas com cariótipo 45,XY,-17 e 46,XY,del(17)(q). Foi encontrada uma única célula com



Tabela 4. Aberrações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nos casos de pele exposta e não exposta à luz solar.

CASO	ABERRAÇÕES CROMOSSOMICAS	MO	MA
PELE EXPOSTA			
Pacientes com idade superior a 40 anos			
925	46,XY,+E,-G [1]	85	12
	47,XY,+mar [1]		
	Poliploidia [1]		

Tabela 3. Aberrações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nos casos de poroqueratose.

CASO	ABERRAÇÃO CROMOSSOMICA	MO	MA
946	46,XY,del(17)(q) [1] 45,XY,-17 [1] Poliploidia [77] Endorreduplicação [1]	177	6
955	Poliploidia [4]	91	18
957	47,XX,+C [8] 46,XX,+C,-F [1] 45,XX,-C [1] 45,XX,-C,+E [2] 46,XX,-G,+mar [2] Poliploidia [3]	454	66
964	Poliploidia [20] Separação de cromátides [3]	108	5
931	46,X,del(X)(q13) [11] 45,X,19q- [1] 44,XX,-C [1] 44,XX,-C,-D [1] 46,XX,-D,-G,+mar,+mar [1] Poliploidia [5] Separação de cromátides [29]	134	57
967	Poliploidia [2]	138	14

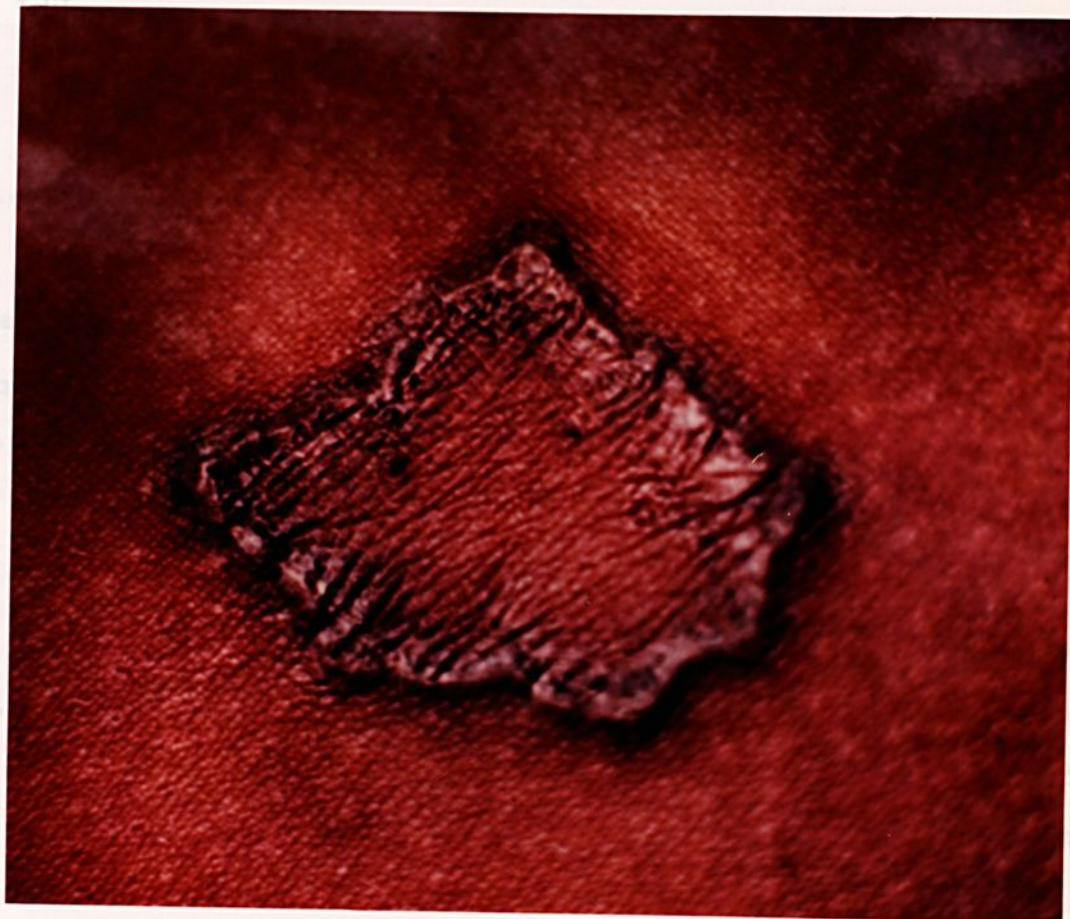


Tabela 4. Aberrações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nos casos de pele exposta e não exposta à luz solar.

CASO	ABERRAÇÕES CROMOSSOMICAS	MO	MA
PELE EXPOSTA			
Pacientes com idade superior a 40 anos			
926	46,XY,+E,-G [1] 47,XY,+mar [1] Poliploidia [1] Separação de cromátides [3]	86	12
930	91,XX,YY,-8,dic(19) [1] 46,XY,t(13;21)(q14;q12) [3] 46,XY,18p+ [38] 47,XY,+12p- [1] 46,XY,del(11)(q) [1] 45,XY,-12,17p- [1] 45,XY,-C [1] 45,XY,-E [1] 44,XY,-C,-19 [1] 44,XY,-C,-G [1] 43,-A,-C,-C [1] 40,X,-4,-13,-14,-15,-20,-Y [1] Poliploidia [29] Endorreduplicação [7] Separação de cromátides [2]	752	168
937	46,XX,t(3;9)(q29;q11) [2] 45,XX,-B [1] 45,XX,-C [1] 46,XX,-B,+7E [1] Poliploidia [9]	105	27
940	Separação de cromátides [17]	101	20
Pacientes com idade inferior a 40 anos			
963	Poliploidia [1] Endorreduplicação [2] Separação de cromátides [2]	121	7
PELE NÃO EXPOSTA			
Pacientes com idade superior a 40 anos			
844	45,XX,-16 [1] 45,XX,-18 [1] 46,XX,-C,+E [2] 45,XX,-B [2] 45,XX,-C [1] 45,XX,-E [1] 44,XX,-C,-C [1] 43,XX,-C,-C,-G [1] 43,XX,-C,-E,-G [1] 41,XX,-C,-C,-C,-D,-D,+F,-G [1] Poliploidia [4] Endorreduplicação [1]	76	48
931	46,X,del(X(q13)) [11] 45,X,19q+ [1] 44,XX,-C [1] 44,XX,-C,-D [1] 46,XX,-D,-G,+mar,+mar [1] Poliploidia [5] Separação de cromátides [29]	134	57
Paciente com idade inferior a 40 anos			
967	Poliploidia [2]	138	14

endocriologia e 77 (43,5%) das 177 encontradas eram poliploides.

CASO 855



interrompido por colóide durante quatro horas.

As células, depois de hiperfixadas e fixadas, foram submetidas à técnica de bandagem B e das 91 células encontradas, apenas cinco permitiram análise total e 13 análises parciais, com cariótipos aparentemente normais. Foi verificada a presença de quatro células poliploides.

Figura 1. Fotografia de uma lesão característica de

encontradas, apenas cinco permitiram análise total e 13 análises parciais, com cariótipos aparentemente normais. Foi verificada a presença de quatro células poliploides.

CASO 957

endorreduplicação e 77 (43,5%) das 177 encontradas eram poliplóides.

CASO 955

A paciente, de 32 anos de idade, descendente de italianos, doméstica e não fumante, relatou o aparecimento, três anos antes, de manchas acastanhadas nos membros inferiores e posteriormente na face, que foram diagnosticadas como poroqueratose actínica superficial disseminada. A paciente referiu ainda que não fazia uso de drogas tóxicas.

Uma pequena amostra de uma das lesões foi colocada em cultivo em duas réplicas iniciais, que começaram a proliferar após dez dias aproximadamente e sofreram repiques. Passados 34 dias, foi realizada nova subdivisão do conteúdo celular originando oito réplicas (A11, A12, A21, A22, B11, B12, B21 e B22), quatro delas posteriormente contaminadas por fungos (A21, A22, B21 e B22) e as quatro restantes com crescimento interrompido por colcemide durante quatro horas.

As células, depois de hipotonizadas e fixadas, foram submetidas à técnica de bandamento G e das 91 metáfases encontradas, apenas cinco permitiram análise total e 13 análise parcial, com cariótipos aparentemente normais. Foi verificada a presença de quatro células poliplóides.



A paciente, de 61 anos de idade, descendente de italianos, não fumante e não usuária de drogas tóxicas, relatou que aos 54 anos observou o aparecimento de manchas acastanhadas nas pernas e posteriormente nos braços e na face, e que tinha uma filha também portadora de tais lesões. O exame histopatológico revelou tratar-se de poroqueratose actínica superficial disseminada.

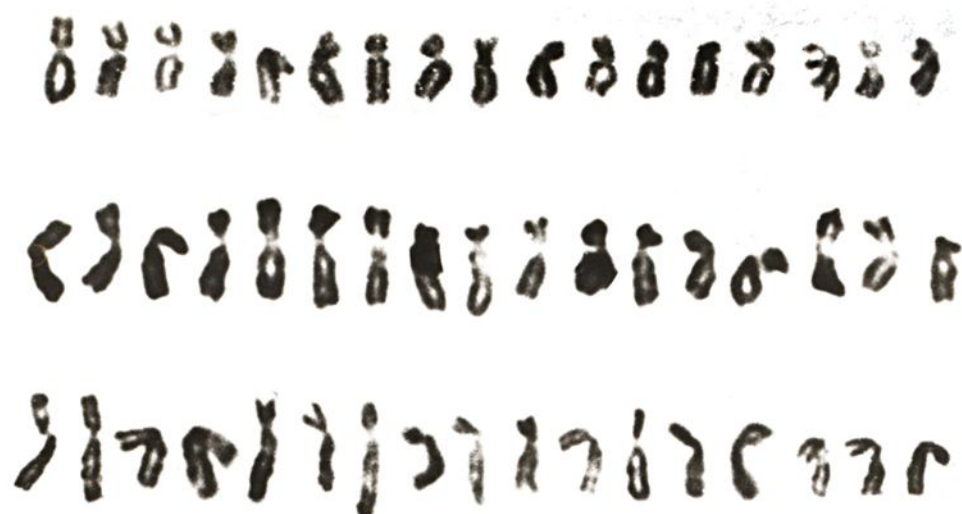
Fragmentos provenientes dessas lesões foram cultivados em duas réplicas iniciais, que mostraram sinais de crescimento dez dias após o início da cultura. Ambas sofreram repiques e suas réplicas foram também subdivididas, de tal forma que aquelas originadas do frasco A (A11, A12, A21 e A22) foram colhidas 37 dias após o início da cultura com colcemide por quatro horas e as derivadas do frasco B inicial (B11, B12, B21 e B22) apresentaram contaminação por fungos e bactérias e foram descartadas.

Foram encontradas 454 metáfases das quais uma única foi analisada parcialmente após bandamento G e 65 foram estudadas em coloração usual. Três delas eram poliplóides e seis mostraram perdas cromossômicas aparentemente casuais, duas delas tinham cariótipo $46,-C,+E$, uma era $46,+C,-F$ e duas outras mostravam a presença de um cromossomo marcador associada à monossomia G. Além dessas, oito metáfases de réplicas diferentes revelaram um cromossomo C extra (Figura 2).



Na análise de 30 linfócitos do sangue periférico dessa paciente não foi detectada qualquer trissomia.

CASO 964



grupo C

Figura 2. Cariogramas parciais do caso 957 mostrando os cromossomos do grupo C.

III.2. Amostras de pele normal proveniente de regiões do corpo expostas à luz solar

III.2.1. Indivíduos com idade superior a 40 anos

Na análise de 50 linfócitos do sangue periférico dessa paciente não foi detectada qualquer trissomia.

CASO 964

A paciente, de 36 anos, não fumante e doméstica, não fazia uso de drogas tóxicas e apresentou manchas acastanhadas no pescoço, braço e tórax diagnosticadas como lesões de poroqueratose de Mibelli. Relatou, durante a anamnese, o acometimento de um sobrinho (caso 946) pelo mesmo tipo de lesão. A cultura da primeira delas foi iniciada em dois frascos, todavia um deles (A) mostrou contaminação por fungos aproximadamente 30 dias depois dos fragmentos terem sido explantados, enquanto o outro (B) foi submetido à subdivisão do conteúdo celular e as réplicas (B1 e B2) tiveram sua proliferação interrompida com colcemide por duas horas, 40 dias após o início da cultura.

O material foi submetido a bandamento G e foram encontradas 108 metáfases das quais cinco permitiram análise parcial apresentando cariótipo normal, 20 (18%) eram poliplóides e três mostraram separação de cromátides.

III.2. Amostras de pele normal proveniente de regiões do corpo expostas à luz solar

III.2.1. Indivíduos com idade superior a 40 anos



Em 1987, foram diagnosticadas no paciente, fumante moderado (de seis a oito cigarros por dia) e então com 42 anos de idade, lesões ulcerativas nas mucosas bucal e peniana diagnosticadas como histiocitose X, uma enfermidade maligna de pele. Passou então a fazer uso de Talidomida, cujo efeito imunomodulador tem grande eficiência em tratamento de úlceras orais e genitais, e de Tegretol como analgésico. Inicialmente, o paciente respondeu bem ao tratamento mas, quatro anos mais tarde, houve recidiva e exibiu, através de radiografias, a presença de metástases ósseas nas tíbias, tendo que ser submetido a tratamento radioterápico por um período de 37 dias. Relatou durante a anamnese história familiar de câncer.

No ano seguinte, desenvolveu um carcinoma basocelular na região frontal, que foi retirado juntamente com uma amostra de pele próxima à lesão. A cultura dessa amostra de pele foi iniciada em duas réplicas e, 23 dias depois, uma delas (A) foi subdividida em duas (A1 e A2) que foram mantidas por mais quatro dias em cultivo e, em seguida, tratadas com colcemide por 16 horas. A outra réplica (B) teve seu crescimento interrompido 36 dias após o início da cultura.

Foram encontradas 86 metáfases, das quais três permitiram análise total e nove a análise parcial após bandamento G. Uma célula era poliplóide e três mostraram divisão centromérica e consequente separação de cromátides. Em uma única metáfase foi constatado o cariótipo 47,XY,+mar (Figura 3a) e em



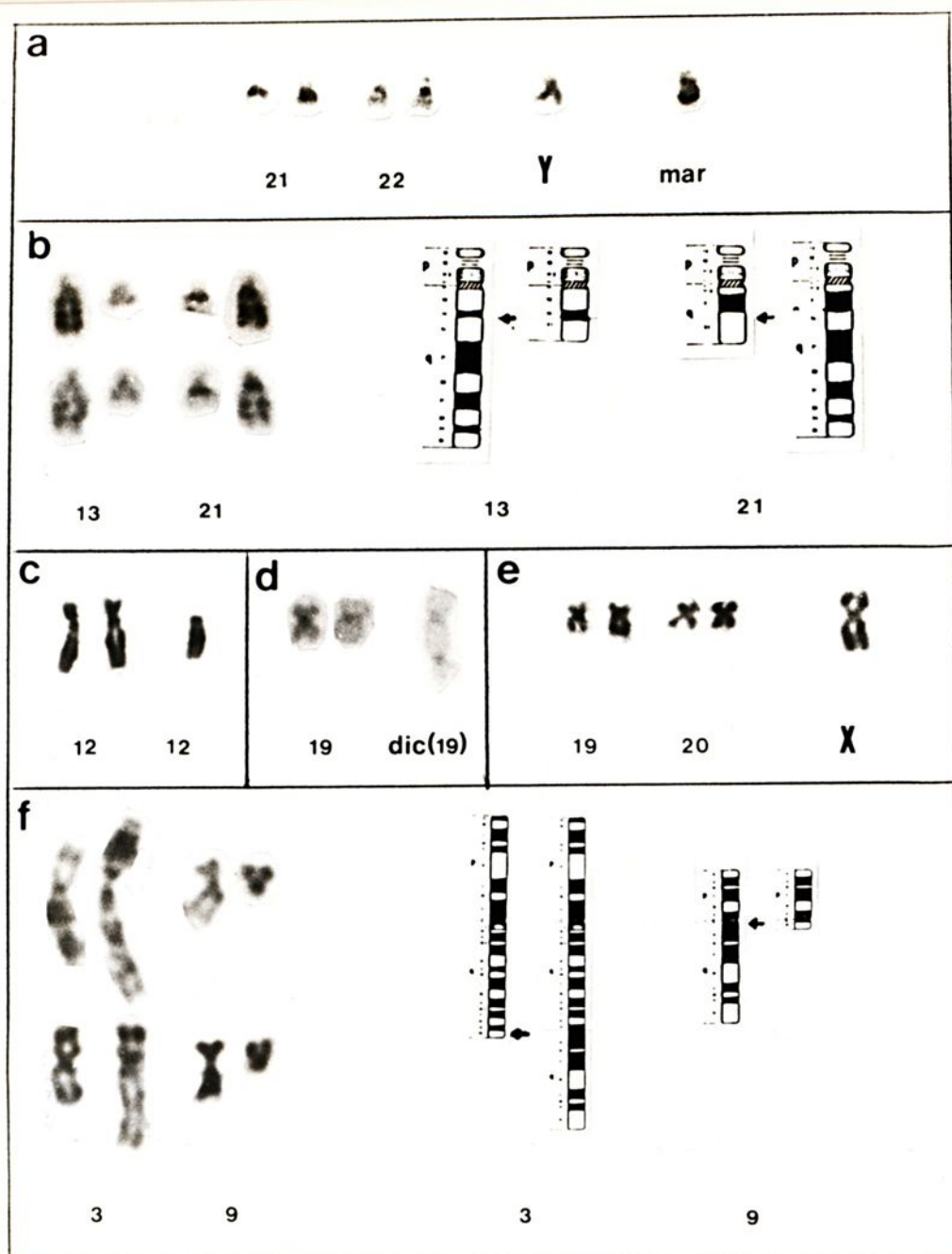


Figura 3. Cariogramas parciais mostrando alterações cariotípicas esporádicas em amostras de pele normal: (a) +mar do caso 926; (b) $t(3;21)(q14;q22)$ com representação esquemática; (c) $+12p^-$ e (d) $dic(19)$ do caso 930; (e) monossomia X e $19q^+$ do caso 931 e (f) $t(3;9)(q29;q11)$ com representação esquemática do caso 937. As setas indicam os pontos de quebra.

outra 46,XY,+E,-G, sendo as demais células aparentemente normais.

CASO 930

O paciente, de 49 anos de idade e descendência italiana, vendedor e não fumante, foi atendido pelo Ambulatório de Dermatologia para a retirada de um carcinoma basocelular da região cervical. Não havia tido qualquer outro tipo de lesão anteriormente e não relatou uso tópico de drogas ou história de câncer em membros da família.

Juntamente com a exérese da lesão do carcinoma, foi realizada a retirada de uma amostra de pele normal próxima à lesão, que foi colocada em cultura em duas réplicas iniciais. Uma delas (A) apresentou crescimento 21 dias após os fragmentos terem sido explantados, enquanto a outra (B) mostrou divisão celular 47 dias depois de ter sido iniciada. Ambas foram, então, subdivididas em dois frascos (A1 e A2; B1 e B2) e, as primeiras, novamente subdivididas. As quatro réplicas (A11, A12, A21 e A22) tiveram seu cultivo interrompido com a adição de colcemide por 16 horas, 37 dias após o início da cultura, e as réplicas B1 e B2 mostraram contaminação por fungos, aproximadamente dois meses depois da sementeira.

Nas 752 metáfases obtidas, a análise total só foi possível em 34, outras 34 tiveram análise parcial e 90 permitiram apenas o estudo em coloração usual. Foi verificada a presença de 29 células poliplóides (Figura 4), uma delas com um cromossomo 19 dicêntrico (Figura 3d), sete com endorreduplicação





Figura 4. Fotomicrografia parcial de uma metáfase poliplóide do caso 930.

(Figura 5) e duas com separação de cromátides. Também foram detectadas seis metáfases com perdas cromossômicas casuais, três outras com cariótipos 45,XY,-12,17p⁻, 46,XY,11q⁻ e 47,XY,+12p⁻ (Figura 3c). Além dessas, 38 células de diferentes réplicas eram portadoras de um cromossomo 18 com o braço curto aumentado (18p⁺) (Figura 6a) nas quatro réplicas estudadas e três mostraram a translocação t(13;21)(q14;q22) (Figura 3b). Não foi verificada qualquer alteração em 50 linfócitos do sangue periférico do paciente.

CASO 937

A paciente, de 47 anos de idade, doméstica, não fumante e que não usava drogas tóxicas, foi encaminhada para o Ambulatório de Dermatologia para exérese de um nevo na face. Na ocasião, não relatou história pessoal de câncer nem tampouco na família, e foi submetida à retirada de um fragmento de pele do dorso de sua mão direita.

Essa amostra de tecido cutâneo foi colocada em cultura em duas réplicas iniciais (A e B), que após 20 dias da semeadura foram subdivididas em novas réplicas (A1, A2, B1 e B2). Ao completarem 23 dias em cultivo, todas as réplicas tiveram seu crescimento bloqueado com a adição de colcemide por 16 horas.

Após a utilização da técnica de bandamento G, foram encontradas 105 metáfases das quais duas permitiram análise total, oito análise parcial e 17 em coloração usual, duas com cariótipo 46,XX,t(3;9)(q29;q11) (Figura 3f), uma 46,XX,-B,+?E e





Figura 5. Fotomicrografia parcial de uma metáfase com endorreduplicação do caso 930.

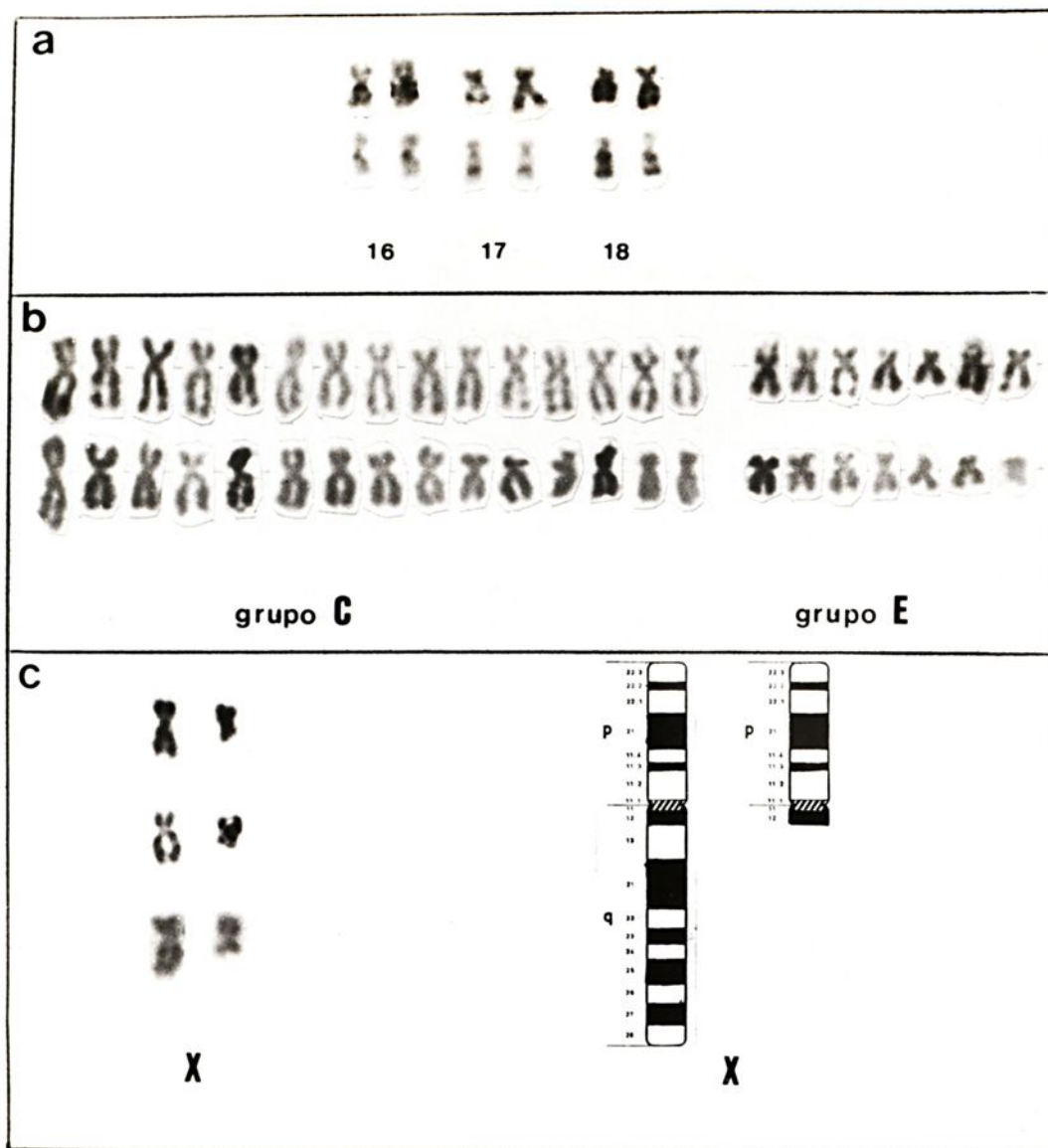


Figura 6. Cariogramas parciais mostrando as aberrações cromossômicas clonais: (a) 18p⁺ do caso 930, (b) monossomia C e trissomia E do caso 844 e (c) del (X)(q13) do caso 931.

duas outras com perdas cromossômicas casuais. Nove metáfases entre aquelas obtidas eram poliplóides.

CASO 963

CASO 940

Foi extraída do braço esquerdo da paciente (já descrita). A paciente, de 68 anos de idade, descendente de espanhóis, não fumante e doméstica, desenvolveu diabetes após os 40 anos de idade e era portadora de gastrite crônica leve. Procurou o Ambulatório de Dermatologia com queixa de uma lesão acastanhada na face, que produzia sensação de queimação sem sangramento, diagnosticada como carcinoma basocelular. Não apresentava história de lesões similares nem de ocorrência de câncer familiar. Foi submetido à técnica de bandamento B e

um total. Um pequeno fragmento de pele normal da face foi obtido dessa paciente e foi imediatamente colocado em cultura, em duas réplicas iniciais. Ambos os frascos mostraram crescimento celular de 15 a 18 dias após a semeadura e foram submetidos à subdivisão do material. As réplicas tiveram atividade mitótica interrompida após aproximadamente 30 dias de cultivo, com a adição de colcemide por duas horas. Foram encontradas 101 metáfases, uma delas analisada totalmente, duas parcialmente e 17 em coloração usual, todas com cariótipo aparentemente normal. Dezessete dessas células mostraram separação de cromátides.



III.2.2. Indivíduos com idade inferior a 40 anos

CASO 963

A paciente, de 42 anos, merendeira, não fumante e de portugueses, foi submetida, quatro anos da consulta a uma cirurgia para retirada de um carcinoma papilar. Foi extraída do braço esquerdo da paciente (já descrita no caso 964) uma pequena amostra de pele normal, cuja cultura foi iniciada em dois frascos, um dos quais não mostrou crescimento celular e foi descartado. O outro, porém, apresentou sinais de proliferação depois de 15 dias de cultivo, sendo subdividido em duas réplicas (B1 e B2) que tiveram a divisão celular interrompida com colcemide por 16 horas, 35 dias após a semeadura. O material foi submetido à técnica de bandamento G e um total de 121 metáfases foi obtido, das quais apenas sete permitiram análise parcial e mostraram cariótipo aparentemente normal. Uma única célula era poliplóide, duas outras evidenciaram endoreduplicação e duas exibiram separação de cromátides.

III.3. Amostras de pele normal proveniente de regiões do corpo não expostas à luz solar

III.3.1. Indivíduos com idade superior a 40 anos



CASO 844

CASO 931

A paciente, de 42 anos, merendeira, não fumante e descendente de portugueses, foi submetida, quatro anos da consulta a uma cirurgia para retirada de um carcinoma papilífero de tireóide e, em decorrência disso, fazia uso da droga Puran T4. Passado esse episódio e em virtude do aumento do volume das mamas, foi encaminhada ao Serviço de Cirurgia Plástica e submetida a intervenção cirúrgica para biópsia de nódulos, que foram diagnosticados como doença fibrocística da mama. Na ocasião, foi realizada a exérese de uma amostra de pele desse local e a cultura foi iniciada em dois frascos, que mostraram proliferação celular 18 dias após a semeadura. Uma das réplicas (A) sofreu três subdivisões enquanto a outra (B) apenas duas. Todas as réplicas derivadas das iniciais sofreram interrupção de suas atividades mitóticas com colcemide por duas horas, após aproximadamente 33 dias de cultivo, porém apenas três continham células em condições de análise (A111, A112 e B11). Cinco eram poliplóides e 29 apresentaram separação de

Nas três réplicas foram encontradas 76 metáfases, das quais quatro eram poliplóides e uma mostrou endoreduplicação. Quarenta e oito metáfases puderam ser estudadas em coloração usual, 12 delas mostraram perdas cromossômicas casuais, uma com trissomia F, e duas metáfases de réplicas diferentes apresentaram cariótipo 46,-C,+E (Figura 6b).



CASO 931

CASO 967

A paciente, com 54 anos, costureira, não fumante e hipertensa, já havia sido submetida à exérese de cistos benignos de mama e tinha história familiar de câncer. Durante a biópsia de um nevo intradérmico pigmentado na região clavicular, sofreu a retirada de uma pequena amostra de pele normal próxima à lesão.

Esse fragmento de tecido cutâneo foi cultivado em dois frascos, que mostraram sinais de crescimento após 20 dias de cultivo. O frasco B sofreu bloqueio da divisão com colcemide por 16 horas, 30 dias depois dos fragmentos serem explantados, enquanto o frasco A foi subdividido em quatro réplicas (A11, A12, A21 e A22), que foram bloqueadas com colcemide por três horas após 39 dias de cultivo.

Foram obtidas 134 metáfases, 13 analisadas parcialmente, cinco totalmente e 39 foram estudadas em coloração usual. Cinco eram poliplóides e 29 apresentaram separação de cromátides (Figura 7). Em uma das réplicas, foi detectada uma célula com cariótipo $45,X,19q^+$ (Figura 3e) e em doze metáfases de duas réplicas diferentes foi verificada uma deficiência no braço longo do cromossomo X ($delX(q13)$) (Figura 6c). Na análise de 50 linfócitos do sangue periférico dessa paciente não foi observada qualquer alteração.



III.3.2. Indivíduos com idade inferior a 40 anos

CASO 967

Foi cultivada uma amostra de pele retirada de uma paciente com 18 anos de idade, estudante, não fumante e que não fazia uso de drogas tóxicas, durante cirurgia para exérese de cistos benignos da glândula mamária. Aproximadamente 11 dias após ter sido iniciada, a cultura mostrou sinais de crescimento, porém um dos frascos (B) apresentou contaminação por bactérias. O outro frasco (A) foi subdividido em duas réplicas (A1 e A2), que foram bloqueadas com colcemide por duas horas, após 36 dias do início do cultivo.

Das 138 metáfases obtidas, dez foram analisadas parcialmente, apenas uma totalmente e três foram estudadas em coloração usual mostrando cariótipo aparentemente normal. Duas delas eram poliplóides.

Figura 7. Fotomicrografia de uma metáfase do caso 931 mostrando separação de cromátides.





Figura 7. Fotomicrografia de uma metáfase do caso 931 mostrando separação de cromátides.

IV. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram cultivadas 37 amostras de pele provenientes de indivíduos do sexo feminino e 24 do sexo masculino. Apesar do número total de casos ser relativamente pequeno, houve uma breve predominância não intencional do primeiro grupo sobre o segundo. Esse resultado, muito provavelmente, foi decorrente do fato de terem sido estudados espécimes de regiões do corpo não expostas à luz solar, muitos dos quais foram obtidos em cirurgias plásticas de mama.

As idades dos pacientes, embora muito variáveis, estavam concentradas numa faixa superior aos 40 anos ($\bar{X} = 51,4$) porque era objetivo do trabalho estudar aqueles com maior probabilidade de apresentar características de senescência e risco de câncer. Indivíduos com idades inferiores também fizeram parte da amostra para comparação com o primeiro grupo e porque alguns eram portadores de poroqueratose, uma condição que predispõe à neoplasia. Não foi possível a obtenção de equivalência entre o número de casos com idade superior e inferior a 40 anos em virtude das dificuldades, discutidas a seguir, no processamento e manipulação das amostras e, também, devido ao fato do encaminhamento dos espécimes não depender de uma escolha rigorosamente direcionada.

Com o objetivo de diminuir as variáveis que pudessem influenciar os resultados, foi tentado o cultivo de amostras de pele exposta e não exposta do mesmo paciente, o que mostrou-se quase sempre não viável em consequência dos problemas enfrentados durante a sua cultura, como a contaminação, o baixo



índice mitótico ou a morfologia pobre dos cromossomos obtidos.

A contaminação pode ser explicada, em parte, pelo fato da pele constituir o revestimento externo do organismo e ser colonizada por um grande número de microrganismos encontrados na natureza. Eles incluem bactérias, fungos e leveduras e podem ser agrupados em duas categorias: os residentes e os transitórios. Os primeiros são aqueles que crescem na pele e são estáveis em número e composição enquanto os outros têm presença transitória na superfície do tegumento (Roth & James, 1988).

Embora tenha sido realizada a assepsia no local da biópsia e os fragmentos de tecido tenham sido lavados em solução contendo antibióticos e fungicida antes de serem manipulados, o número de contaminação por bactérias (31%), por fungos (10%) ou por ambos os agentes (5%) foi grande. Muito frequentemente, logo após a semeadura, já eram evidentes os seus sinais, que eram acompanhados pela diminuição do pH do meio, pelo desprendimento das células do substrato e pela consequente morte da cultura. É possível, por isso, que o início da propagação dos microrganismos tenha ocorrido por ocasião da colheita do material ou da sua introdução no meio de transporte, antes mesmo, portanto, do seu manuseio no laboratório.

Em relação ao tipo de desagregação tecidual, o tratamento enzimático empregado nos experimentos iniciais não se mostrou eficiente, ao contrário do que comumente ocorre com culturas de células tumorais e, por isso, a dissociação mecânica e a técnica de explante foram utilizadas nos demais casos. Esse resultado foi provavelmente decorrente da perda de células viáveis que, em geral, ocorre quando o material é submetido a



tratamentos enzimáticos (Freshney, 1987).

Apesar dos cuidados iniciais citados, os fragmentos explantados nem sempre aderiram ao frasco ou, quando aderiram, não mostraram proliferação celular satisfatória, acarretando a eliminação dessas culturas ainda incipientes. É possível que tal fato tenha ocorrido em virtude de fatores inerentes às condições utilizadas. Por exemplo, os frascos eram incubados em estufas comuns, não providas de suprimento controlado de gás carbônico e, talvez por isso, as funções vitais, como a respiração, ficaram prejudicadas e comprometeram a viabilidade e proliferação das células (Freshney, 1987). Além disso, é sabidamente reconhecida a importância da estimulação por fatores de crescimento em culturas de tecidos sólidos (Boyce & Ham, 1986; Pittelkow & Shipley, 1989; Teyssier, 1989) e, no entanto, não foi feita a utilização dessas substâncias, o que pode responder, pelo menos em parte, pelo fracasso em alguns casos.

Outra hipótese que pode explicar uma porcentagem do insucesso observado é a resposta diminuída dos tecidos de indivíduos idosos a estímulos mitogênicos (Schneider, 1979). Já foi amplamente discutido no início desse trabalho que as células, após um determinado número de divisões "in vitro", passam a apresentar alterações morfo-fisiológicas, entram em processo de senescência, param de se duplicar e morrem (Holliday, 1990). Tal fato pode ser observado "in vivo" e "in vitro" e constitui uma das principais evidências da teoria do envelhecimento programado (Hayflick, 1979). Realmente, os casos estudados que mostraram ausência de crescimento ou culturas senescentes com morte celular foram provenientes de indivíduos



idosos. Não pode ser excluída, portanto, a possibilidade de que esse resultado seja fruto da resposta deficiente das células às condições fornecidas, em virtude da iminência do limiar de suas potencialidades.

Os fibroblastos de pele normal, ao contrário de células tumorais, levam longos períodos de tempo para apresentar os primeiros sinais de proliferação celular "in vitro" (Thompson, 1991) . Os casos aqui descritos evidenciaram sinais de multiplicação celular entre sete e 20 dias após terem sido semeados e permaneceram em cultivo por períodos variados de três a sete semanas, quando foram submetidos a tratamento enzimático para subdivisão em novos frascos. O índice mitótico em alguns deles foi muito bom e permitiu que o número de réplicas obtido fosse, em média, maior que três. Em outros casos, entretanto, as culturas apresentaram baixo índice mitótico por razões desconhecidas e resultaram em poucas metáfases. Eles tiveram, por isso, seus períodos de bloqueio da divisão celular ampliados de duas a quatro horas para 16 horas na tentativa de ser obtido um número maior de células que permitisse posterior análise citogenética. Todavia, nem sempre os artifícios empregados converteram em sucesso. A frequência de casos com ausência de metáfases passíveis de análise foi grande (16,4%) e alguns daqueles em que foi possível sua obtenção mostraram cromossomos muito contraídos, resistentes ao tratamento utilizado pela técnica de bandamento G, possibilitando, na maior parte das vezes, apenas o estudo em coloração usual.



As 12 amostras que permitiram a análise foram agrupadas de acordo com o grau de risco dos pacientes correspondentes desenvolverem neoplasias de pele. Inicialmente serão discutidos os casos de poroqueratose, seguidos dos casos de pele exposta à luz solar e, finalmente, daqueles de pele não exposta.

IV.1. Lesões de poroqueratose

A poroqueratose, como referido anteriormente, é um tipo de lesão de pele que apresenta formas clínicas variadas (Lever & Schaumburg-Lever, 1990) e propensão ao desenvolvimento de câncer cutâneo, como carcinomas baso e espinocelulares (Fusaro, 1989). Estudos por microfluorimetria (Imakado *et al.*, 1988; Otsuka *et al.*, 1988) demonstraram conteúdos elevados de DNA na epiderme de lesões dessa doença e sugeriram que esse achado reflete a existência de pequenos clones neoplásicos que respondem pelas irregularidades mitóticas observadas e é provavelmente uma manifestação de estágios iniciais da malignização. Realmente, muitas lesões malignas como carcinoma colo-retal (Kouri, 1993), câncer de mama (Witzig *et al.*, 1993) e carcinomas de pele (Aledo *et al.*, 1988; Atkin & Baker, 1990) evidenciam esse fenômeno. Herzberg (1992) também fez referências à poliploidização do DNA em diferentes tumores de pele e, apesar dos resultados serem conflitantes provavelmente por decorrência das diferenças técnicas entre laboratórios, afirmou que os dados podem ser usados no diagnóstico e no prognóstico de algumas dessas condições.



Tabela 5. Frequência de aberrações cromossômicas recorrentes ou esporádicas em casos de poroqueratose.

REFERENCIA: Todos as amostras de poroqueratose estudadas mostraram poliploidia porém apenas nos dois casos do tipo placa ou de Mibelli (casos 946 e 964) esse evento foi verificado em frequência bastante alta, respectivamente 43,5 e 18%. Tal achado está em concordância com os dados da literatura citados acima e parece indicar instabilidade genética. Em muitas situações, entretanto, essa anomalia é referida como um efeito das condições "in vitro" (Chen & Shaw, 1973), mas isso fica difícil de ser aceito quando a frequência observada é muito elevada, como nas amostras em questão. Além disso, o espécime 964 difere quanto a esse fenômeno do caso 963, uma amostra de pele normal da mesma paciente, cultivada em paralelo com a anterior, cuja frequência de poliploidia não atingiu 1%. Esse resultado parece sugerir que os fibroblastos da lesão realmente possuem maior instabilidade genética, o que pode resultar no aparecimento de clones anormais na epiderme (Scappaticci **et al.**, 1989c; Lever & Schaumburg-Lever, 1990) e refletir o seu potencial de malignização.

Constam na literatura alguns relatos sobre a presença de aberrações cromossômicas em amostras de poroqueratose (Tabela 5). No estudo de Taylor **et al.** (1973), apesar de anterior aos recursos da técnica de bandamento cromossômico, foram detectadas de forma esporádica ou recorrente, diferentes aneuploidias e cromossomos marcadores, provavelmente representando rearranjos estruturais não relacionados. Nos espécimes analisados por Otsuka **et al.** (1991), foram igualmente verificadas anomalias esporádicas e recorrentes, as primeiras principalmente do tipo



Tabela 5. Frequência de aberrações cromossômicas recorrentes ou esporádicas em casos de poroqueratose.

REFERENCIA	AMOSTRA	ALTERAÇÃO RECORRENTE [MAf/MA]	ALTERAÇÃO ESPORADICA
Taylor et al., 1973	POM1	46,XY,-B,+mar[3/30] 46,XY,-D,-E,+G,+mar[25/32] 46,XY,-B,-3,+F,+mar[6/30] 46,XY,-F,-G,+mar,+mar[6/30] 46,XY,-C,-C,-C,-E,+F,-G, +mar,+mar,+mar[7/30]	numéricas/estruturais
	POM3	46,XX,-2,+mar[7/30] 46,XX,-C,+mar[5/30]	
	POM4	46,XX,-2,-3,+C,-D,+mar, +mar[7/30] 46,XX,-E,+mar[3/33]	
Scappaticci et al., 1989c	PN1	t(5;10)(p11;p15)[9/100] t(3;21)(p14;p11)[5/100] t(17;22)(q22;p11)[3/100] dic[3der(21)][2/100]	
	PN2	t(Y;22)(p13;q11)[2/50]	
	PN1 e 2	del(18)(p11)[2/100][2/50]	
	PN2 e 3	del(3)(p12)[2/50][4/50]	
	PN4	t(3;3)(q21;q29)[3/50] del(X)(p14)[2/50]	
Otsuka et al., 1991	PN5	47,XY,+12[3/100] 46,X,-Y,+10[30/100] 45,X,-Y[5/100]	77,XY,1p ⁺
	P04		47,XY,+7 46,XY,t(1;8)(q7;q7) 46,XY,t(13;15)(q7;q7) 46,XY,t(11;20)(q7;q7) 46,XY,19p ⁺ ,22q ⁺ 46,XY,9p ⁺ ,16p ⁺ , der(16)
	P05	47,XY,+12[11/50]	53,XY 73,XY
	P07	45,X,-Y[8/100] 47,XY,+9[3/100] 47,XY,+18[2/100] 47,XY,+5[2/100]	45,XY,1p ⁺ , -9
	P08	47,XY,+5[2/100] 47,XY,+7[2/100]	
	P09	47,XX,+X[3/100] 47,XX,+18[2/100]	
Presente estudo	PN963		poliploidia
	POM946		46,XY,del(17)(q) 45,XY,-17
	P0955		poliploidia
	P0957	47,XX,+C [8/66]	poliploidia 45,XX,-C 45,XX,-C,+E 46,XX,+C,-F 46,XX,-G,+mar
	POM964		poliploidia poliploidia

POM => lesão de poroqueratose de Mibelli; PO => lesão de poroqueratose; PN => pele normal de pacientes com poroqueratose; MAf => número de metáfases afetadas e MA => número de metáfases analisadas.

estrutural e as outras do tipo numérico. Pelo menos em um caso, essas anomalias foram múltiplas e não relacionadas. Os dados citogenéticos das amostras de poroqueratose presentemente estudadas compreenderam monossomias e trissomias totais ou parciais e cromossomos marcadores, além de euploidias já citadas (Tabela 3). A maioria das aberrações foi esporádica e do tipo numérica e em um caso foi observada uma alteração clonal.

Duas células com cariótipos 45,XY,-17 e 46,XY,del(17)(q) foram encontradas no caso 946. Embora os achados sejam não clonais, é importante salientar, em relação à primeira anomalia, que o gene TP53 está localizado no cromossomo 17 (17p13) e que sua alteração é considerada um passo importante no processo neoplásico (Weinberg, 1991) e já foi observada como decorrente da ação da luz UV em lesões de pele (Brash et al., 1991; Hall et al., 1993).

No caso 957, cujo paciente era portador de poroqueratose actínica disseminada superficial, além de aberrações casuais, foi constatada a presença de um clone com cariótipo 47,XX,+C nas diferentes réplicas analisadas mas não nos linfócitos do sangue periférico. Um cromossomo C extra também já foi observado por outros autores em algumas células de lesões de poroqueratose, tanto nos queratinócitos epidérmicos como nos fibroblastos dérmicos, e correspondem às trissomias 7, 9, 12 e X (Taylor et al., 1973; Otsuka et al., 1991).

No presente estudo, como a aneuploidia foi clonal e, portanto, esteve presente "in vivo", é possível que ela esteja relacionada com a origem da doença e com alterações na expressão gênica e no metabolismo celular. Além disso, aberrações



numéricas desse tipo podem acarretar erros mitóticos posteriores em virtude da disposição anômala dos cromossomos na placa metafásica e nas fibras do fuso (Chen, 1983; Wolman, 1986). Em virtude das lesões de poroqueratose representarem uma condição que antecede muitas vezes processos neoplásicos, a detecção de alterações cromossômicas desse tipo pode constituir um meio valioso no acompanhamento e no auxílio à terapêutica desses pacientes.

A malignização cutânea na poroqueratose já foi relatada em todos os subgrupos clínicos porém sua ligação com fatores ambientais, em especial com a luz UV, tem sido demonstrada consistentemente na forma actínica disseminada superficial (Fusaro, 1989). É interessante citar nesse ponto que os carcinomas epidérmicos que se desenvolvem nessa doença também estão associados com a exposição à luz solar e apresentam aberrações cromossômicas esporádicas e clonais múltiplas não relacionadas (Mertens et al., 1992), semelhantes àquelas descritas por Taylor et al. (1973) e por Otsuka et al. (1991) em poroqueratose. Como o mesmo fenômeno citogenético foi observado em células de pele normal de indivíduos idosos derivada de regiões expostas ao sol e de pacientes com a doença (Scappaticci et al., 1989c; Otsuka et al., 1991; Mertens et al., 1992; presente estudo), tais achados cariotípicos podem não ser característicos da célula tumoral mas decorrentes do acúmulo de lesões do DNA em fibroblastos cutâneos ou de uma possível deficiência de mecanismos de reparo, como já foi citado anteriormente em poroqueratose (Otsuka et al., 1991; Mertens et al., 1992). De qualquer modo, os dados obtidos até o presente



não permitem excluir a hipótese de que pelo menos algumas das anomalias cromossômicas observadas nas lesões pré-neoplásicas da doença constituem um dos passos no processo de malignização.

Três das amostras de pele exposta exibiram alterações

IV.2. Amostras de pele proveniente de regiões do corpo expostas à luz solar

Das cinco amostras de pele exposta estudadas, quatro provieram de indivíduos com idade superior a 40 anos. Em três delas (926, 930 e 937) foram encontradas células poliplóides e, apenas no caso 930, células com endoreduplicação, porém em frequências não elevadas. Um outro fenômeno verificado nas metáfases analisadas foi o da separação de cromátides (casos 926, 930, 937 e 940). Em relação a esse evento, há controvérsias quanto à nomenclatura empregada. Chamla (1988) fez referência a um fenômeno muito semelhante ao observado no presente trabalho, que foi por ele citado de C-anáfase, sendo dependente da ação da colchicina e não associado a patologias. Atkin & Baker (1992), por sua vez, batizaram esse evento de falha mitótica do fuso e relataram sua ocorrência em alguns tipos de neoplasias, como seminomas e doenças hematopoéticas, e sugeriram que, embora possam ser consequência de condições "in vitro", não é possível excluir a hipótese de representarem marcadores tumorais ou serem responsáveis pela origem de células poliplóides. Deve ser salientado que todos os casos observados no presente estudo com essa alteração, inclusive um de pele não exposta à luz solar (931), foram submetidos a períodos de bloqueio da divisão celular com colcemide por 16 horas, ao contrário dos demais. Esse dado, portanto, reforça a idéia de que tal fenômeno,



independente da nomenclatura adotada, pode ser produto de fatores atuantes no cultivo celular e não decorrentes de características da célula analisada.

Três das amostras de pele exposta exibiram alterações estruturais e numéricas diferentes. O caso 930, por exemplo, cujo paciente tinha sido submetido à exérese de um carcinoma basocelular, mostrou, além de aneuploidias esporádicas, um clone com cariótipo $46,XY,18p^+$, três células com a translocação $t(13;21)(q29;q11)$, além de outras anomalias estruturais envolvendo os segmentos 11qter, 12q e 17p.

Como já referido, o gene supressor de tumor TP53 está mapeado em 17p13 e sua importância no desenvolvimento de neoplasias tem sido amplamente reconhecida. Em relação ao cromossomo 11, foi identificada a participação de bandas 11q terminais em sarcoma de Ewing, que é um tipo de tumor originado de células neuroectodérmicas, e tal achado fala a favor de genes nesse local que participam do processo neoplásico (Selleri et al., 1991). Análises da região 12q, por sua vez, sugerem que seus genes desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de doenças linfoproliferativas caracterizadas pela trissomia desse cromossomo (Gerald & Grzeschik, 1984; Einhorn et al., 1989). Alterações desse segmento, que contém o oncogene ERBB3 e os genes da queratina 1 e 7, também já foram verificadas em tumor de pele (Sozzi et al., 1988). De qualquer modo, as anomalias observadas foram aparentemente esporádicas e podem não ter tido qualquer papel nas células detectadas.

No caso da alteração do braço curto do cromossomo 18, deve ser referido que na banda 18p11.32 já foi mapeado o gene da



enzima sintetase do timidilato, que é muito importante na duplicação do DNA pois mantém sua síntese em taxas normais. Condições de estresse, que limitam a atividade dessa enzima, descontrolam o nível de desoxinucleotídeos e causam instabilidade genética como mutação, recombinação, fragmentação do DNA, aberração cromossômica e troca entre cromátides irmãs (Hori *et al.*, 1990). A inserção de sequências de DNA nessa região, portanto, poderia levar a alterações na estrutura ou atividade da proteína resultando no comprometimento da síntese de DNA (Solomon *et al.*, 1991).

A translocação t(13;21) também pode ter efeitos na célula portadora. A banda 13q14 comporta o gene RB1, que é um supressor de tumor, cuja perda através de translocação, por exemplo, está implicada no desenvolvimento de retinoblastoma e osteossarcoma (Hansen *et al.*, 1985). Além disso, na banda 21q22 estão mapeados três locos gênicos bastante importantes: o SOD-1, o APP e o EPM1. O primeiro deles codifica a enzima superóxido desmutase, que atua no reparo de lesões oxidativas e cujo papel na senescência foi amplamente discutido (Cox *et al.*, 1984). O gene APP codifica o peptídeo beta-amilóide, acumulado em forma de placa nas células nervosas de pacientes com doença de Alzheimer e implicado nas características de senescência dessa condição (St. George-Hyslop *et al.*, 1987). Finalmente, o EPM1 é responsável por um tipo de epilepsia mioclônica que apresenta deficiências no DNA mitocondrial e acúmulo de lipofuscina nos neurônios (Lehesjoki *et al.*, 1991), achados esses que têm sido descritos muitas vezes em tecidos de indivíduos idosos (Kirkland, 1989; Brunk *et al.*, 1992; Wei, 1992). Em



consequência, a translocação t(13;21) pode levar a alterações na estrutura ou na taxa de síntese de alguns produtos e resultar em defeitos metabólicos capazes de comprometer as funções celulares culminando em senescência e morte celular ou em proliferação desordenada.

No caso 937, foi detectada em duas células analisadas a translocação t(3;9) com pontos de quebra em 3q29 e 9q11. Essa região do cromossomo 9 corresponde à heterocromatina constitutiva enquanto aquela do cromossomo 3 possui o gene da enzima dependente do folato, a sintetase do folilpoliglutamato, imprescindível na síntese de DNA (Jones et al., 1980). Sua função pode ser alterada em decorrência da translocação e, com isso, os mecanismos de divisão celular podem ficar comprometidos. É interessante que o envolvimento dessas regiões cromossômicas já foi observado em melanoma maligno (Kakati et al., 1977; Becher et al., 1983).

As únicas amostras de pele exposta que não exibiram alterações cromossômicas, com exceção de poliploidia e endoreduplicação, foram a 940 e a 963. Ambas tiveram um pequeno número de metáfases analisadas e a segunda era proveniente de indivíduo com idade inferior a 40 anos. Tais condições podem ter sido responsáveis pelos achados normais nesses casos, muito embora o caso 926, que também teve poucas metáfases analisadas, tenha apresentado algumas anormalidades cariotípicas.

IV.3. Amostras de pele proveniente de regiões do corpo não expostas à luz solar

As três amostras de pele não exposta à luz solar foram



obtidas de pacientes que manifestaram cistos de mama. A poliploidia não foi frequente, porém a separação de cromátides foi observada em 19,4% das células encontradas no caso 931 que, entretanto, pode ter sido resultante da ação prolongada de colcemide a que foi submetido o espécime. Esse caso também revelou instabilidade cromossômica na forma de aneuploidias e diferentes alterações estruturais esporádicas, entre elas a deficiência del(X)(q13) em 31,4% das células de duas réplicas obtidas. Tal achado significa que essa aberração cromossômica estava presente "in vivo" no local biopsiado e provavelmente ausente em outros tecidos, dado que a análise dos linfócitos do sangue periférico excluiu mosaicos com frequência de 6% ou maior, com probabilidade de 95% (Hook, 1977). É interessante citar nesse ponto que essa paciente manifestava um nevo na região próxima ao fragmento de pele biopsiado e que a banda Xq13 já foi relatada em aberrações observadas em melanoma maligno (Pedersen et al., 1986). Untch (Martens et al., 1972) detectou

anormalia. O cromossomo X apresenta mecanismo de regulação próprio, que resulta na inativação dos genes de um dos membros do par cromossômico para que haja equivalência gênica entre homens e mulheres. A inativação desse X parece decorrer da expressão de um gene denominado XIC (centro de inativação do X) em Xq13 (Brown et al., 1991). O ponto de quebra no caso 931 pode, portanto, ter afetado o gene XIC resultando na ativação permanente desse cromossomo e na expressão de genes em quantidades anormais, como por exemplo o da polimerase alfa do DNA, que está mapeado em Xp22.1-p21.3 e que participa diretamente do processo de divisão celular (Wong et al., 1987).



A amostra 844 também revelou um pequeno clone com uma provável deficiência parcial de um cromossomo C, levando a uma suposta trissomia E, além de muitas aneuploidias diferentes. Embora o material estudado nesses dois últimos casos (844 e 931) tenha tido origem em pele não exposta, as pacientes possuíam idade superior a 40 anos e as diversas anomalias detectadas podem representar uma mutação constitucional em mosaico de frequência baixa.

De modo geral, em três das oito amostras de pele normal estudadas foram observadas alterações estruturais clonais que afetaram até 23% do total de células analisadas. A frequência de rearranjos não clonais, principalmente do tipo numérico, exceto as euploidias, variou de 4 a 8%. Esses achados estão de acordo com os poucos dados já publicados sobre análises citogenéticas de biópsias de pele normal provenientes de áreas expostas e não expostas ao sol. O único trabalho encontrado na literatura sobre o assunto (Mertens *et al.*, 1992) detectou anomalias clonais em dois de seis casos de pele exposta estudados mas nenhuma em pele não exposta, e uma porcentagem média de células com alterações esporádicas igual a 9% no primeiro grupo e 3% no segundo grupo (Tabela 6).

Tais resultados ganham importância quando comparados com aqueles de tumores cutâneos do tipo carcinomas baso e espinocelulares e de seus correspondentes benignos e pré-malignos (Tabela 6). Nesses casos, os dados já publicados mostram 24 com anomalias clonais, e pelo menos dez nos quais os clones eram múltiplos e não relacionados (Fitchett *et al.*, 1984;



Heim et al., 1988; Heim et al., 1989b; Mertens et al., 1989a;

Tabela 6. Frequência de aberrações cromossômicas em amostras de et al.. tumores de pele e pele normal. típicas compreenderam

Tipo de amostra/ Referência	Número de casos	Número de casos com AC	% média do número de metáfases com ANC
--------------------------------	-----------------------	------------------------------	--

TUMORES MALIGNOS

Ca Basocelular

Scappaticci et al., 1989b	1	1	9
Kawasaki et al., 1991a	1	1	43
Kawasaki et al., 1991b	1	1	2
Mertens et al., 1992	47	7	12

Ca Espinocelular

Fitchett et al., 1984	1	1	0
Mertens et al., 1992	17	5	11

TUMORES BENIGNOS

Ca espinocelular "in situ"

Scappaticci et al., 1989a	1	1	3
Mertens et al., 1992	6	3	12

Queratoacantoma

Mertens et al., 1992	5	1	15
----------------------	---	---	----

Papiloma

Mertens et al., 1992	5	3	7
----------------------	---	---	---

PELE NORMAL

Exposta

Mertens et al., 1992	6	2	9
Presente estudo	5	1	8

Não exposta

Mertens et al., 1992	14	0	3
Presente estudo	3	2	4

AC => aberrações cromossômicas clonais; ANC => aberrações cromossômicas não clonais e CA => carcinoma.

UV, um agente sabidamente mutagênico e desencadeante de tumores de pele. De qualquer modo, outros fatores que não a luz UV



podem estar relacionados com a carcinogênese. Entre eles Heim et al., 1988; Heim et al., 1989b; Mertens et al., 1989a; podem ser citados uma alimentação pobre em beta-caroteno, vitamina C, ácido fólico e polifenóis (Heim et al., 1989a, b; Mertens et al., 1992). As alterações cariotípicas compreenderam principalmente translocações balanceadas, mas deficiências, isocromossomos, monossomias e trissomias já foram encontradas expostas a fatores potencialmente carcinogênicos. Estes efeitos sem, entretanto, revelar um cromossomo ou segmento cromossômico seriamente afetado. Rearranjos esporádicos também foram detectados em todos os tipos de tumores de pele e afetaram até 43% das metáfases.

A aparente semelhança de características citogenéticas em pele normal e neoplasias cutâneas pode ser casual, dado que o número de casos estudados é ainda pequeno, pelo menos no primeiro grupo. Entre os tumores, os achados de anomalias com rearranjos estruturais de um cromossomo C, identificado em clones múltiplas não relacionadas foram inicialmente interpretados como sugestivos de origem multifocal da lesão (Heim et al., 1988). Entretanto, a sua presença em pele normal constitui uma evidência indireta de que os clones não refletem populações de células tumorais, apesar de não poder ser excluída a possibilidade de que eles representem predisposição à malignização (Mertens et al., 1992).

Por outro lado, amostras de pele proveniente de regiões não expostas à luz solar exibem frequências mais baixas dessas anomalias, em especial das clonais, que aquelas provenientes de regiões expostas (Tabela 6). Essa observação parece indicar que a sua etiologia está associada à irradiação UV, um agente sabidamente mutagênico e desencadeante de tumores de pele. De qualquer modo, outros fatores que não a luz UV



poderiam estar relacionados com a carcinogênese. Entre eles podem ser citados uma alimentação pobre em beta-caroteno, vitamina C, crucíferas e peixes (Kune **et al.**, 1992) e a própria predisposição hereditária (Czarnecke **et al.**, 1992). Sendo assim, os fibroblastos cutâneos acumulariam danos no DNA, em virtude da exposição a fatores potencialmente carcinogênicos cujos efeitos seriam mais evidentes quanto maior fosse o seu período de ação. Em consequência, indivíduos idosos teriam uma frequência maior dessas alterações. Realmente, os dois pacientes com idades inferiores a 40 anos estudados no presente trabalho mostraram poucas aberrações cariotípicas.

Ao contrário dos dados da literatura (Mertens **et al.**, 1992), duas amostras de pele não expostas à luz exibiram clones com rearranjos estruturais de um cromossomo C, identificado em um deles como sendo o X. Embora as pacientes possuíssem idades superiores a 40 anos e o resultado talvez decorresse de lesões causadas por diferentes agentes ao longo do tempo (Mertens **et al.**, 1992), uma outra possibilidade deve ser considerada. As anomalias em questão podem ser constitucionais mesmo não estando presentes em outros tecidos do mesmo indivíduo. É interessante que em ambos os casos foram referidos cistos de mama, uma alteração resultante de distúrbios hormonais (Lipsett & Lippman, 1981), que pode representar uma das consequências da aberração cromossômica envolvida. Por outro lado, os distúrbios endócrinos desencadeantes de tais tumores podem constituir a causa das anomalias cariotípicas observadas e, portanto, indicar a ação do ambiente endógeno na origem de tais rearranjos clonais e esporádicos e não um efeito direto da luz UV.



Os achados cariotípicos em amostras de pele exposta
V. CONCLUSÕES
proveniente de indivíduos idosos podem, portanto, sugerir o

potencial de malignização do tecido e representar um dos passos
1. A técnica de cultura de curta duração por explante de
na tumorigênese cutânea. A favor dessa idéia estão os resultados
fragmentos de pele mostrou-se mais eficaz do que aquela
previamente discutidos de pacientes com poroqueratose que exibem
realizada após desepuração enzimática.

quadro citogenético semelhante na pele aparentemente normal e
2. Os fibroblastos de pacientes portadores de poroqueratose
nas suas lesões pré-neoplásicas. Entretanto, uma conclusão
apresentaram poliploidia, em especial no tipo plano de
definitiva sobre a relação direta entre os achados cariotípicos
hibrida, nas quais as frequências foram muito elevadas quando
e a malignização não pode ser estabelecida. Antes disso deve ser
comparadas com aquelas provenientes de lesões de forma

esclarecida a natureza histológica das células aberrantes e o
artificialmente disseminada ou mesmo com fibroblastos normais.
significado real das aberrações cromossômicas na iniciação e
3. Os fibroblastos de pacientes portadores de poroqueratose
progressão neoplásica.

apresentaram alterações cromossômicas, principalmente
numéricas, clonais e/ou esporádicas.

4. O fenômeno de separação de cromátides nas células analisadas
parece estar associado a condições "in vitro" e não
representar uma característica da célula analisada.

5. Diversas alterações citogenéticas esporádicas e recorrentes
foram detectadas em fibroblastos normais de pele exposta. Os
níveis elevados de alterações cromossômicas em células normais
não à luz solar, mostram-se mais frequentes nos casos em
que esses indivíduos se expõem ao sol.

6. Os segmentos cromossômicos envolvidos nos rearranjos
observados possuem genes relacionados com a proliferação
celular ou com características da senescência.



V. CONCLUSÕES

1. A técnica de cultura de curta duração por explante de fragmentos de pele mostrou-se mais eficaz do que aquela realizada após desagregação enzimática.
2. Os fibroblastos de pacientes portadores de poroqueratose apresentaram poliploidia, em especial no tipo placa ou de Mibelli, na qual as frequências foram muito elevadas quando comparadas com aquelas provenientes de lesões da forma actínica disseminada ou mesmo com fibroblastos normais.
3. Os fibroblastos de pacientes portadores de poroqueratose apresentaram alterações cromossômicas, principalmente numéricas, clonais e/ou esporádicas.
4. O fenômeno de separação de cromátides nas células analisadas parece estar associado a condições "in vitro" e não representar uma característica da célula analisada.
5. Diversas alterações citogenéticas esporádicas e recorrentes foram detectadas em fibroblastos normais de pele exposta ou não à luz solar, mostrando-se mais frequente nos casos em que esses provieram de indivíduos idosos.
6. Os segmentos cromossômicos envolvidos nos rearranjos observados possuem genes relacionados com a proliferação celular ou com características da senescência.



VI. RESUMO

7. A presença de aberrações cromossômicas múltiplas e não relacionadas, verificada nos casos estudados, é comumente observada em tumores de pele, o que pode sugerir sua participação nos processos de iniciação, promoção e progressão tumoral.

8. Dado que as anomalias anteriormente citadas foram observadas tanto em pele exposta como não exposta, é possível que outros fatores, além da irradiação UV, podem estar envolvidos no seu aparecimento.

O câncer e o envelhecimento estão intimamente relacionados e ambos os processos podem ser iniciados e promovidos por um desequilíbrio na regulação gênica. Nesse aspecto, a pele constitui um bom modelo para estudos dos efeitos de determinantes externos, como a irradiação ultravioleta (UV), que poderia influenciar a incidência e a evolução de tumores cutâneos.

A fim de investigar os mecanismos do envelhecimento e de fotocarcinogênese cutânea, o presente trabalho analisou células cultivadas de pele normal proveniente de áreas extensivamente expostas ao sol e de lesões pré-malignas e comparou os resultados com aqueles de pele de regiões não expostas. O material consistiu de quatro biópsias cutâneas de lesões de porqueria (três mulheres e um homem, com idades de entre 13 e 41 anos), cinco amostras de pele de áreas expostas a luz solar (três mulheres e dois homens, com idades entre 36 e 58 anos) e três amostras de pele de áreas não expostas a luz solar (três mulheres, com idades entre 18 e 34 anos).



VI. RESUMO

O envelhecimento é propriedade da maioria dos organismos, afetando-os em todos os níveis, inclusive em nível molecular. Os dados experimentais resultantes do seu estudo são limitados, ao contrário das especulações teóricas que tentam explicar seus mecanismos. De acordo com tais teorias o envelhecimento seria o resultado de um programa genético pré-existente ou consequência de danos deletérios em diferentes moléculas, entre elas o DNA, e em muitos outros componentes.

O câncer e o envelhecimento estão intimamente relacionados e ambos os processos podem ser iniciados e promovidos por um desequilíbrio na regulação gênica. Nesse aspecto, a pele constitui um bom modelo para estudo dos efeitos de determinados agentes, como a irradiação ultravioleta (UV), que poderiam influenciar a senescência e a incidência de tumores espontâneos.

A fim de investigar os mecanismos do envelhecimento e da fotocarcinogênese cutânea, o presente trabalho analisou células cultivadas de pele normal proveniente de áreas extensivamente expostas ao sol e de lesões pré-malignas e comparou os resultados com aqueles de pele de regiões não expostas. O material consistiu de quatro biópsias cutâneas de lesões de poroqueratose (três mulheres e um homem, com idades de entre 13 e 61 anos), cinco amostras de pele de áreas expostas à luz solar (três mulheres e dois homens, com idades entre 36 e 68 anos) e três amostras de pele de áreas não expostas à luz solar (três mulheres, com idades entre 18 e 54 anos).



Todas as amostras exibiram poliploidia, endorreduplicação ou aberrações numéricas, sendo a poliploidia detectada com alta frequência em dois casos de poroqueratose. Foram observados rearranjos clonais em quatro das 12 biópsias, uma de poroqueratose, uma de área exposta ao sol e duas de áreas não expostas ao sol, todas provenientes de pacientes idosos. Esses rearranjos consistiram de uma trissomia C, do aumento do braço curto do cromossomo 18, da deficiência del(X)(q13) e de uma suposta deficiência parcial de um cromossomo C. Anormalidades cromossômicas estruturais esporádicas ou recorrentes foram também detectadas em pacientes com idade avançada e consistiram das translocações t(13;21) e t(3;9), do dicêntrico dic(19), da trissomia de 12q, do aumento do braço longo do 19 e de cromossomos marcadores. Resultados semelhantes, como pequenos clones e aberrações estruturais esporádicas, têm sido consistentemente observados em tumores de pele. Os achados do presente trabalho, portanto, parecem indicar que a presença de rearranjos cromossômicos em pele normal de indivíduos idosos ou em lesões pré-malignas, como as de poroqueratose, reflete o risco desses tecidos para a transformação maligna e acompanha a carga mutagênica a que eles estiveram submetidos.



VII. SUMMARY

Ageing is a property of most living organisms and affects all components from the molecular level to the whole organism. The experimental results resulting from the study of ageing are limited in contrast to the theoretical speculations which try to explain its mechanisms. In accordance with the theories of ageing, the process may be the result of a pre-existing genetic programme or the sum of deleterious damages in DNA and other molecules and in many other components.

Ageing and cancer are clearly interconnected and both may be initiated and promoted by impairments of gene regulation. In this respect, the skin can provide the opportunity to investigate the effects of agents, like UV radiation, which could influence age-related processes and incidence of spontaneous tumors.

To investigate the mechanisms of skin ageing and photo-carcinogenesis, the present study analysed short term cultured cells of normal skin from extensively sun-exposed areas or premalignant lesions and compared the results with sun-protected skin. The material consisted of four cutaneous biopsies from porokeratosis lesions (3 women, 1 men, age 13-61 years), five skin samples from sun-exposed areas (3 women, 2 men, age 36-68 years) and three skin samples from nonexposed areas (3 women, age 18-54 years). All samples exhibited polyploidy, endoreduplication or numerical aberrations.



Poliploidy was detected in very high frequencies in two samples from lesions of porokeratosis.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Clonal rearrangements were detected in four of the twelve biopsies, one from porokeratosis, one from sun-exposed and two from protected areas of elderly patients. They consisted of trissomy C, enlargement of p arm of chromosome 18, del(X)(q13) and a supposed partial deletion of a chromosome C.

Sporadic or recurrent structure abnormalities consisted of t(13;21), t(3;9), dic(19), trissomy 12q, 19q⁺, marker chromosomes and were also detected in old patients.

Similar results like small clones and sporadic structural aberrations have been consistently observed in skin tumors. Therefore, the findings of the present study suggest that the presence of chromosomal rearrangements in normal skin of elderly people or in premalignant lesions reflect the risk of malignant transformation and run parallel with mutagenic load.

R.G. (Eds.). Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression. New York: Raven Press. 1983. p. 137-146.

ANISIMOV, V.N.. Effects of factors prolonging life span on carcinogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci., V. 621, p. 373-384, 1991.

ARNHEIM, N., CORTOPASSI, S.. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. Mutat. Res., V. 275, p. 157-167, 1992.

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

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



VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M.J., CORONEL, C., SHELTON, E., SEEGLER, J.E., DEWILL, N.N.. Increased gene expression of Alzheimer disease B-amyloid precursor protein in senescent cultured fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, V. 88, p. 16-20, 1991.
- ALEDO, R., AURIAS, A., CHRÉTIEN, B., DUTRILLAUX, B.. Jumping translocation of chromosome 14 in a skin squamous cell carcinoma from a Xeroderma pigmentosum patient. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 33, p. 29-33, 1988.
- AMES, B.N., SAUL, R.L., SCHWIERS, E., ADELMAN, R., CATHCART, R.. Oxidative DNA damage as related to cancer and aging: assay of thymine glycol, thymidine glycol, and hidroximethyluracil in human and rat urine. In: SOHAL, R.S., BIRNBAUM, L.S., CUTLER, R.G. (Eds.). *Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression*. New York: Raven Press. 1985. p. 137-144.
- ANISIMOV, V.N.. Effects of factors prolonging life span on carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, V. 621, p. 373-384, 1991.
- ARNHEIM, N., CORTOPASSI, G.. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutat. Res.*, V. 275, p. 157-167, 1992.
- ATKIN, N. B., BAKER, M. C.. Cytogenetic studies of basal cell carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 49, p.281-282, 1990.
- ATKIN, N.B., BAKER, M.C.. Mitotic spindle failure in human cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.62, p. 106-107, 1992.



- BECHER, R., GIBAS, Z., KARAKOUSIS, C., SANDBERG, A.A.. Nonrandom chromosome changes in malignant melanoma. **Cancer Res.**, V. 43, p. 5010-5016, 1983.
- BEERS, B., JASZCZ, W., SHEETZ, K., HOGAN, D.J., LYNCH, P.. Porokeratosis palmaris et plantaris disseminata. **Arch. Dermatol.**, V. 128, p. 236-239, 1992.
- BELL, M., BEYL, C.M., SCHOPF, R.E., SCHRAMM, P.. Light exposure of the lower leg as a pathogenetic factor in the occurrence of malignant melanoma. **Dermatology**, V. 185, p. 257-261, 1992.
- BEREZNEY, R., COFFEY, D.S.. Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. **Science**, V. 189, p. 291-293, 1975.
- BERNSTEIN, C., BERNSTEIN, H.. **Aging, sex and DNA repair**. San Diego: Academy Press Inc., 1991. 382p..
- BIRD, B.R., FORRESTER, F.T.. **Basic laboratory techniques in cell culture**. Atlanta, Department of Health and Human Services, 1981.
- BLACKBURN, E.H.. Structure and function of telomeres. **Nature**, V. 350, p. 569-573, 1991.
- BOYCE, S.T., HAM, R.G. Normal human epidermal keratinocytes. In: WEBER, M.M., SEKELY, L. (Eds.). **In vitro models for cancer research**, Boca Raton: CRC Press Inc., V.3, 1986. p. 245-274.
- BRASH, D.C., RUDOLPH, J.A., SIMON, J.A., LIN, A., MCKENNA, G.J., BADEN, H.P., HALPERIN, A.J., PONTÉN, J.. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V. 88, p. 10124-10128, 1991.



- CHEN, T. R.. Chromosome changes in 6-TG-resistant mutant strains.
- BROCCOLI, D., COOKE, H.. Invited Editorial. Aging, healing, and the metabolism of telomeres. **Am. J. Hum. Genet.**, V. 52, p. 657-660, 1993.
- BROWN, C.J., BALLABIO, A., RUPERT, J.L., LAFRENIERE, R.G., GROMPE, M., TONLORENZI, R., WILLARD, H.F.. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, V. 349, p. 38-44, 1991.
- BRUNK, V.T., JONES, CH.B., SOHAL, R.S.. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. **Mutat. Res.**, V. 275, p. 395-403, 1992.
- BUNN, C.L., WHITE, F.A.. Somatic mutation and aging in mammalian cells. In: SOHAL, R.S., BIRBAUM, L.S., CUTLER, R.G. (Eds.). **Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression**. New York: Raven Press, 1985, p. 77-92.
- CARRILLO, M.C., KANAI, S., SATO, Y., KITANI, K.. Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region and organ, as well as sex, selective in the rat. **Mech. Ageing and Develop.**, V. 65, p. 187-198, 1992.
- CASATI, A., STEFANINI, M., GIORGI, R., GHETI, P., NUZZO, F.. Chromosome rearrangements in normal fibroblasts from Xeroderma pigmentosum homozygotes and heterozygotes. **Cancer Genet Cytogenet.**, V. 51, p. 89-101, 1991.
- CATANIA, J., FAIRWEATHER, D.S.. DNA methylation and cellular ageing. **Mutat. Res.**, V. 256, p. 283-293, 1991.



- CHEN, T. R.. Chromosome changes in 6-TG-resistant mutant strains derived from a karyotypically stable human line C32. **Cytogenet. Cell Genet.**, V. 35, p. 181-189, 1983.
- CHEN, T.R., SHAW, M.W.. Stable chromosome changes in a human malignant melanoma. **Cancer Res.**, V. 33, p. 2042-2047, 1973.
- CORPAS, E., HARMAN, S.M., BLACKMAN, M.R.. Human growth hormone and human aging. **Endocrine Reviews**, V. 14, p. 20-39, 1993.
- CORTOPASSI, G.A., ARNHEIM, N.. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. **Nucleic Acids Res.**, V. 18, p. 6927-6933, 1990.
- COWAN, J.M., HALABAN, R., FRANCKE, V.. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. **J. Nat. Cancer Inst.**, V. 80, p. 1159-1164, 1988.
- COX, D.R., KAWASHIMA, H., VORA, S., EPSTEIN, C.J.. Regional mapping of SOD-1, PRGS and PFK-L on human chromosome 21. **Cytogenet. Cell Genet.**, V. 37, p. 441-442, 1984.
- CUTLER, R.G.. Antioxidants and aging. **Am J. Clin. Nutr.**, V. 53, p. 373s-379s, 1991.
- CZARNECKE, D., ZALCBERG, J., MEEHAN, C., O'BRIEN, T., LEAHY, S., BANKIER, A., NASH, C.G.. Familial occurrence of multiple nonmelanoma skin cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, V. 61, p. 1-5, 1992.
- DAYA-GROSJEAN, L., ROBERT, C., DROUGARC, C.H., SUAREZ, H.G., SARASIN, A.P.. High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient Xeroderma pigmentosum patients. **Cancer Res.**, V. 53, p. 1625-1629, 1993.



- DRINKWATER, R.D., BLAKE, T.J., MORLEY, A.A., TURNER, D.R.. Human lymphocytes aged in vivo have reduced levels of methylation in transcriptionally active and inactive DNA. *Mutat. Res.*, V. 219, p. 29-37, 1989.
- DRIVER, CH.J.I., McKECHNIE, S.W.. Transposable elements as a factor in the aging of *Drosophila melanogaster*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, V. 673, p. 83-91, 1992.
- EINHORN, S., BURVALL, K., JULIUSSON, G., GAHRTON, G., MEEKER, T.. Molecular analyses of chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, V. 3, p. 871-874, 1989.
- ELEFThERIOU, Ch.S., TRAKAS, N.B., TZARTOS, S.J.. Cellular ageing related proteins secreted by human fibroblasts. *Mutat. Res.*, V. 256, p. 127-138, 1991.
- ESPOSITO, D., FASSINA, G., SZABO, P., DE ANGELIS, P., ROGERS, L., WEKSLER, M., SINISCALCO, M.. Chromosomes of older humans are more prone to aminopterin-induced breakage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, V. 86, p. 1302-1306, 1989.
- FRESHNEY, R.J.. *Culture of animals cells - a manual of basic technique*. New York: Alan R. Liss., 1987. 235p..
- FITCHETT, M., DOWNING, R.G., HOPKINSON, D.A., BAYLEY, A.C.. Interstitial deletion of chromosome band 13q14 associated with squamous cell carcinoma. *J. Med. Genet.*, V. 21, p. 339, 1984.
- FUJITA, T., SHIRASAWA, T., UCHIDA, K., MARUYAMA, N.. Isolation of DNA clone encoding rat senescence marker protein-30 (SMP30) and its tissue distribution. *Biochem. et Biophys. Acta*, V. 1132, p. 297-305, 1992.



- FURTH, J.J.. The steady-state levels of type I collagen mRNA are reduced in senescence fibroblasts. **J. Gerontol.**, V. 46, p. B122-124, 1991.
- FUSARO, R.M.. The environment and cancer associated genodermatoses. In: LYNCH, H.T., HIRAYAMA, T. (Eds.). **Genetic epidemiology of cancer**, Boca Raton: CRC Press. Inc., 1989. p. 160-181.
- GADALETA, M.N., RAINALDI, G., LEZZA, A.M.S., MILELLA, F., FRACASSO, F., CANTATORE, P.. Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. **Mutat. Res.**, V. 275, p. 181-193, 1992.
- GANGULY, T., DUCKER, N.J.. Glycosylases that excise modified DNA pyrimidines in young and senescent human WI-38 fibroblasts. **Mutat. Res.**, V. 237, p. 107-115, 1990.
- GARMYN, M., YAAR, M., BOILEAU, N., BACKENDORF, C., GILCHREST, B.A.. Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured human keratinocytes to solar-simulated irradiation. **J. Invest. Dermatol.**, V. 99, p. 743-748, 1992.
- GERALD, P.S., GRZESCHIK, K.H.. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 10, 11 and 12. **Cytogenet. Cell Genet.**, V. 37, p. 103-126, 1984.
- GILLE, J.J.P., MULLAART, E., VIJG, J., LEYVA, A.L., ARWET, F., JOENJE, H.. Chromosomal instability in an oxygen-tolerant variant of Chinese hamster ovary cells. **Mutat. Res.**, V. 219, p. 17-28, 1989.
- GORDON, H.. Oncogenes. **Mayo Clin. Proc.**, V. 60, p. 697-713, 1985.



- HEIM, S., JIN, Y.-S., MANDAH, N., MITELMAN, F.. Multiple
cytogenetically unrelated clones in short-term cultures from
GROUCHI, J. De., TURLEAU, C.. **Atlas des maladies cromossomiques.**
squamous cell carcinoma. In: International workshop on
Paris: Expansion Scientifique Francaise, 1977.
chromosomes in tumors. J. Jucson, 26/02 - 01/03/1989a.
HALL, P.A., MCKEE, P.H., MENAGE, H.P., DEVER, R., LANE, D.P..
Abstracts, p. 30.
High levels of p53 proteins in UV irradiated human skin.
HEIM, S., MERTENS, F., JIN, Y.-S., MANDAH, N., JOHANSSON, S.,
Oncogene, V. 8, p. 191-193, 1993.
BIORKLUND, A., WENNWEBER, J., JOHANSSON, N., MITELMAN, F..
HANSEN, M.F., KOUFOS, A., GALLIE, B.L., PHILLIPS, R.A., FODSTAD,
D., BROGGER, A., GEDDE-DAHL, T., CAVENEE, W.K.. Osteosarcoma
and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing
the skin. **Cancer Genet. Cytogenet.**, V. 39, p. 59-76, 1988.
HEIM, S., CAPON, M., JIN, Y.-S., MANDAH, N., MITELMAN, F..
recessive predisposition. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V. 82, p.
Genetic convergence during serial in vitro passage of a
6216-6220, 1985.
POLYCLONAL squamous cell carcinoma. **Cytogenet. Cell Genet.**, V.
HARLEY, C.B.. Telomere loss: mitotic clock or genetic time
52, p. 133-135, 1989c.
bomb? **Mutat. Res.**, V. 256, p. 271-282, 1991.
HERTZBERG, A.J.. Significance of DNA ploidy in cutaneous
HARLEY, C.B., FUTCHER, A.B., GREIDER, C.W.. Telomeres shorten
lesions. **Arch. Dermatol.**, V. 129, p. 661-672, 1993.
during ageing of human fibroblasts. **Nature**, V. 345, p. 458 -
HOLLIDAY, R.. Minireviews: the limited proliferation of
460, 1990.
Cultured human diploid cells: regulation or senescence. 3. of
HAYFLICK, L.. The cell biology of aging. **J. of Invest.**
Gerontol., V. 43, p. B34-B41, 1990.
Dermatol., V. 73, p. 8-14, 1979.
HOLMES, G.E., BERNSTEIN, C., BERNSTEIN, H.. Oxidative and other
HASHIMOTO, K., MEHREGAN, A.H.. **Tumors of the epidermis:**
damages as the basis of aging: a review. **Mutat. Res.**, V. 375,
practical dermatopathology series. Stoneham: Butter Worth
P. 305-315, 1992.
Publishers, 1990. 281p..
HOOK, E.B.. Exclusion of chromosomal associations: tables of 90%,
HEIM, S., MITELMAN, F.. **Cancer cytogenetics.** New York: Alan R.
95% and 99% confidence limits and comments on use. **Am. J. Hum.**
Liss., 1987. 309p..
Genet., V. 29, p. 94-97, 1977.
HEIM, S., JIN, T., MANDAH, N., BIORKLUND, A., WENNWEBER, J.,
HOPI, T., TAKAKASHI, E., AYUSCURA, D., TAKEISHI, K., KANEDA, S.,
JONSSON, N., MITELMAN, F.. Multiple unrelated clonal
SEN, T.. Regional assignment of the human thymidylate synthase
abnormalities in an in situ squamous cell carcinoma of the
(19) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ
skin. **Cancer Genet. Cytogenet.**, V. 36, p. 149-153, 1988.
hybridization. **Human Genet.**, V. 85, p. 578-580, 1990.



- HEIM, S., JIN, Y.-S., MANDAH, N., MITELMAN, F.. Multiple cytogenetically unrelated clones in short-term cultures from squamous cell carcinoma. In: International workshop on chromosomes in tumors, 3, Tucson, 26/02 - 01/03/1989a. Abstracts. p. 30.
- HEIM, S., MERTENS, F., JIN, Y.-S., MANDAH, N., JOHANSSON, B., BIRKELUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F.. Diverse chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 39, p. 69-76, 1989b.
- HEIM, S., CARON, M., JIN, Y.-S., MANDAH, N., MITELMAN, F.. Genetic convergence during serial in vitro passage of a polyclonal squamous cell carcinoma. *Cytogenet. Cell Genet.*, V. 52, p. 133-135, 1989c.
- HERZBERG, A.J.. Significance of DNA ploidy in cutaneous lesions. *Arch. Dermatol.*, V. 128, p. 663-672, 1992.
- HOLLIDAY, R.. Minireview: The limited proliferation of cultured human diploid cells: regulation or senescence. *J. of Gerontol.*, V. 45, p. B36-B41, 1990.
- HOLMES, G.E., BERNSTEIN, C., BERNSTEIN, H.. Oxidative and other damages as the basis of aging: a review. *Mutat. Res.*, V. 275, p. 305-315, 1992.
- HOOK, E.B.. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am. J. Hum. Genet.*, V. 29, p. 94-97, 1977.
- HORI, T., TAKAKASHI, E., AYUSCURA, D., TAKEISHI, K., KANEDA, S., SENDO, T.. Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Human Genet.*, V. 85, p. 576-580, 1990.



- KAKATI, J., ZHANG, S.Y., SANDBERG, A.A.. Chromosomes and
- HORI, M., UDONO, M.U., YOSHIDA, H., URATA, Y., KOIKE, K., IHARA, M.. Immunochemical detection of unpaired cyclobutane-type pyrimidine dimers of DNAs extracted from human skin tumors. **Arch. Dermatol. Res.**, V. 284, p. 283-289, 1992.
- HORNSBY, P.J., YANG, L., GUNTER, L.E.. Demethylation of satellite I DNA during senescence of bovine adrenocortical cells in culture. **Mutat. Res.**, V. 275, p. 13-19, 1992.
- HORNSBY, P.J., YANG, L., RAJU, S.G., CHENG, C.Y.. Changes in gene expression and DNA methylation in adrenocortical cells senescing in culture. **Mutat. Res.**, V. 256, p. 105-113, 1991.
- IMAKADO, S., OTUSUKA, F., ISHIBASHI, Y.. Abnormal DNA ploidy in cells of the epidermis in a case of porokeratosis. **Arch. Dermatol.**, V. 124, p. 331-332, 1988.
- ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. **Cytogenet. Cell Genet.**, V. 21, p. 309-404. 1978.
- ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. HARNDEN, D.G., PATH, F.R.C., KLINGER, H.P. (Eds.). Karger, Basel, 117p., 1985.
- ISCN: Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an international system for human cytogenetic nomenclature. MITELMAN, F. (Ed.). Karger, Basel, 56p., 1991.
- JONES, C., KAO, F.T., TAYLOR, R.T.. Chromosomal assignment of the gene for folylpolyglutamate synthetase to human chromosome 9. **Cancer Genet. Cytogenet.**, V. 28, p. 181-194, 1980.
- KAHN, P., GRAF, TH.. **Oncogenes and growth control**. 2nd ed., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 369p.



KAKATI, S., SONG, S.Y., SANDBERG, A.A.. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXII. Karyotypic changes in malignant melanoma. *Cancer*, V. 40, p. 1171-1181, 1977. patients and controls. *Nutrition and Cancer* - a

KAWASAKI, R.S., CALDEIRA, L.F., ANDRÉ, F.S., GASQUES, J.A.L., CASTILHO, W.H., BOZOLA, A.R., TAJARA, E.H.. Multiple cytogenetic clones in basal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 54, p. 33-38, 1991a. *lepsy to chromosome 21q22.*

KAWASAKI, R.S., CALDEIRA, L.F., ANDRÉ, F.S., GASQUES, J.A.L., CASTILHO, W.H., BOZOLA, A.R., TAJARA, E.H.. Translocation (4;14) and concomitant inv(14) in a basal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 56, p. 177-180, 1991b. *skin. 7th*

KIRKLAND, J.L.. Evolution and ageing. *Genone*, V. 31, p. 398-405, 1989. *McBILL, N.J., LINDSEY, L.A., GREEN, D.K., COUPE,*

KIRKWOOD, T.B.L.. DNA, mutations and aging. *Mutat. Res.*, V. 219, p. 1-7, 1989. *V. 226, p. 43-48, 1991.*

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

KNUDSON, A.G.. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. *Cancer*, V. 63, p. 1888-1891, 1989. *endocrinology. 6th*

KNUDSON Jr., A.G.. Overview: Genes that predispose to cancer. *Mutat. Res.*, V. 247, p. 185-190, 1991. *SHIRAIISHI, S., SASAKI,*

KOURI, M.. DNA ploidy of colorectal carcinoma by tumor site, gender and history of noncolorectal malignancies. *Oncology*, V. 50, p. 41-45, 1993. *J. of Dermatol., V. 111, p. 579-586, 1984.*



- KUNE, G.A., BANNERMAN, S., FIELD, B., WATSON, L.F., CLELAND, H., MERENSTEIN, D., VITETTA, L.. Diet, alcohol, smmoking, serum beta-carotene, and vitamin-A in male nonmelanocytic skin cancer patients and controls. **Nutrition and Cancer - a International Journal**, V. 18, p. 237-244, 1992.
- LEHESJOKI, A.E., KOSKINIEMI, M., SISTONEN, P., MIAO, J., HASTBACKA, J., NORIO, R., LA CHAPELLE, A.. Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V. 88, p. 3696-3699, 1991.
- LEHMANN, A.R.. Cockayne's syndrome and trichothiodystrophy. **Cancer Rev.**, V. 7, p. 82-91, 1987.
- LEVER, W.F., SCHAUMBURG-LEVER, G.. **Histopathology of skin**. 7th ed.. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1990. 940p.
- LINDSEY, J., MCGILL, N.I., LINDSEY, L.A., GREEN, D.K., COOKE, H.J.. "In vivo" loss of telomeric repeats with age in humans. **Mutat. Res.**, V. 256, p. 45-48, 1991.
- LIPMAN, J.M., APPLGATE-STEVENSON, A., SOYKA, L.A., HART, R.W.. Cell cycle defect of DNA repair in progeria skin fibroblasts. **Mutat. Res.**, V. 219, p. 273-281, 1989.
- LIPSETT, M.B., LIPPMAN, M.E.. Endocrine responsive cancers of man. In: WILLIAMS, R.H. (Ed.). **Textbook of endocrinology**. 6th ed.. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1981. p. 1213-1227.
- MACHINO, H., MIKI, Y., TERAMOTO, T., SHIRAISHI, S., SASAKI, M.S.. Cytogenetic studies in a patient with porokeratosis of Mibelli, multiple cancers and a forme of Werner's syndrome. **British. J. of Dermatol.**, V. III, p. 579-586, 1984.



- MACIEIRA-COELHO, A.. Chromatin reorganization during senescence of proliferation cells. **Mutat. Res.**, V. 256, p. 81 - 104, 1991.
- MACIEIRA-COELHO, A., PUVION-DUTILLEUL, F.. Evaluation of the reorganization in the high-order structure of DNA occurring during cell senescence. **Mutat. Res.**, V. 219, p. 165-170, 1989.
- MAIER, J.A., VOULALAS, P., ROEDER, D., MACIAG, T.H. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin 1 alpha antisense oligomer. **Science**, V. 249, p. 1570-1574, 1990.
- MARKS, R., JOLLEY, D., LECTSAS, S., FOLEY, P.. The role of childhood exposure to sunlight in the development of solar keratoses and non-melanocytic skin cancer. **Med. J. of Austral.**, V. 152, p. 62-66, 1990.
- MARTIN, G.M., TURKER, M.S.. Minireview: Model systems for the genetic analysis of mechanisms of aging. **J. Gerontol.**, V. 43, p. B33-39, 1988.
- MARTIN, G.M., FRY, M., LOEB, L.A.. Somatic mutation and aging in mammalian cells. In: SOHAL, R.S., BIRBAUM, L.S., CUTLER, R.G. (Eds.). **Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression**. New York: Raven Press., 1985. p. 7-21.
- MERRY, B.J.. Biological mechanisms of ageing. **Eye**, V. 1, p. 163-170, 1987.
- MERTENS, F., HEIM, S., JIN, Y.-S., JOHANSSON, B., MANDAH, N., BIORKLUND, A., WENNERBERG, J., JONSSON, N., MITELMAN, F.. Basosquamous papilloma. A benign epithelial skin tumor with multiple cytogenetic clones. **Cancer Genet. Cytogenet.**, V. 37, p. 235-239, 1989a.



- NAGLEY, Ph., MACKAY, I.R., SAUMER, A., MAXWELL, R.J., VAILLANT, F., WANG, Z.X., ZHANG, Ch., LINNANE, A.W.. Mitochondrial DNA mutation associated with aging and degenerative disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, V. 673, p. 93-102, 1992.
- BIORKLUND, A., JONSSON, N., MITELMAN, F.. Clonal chromosome aberrations in a keratoacanthoma and a basal cell papilloma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 39, p. 227-232, 1989b.
- MERTENS, F., JIN, Y., HEIM, S., MANDAH, N., JONSSON N., MERTENS, O., PERSSON, L.S., WENNERBERG, J., MITELMAN, F.. Clonal structural chromosome aberrations in nonneoplastic cells of the skin and upper aerodigestive tract. *Genes, chromosomes & cancer*, V. 4, p. 235-240, 1992.
- MIQUELL, J.. Un update on the mitochondrial DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat. Res.*, V. 275, p. 209-216, 1992.
- MOYZIS, R.K.. The human telomere. *Scientific American*, V. 265, p. 34-41, 1991.
- MULLAART, E., LOHMAN, P.H.M., BERENDS, F., VIJG, J.. DNA damage metabolism and aging. *Mutat. Res.*, V. 237, p. 189-210, 1990.
- MUNSCHER, C., RIEGER, T., MULLER-HOCKER, J., KADENBACH, B.. The point mutation of mitochondrial DNA characteristic for MERRF disease is found also in health people of different ages. *Jpn. Cancer Res.*, V. 80, p. 41-44, 1989.
- MURRAY, V.. Are transposons a cause of ageing? *Mutat. Res.*, V. 237, p. 59-63, 1990.
- PARIS CONFERENCE (1971): Standardization in human cytogenetics. *Birth defects*, V. 8, 1972.

- 632/94
- NAGLEY, Ph., MACKAY, I.R., BAUMER, A., MAXWELL, R.J., VAILLANT, F., WANG, Z.X., ZHANG, Ch., LINNANE, A.W.. Mitochondrial DNA mutation associated with aging and degenerative disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, V. 673, p. 92-102, 1992.
- NAKATSURU, Y., AOKI, K., ISHIKAWA, T.. Age and strain dependence of O6-methylguanine DNA methyltransferase activity in mice. *Mutat. Res.*, V. 219, p. 51-56, 1989.
- NIEDERMULLER, H.. DNA repair during aging. In: SOHAL, R.S., BIRBAUM, L.S., CUTLER, R.G. (Eds.). *Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression*. New York: Raven Press, 1985. p. 173-194.
- OTSUKA, F., CHI, J.I., SHIMA, A., ISHIBASHI, Y.. Cytological demonstration of abnormal DNA ploidy in the epidermis of porokeratosis. *Arch. Dermatol. Res.*, V. 280, p. 61-63, 1988.
- OTSUKA, F., NASHIRO, K., KOBAYASHI, K., ISHIBASHI, Y.. Chromosome abnormalities of porokeratosis-cultured epidermal keratinocytes - comparison with those of dermal fibroblasts. *Cancer Genetics Cytogenet.*, V. 56, p. 163-169, 1991.
- OTSUKA, F., WATANABE, R., MORO, A., OHKOCHI, H., ISHIBASHI, Y.. Cultured skin fibroblasts from patients with porokeratosis are hypersensitive to the letal effects of X- radiation. *Jpn. J. Cancer Res.*, V. 80, p. 41-44, 1989.
- OYAMA, R.S.K.. *Estudo citogenético em tumores de pele*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 1991.
- PARIS CONFERENCE (1971): Standardization in human cytogenetics. *Birth defects*, V. 8, 1972.



- PARIS CONFERENCE (1971), SUPPLEMENT (1975): Standardization in human cytogenetics. *Birth defects*, V. 11, 1975.
- PEDERSEN, M.I., BENNETT, J.W., WANG, N.. Nonrandom chromosome structural aberrations and oncogene loci in human malignant melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 20, p. 11-27, 1986.
- PITTELKOW, M.R., SHIPEY, G.D.. Serum-free culture of normal human melanocytes: growth kinetics and growth factor requirements. *J. Cellular Physiol.*, V. 140, p. 565-576, 1989.
- POOT, M.. Oxidants and antioxidants in proliferative senescence. *Mutat. Res.*, V. 256, p. 177-189, 1991.
- RAES, M.. Involvement of microtubules in modifications associated with cellular aging. *Mutat. Res.*, V. 256, p. 149-168, 1991.
- RAO, K.M., COHEN H.J.. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mutat. Res.*, V. 256, p. 139-148, 1991.
- RAO, K.S., LOEB, L.A.. DNA damage and DNA repair in brain: relationship to aging. *Mutat. Res.*, V. 275, p. 317-329, 1992.
- REED, R.J., LEONE, P.H.. Porokeratosis - a mutant clonal keratosis of the epidermis. I. Histogenesis. *Arch. Dermatol.*, V. 101, p. 340-347, 1970.
- RICHARDSON, A., RUTHERFORD, M.S., BIRCHENALL-SPARKS, M.C., ROBERTS, M.S., WU, W.T., CHEUNG, H.T.. Levels of specific messenger RNA species as a function of age. In: SOHAL, R.S., BIRBAUM, L.S., CUTLER, R.G.. (Eds.). *Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression*. New York: Raven Press, 1985. p. 229-241.



- ROTH, R.R., JAMES, W.D.. Microbial ecology of the skin. *Ann. Rev. Microbiol.*, V. 42, p. 441-464, 1988.
- RUSTING, R.L.. Why do we age? *Scientific American*, V. 267, p. 87-95, 1992.
- SAJDEL-SULKOWSKA, E.M., MAROTTA, Ch.A.. Functional messenger RNA from the postmortem human brain: comparison of aged normal with Alzheimer's disease. In: SOHAL, R.S., BIRBAUM, L.S., CUTLER, R.G. (Eds.). *Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression*. New York: Raven Press, 1985. p. 243-256. *Cytogenet.*, V. 15, p. 380-387, 1975.
- SANDBERG, A.A.. *The chromosomes in human cancer and leukemia*. 2^a ed., New York, 1990. 1315p.
- SCAPPATICCI, S., FRACCARO, M., ORECHIA, G.. Multiple clonal chromosome in superficial basal cell epithelioma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 42, p. 309-311, 1989a.
- SCAPPATICCI, S., LAMBIASE, S., FRACCARO, M., ORECHIA, G.. A clonal t(9;12)(q32;q21) in cultured fibroblasts from a case of Bowen's disease. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 43, p. 249-250, 1989b.
- SCAPPATICCI, S., LAMBIASE, S., ORECHIA, G., FRACCARO, M.. Clonal chromosome abnormalities with preferential involvement of chromosome 3 in patients with Poroqueratosis of Mibelli. *Cancer Genet. Cytogenet.*, V. 43, p. 89-94, 1989c.
- SCHNEIDER, E.L.. Aging and cultured human skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, V. 73, p. 15-18, 1979.



STEFANINI, M., SCAPPATIGGI, S., LAGOMARSINI, P., BORRONI, G.,
 SCHNEIDER, E.L.. Interrelationships among aging, cancer and
 differentiation. In: PULLMAN, B. et al (Eds.).
Interrelationship among aging, cancer and differentiation.
 D. Reidel Publishing, 1985. p. 1-5.

SCHULL, W. J.. The segregation of cancer causing genes in
 human population. **Mutat. Res.**, V. 247, p. 191-198, 1991.

SELLEN, J.R., MOORHEAD, P.S., DEHLERT, M.L., PATTERSON, D.F..
 The giemsa banding pattern of the canine karyotype. **Cancer
 Genetics Cytogenet.**, V. 15, p. 380-387, 1975.

SELLERY, L., HERMANSON, G.G., EUBANKS, J.H., LEWIS, K.A., EVANS,
 G.A.. Molecular localization of the t(11;22)(q24;q12)
 translocation of Ewing sarcoma by chromosomal in situ
 suppression hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V. 88, p.
 887-891, 1991.

SLAGBOOM, P.E., VIJG, J.. Genetic instability and aging:
 theories, facts and future perspectives. **Genome**, V. 31, p.
 373-385, 1989.

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

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

STADTMAN, E.R.. Protein oxidation and aging. **Science**, V. 257, p.
 1220-1224, 1992.



- TAYLOR, A. M., F. J. HARRDEN, D. S. & FAIRBURN, E. A.,
STEFANINI, M., SCAPPATICCI, S., LAGOMARSINI, P., BORRONI, G.,
BERARDESCA, E., NUZZO, F.. Chromosome instability in
lymphocytes from a patient with Werner's syndrome is not
associated with DNA repair defects. *Mutat. Res.*, V. 219, p.
179-185, 1989.
- ST. GEORGE-HYSLOP, P.H., TANZI, R.E., POLINSKY, R.J., HAINES,
J.L., NEE, L., WATKINS, P.C., MYERS, R.H., FELDMAN, R.G.,
POLLEN, D., DRACHMAN, D., GROWDON, J., BRUNI, A., FONCIN,
J.F., SALMON, D., FROMMELT, P., AMADUCCI, L., SORBI, S.,
PIACENTINI, S., STEWART, G.D., HOBBS, W.J., CONNEALLY, P.M.,
GUSELLA, J.F.. The genetic defect causing familial Alzheimer's
disease maps on chromosome 21. *Science*, V. 235, p. 885-890,
1987.
- SOZZI, G., BERTOGLIO, M.G., PRLOTTI, S., RILKE, F., PIEROTTI,
M.A., DELLA PORTA, G.. Cytogenetic studies in primary and
metastatic neuroendocrine Merkel cell carcinoma. *Cancer Genet.*
Cytogenet., V. 30, p. 151-158, 1988.
- SUTHERLAND, B. M., BALCKETT, A. D., FENG, N. N., FREEMAN, S.E.,
OGUT, E.S., RICHARD, W. G., SUTHERLAND, J. C..
Photoreactivation and other ultraviolet/visible light effects
on DNA in human skin. *Annals N. Y. Acad. Sciences*, V. 543,
p.7379, 1985.
- TAKESHITA, T., ARIIZUMI-SHIBUSAWA, CH., SHIMIZU, K., HOSHINO,
H., YAMAGATA, Z., IJIMA, S., ASAKA, A., HIGURASHI, M.. The
effect of ageing on cell-cycle kinetics and X-ray induced
chromosome aberrations in cultured lymphocytes from patients
with Down syndrome. *Mutat. Res.*, V. 275, p. 21-29, 1992.



- TAYLOR, A. M. R.; HARNDEN, D. G. & FAIRBURN, E. A.. Chromosomal instability associated with susceptibility malignant disease in patients with Poroqueratosis of Mibelli. **J. Natl. Cancer Inst.**, V. 51, p. 371-378, 1973.
- TEYSSIER, J.R. The chromosomal analysis of human solid tumors. A triple challenge. **Cancer Genet. Cytogenet.**, V. 37, p. 103-125, 1990.
- THOMPSON, F.H.. Cytogenetic methodological approaches and findings in human solid tumors. In: BARCH, M.J. (Ed.). **The ACT cytogenetics laboratory manual**, 2nd ed., New York: Raven Press, 1991. p. 451-488.
- TRENT, J.M., STRANBRIDGE, E.J., McBRIDE, A.L., MEESE, E.V., CASEY, G., ARAUJO, D.G., WITKOWSKI, C.M., NAGLE, R.B.. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. **Science**, V. 247, p. 568-571, 1990.
- VAZIRI, H., SCHACHTER, F., UCHIDA, I., WEI, L. ZHU, X., EFFROS, R., COHEN, D., HARLEY, C.. Loss of telomere DNA during aging normal and trisomy 21 human. **Am. J. Hum. Genet.**, V. 52, p. 661-667, 1993.
- VIJG, J., VITTERLINDEN, A.G., MULLAART, E., LOHMAN, P.H.M., KNOOK, D.L.. Processing of DNA damage during aging: induction of genetic alteration. In: SOHAL, R.S., BIRBAUM, L.S., CUTLER, R.G. (Eds.). **Molecular biology of aging. Gene stability and gene expression**. New York: Raven Press, 1985. p. 155-172.
- WALLACE, D.C.. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? **Science**, V. 256, p. 628-632, 1992.



- WANG, S., NISHIGORI, Ch., ZHANG, J., TAKEBE, H.. Reduced repair capacity in cells originating from a progeria patient. **Mutat. Res.**, V. 237, p. 253-257, 1990.
- WAREHAM, K.A., LYON, M.F., GLENISTER, P.H., WILLIAMS, E.D.. Age related reactivation of an X-linked gene. **Nature**, V. 327, p. 725-727, 1987.
- WARNER, H.R., PRICE, A.R.. Involvement of DNA repair in cancer and aging. **J. Gerontol.**, V. 44, p. 45-54, 1989.
- WATSON, J. D., HOPKINS, N. H., ROBERTIS, J. W., STEITZ, J. A., WEINER, A. M.. **Molecular biology of gene**. 4th ed.. Menlo Park: The Benjamin/Cummings. 1987. p. 747-1163.
- WEI, Y.H.. Mitochondrial DNA alteration as ageing-associated molecular events. **Mutat. Res.**, V. 275, p. 145-155, 1992.
- WEI, Q., MATANOSKI, G.M., FARMER, E.R., HEDAYATI, M.A., GROSSMAN, L.. DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V. 90, p.1614-1618, 1993.
- WEINBERG, R.A.. Tumor supressor genes. **Science**, V. 254, p. 1138-1146, 1991.
- WITZIG, TH. E., INGLE, J.N., SCHAID, D.J., WOLD, L. E., BALOW, J.F., GONCHOROFF, N.J., GERSTNER, J.B., KROOK, J.E., GRANT, C.S., KATZMANN, J.A.. DNA ploidy and percente S-phase as prognostic factors in node-positive breast cancer: results from patients enrolled in two randomized trials. **J. Clin. Oncol.**, V. 11, p. 351-359, 1993.
- WOLMAN, S.R.. Cytogenetic heterogeneity: its role in tumor evolution. **Cancer Genet. Cytogenet.**, V. 19, p. 129-140, 1986.



WONG, S.W., WAHL, A.F., PEARSON, B.E., MOHANDAS, T., SHAPIRO, L.J., FRANCKE, U., KORN, D., WANG, T.S.F.. The structural gene of human DNA polymerase alpha (POLA) is located on the short arm of the X chromosome. **Cytogenet. Cell Genet.**, V. 46, p. 719, 1987.

YAMAMOTO, H., SOHMIYA, M., OKA, N., KATO, Y.. Effects of aging and sex on plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in normal adults. **Acta Endocrinol.**, V. 124, p. 497-500, 1991.

YANCIK, R., RIES, L.G.. Cancer in the aged. An epidemiologic perspective on treatment issues. **Cancer**, V. 68, p. 2502-2510, 1991.

YEN, T. Ch., SU, J.H., KING, K.L., WEI, Y. H.. Ageing associated 5 Kb deletion in human liver mitochondrial DNA. **Biochem. and Biophys. Res. Comm.**, V. 178, p. 124-131, 1991.

concentração final 125 U/ml : 125 ug/ml

- 20 ml de soro fetal bovino (CULTILAB)

- 1 ml de solução de glutamina 200 mM

- 20 ml de solução de insulina

Sua estocagem foi feita a 4°C por um período

aproximado de 30 dias.

b. Solução salina de Hanks sem Ca e Mg

- 8 g de NaCl

- 0,4 g de KCl

- 1,0 g de glicose

- 60 mg de KH_2PO_4

- 47,5 mg de Na_2HPO_4

- 17 mg de vermelho de fenol



IX. APENDICE

Meios de cultura e soluções utilizadas

a. Meios de cultura

a.1. Meio incompleto

— 9,8 g do pó de meio de cultura Ham F-10 (SIGMA) e 0,6 g de bicarbonato de sódio foram diluídos em 1000 ml de água desionizada autoclavada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4°C, por períodos de até um mês.

a.2. Meio completo

— 100 ml de meio de cultura incompleto
— 1 ml de solução de penicilina/estreptomicina, concentração final 125 U/ml : 125 ug/ml
— 20 ml de soro fetal bovino (CULTILAB)
— 1 ml de solução de glutamina 200 mM
— 20 ul de solução de insulina
— 50 ul de anfotericina B (concentração final 2,5 ug/ml)
Sua estocagem foi feita a 4°C por um período aproximado de 30 dias.

b. Solução salina de Hanks sem Ca e Mg

c. Solução de penicilina/estreptomicina (12500 U/ml /

12500 ug/ml)
— 8 g de NaCl
— 0,4 g de KCl
— 1,0 g de glicose
— 60 mg de KH_2PO_4
— 47,5 mg de Na_2HPO_4
— 17 mg de vermelho de fenol



- concentração de 300.000 ug/ml, preparada a partir da solução
- 1000 ml de água desionizada

A solução foi estocada a -20°C , por seis meses.

b.1. Para transporte de amostras

- 100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

- 2 ml de solução de penicilina/estreptomicina

(concentração final 250 U/ml : 250 ug/ml) ou de penicilina/quemicetina (concentração final 250 U/ml : 10 ug/ml)

- 0,2 ml de sulfato de gentamicina (concentração

final 0,04 mg/ml)

A solução foi estocada a 4°C por seis meses.

b.2. Para lavagem das amostras

- 100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

- 2 ml de solução de penicilina/estreptomicina

(concentração final 250 U/ml : 250 ug/ml) ou de penicilina/quemicetina (concentração final 250 U/ml : 10 ug/ml)

- 0,2 ml de sulfato de gentamicina (concentração

final 0,04 mg/ml)

- 50 ul de anfotericina B (concentração final 2,5

ul/ml)

A solução foi estocada a 4°C por seis meses.

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

- 0,5 ml de solução-mãe de penicilina com

concentração de 1.000.000 U/ml, preparada a partir da solução comercial (SQUIBB) diluída em água desionizada estéril

- 1 ml de solução-mãe de estreptomicina com

concentração de 500.000 ug/ml, preparada a partir da solução comercial (CEME) diluída em água desionizada estéril

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

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

d. Solução de penicilina/quemisetina (12500 U/ml / 500 ug/ml)

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

- 0,5 ml de solução-mãe de quemisetina com concentração de 40.000 ug/ml, preparada a partir da solução comercial (CARLO-ERBA) diluída em água desionizada estéril

- 39 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

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

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

- 2,92 g de L-glutamina

- 100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

Foi esterilizada por filtração e estocada a -20°C pelo período de um ano, no máximo.

f. Solução de insulina (BIOBRAS U-40) (40 U/ml)

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



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

A solução comercial possui concentração final de 20 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada a 4°C pelo período de um ano e meio, no máximo.

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

- 50 mg de anfotericina B

- 10 ml de água desionizada estéril

A solução foi estocada a -20°C por seis meses.

i. Solução de collagenase (GIBCO-TIPO II) (200 U/ml)

A solução de collagenase foi obtida dissolvendo-se a substância em meio incompleto (concentração final de 200 U/ml). A solução foi mantida em banho-maria a 37°C por duas horas e, em seguida, a 4°C por 12 a 14 horas. Após esse período, a solução foi esterilizada por filtração e estocada em alíquotas de 0,5 ml a -20°C por dois a três meses.

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

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

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



k. Solução hipotônica

Solução aquosa de citrato de sódio 1% estocada à temperatura ambiente ou a 4°C, por dois a três meses.

l. Fixador

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

Foi preparado pouco antes do uso.

m. Tampão Sorensen

- 49 ml de solução A
- 51 ml de solução B
- 200 ml de água desionizada

Foi preparado pouco antes do uso.

m.1. Solução A

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

m.2. Solução B

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

n. Solução salina de PBS

- 8,0 g de NaCl
- 0,2 g de KCl
- 1,15 g de difosfato de sódio (Na_2PO_4)
- 0,2 g de monofosfato de potássio (KH_2PO_4)



- 100 ml de água desionizada

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

O A Q A O D	
Nº 14	Po 00
Data 00/00/00	
Assinatura	
M. S. O. 00/00/00	

o. Soluções de tripsina

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

A solução foi preparada dissolvendo-se 0,006 g de tripsina em 60 ml de PBS, minutos antes do uso.

o.2. Solução de tripsina/EDTA (CULTILAB) para repique das culturas

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

p. Solução de Giemsa (MERCK)

p.1. Solução-mãe

A solução foi obtida dissolvendo-se 0,5 g de Giemsa em 33 ml de glicerina aquecida a 60°C e agitando-se com bastão de vidro. Após completada a dissolução e o resfriamento, foram adicionados 33 ml de metanol, agitando sempre. A solução foi filtrada e estocada em frasco escuro, à temperatura ambiente.

p.2. Solução de uso (2%)

- 0,5 ml de solução-mãe de Giemsa

- 24,5 ml de tampão Sorensen



