

Agnes Cristina Fett Conte

**Estudo Cromossômico em Leucemia,
Linfoma e Câncer de Pulmão**

ANEXO CROMOSSOMAL DO TUMOR

ESTUDO CROMOSSÔMICO EM LEUCEMIA LINFOMA E CÂNCER DE PULMÃO

1910000380



AGNES CRISTINA FETT CONTE

ESTUDO CROMOSSÔMICO EM LEUCEMIA, LINFOMA E CÂNCER DE PULMÃO

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

Orientador Prof. Dr. Marilene Yarelli-Garcia

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

1987



T-380/88



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Orientador: Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia



Dedico este trabalho

A meus pais, Hitler e Neyre,

gratidão eterna.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

"Se alguma coisa sobre a terra merece o nome de felicidade é
aquela íntima sensação, aquele íntimo sentimento moral resultante
do emprego de nossas faculdades na investigação da verdade
e na prática da virtude".

Gaspard M. de Jovellanos

AGRADECIMENTOS

As D^{as}. Eloíza Helena Tajira da Silva e Marieli da Veralla Garcia pela confiança, amizade e estímulo constante e pela orientação no planejamento e execução deste projeto.

A Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith, pelo carinho, atenção e por todas as sugestões recebidas durante a análise da pro-fo.
Dedico este trabalho

As Professoras Ana Elizabete Silva, Eliana Marielle e Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, sempre dispostas a compartilhar das minhas emoções, pelo ombro amigo e pela colaboração.

A meus pais, Hitler e Meyre, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo e pelo clima familiar com que os meus estudos são recebidos.
A meus pais, Hitler e Meyre,
amigos constantes.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e estagiários do Departamento de Biologia, pela convivência amigável, interesse e consideração sempre demonstrados.

Ao José Carlos, companheiro inigualável.
Ao José Carlos, companheiro
inigualável.

A Dra. Maria Eugênia da Silva Fernandes e a Pós-graduanda Eugênia Costanzi, da Escola Paulista de Medicina, pela análise da enzima esterase D do caso 1.

Aos D^{rs}. Ana Maria C. Rossi, Arivaldo Castanheira, Ivan de Lucena Angulo, José Furini Neto, Octávio Picot Júnior e aos residentes do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, pelo encaminhamento dos pacientes e interesse demonstrado.

Ao Dr. James Robert Coleman, pelo auxílio na re-

"Se alguma coisa sobre a terra merece o nome de felicidade é aquela íntima sensação, aquele íntimo sentimento moral resultado do emprego de nossas faculdades na indagação da verdade e na prática da virtude".

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das

Gaspar M. de Jovellanos

AGRADECIMENTOS

Às Dras. Eloiza Helena Tajara da Silva e Marilei la Varella Garcia pela confiança, amizade e estímulo constantes e pela orientação no planejamento e execução deste projeto.

À Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith, pelo carinho, atenção e por todas as sugestões recebidas durante a análise da pro-forma.

Às Professoras Ana Elizabete Silva, Eliana Morielle e Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, sempre dispostas a compartilhar das minhas emoções, pelo ombro amigo e pela colaboração.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo e pelo clima familiar com que todos os pós-graduandos são recebidos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e estagiários do Departamento de Biologia, pela convivência amigável, interesse e consideração sempre demonstrados.

Aos funcionários e amigos Josué Rodrigues dos Santos, Rosana Silistino e aos demais, pelo auxílio nos serviços laboratoriais e datilográficos.

À Dra. Maria Eugênia da Silva Fernandes e a Pós-graduanda Eugênia Costanzi, da Escola Paulista de Medicina, pela análise da enzima esterase D do caso 1.

Aos Drs. Ana Maria C. Rossi, Ariovaldo Castanheira, Ivan de Lucena Angulo, José Purini Neto, Octávio Ricci Júnior e aos residentes do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, pelo encaminhamento dos pacientes e interesse demonstrado.

Ao Dr. James Robert Coleman, pelo auxílio na revisão do Summary.

Aos pacientes e seus familiares, pela contribuição imprescindível e exemplo de amor à vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

Í N D I C E

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Neoplasias: conceito e classificação	1
I.2. Cromossomos e neoplasias	6
I.3. Oncogenes	10
I.4. Sítios frágeis	12
I.4.1. Nomenclatura	13
I.4.2. Padrões de indução	20
I.4.3. Natureza dos sítios frágeis	20
I.4.4. Efeitos fenotípicos	23
I.5. Objetivos	24
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
II.1. Caracterização da casuística	26
II.2. Estudo laboratorial	28
III. RESULTADOS.....	32
IV. DISCUSSÃO.....	54
IV.1. Anomalias cromossômicas e neoplasias	54
IV.2. Sítios frágeis e neoplasias	64
IV.3. Heteromorfismos e neoplasias	68
IV.4. Exposição ocupacional, hábito de fumar e neoplasias	72
IV.5. Condições de cultivo celular e clastogenicidade...	75
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	79
VI. SUMMARY	83
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

I. INTRODUÇÃO

I.1. Neoplasias: conceito e classificação

As neoplasias (do grego neo, novo e plasis, forma) ou neoplasmas são distúrbios patológicos do crescimento celular caracterizados por uma proliferação relativamente autônoma, excessiva e incessante de células, que resulta de uma alteração induzida por fatores de diferentes naturezas e que pode ser transmitida às células filhas. O termo câncer (do latim, significando caranguejo), também tem sido usado como sinônimo de neoplasma. Popularmente, o neoplasma é referido como tumor, que significa, simplesmente, uma inchação de qualquer etiologia.

Os neoplasmas são considerados benignos quando crescem lentamente e permanecem localizados, geralmente, causando poucos distúrbios aos pacientes acometidos. Suas células podem ser típicas do tecido de origem e, geralmente, possuem um ritmo de crescimento progressivo e lento, podendo chegar a um limite e regredir. Quando tendem a se disseminar pelo organismo, por um processo denominado metástase, causando maiores prejuízos aos seus hospedeiros, os neoplasmas são classificados como malignos. Comumente, a estrutura das células destes neoplasmas é atípica e o seu ritmo de crescimento é oscilante, variando de lento a rápido (DIAMANDOPOULOS & MEISSNER, 1985; ROBBINS e col., 1986).

As neoplasias podem ser de vários tipos, em função da célula primordialmente envolvida (DIAMANDOPOULOS & MEISSNER, 1985). A maioria dos tumores benignos é classificada histologicamente, adicionando-se o sufixo "oma" ao tipo celular



que o constitui. Assim, por exemplo, são designados de miomas, os originados de células musculares, de adenomas os originados de células glandulares e de lipomas os originados de células adiposas.

As neoplasias malignas, por sua vez, são chamadas carcinomas, quando originadas de células epiteliais de qualquer uma das três camadas germinativas, sarcomas, quando derivadas do tecido conjuntivo ou mesenquimal, e leucemias ou linfomas, quando referentes ao tecido hematopoético. Sempre que possível, a denominação especifica o órgão ou tecido de origem. Por exemplo, designa-se carcinoma espinocelular broncogênico a neoplasia maligna das células escamosas do trato respiratório, de lipossarcoma a derivada do tecido gorduroso e de linfossarcoma a do tecido linfático.

Há muitos anos, as leucemias têm sido separadas em duas grandes categorias, as agudas e as crônicas. As primeiras referem-se a doenças de curso rápido e fatal na maioria dos pacientes e caracterizam-se pela presença de células blásticas indiferenciadas ou pobremente diferenciadas. As formas crônicas são doenças de curso longo e apresentam células bem diferenciadas. Uma subdivisão adicional dentro de cada uma dessas categorias divide-as em mielóide ou não linfocítica e linfóide ou linfocítica, referindo-se ao tipo celular predominante.

Os linfomas são doenças neoplásicas caracterizadas pela proliferação extramedular de células linforreticulares e são divididos, com base nos aspectos histológicos do tumor, em dois grupos principais: doença de Hodgkin e linfoma não Hodgkin. Esses diferem histopatologicamente, apresentando quadros particulares de manifestações clínico-laboratoriais (MIALE, 1977; JAMRA-LORENZI, 1983).



As leucemias e os linfomas, ainda hoje, têm sido classificados, principalmente, com base em suas características morfológicas. Duas dessas classificações, a FAB (French-American-British Cooperative Group), específica para leucemias agudas (BENNETT e col, 1976) e a de WINTROBE (1981) estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

No entanto, o desenvolvimento recente na área imunológica tem permitido o reconhecimento das células malignas em vários estágios de diferenciação, através de anticorpos monoclonais específicos para antígenos de superfície (FOON & TODD, 1986). Além disso, a realização de testes envolvendo reações citoquímicas e ensaios enzimáticos e de técnicas de bandamento cromossômico de alta resolução também tem levado à identificação de subgrupos caracterizados por aberrações cromossômicas específicas (cf YUNIS, 1983). Sem dúvida, a combinação de critérios morfológicos, imunológicos e citogenéticos deve refletir uma compreensão maior da patogênese e diferenciação das leucemias e linfomas.

Esses mesmos progressos não têm sido observados com relação aos tumores sólidos, tanto sarcomas como carcinomas. Tais neoplasmas têm sido classificados quase que exclusivamente com base em critérios morfológicos (ROBBINS e col, 1986). A utilização de dados citogenéticos na classificação é prejudicada, principalmente, pela falta de técnicas satisfatórias para a preparação dos cromossomos e pela dificuldade na análise dos mesmos, uma vez que esses tumores tendem a exibir muitas alterações cromossômicas numéricas e estruturais (PATHAK, 1986; TRENT e col, 1986).



Tabela 1. Classificação das doenças neoplásicas do sistema hematopoético, segundo WINTROBE (1981), com modificações.

I. LEUCEMIAS

A. Leucemia Mielóide

1. Leucemia mielóide crônica (LMC)

- a. Típica (Ph_1^1 - positiva)
- b. Atípica (Ph_1^1 - negativa)
- c. Juvenil (Ph_1^1 - negativa)
- d. Eosinofílica
- e. Basofílica
- f. Monocítica

2. Leucemia mielóide aguda (LMA)

- a. Mieloblástica
- b. Mielomonoblástica
- c. Monocítica
- d. Promielocítica
- e. Eritroblástica
- f. Eosinofílica
- g. Basofílica
- h. Megacariocítica

B. Leucemia Linfóide

1. Leucemia linfóide crônica (LLC)

- Leucemia crônica de células linfossarcomatosas

2. Leucemia linfóide aguda (LLA)

- a. subclassificação baseada nos marcadores de superfície
 - tipo comum (tipo Null)
 - célula "B"
 - célula "T"

- b. Leucemia aguda das células linfossarcomatosas

II. LINFOMAS (Tumores primários dos órgãos linfóides)

A. Doença de Hodgkin

- 1. Esclerose nodular
- 2. Predominância linfocítica
- 3. Celularidade mista
- 4. Deficiência linfocítica

B. Linfomas não Hodgkin

1. Variantes comuns

- a. Difuso ou nodular
- b. Linfocítico bem diferenciado
- c. Linfocítico mal diferenciado
- d. Histiocítico
- e. Misto
- f. Linfocítico indiferenciado

2. Variantes incomuns

- a. Linfoma de Burkitt
- b. Sarcoma imunoblástico
- c. Micose fungóide (Síndrome de Sézari)

Tabela 2. Classificação FAB das leucemias agudas.

Subtipo FAB	Características
MIELOÍDE AGUDA	
M1	mieloblástica sem maturação
M2	mieloblástica com maturação
M3	promielocítica, hipergranular
M3V	promielocítica, microgranular
M4	mielomonocítica
M5a	monocítica, pobremente diferenciada
M5b	monocítica, bem diferenciada
M6	eritroleucemia
LINFÓIDE AGUDA	
L1	células pequenas; morfologia homogênea
L2	células grandes; morfologia heterogênea
L3	células grandes; morfologia homogênea

I.2. Cromossomos e neoplasias

Inúmeros estudos têm sugerido a participação de alterações genéticas no desenvolvimento do câncer. Um dos achados que reforçam essa hipótese é a existência de condições hereditárias de câncer como, por exemplo, o retinoblastoma e tumor de Wilms, herdados com um padrão recessivo, ou variantes de câncer de mama, polipose de cólon, carcinoma de cólon e a neurofibromatose, herdados com padrão dominante, muitas vezes com penetração incompleta (MARKS, 1981; KNUDSON, 1985; HARNDEN, 1985, para referências). Todavia, na maior parte dos exemplos de neoplasias consideradas hereditárias, verifica-se que o que existe é a herança de uma predisposição ao desenvolvimento dos tumores. Essa predisposição familiar foi destacada também por HARNDEN (1983) em relação à resposta a agentes ambientais considerados carcinógenos.

Outras indicações da base genética da transformação celular são dadas pela demonstração de que os agentes mutagênicos podem atuar como carcinogênicos (ROWLEY, 1983, 1985; FORNI, 1984; GEBHART, 1984; MITELMAN, 1984). A maioria dos compostos mutagênicos-carcinogênicos tem como alvo principal a molécula de DNA, sendo que o tipo de lesão ocorrida depende do agente em questão. Radiações ionizantes e agentes químicos de gradantes, como a bleomicina e seus análogos, induzem a ocorrência de quebras nas cadeias do DNA. Ondas curtas de U.V. promovem a formação de dímeros de pirimidinas, enquanto que agentes alquilantes, como a ciclofosfamida e a mitomicina C, e intercalantes como actinomicina D e daunomicina desestabilizam a molécula e interferem nas suas funções de duplicação e transcrição. Além disso, há substâncias que atuam como antagonistas

das bases nitrogenadas ou dos folatos inibindo, consequentemente, os processos normais de síntese.

As lesões induzidas por esses agentes estão potencialmente sujeitas ao reparo celular e aquelas não reparadas, ou só parcialmente reparadas, originam aberrações cromossômicas. As aberrações cromossômicas, por sua vez, também podem participar da etapa de iniciação como definir a fase de promoção de um tumor (LEVAN & MITELMAN, 1975; NOWELL, 1976; MITELMAN & LEVAN, 1981; EVANS, 1982; RADMAN, 1982; SASAKI, 1982; NATARAJAN, 1984; DE LA CHAPELLE & BERGER, 1984; SANDBERG, 1984; DEWALD e col, 1985; POPESCU & DIPAOLO, 1985; MITELMAN, 1986).

A primeira referência de uma possível relação causal entre aberrações cromossômicas e câncer é atribuída ao zoólogo alemão Theodore Boveri, pela formulação da hipótese da "mutação somática" para a origem do câncer, em 1914. De acordo com Boveri, a célula primordial de um crescimento maligno seria uma célula somática com uma constituição da cromatina anômala, que levaria à perda das propriedades normais da célula (CROCE & KOPROWSKI, 1978; NERI, 1984; ambos para referência).

A associação de uma aberração cromossômica com um tipo específico de câncer foi feita pela primeira vez por NOWELL & RUNGERFORD (1960), que relacionaram a deficiência parcial de um pequeno cromossomo do grupo G, nas células de medula óssea, com a leucemia mielóide crônica dos pacientes. O cromossomo alterado foi denominado "Philadelphia" ou Ph^1 , por TOUGH e col (1961) e foi reconhecido por ROWLEY (1973) como um cromossomo 22, que se apresentava envolvido em uma translocação, geralmente com o cromossomo 9.

Posteriormente, inúmeros tipos de câncer foram sendo associados com aberrações cromossômicas específicas



(MITELMAN & LEVAN, 1981; MITELMAN, 1983; YUNIS e col, 1981, 1982; HART, 1983; YUNIS, 1983, 1985a,b; SANDBERG e col, 1984; BLOOMFIELD, 1985, entre outros), alguns dos quais estão apresentados na Tabela 3.

Observa-se, nesta tabela, que a maior parte das aberrações cromossômicas preferenciais encontradas em neoplasias apresentam-se como translocações recíprocas e deficiências. GILBERT (1983, 1985) destacou, também, a ocorrência frequente de duplicações, manifestadas como trissomias completas ou parciais e de amplificações gênicas, que consistem na multiplicação de determinadas seqüências que podem permanecer incorporadas ao cromossomo, na forma de regiões homogeneamente coradas (HSR) ou se manifestarem como fragmentos cromossômicos pareados, os "double minutes" (DM). Ambos são encontrados em vários tipos de neoplasmas humanos, como por exemplo, em neuroblastomas (GEBHART e col, 1983; BULLERDIEK e col, 1985; BRODEUR & SEEGER, 1986; MELTZER e col, 1986).

Outras anomalias, como as inversões, são eventos mais raros. Entretanto, algumas já foram encontradas com frequência em certos tipos de câncer, como é o caso da inversão pericêntrica do cromossomo 16, comum nas leucemia mielóide aguda do tipo M4 (YUNIS, 1985a).

Na maioria dos casos, as anomalias cromossômicas das células malignas são adquiridas e tem uma origem clonal, ou seja, originam-se na célula primordial do crescimento maligno sendo, portanto, específicas do tecido neoplásico (NOWELL, 1976). Entretanto, algumas anomalias cromossômicas constitucionais também relacionam-se a neoplasmas específicos. Exemplos desta situação são as deficiências da banda 13q14, no retinoblastoma



Tabela 3. Neoplasias associadas com aberrações cromossômicas específicas, segundo YUNIS (1985a), com modificações.

Doença	Aberração cromossômica	Pontos de quebra ou deficiência
LEUCEMIAS		
Leucemia mielóide crônica	t(9;22)	9q34.1 e 22q11.21
Leucemia mielóide aguda		
M1	t(9;22)	9q34.1 e 22q11.21
M2	t(8;21)	8q22.1 e 21q22.3
M3	t(15;17)	15q22 e 17q11.2
M1, M2, M4, M5, M6	del 5q del 7q +8	5q13 e 5q31 7q22 e 7 q32
Leucemia linfóide crônica	t(11;14) +12	11q13.3 e 14q32.3
Leucemia linfóide aguda		
L1	t(1;19) t(11;14)	1q23? e 19p13? 11p13-14 e 14q13
L2	t(4;11)	4q21 e 11q23
L3	t(8;14)	8q24.13 e 14q32.33
LINFOMAS		
Tipo Burkitt	t(8;14)	8q24.13 e 14q32.33
Linfoma difuso	del 6q	q21 e q25
CARCINOMAS		
Neuroblastoma	del 1p	1p31 e p36
Câncer de pulmão	del 3p	3p14 e p23-24
Retinoblastoma	del 13q	13q14
Tumor de Wilms	del 11p	11p13

(YUNIS E RAMSAY, 1978; POTLURI e col, 1986), e da banda 11p13, no denominado complexo WAGR, constituído por tumor de Wilms, aniridia, anomalias de genitalia e retardo mental (NAKAGOME e col, 1984; SLATER, 1986).

I.3. Oncogenes

Oncogenes são genes com potencial para a indução da transformação neoplásica em condições naturais ou experimentais. Mais de trinta oncogenes foram identificados no cariótipo humano, muitos dos quais já estão mapeados (GORDON, 1985; PIMENTEL, 1985). Estes genes, aparentemente, desempenham funções normais e têm um importante papel no controle da divisão celular sendo, neste estado, definidos como proto-oncogenes (WILLECKE & SCHÄFER, 1984). Seus produtos têm sido identificados e compreendem fatores de crescimento, receptores da membrana plasmática, moduladores da transmissão de sinais através da membrana, ou substâncias que parecem atuar no núcleo celular, agindo diretamente sobre a duplicação ou transcrição do DNA (GORDON, 1985).

A ativação de um proto-oncogene poderia levar à divisão celular desordenada e contribuir para a patogênese do câncer. Vários mecanismos que podem levar a essa ativação já foram identificados. Entre eles, estão a ocorrência de mutação gênica em ponto, ou seja, de uma alteração espontânea ou induzida por agentes físicos ou químicos em um pequeno segmento gênico, e de amplificação gênica, um fenômeno pelo qual o oncogene passa por duplicações sucessivas, resultando em várias cópias ativas do mesmo em uma mesma célula.

Um oncogene pode também ser ativado por incorpora

ção por um retrovirus. Quando este infecta uma célula animal, pode incorporar do hospedeiro um oncogene inativado, que passará a fazer parte do seu complemento genético, assim como do de sua progênie. Este processo, algumas vezes, ativa o oncogene e uma infecção subsequente por aquela linhagem virótica poderá induzir uma transformação neoplásica na nova célula hospedeira.

Finalmente, a ativação de um oncogene pode ocorrer como consequência de uma aberração cromossômica. Esta, por exemplo, pode levar à introdução do oncogene em uma posição próxima a seqüências gênicas reguladoras, que estimulam sua produção ou, possibilitam que o oncogene escape dos mecanismos que normalmente controlam sua expressão no cromossomo de origem, levando assim ao desenvolvimento do processo maligno. Esse tipo de ativação é o que ocorre com o oncogene c-myc no linfoma de Burkitt, um câncer que afeta os linfócitos B do sistema imune (CROCE & KLEIN, 1985).

Através de técnicas de hibridização de células somáticas ou hibridização molecular *in situ*, foram localizados vários oncogenes em regiões cromossômicas envolvidas em translocações recíprocas e em deficiências cromossômicas frequentes em certas neoplasias humanas. Como exemplo, pode-se citar a localização de c-erb-B2 em 7p11 (KHAN & SMITH, 1984), de c-myc em 8q24 (DALLA-FAVERA e col, 1982, 1983; NEEL e col, 1982; TAUB e col, 1982), de c-mos em 8q22 (NEEL e col, 1982), de c-abl em 9q34 (DE KLEIN e col, 1982), de c-bcl-1 em 11q13 (ERIKSON e col, 1984), de c-ras-H e c-ras-K em 11p14.2, 12p12.1 e 12q23.2 (JHANWAR, 1983; GORDON, 1985, para referências), de c-myb e c-fes em 6q22.24 e 15q25.26 (HARPER e col, 1983), de c-erb-A em 17q11.2 (MITELMAN e col, 1986) e de c-bcl-2 em 18q21 (PEGORARO e col, 1984).

Embora a função dos oncogenes nas células normais

ainda não esteja totalmente esclarecida, o fato deles serem altamente conservados ao longo da evolução reforça a conclusão de que desempenham papéis essenciais para a célula, como o controle do crescimento e diferenciação celular (WEINBERG, 1983; HUNTER, 1984). Sua associação com determinadas regiões cromossômicas em neoplasias, portanto, não deve ser casual.

I.4. Sítios frágeis

Conforme definição proposta originalmente por SUTHERLAND (1979a), os sítios frágeis (SF) consistem em regiões cromossômicas específicas que se caracterizam por uma falha, geralmente cromossômica, herdada com padrão codominante, que sob determinadas condições *in vitro* originam fragmentos acêntricos, cromossomos com deficiências e figuras multirradiais. Esta última característica é referida como manifestação essencial para a classificação de um SF raro (SUTHERLAND, 1983).

O primeiro exemplo de fragilidade cromossômica foi descrito por DEKABAN, em 1965, no braço longo de um cromossomo do grupo C. LEJEUNE, em 1968, foi o pioneiro em referir a herdabilidade dessa característica, ao descrever o sítio 2q1 em uma mulher e sua filha (cf. SUTHERLAND, 1979b).

Na mesma época, LUBS (1969), estudou uma família com deficiência mental associada a um cromossomo X marcador, caracterizado por uma constrição secundária na porção distal do braço longo. Tal marcador foi observado com uma frequência de 10 a 33% em células de quatro homens com retardo mental severo

e com frequência de 0 a 28% em células de sete mulheres normais da mesma família. No ano seguinte, MAGENIS e col (1970) designaram como "sítio frágil" a região distal do braço longo do cromossomo 16, caracterizada pelo aparecimento de quebras frequentes nesta região, em um probando com deficiência de imunoglobulina A e em outros membros normais de sua família.

A partir destes trabalhos, muitas outras regiões foram identificadas *in vitro* como SF e já foram observados em linfócitos, fibroblastos, amniócitos, híbridos de células somáticas e outros tipos celulares (MAGENIS e col, 1970; SUTHERLAND, 1979b; JACKY & DILL, 1980; JENKINS e col, 1981; JACOBS e col, 1982; BRYANT e col, 1983; NUSSBAUM e col, 1983; HECHT & HECHT, 1984a e b; LI & ZHOU, 1985; SMEETS e col, 1985; PETIT e col, 1986, entre outros).

I.4.1. Nomenclatura

Com base nas regras propostas pela Paris Conference (1971) Supplement (1975), para a caracterização de anomalias cromossômicas, os SF foram designados pelo símbolo fra seguido pela banda cromossômica onde cada um se localizava. Entretanto, com o número crescente de descrições de sítios frágeis surgiram dificuldades em relação a esta nomenclatura. Por exemplo, existem dois sítios frágeis em 8q24, um em 8q24.1 e outro em 8q24.3 (YUNIS & SORENG, 1984), e o símbolo do SF deveria incluir a sub-banda para que a informação transmitida fosse correta. Para simplificar foi proposto na 8ª Conferência Internacional Sobre Mapeamento Genético Humano (BERGER e col, 1985a), que os SF em cada cromossomo fossem identificados por uma letra após a expressão FRA seguida pe

lo número do cromossomo. Assim, o fra(X)(q27.3) pode ser agora designado, resumidamente por FRAXA, sendo que cada novo sítio descrito nesse cromossomo terá a próxima letra do alfabeto para distinguí-lo.

A Tabela 4 apresenta a localização de 18 sítios frágeis raros já descritos no cariótipo humano e seu estado, em relação ao grau de confirmação o que é indicado por C (localização confirmada) e P (localização com evidência considerável) (BERGER e col, 1985a).

I.4.2. Padrões de Indução

As primeiras observações dos SF foram feitas quando a maioria dos laboratórios de citogenética humana usava o meio TC 199 para cultura de linfócitos, um meio relativamente pobre em vitaminas, inclusive ácido fólico. A partir do início da década de 70, a mudança desse meio para outros que permitiam melhores índices mitóticos impediu que tais sítios fossem observados, durante anos. O desenvolvimento de estudos nesta área só ocorreu quando SUTHERLAND (1977) reexaminou famílias que haviam apresentado SF em estudos anteriores, utilizando o meio TC 199, e percebeu que tal não ocorria com outros meios de cultura. Esta observação levou-o a concluir que a manifestação de SF era induzida por fatores presentes no meio de cultura. A partir daí, inúmeros trabalhos foram publicados avaliando as características de expressão desse fenômeno cromossômico.

De acordo com a frequência com a qual se manifestam na população, os SF têm sido agrupados em diferentes classes. Segundo SUTHERLAND e col (1985a), os SF são designados ra

Tabela 4. Localização dos sítios frágeis raros segundo BERGER e col (1985a), modificada. C = confirmado, descrito por mais de um laboratório; P = provisório, descrito com evidência considerável por um laboratório.

SÍTIO FRÁGIL	LOCALIZAÇÃO	ESTADO
FRA2A	2q11.2	C
FRA2B	2q13	C
FRA6A	6p23	P
FRA7A	7p11.2	C
FRA8A	8q22.3	C
FRA9A	9p21.1	C
FRA9B	9q32	P
FRA10A	10q23.3	C
FRA10B	10q25.2	C
FRA11A	11q13.3	C
FRA11B	11q23.3	P
FRA12A	12q13.1	C
FRA16A	16p12.3	C
FRA16B	16q22.1	C
FRA17A	17p12	C
FRA20A	20p11.23	C
FRA22A	22q13	P
FRAXA	Xq27.3	C

ros quando se encaixam na definição proposta originalmente por SUTHERLAND (1979a) e têm baixos índices de expressão na população. Nestas condições, estão os 18 SF já referidos, um deles localizado no cromossomo X e os demais em autossomos (SUTHERLAND, 1979b, 1982a; SUTHERLAND e col, 1980, 1985a). A outra classe proposta por SUTHERLAND e col (1985a) é a dos SF comuns, que são assim chamados porque são encontrados em grande número de indivíduos e muitas vezes em homozigose (SUTHERLAND, 1983; HOWARD-PEEBLES, 1984). Mais de 50 desses SF comuns já foram identificados no cariótipo humano (GLOVER e col, 1984; YUNIS & SORENG, 1984), e alguns deles também no cariótipo de primatas (YUNIS & SORENG, 1984; SCHMID e col, 1985).

Com base nas condições de cultivo necessárias para sua expressão, SUTHERLAND e col (1985a) e BERGER e col (1985a) classificam os SF raros em três grupos:

- Grupo 1: SF sensíveis ao folato. Sua expressão em células cultivadas é induzida sob condições de escassez de ácido timidílico, decorrente da privação de ácido fólico, ou pela inibição da redutase do hidrofolato (SUTHERLAND, 1979a,b; SUTHERLAND & HINTON, 1981). Tais condições são obtidas pela adição nas culturas de antagonistas do ácido fólico, como o metotrexato (MTX), trimetoprim ou pirimetamina (LEJEUNE e col, 1982; CALVA-MERCADO e col, 1983; SUTHERLAND e col, 1983), de inibidores da sintetase do ácido timidílico, como 5-fluorodesoxiuridina (FUdR), fluorodesoxicitidina (FCdR) e trifluorotimidina (GLOVER, 1981; TOMMERUP e col, 1981; GLOVER & HOWARD-PEEBLES, 1983; JACKY & SUTHERLAND, 1983) ou, ainda, pela presença de concentrações de timidina muito elevadas (SUTHERLAND e col 1985b; SUTHERLAND & BAKER, 1986). Estes SF são os apresentados na Tabela 4 como FRA2A, FRA2B, FRA6A, FRA7A, FRA8A, FRA9A, FRA9B,

FRA10A, FRA11A, FRA11B, FRA12A, FRA16A, FRA20A, FRA22A e FRAXA.

- Grupo 2: SF sensíveis à distamicina A. O FRA16B foi o primeiro identificado como insensível ao ácido fólico (SUTHERLAND, 1979a), pois tem expressão espontânea em muitos indivíduos. Posteriormente, verificou-se que sua frequência podia ser aumentada por interferon e distamicina A (DUNNER e col, 1983; SHABTAI e col, 1983a). O FRA17A, também enquadrado neste grupo, havia sido citado desde a década de 60 (cf GIRAUD e col, 1976) e apesar de ter sido proposto como um SF por SHABTAI e col (1982), só mais recentemente foi aceito como tal (SUTHERLAND e col, 1984). Os SF do grupo 2 também podem ter suas frequências aumentadas pela adição de Netropsin, Hoechst 33258, bromodesoxiuridina (5-BrdU) e bromodesoxicitidina (BrdC) (CROCI, 1983; SUTHERLAND e col, 1984; SCHMID e col, 1986).

- Grupo 3: SF induzíveis por 5-BrdU, sendo o FRA10B o único classificado neste grupo (SCHERES & HUSTINX, 1980; SUTHERLAND e col, 1980; SUTHERLAND, 1982b; GOLLIN e col, 1985a; TAKAHASHI e col, 1985). Este sítio é também referido como sensível à BrdC (SUTHERLAND e col, 1984) e há indicações de sua expressão espontânea em frequências que podem ser (TAYLOR & BUNDEY, 1983; GOLLIN e col, 1985b) ou não (PETIT & FRYNS, 1983) aumentadas pela adição de BrdU.

Assim como os SF raros, os comuns apresentam-se induzíveis, ou têm um aumento em suas frequências, sob determinadas condições de cultivo. Com base nessas características, eles também são classificados em três grupos (SUTHERLAND e col, 1985a; BERGER e col, 1985a):

- Grupo 1: SF induzíveis por afidicolina. Estes sítios apresentam baixo nível de expressão em condições de defi

ciência de folato (DANIEL e col, 1984), mas podem ser induzidos em culturas celulares por afidicolina (GLOVER e col, 1984; HECHT e GLOVER, 1984), ou cafeína (YUNIS & SORENG, 1984; GLOVER e col, 1986). Alguns, como o 16q23.24, também podem ser induzidos pela adição de uridina ao meio de cultura (LI & ZHOU, 1985). Outros exemplos destes SF são os localizados em 2q31, 3p14, 6q26, 7q32 e Xp22.

- Grupo 2: SF induzíveis por 5-azacitidina(5-AZA) localizados em 1q42 e 19q13. A indução máxima destes sítios é feita pela adição da droga à cultura de linfócitos 5 a 8 horas antes da colheita do material (SUTHERLAND e col, 1985a).

- Grupo 3: SF induzíveis por 5-BrdU, localizados entre outras, nas bandas 6q13, 9p21 e 10q21. Eles são induzidos pela adição de 5-BrdU à cultura de linfócitos de 4 a 6 horas antes do término da mesma.

Entretanto, uma melhor classificação para os SF parece ser a proposta por HECHT (1986), com base tanto nas frequências populacionais como nos padrões de indução, que está apresentada na Tabela 5. Os SF raros seriam aqueles com frequências menores que 1% na população, os polimórficos com frequências de 1 a 50% e os comuns com frequências maiores que 50%. Os SF designados polimórficos por este autor, foram classificados como raros por SUTHERLAND e col (1985a).

Não se pode deixar de destacar, contudo, que a classificação dos SF baseada nas condições de cultivo apesar de prática, é artificial, já que um mesmo SF pode ser sensível a diferentes modos de indução. Por exemplo, a banda 10q25 enquadra-se na classe dos SF raros sensíveis à 5-BrdU, segundo SUTHERLAND e col (1985a), no grupo dos SF polimórficos quando induzido por

5-BrdU, segundo HECHT (1986) e na classe dos SF comuns, quando induzida por cafeína, segundo YUNIS & SORENG (1984).

1.4.3. Natureza dos sítios frágeis

A estrutura do cromossomo ou da molécula de DNA na região de um SF ainda não é conhecida. Apenas o sítio 1q22 foi analisado ao microscópio eletrônico, apresentando-se como uma descontinuidade com fragmentos ligados ao cromossomo por filamentos.

Tabela 5. Classificação dos SF por frequência e padrão de indução, segundo HECHT (1986).

Classe	Frequência	População	Padrão de indução	Exemplo
A1	Raro	< 1%	Sensível ao folato	6p23
A2	Raro	< 1%	Distamicina A	17p12
B1	Polimórfico	1-50%	BrdU	10q25
B2	Polimórfico	1-50%	Distamicina A	16q22
C1	Comum	> 50%	Afidicolina	3p14
C2	Comum	> 50%	5-Azacitidina	1q42
C3	Comum	> 50%	BrdU	9p21

em sítios específicos no genoma humano pode dar origem a lesões cromossômicas que se assemelham aos SF (Mc DOUGALL, 1977). Além disso, alguns SF, como o FRA16B, têm sua expressão significativamente aumentada por agentes anti-virais como o interferon e a distamicina A, e em indivíduos com deficiência imunológica, sugerindo que nestes casos o mesmo fator etiológico seja influenciado. Com relação à distamicina A, é possível que ela provoque a excisão do genoma viral integrado ou, alternativamente,

5-BrdU, segundo HECHT (1986) e na classe dos SF comuns, quando induzida por cafeína, segundo YUNIS & SORENG (1984).

I.4.3. Natureza dos sítios frágeis

A estrutura do cromossomo ou da molécula de DNA na região de um SF ainda não é conhecida. Apenas o sítio Xq27 foi analisado ao microscópio eletrônico, apresentando-se como uma descontinuidade com fragmentos ligados ao cromossomo por fibras individuais de 25 nanômetros, ou como uma quebra incompleta, com várias fibras cromatídicas ligando os segmentos de forma semelhante ao arranjo visto nos satélites de acrocêntricos. Nestes últimos casos, o SF nem sempre era visível ao microscópio óptico (HARRISON e col, 1983).

Várias hipóteses têm sido sugeridas para elucidar a natureza dos SF. Algumas delas os associam com elementos transponíveis virais, outras com o fenômeno de amplificação de seqüências especiais ou com alterações no mecanismo de duplicação da própria cadeia.

SUTHERLAND (1979a) propôs, inicialmente, que alguns SF representassem regiões de modificação viral. A favor desta hipótese está o fato de que a integração do adenovírus 12 em sítios específicos no genoma humano pode dar origem a lesões cromossômicas que se assemelham aos SF (Mc DOUGALL, 1971). Além disso, alguns SF, como o FRA16B, têm sua expressão significativamente aumentada por agentes anti-virais como o interferon e a distamicina A, e em indivíduos com deficiência imunológica, sugerindo que nestes casos o mesmo fator etiológico seja influenciado. Com relação à distamicina A, é possível que ela provo-que a excisão do genoma viral integrado ou, alternativamente,

possibilite a expressão das funções virais por alterar a atividade da célula hospedeira (SCHMID e col, 1980, 1984; SHABTAI e col, 1980, 1983a; THESTRUP-PEDERSEN e col, 1980).

Mais recentemente, HOEGERMAN & RARY (1986) e FRIEDMAN & HOWARD-PEEBLES (1986) propuseram modelos segundo os quais as mutações para o FRAXA resultariam da inserção de elementos transponíveis virais. Os primeiros autores pressupõem a ocorrência de perda da função dos genes no sítio de inserção e dos genes distais a ele, em decorrência do desligamento e perda do pequeno segmento terminal, após a excisão do elemento transponível. Os últimos autores elaboraram um modelo mais complexo, no qual os elementos transponíveis desenvolvem atividades tanto cromossômicas como extra-cromossômicas. Ambos os modelos atendem às características especiais de manifestação e transmissão do FRAXA na espécie humana e, provavelmente, estão sendo testados com técnicas modernas de genética molecular.

Outros autores tentaram associar o SF à amplificação de regiões do genoma. SUTHERLAND e col (1985b), por exemplo, sugeriram que essas regiões, fossem constituídas por sequências amplificadas de polipurinas e polipirimidinas alternadas que, em condições de deficiência de trifosfato de desoxitimidina (dTTP) ou trifosfato de desoxicitidina (dCTP), resultariam em falhas, constituídas por filamentos de DNA unicatenário. Essas falhas não se empacotariam corretamente por ocasião da condensação cromossômica mitótica e manifestar-se-iam como sítios frágeis. Os autores formularam esta hipótese para explicar porque tanto níveis altos como níveis baixos de timidina são capazes de induzir os SF sensíveis ao folato. A interpretação bioquímica que apresentam é que os níveis altos de timidina aumentam os níveis de dTTP, que por sua vez inibem a redução de

difosfato de citidina (CDP) a difosfato de desoxicitidina (dCTP), por inibir a ação da redutase do ribonucleotídeo. O resultado é uma situação de deficiência de dCTP, necessário para a síntese de DNA. Em conclusão, proporções adequadas de dCTP/dTTP inibiriam a expressão dos SF, ou ainda, o fator crítico na expressão do sítio frágil seria a ocorrência de valores elevados ou muito reduzidos desta proporção.

Outros autores também propõem a amplificação como um fenômeno importante para o surgimento de um SF, como NUSSBAUM e col (1986). Analisando as características do FRAXA, eles formularam a hipótese de que em indivíduos normais tal região apresentaria sequências ricas em pirimidinas, que poderiam ser amplificadas por permutas não homólogas durante a meiose, em gerações sucessivas, constituindo a lesão inicial do FRAXA. Sob condições usuais de cultivo celular, essas regiões duplicar-se-iam normalmente. Entretanto, sob condições de deficiência de pirimidina, durante a fase S do ciclo celular, haveria a incorporação de monofosfato de desoxiuridina. Pela grande extensão do segmento com incorporação errônea de nucleotídeos, ele não teria condições de ser excisado corretamente pelos mecanismos de reparo pós-duplicação e a região seria observada como um SF, no cromossomo metafásico. Os autores utilizam essa hipótese para explicar o fenótipo do FRAXA como consequência de alterações na transcrição de um ou mais genes desta região, em função da amplificação da lesão.

Também foi proposto, por GLOVER & STEIN (1987) que os SF sejam originados por bloqueios no desligamento da forquilha de duplicação, que originam regiões unicatenárias ou, que por só se completarem muito tardiamente, originam cadeias duplas que não mais se condensam de modo normal. Essa proposta surgiu a partir de estudos que detectaram a ocorrência preferencial, nos SF comuns 3p14 e 16q23, não só de lesões cromossômicas, tais como falhas, mas também de recombinações intracromos-



sômicas, que podem ser avaliadas pelas frequências de trocas entre cromátides irmãs.

Verifica-se portanto, que apesar da natureza dos SF ser uma questão bastante investigada, ainda não está esclarecida.

I.4.4. Efeitos fenotípicos

Com exceção do FRAXA, que leva a um quadro de retardo mental ligado ao sexo (SUTHERLAND, 1979b, 1983; OPITZ & SUTHERLAND, 1984; MICHELS, 1985; ARINAMI e col, 1986; TURNER e col, 1986), os demais SF não parecem ter qualquer efeito fenotí

co, embora já tenham sido observados em propósitos com malfor

mações, retardo mental, aberrações cromossômicas, infertilidade e neoplasias (CÔTÉ e col, 1978; SUTHERLAND, 1979a,b, 1981; CÔTÉ & KATSANTONI, 1980; GUICHAOUA e col, 1982; DUNNER e col, 1983; PETIT & FRYNS, 1983; SESSAREGO e col 1983; SHABTAI e col, 1983a,b; SUTHERLAND, 1983; WEGNER, 1983; YUNIS, 1983; LE BEAU & ROWLEY, 1984; WEBB & THAKE, 1984; DE BRAEKELEER e col, 1985; SMEETS e col, 1985; SMITH e col, 1985; TAKAHASHI e col, 1985; MORGAN e col, 1985; ROMAIN e col, 1986).

Muitos desses achados, entretanto, devem ser produto do tipo de averiguação. O FRA10B, por exemplo, tem sido observado em indivíduos normais (SUTHERLAND e col, 1980), com retardo mental (SCHERES & HUSTINX, 1980; ROMAIN e col, 1984) e com neoplasia (MORGAN e col, 1985). Além disso, alguns sítios como o FRA10B e o FRA17A já foram observados até em homozigose, sem qualquer efeito aparente (BERG e col, 1969; SUTHERLAND, 1981; IZAKOVIC, 1984).

Os estudos citogenéticos desenvolvidos em condi



ções de cultivo apropriados para a detecção de SF em amostras de indivíduos normais ou com retardo mental não chegaram a conclusões definitivas sobre diferenças entre elas (SUTHERLAND, 1982a,b, 1985; OPTIZ & SUTHERLAND, 1984 para referências; PETIT e col, 1986; FRYNS & PETIT, 1987). Por exemplo, SUTHERLAND (1982a) encontrou uma incidência sete vezes maior de SF autossômicos em indivíduos com retardo mental, comparados com recém nascidos selecionados casualmente. Entretanto, segundo o próprio autor houve tendenciosidade na amostra, pois alguns dos indivíduos com retardo já haviam sido identificados como portadores de SF. De modo similar, os resultados de PETIT e col (1986), que mostraram uma incidência vinte vezes maior de SF autossômicos sensíveis ao folato em indivíduos com retardo mental, que em recém nascidos, também não são adequados para firmar a associação entre SF autossômicos e retardo mental, porque o controle era histórico.

A revisão da literatura neste aspecto, deixa clara a necessidade de outros estudos para elucidar um possível efeito fenotípico dos SF autossômicos.

I.5. Objetivos

Embora os mecanismos que associem as aberrações cromossômicas e o processo de malignização celular não sejam ainda bem determinados, é possível que envolvam os oncogenes e que sejam facilitados pela presença de sítios frágeis ou de agentes carcinogênicos.

O presente trabalho teve por objetivo investigar a ocorrência de alterações cromossômicas constitucionais, in-

clusive de sítios frágeis, em células sanguíneas normais de pacientes portadores de leucemia, linfoma e câncer de pulmão. Nos casos possíveis pesquisou-se também as alterações cromossômicas na linhagem maligna, na tentativa de estabelecer uma relação entre a presença de anomalias nas linhagens celulares normais e o desenvolvimento do processo maligno. Além disso, procurou-se estender o estudo citogenético aos familiares dos pacientes que apresentaram alterações ou variantes cromossômicas, a fim de identificar se tais características eram herdadas.

Cirurgia da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto e por clínicas particulares de hematologia e oncologia desta cidade. Foram também analisados 10 indivíduos das famílias dos propósitos que apresentaram alterações cromossômicas ou heteromorfismos constitucionais, no intuito de investigar se tal característica era herdada.

Na Tabela 6 encontram-se os dados relativos ao sexo, grupo étnico, idade do paciente na época do diagnóstico e o tipo de neoplasia apresentada. Três pacientes, com idades variáveis de 31 a 50 anos, apresentavam leucemia mieloide (ou não linfocítica) aguda; 7 pacientes, com idades de 2 a 16 anos, manifestavam leucemia linfóide (ou linfocítica) aguda; 3 pacientes, com idades de 4 a 11 anos, eram portadores de linfomas e 3 pacientes, com idades entre 47 e 74 anos apresentavam carcinoma de pulmão. Das únicas pacientes da amostra, o caso 15, era negra, todos os demais eram caucasóides.

De cada paciente colheram-se informações sobre a evolução clínica, o hábito de fumar, as atividades profissionais exercidas anteriormente ao diagnóstico e a ocorrência de outros casos de neoplasias na família.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Caracterização da casuística

Foram estudados citogeneticamente 16 indivíduos, 11 homens e 5 mulheres, com diagnóstico de leucemia, linfoma ou câncer de pulmão, previamente à radio ou quimioterapia. Tais pacientes foram encaminhados pelos Setores de Hematologia e de Cirurgia da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto e por clínicas particulares de hematologia e oncologia desta cidade. Foram também analisados 10 indivíduos das famílias dos propósitos que apresentaram alterações cromossômicas ou heteromorfismos constitucionais, no intuito de investigar se tal característica era herdada.

Na Tabela 6 encontram-se os dados relativos ao sexo, grupo étnico, idade do paciente na época do diagnóstico e o tipo de neoplasia apresentada. Três pacientes, com idades variáveis de 31 a 50 anos, apresentavam leucemia mielóide (ou não linfocítica) aguda; 7 pacientes, com idades de 2 a 16 anos manifestavam leucemia linfóide (ou linfocítica) aguda; 3 pacientes, com idades de 4 a 11 anos, eram portadores de linfomas e 3 pacientes, com idades entre 67 e 74 anos apresentavam carcinoma de pulmão. Uma única paciente da amostra, o caso 15, era negra, todos os demais eram caucasóides.

De cada paciente colheram-se informações sobre a evolução clínica, o hábito de fumar, as atividades profissionais exercidas anteriormente ao diagnóstico e a ocorrência de outros casos de neoplasias na família.

Tabela 6. Caracterização da casuística quanto ao diagnóstico, sexo, idade e grupo étnico. M = masculino; F = feminino; B = branco; N = negro.

Caso	Diagnóstico	Sexo	Idade	Grupo étnico
1	LMA-M2	M	32a	B
2	LMA-M2	M	50a	B
3	LMA	M	31a	B
4	LLA-L2	M	6a	B
5	LLA-L2	F	5a	B
6	LLA	F	16a	B
7	LLA	M	2a	B
8	LLA-L2	M	3a	B
9	LLA-L2	M	11a	B
10	LLA-L2	M	3a	B
11	linfoma histiocítico	M	5a	B
12	linfoma linfocítico difuso	M	4a	B
13	esclerose nodular	F	11a	B
14	Ca de pulmão, indiferenciado de grandes células	M	69a	B
15	Ca de pulmão, espinocelular grau II invasivo	F	67a	N
16	Ca de pulmão, espinocelular grau II, invasivo	F	74a	B

II.2. Estudo laboratorial

O cariótipo dos pacientes foi investigado em metáfases de linfócitos do sangue periférico, cultivados segundo técnica descrita por MOORHEAD e col (1960) com modificações.

Cada frasco de cultura continha aproximadamente meio mililitro de plasma, 6 ml de meio de cultura TC 199 ou RPMI 1640, suplementados de sêro sanguíneo humano do tipo AB a 5% e 20%, respectivamente, e 0,2 ml de fito-hemaglutinina (PHA), fornecida pela Dra. Iris Ferrari da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

A pesquisa dos sítios frágeis raros foi realizada em material cultivado em meio TC 199 com e sem adição de metotrexato, e com adição de Hoechst 33258 e 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU).

De cada paciente leucêmico foram montados 10 frascos de cultura. Nos frascos numerados de 1 a 5 utilizou-se meio RPMI 1640 e nos de 6 a 10 meio TC 199. Os frascos 1 e 2 não receberam PHA e serviram para a análise de blastos periféricos, a linhagem maligna. Os frascos 3 e 6 não receberam qualquer tratamento, além da PHA como estímulo mitogênico e serviram como controle. Aos frascos 4 e 9 adicionou-se 5-BrdU, no início da cultura, numa concentração de 10 a 12 $\mu\text{g/ml}$ de meio e os mesmos foram cobertos com papel alumínio, para evitar a fotólise do composto. Os frascos 5 e 10 receberam Hoechst 33258 em concentração final de 3 $\mu\text{g/ml}$ e os frascos 7 e 8 solução aquosa de metotrexato (MTX), em concentração final de 5 $\mu\text{g/ml}$ de meio, 24 horas antes do término da cultura. Dos demais pacientes, os portadores de linfomas ou câncer de pulmão, foram montados 8 frascos, sendo excluídos o 1 e o 2 anteriormente des



critos.

Após a semeadura, as culturas foram transferidas para estufa bacteriológica onde permaneceram por 48 (frascos 1 e 2) ou 70 horas (frascos 3 a 10), a 37°C, quando adicionou-se colquicina Houdé, em concentração final de 4.10^{-5} M. Decorridos 60 minutos procedeu-se a hipotonização do material com solução de KCl a 0,075 M e fixação com metanol acético (3:1). A suspensão celular foi gotejada em lâminas geladas e úmidas, que foram secas ao ar.

Algumas lâminas foram coradas com solução de Giemsa (MERCK) a 2% (coloração usual), sendo que previamente o material foi hidrolizado em HCl 1N, a 60°C por 7 minutos, ou em solução salina duas vezes concentrada (2xSSC), por 5 minutos, lavado rapidamente em água desionizada gelada e por 10 minutos em água destilada corrente. Posteriormente, recebeu um banho rápido em solução tampão Sørensen, pH 6,8, foi corado em solução tamponada a 2% de Giemsa por cerca de 5 minutos e lavado em água destilada.

Lâminas não coradas de cada caso, ou aquelas coradas após hidrólise por 2xSSC, foram utilizadas para o bandamento G, desenvolvido segundo de GROUCHY & TURLEAU (1977), com modificações, sendo essas últimas previamente descoradas por banhos em álcoois 100%, 70% e 50%. Para o bandamento G, o material, após seis a quinze dias de fixação, foi imerso sequencialmente em solução de álcool metílico a 50% e água destilada por 2 minutos, e tampão Sørensen, pH 6,8, por no mínimo 30 minutos. Logo após, foi tratado em solução de tripsina (DIFCO) a 0,2%, tamponada em solução salina PBS, por um tempo variável de 1 a 20 segundos, de acordo com o período decorrido após a fixação do material. Em seguida, o material foi imerso em solução

PBS por 2 minutos, corado com solução tamponada de Giemsa a 2% por 3 minutos e lavado em água destilada.

A identificação do cariótipo foi feita em material corado usualmente e com bandas G. Nos casos em que foram detectadas alterações cromossômicas e aqueles que apresentavam variantes heteromórficas foram, também, analisados após bandamento C e Ag-NOR, segundo as técnicas de SUMNER (1972) e HOWELL & BLACK (1980), respectivamente, para melhor caracterização do cariótipo.

Para a pesquisa da ocorrência de quebras preferenciais foram analisadas, sempre que possível 100 metáfases de cada tratamento. Quando encontradas, em qualquer desses tratamentos, duas ou mais células com quebras ou falhas supostamente na mesma região cromossômica, a lâmina foi descorada e submetida ao bandamento G, ou a análise do tratamento foi ampliada com outras 50 metáfases em banda G.

Foram identificadas como quebras as descontinuidades com desalinhamento nítido dos segmentos cromossômicos e com deslocamento superior à largura de uma das cromátides do cromossomo afetado. Foram classificadas como falhas, as descontinuidades com um pequeno desalinhamento ou sem, tendo deslocamento inferior à largura de uma das cromátides. As quebras e falhas foram classificadas como cromossômicas, quando se manifestavam no mesmo local em ambas as cromátides de um cromossomo, e cromatídicas, quando afetavam apenas uma das cromátides do mesmo. Também foram computadas como quebras as figuras tri e quadrirradiais. Na análise em coloração usual, a localização dos eventos foi feita de acordo com a posição do terço proximal, mediano ou distal do braço cromossômico envolvido. Na análise com bandas G, a localização dos eventos foi feita de acordo com



a PARIS CONFERENCE (1971) e a ISCN (1978).

Devido a vários fatores de natureza técnica e biológica, nem todos os frascos de cultura apresentaram material em condições satisfatórias para a análise cromossômica. Como após a colheita do sangue periférico, os pacientes eram encaminhados para tratamento químico ou radioterápico, os exames não podiam ser repetidos nas mesmas condições iniciais.

A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico marca Carl Zeiss, Jena, modelo Laboval 3, e os eventos anômalos fotografados em microscópio Carl Zeiss OBERKONIG, Standard WL, em filme Kodak Panatomic X, 32 ASA. As cópias fotográficas foram feitas em papel Kodabromid F3 e F4 ou TALBOT BS-3 e BS-4.

No caso 1, a análise da esterase D dos hemolisados foi determinada pelo método quantitativo desenvolvido por SPARKES e col (1979). A análise fenotípica da isozima foi desenvolvida em eletroforese de gel de amido, de acordo com HOPKINSON e col (1973). Uma unidade de esterase D corresponde a 10^{-7} moles de metil-umbeliferil acetato hidrolisado /h/g de hemoglobina. A investigação bioquímica foi processada no Departamento de Genética da Escola Paulista de Medicina, sob responsabilidade da Dra. Maria Eugênia da Silva Fernandes.



III. RESULTADOS

Os cariótipos dos pacientes estão apresentados na Tabela 7. Dos dezesseis indivíduos estudados, dois apresentaram quebras cromossômicas preferenciais e quatro apresentaram alterações ou variantes cariotípicas. As alterações encontradas foram um cromossomo 22 com braço curto aumentado e um cromossomo derivado do 15. As variantes foram inversão parcial e total da região heterocromática do cromossomo 9.

No caso 1, diagnosticado como tendo LMA-M2, foi detectada uma fragilidade em 13q mediano, entre as bandas q14 e q21. Esta característica manifestava-se preferencialmente como quebras do tipo cromatídica ou cromossômica, e menos frequentemente como falhas, figuras multirradiais ou deficiências (Figura 1.A-F). Além disso, em muitas metáfases foram observadas constrições acentuadas nesta região sem, todavia, haver descontinuidade.

Também foram examinados a mãe do paciente, com 57 anos, sua esposa, com 27 anos e seus dois filhos, um menino e uma menina com 4 e 7 anos, respectivamente, todos fenotipicamente normais. A mesma característica foi encontrada nas células da mãe e dos filhos do propósito.

A análise citogenética do paciente e de sua mãe foi realizada em três épocas diferentes, designadas culturas I, II e III, com um intervalo de aproximadamente 3 meses entre cada uma delas. As frequências de manifestação da fragilidade em todos os portadores nas diferentes culturas e condições de cultivo, acham-se sumarizadas na Tabela 8. A frequência de quebras em 13q mediano, nas células cultivadas em meio TC 199 foi baixa no pa

Tabela 7. Cariótipo dos pacientes estudados.

Caso	Cariótipo	Observações
1	46,XY	quebras preferenciais em 13q mediano.
2	46,XY	
3	46,XY,22p ⁺ mat	
4	46,XY	
5	46,XX	quebras preferenciais em 3p14.
6	46,XX	
7	46,XY	
8	46,XY	
9	46,XY	
10	46,XY,inv(9)(p11q12.1) mat	
11	46,XY	
12	46,XY	
13	46,XX	
14	46,XY	
15	46,XX,inv(9)(p11q12.2)	
16	46,XX,-15,der(15),t(15;?)(p11;?)	

manifestações da fragilidade em 13q mediano: quebra cromossômica (A), quebra cromatídica (B), falha cromossômica (C-D), figura trirradial (E) e deficiência (F).

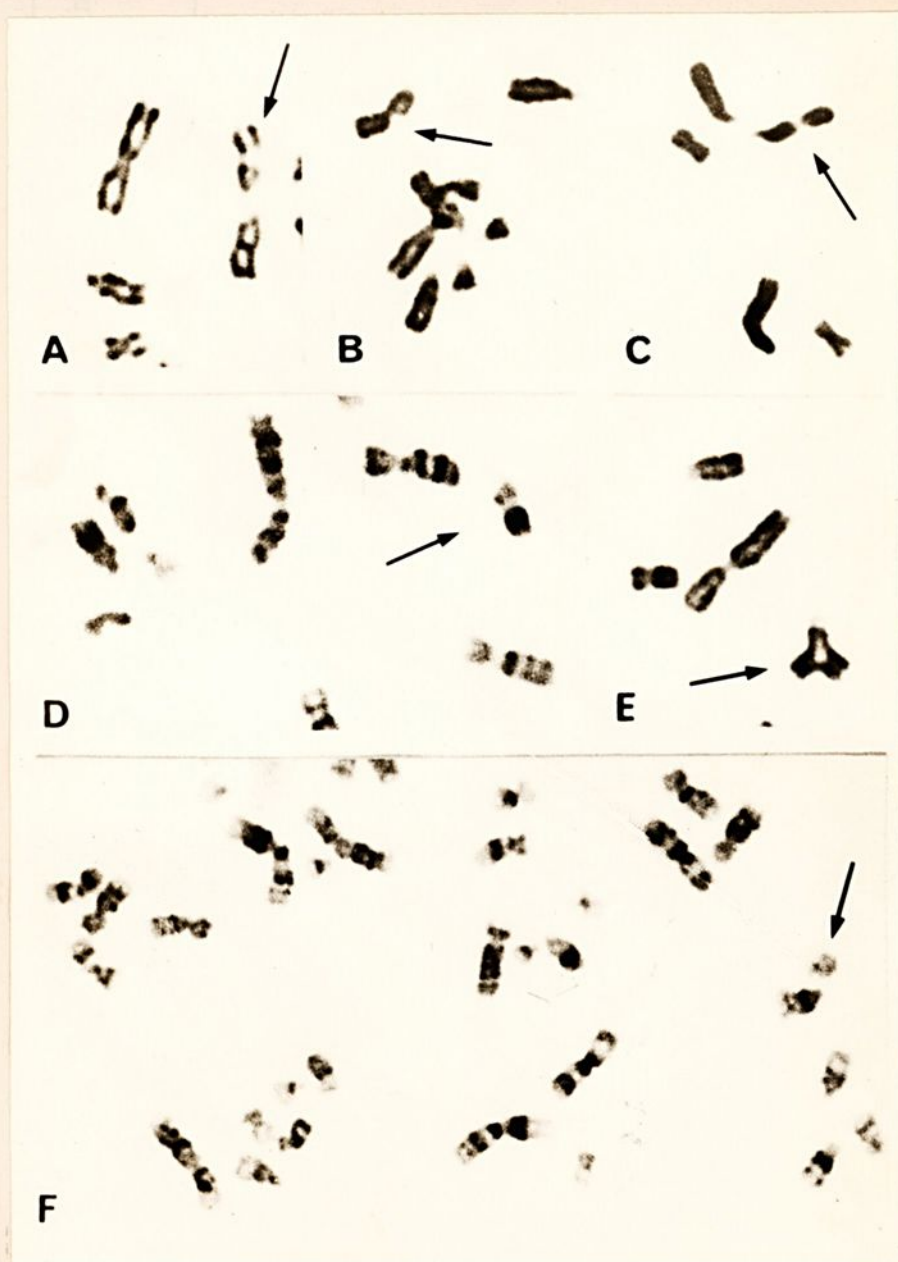


Figura 1. Metáfases parciais do caso 1 mostrando os tipos de manifestações da fragilidade em 13q mediano; quebra cromossômica (A), quebra cromatídica (B), falha cromossômica (C-D), figura trirradial (E) e deficiência (F).

Tabela 8. Frequência da fragilidade em 13q mediano, por tratamento e época do estudo citogenético no probando, sua mãe e filhos; A = células positivas; B = células informativas.

Condições de cultivo	Cultura	Probando		Mãe		Filha		Filho	
		A/B	%	A/B	%	A/B	%	A/B	%
RPMI 1640	I					0/300			
	II	2/68	2,9	0/50					
	III	*1/50	2,0	2/300	1,5				
TC 199	I	3/200	1,5	5/49	10,2	3/300	1,0	1/215	0,5
	II	1/100	1,0	2/81	2,5				
	III			3/300	1,0				
TC 199 + MTX	I	11/185	6,0	3/50	6,0	4/200	2,0	0/45	
	II	4/100	4,0	1/47	2,1				
TC 199 + BrdU	II	4/98	4,1						
TC 199 + HOECHST	II	0/50							

* sem PHA



ciente e em seus filhos (em torno de 1%) e maior em sua mãe (em torno de 4%). A adição de metotrexato aumentou a frequência de quebras nas células do paciente, mas este efeito não ocorreu nas células da mãe ou das crianças. Nas células cultivadas em meio RPMI 1640, a fragilidade foi observada no paciente e em sua mãe, não tendo se manifestado em sua filha. A adição de BrdU ou de Hoechst 33258 em culturas do paciente não aumentou a expressão da mesma.

Nas células malignas do paciente foi identificado o cariótipo 46,XY,t(8;21)(q22;q22), apresentado na Figura 2. Em uma dessas células também foi observada a quebra em 13q mediano.

Os portadores da fragilidade, exibiram o fenótipo ESD₂₋₁ da esterase D. A análise quantitativa também indicou valores normais para seus hemolisados (120, 93,8, 160 e 209 unidades, respectivamente, para o paciente, sua mãe, sua filha e seu filho).

A LMA do caso 1 foi diagnosticada em março de 1985. Sua história consistia de fadiga, fraqueza e febre, que ocorreram por cerca de quatorze dias antes do primeiro exame clínico. Nesta época sua contagem de glóbulos brancos era 12.100/ml com 93% de blastos periféricos, nível de hemoglobina 12,0 g/dl, 37% de hematócrito e 46.000 plaquetas/ml. O exame hematológico mostrou a presença de corpos de Auer, característicos das células da LMA-M2. O exame físico revelou esplenomegalia (4 cm do rebordo costal direito) e hepatomegalia (2 cm do rebordo costal esquerdo).

Primeiramente ele foi submetido a quimioterapia com citosina arabinosídeo, 6-mercaptopurina e daunorrubicina, o que resultou em remissão completa da leucemia. Quatro meses mais tarde apresentou nova crise leucêmica, e foi tratado com

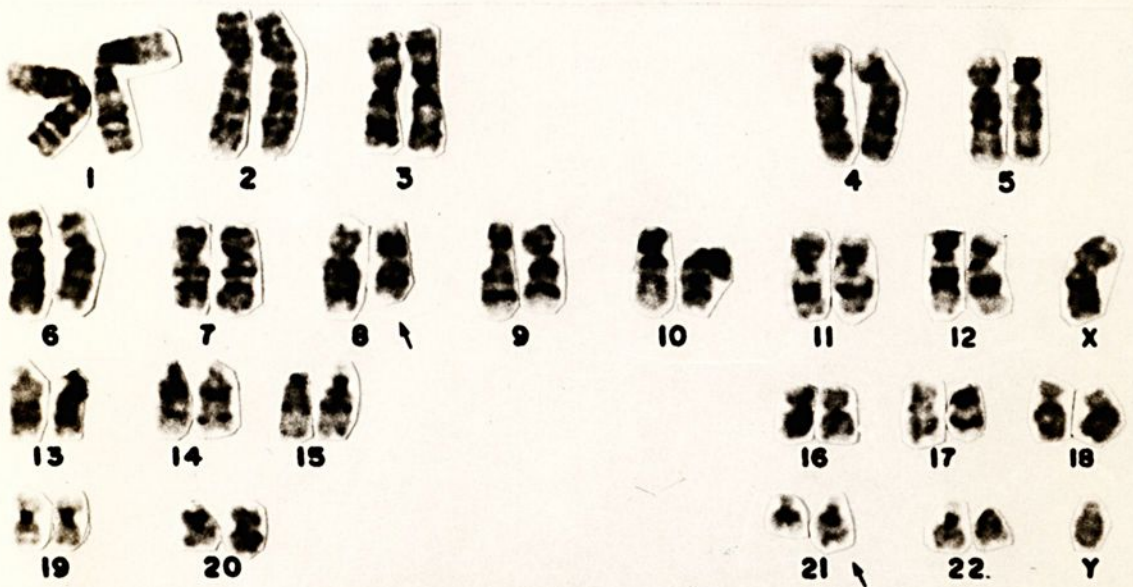


Figura 2. Cariograma representativo de uma célula maligna do caso 1, com cariótipo 46,XY,t(8;21)(q22;q22).

ciclofosfamida, vincristina, aracitina e prednizona, alcançando uma remissão parcial. Além disso, o paciente foi submetido a várias transfusões sanguíneas.

Em dezembro de 1985, sofreu um acidente vascular cerebral e permaneceu em coma, até falecer de insuficiência respiratória, em janeiro de 1986.

Esse paciente trabalhou durante cerca de cinco anos com produtos derivados de petróleo, altamente tóxicos, utilizados na aplicação de pisos de borracha, e fumava intensamente.

No caso 3, também com LMA detectou-se a presença de um cromossomo do grupo G anômalo, com braço curto muito aumentado e satélites bem evidentes (Figura 3.A e B). Esse cromossomo foi observado em associação com outros acrocêntricos (Figura 3.B-D). Em bandamento G, foi identificado como um cromossomo 22, tendo uma banda escura extra entre a região do satélite e o centrômero (Figura 3.E). A análise com outras técnicas citogenéticas mostrou uma banda C extra na porção mediana do braço curto (Figura 3.F) e uma ou duas bandas NORs (Figura 3.G). A análise das células malignas não evidenciou alterações cromossômicas, além do cromossomo 22p⁺.

Esse cromossomo também foi observado na mãe do paciente, com 55 anos, fenotipicamente normal. O cariótipo do paciente, portanto, pode ser representado por 46,XY,dir dup(22p)(pter→q11::p13→qter)mat, supondo-se que tal anomalia tenha se originado por uma duplicação do braço curto do cromossomo 22, a partir de q11. Outra possibilidade é que o cromossomo anômalo seja derivado de uma translocação entre o cromossomo 22 e outro acrocêntrico, sendo que neste caso a quebra deveria ter ocorrido em 22p11.

O paciente foi diagnosticado como portador de





Figura 3. Metáfases parciais do caso 3 mostrando o cromosomo $22p^+$ em coloração usual (A-B); em associação de satélites (B-D); pares de cromossomos 22, com o anômalo à esquerda, em bandas G(E) e C(F); cromossomos 22 anômalos, com marcação em uma ou duas NORs (G).

LMA em outubro de 1986. Na ocasião apresentava palidez intensa, fraqueza, febre, esplenomegalia, dores nos membros inferiores e vertigem aos pequenos esforços. Seus exames revelaram: 30.500 glóbulos brancos/ml com 95% de blastos periféricos, nível de hemoglobina 6,4 g/dl, 20% de hematócrito e 20.000 plaquetas/ml. Recebeu, então, tratamento quimioterápico com puri^unetol, aracitina e daunoblastina, o que resultou em remissão parcial. Durante esse período foi submetido, também a várias transfusões sanguíneas. Até março de 1987 ele continuava com o tratamento, com alternância de quadros de melhora e crises leucêmicas.

Esse paciente é fumante moderado e desde a ado^ulescência exerceu atividade agrícola, relatando ter tido exposição profissional a diversos agrotóxicos, sem uso de equipamentos de proteção individual ou mesmo de cuidados básicos.

Nas células do caso 5, portadora de LLA-12, fo^uram observadas quebras preferenciais na região mediana do braço curto do cromossomo 3, especificamente em 3p14 (Figura 4), com expressão em 9% das células cultivadas em TC 199.

A análise citogenética dos seus progenitores identificou tal característica em seu pai, fenotipicamente nor^umal, com 25 anos, expressando-se em 5% das células nas mesmas condições de cultivo.

Seu diagnóstico foi feito em novembro de 1984 e sua história consistia em febre, sangramento do nariz, lesões no palato, dores nos membros inferiores, gânglios palpáveis, manchas roxas no corpo e infecção de garganta. A contagem dos glóbulos brancos foi de 33.000/ml com 90% de blastos periféri-

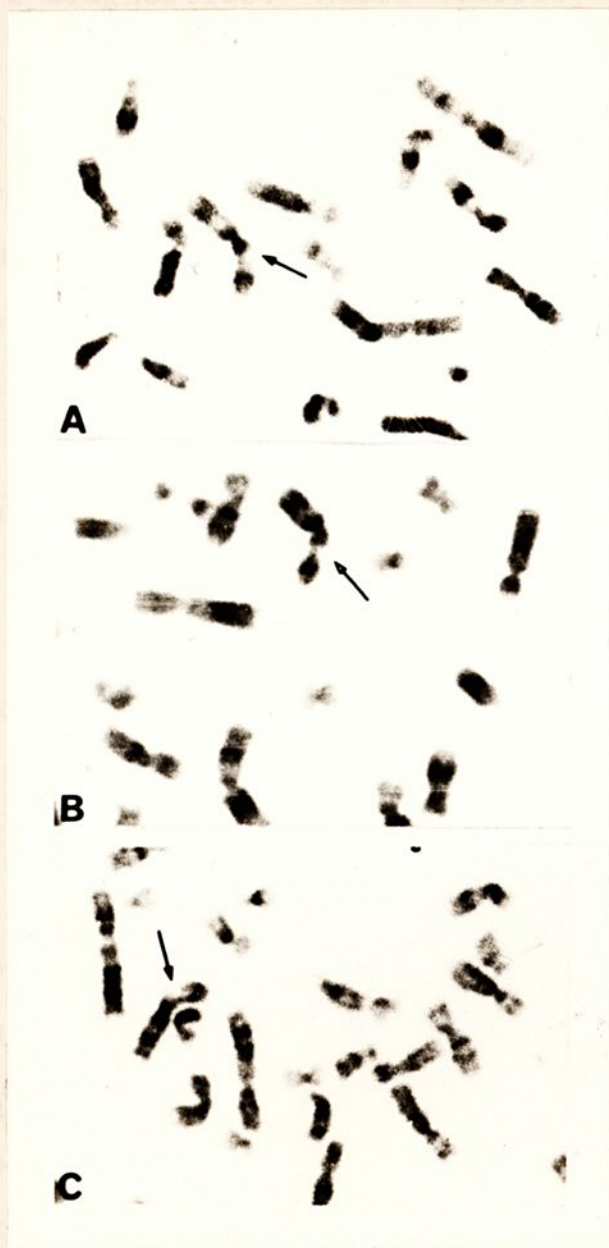


Figura 4. (A-C) Metáfases parciais do caso 5 em banda G, ilustrando quebras observadas em 3p14.

cos, nível de hemoglobina 11,4 g/dl, 36% de hematócrito e menos de 5.000 plaquetas/ml. Seu mielograma revelou 90% de blastos, confirmando o diagnóstico. Nessa ocasião, a paciente foi submetida à quimioterapia com prednisona, vincristina, ciclofosfamida e doxorubicina, que resultou em remissão completa da doença. Onze meses depois ela teve nova recaída, sendo tratada com doxorubicina e metotrexato. Seguiu-se uma piora do quadro clínico, com febres altas, taquicardia e varicela, indo a paciente a óbito em novembro de 1985.

O caso 10, com LLA-L2, apresentou uma inversão de um pequeno segmento da região 9qh, sendo o seu cariótipo caracterizado como 46,XY,inv(9)(p11q12.1)mat.

Essa variante foi também observada em sua mãe, com 28 anos, fenotipicamente normal. Na Figura 5 pode-se observar metáfases parciais deste paciente, submetidas ao bandamento C.

Antes de ser corretamente diagnosticado, este paciente recebeu tratamento para anemia, incluindo diversas transfusões sanguíneas. Os sinais clínicos consistiam em febres, gânglios palpáveis nas regiões cervical e inguinal, esplenomegalia (3 cm do rebordo costal direito) e hepatomegalia (3 cm do rebordo costal esquerdo). Em janeiro de 1987, época do diagnóstico, seus exames mostraram 17,0% de hematócrito, nível de hemoglobina 5,4 g/dl, 10.000 plaquetas/ml com 4% de blastos periféricos. O diagnóstico foi confirmado pelo mielograma, que revelou mais de 80% de blastos. Nessa ocasião, ele foi submetido à quimioterapia com dexametasona, vincristina, doxorubicina e metotrexato, à qual vinha reagindo bem. Ao iniciar a segunda fase deste tratamento o paciente apresentou febres altas, vômitos e queda do seu estado geral, indo a óbito em fevereiro de 1987.

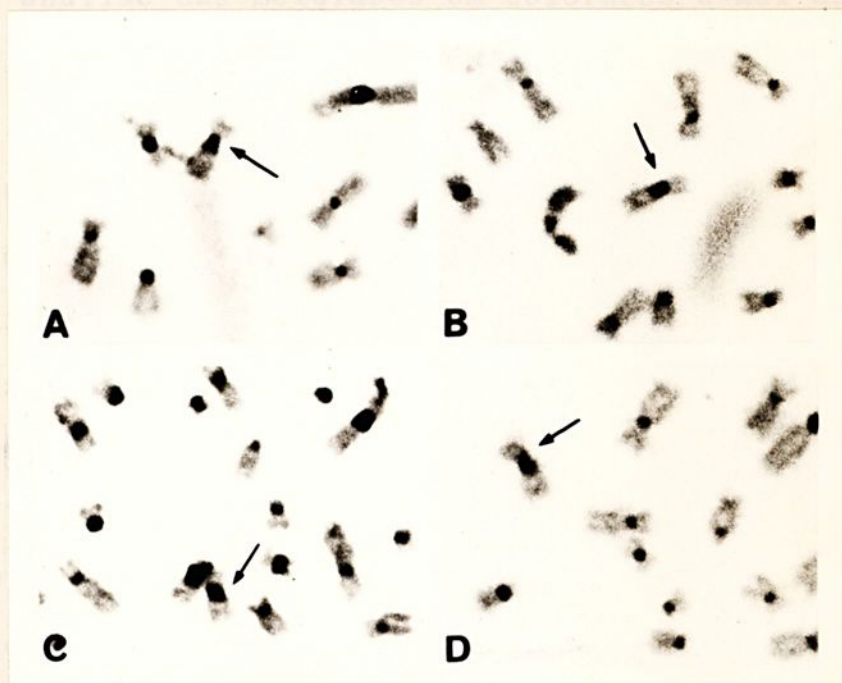


Figura 5. Metáfases parciais do caso 10, em banda C, mostrando a inversão parcial de um cromosomo 9.

Três familiares maternos do caso 10, o avô, a avó e uma tia, desenvolveram neoplasias de estômago, útero e pele, respectivamente. O avô foi submetido à cirurgia para retirada do estômago e a tia teve uma de suas pernas amputadas. A avó faleceu em decorrência da doença.

A análise das metáfases em coloração usual do caso 15, portadora de câncer de pulmão, do tipo carcinoma espinocelular, grau II, invasivo, mostrou um cromossomo do grupo C metacêntrico, em 100% das mesmas. Após as técnicas de bandamento G e C, ele foi identificado como um cromossomo 9, com inversão total da heterocromatina constitutiva da região qh e o cariótipo da paciente caracterizado como 46,XX,inv(9)(p11q12.2). Esta inversão está ilustrada na Figura 6, em coloração usual e bandas G e C.

O diagnóstico deste caso foi feito em janeiro de 1986. Ela apresentava um quadro clínico caracterizado por febres, disfagia há cerca de 3 anos, tosse constante com secreção amarela, rouquidão, dispnéia progressiva, edema de membros inferiores e roncos pulmonares disseminados. Após o diagnóstico de câncer de pulmão, realizado através de radiografias e broncoscopia com biópsia, a paciente foi encaminhada para radioterapia. Decorridas as primeiras aplicações a paciente abandonou o tratamento e soube-se que fora a óbito algum tempo depois, em decorrência da piora do seu estado geral. Ela era casada, teve 8 filhos, fumou intensamente durante cerca de 20 anos e relatou ter sido exposta profissionalmente a agrotóxicos, sem qualquer tipo de proteção, durante vários anos em que trabalhou como lavradora. Não foi possível estudar os seus pais, pois esses já eram falecidos por ocasião do diagnóstico de sua neoplasia.

O caso 16, também portadora de câncer de pulmão

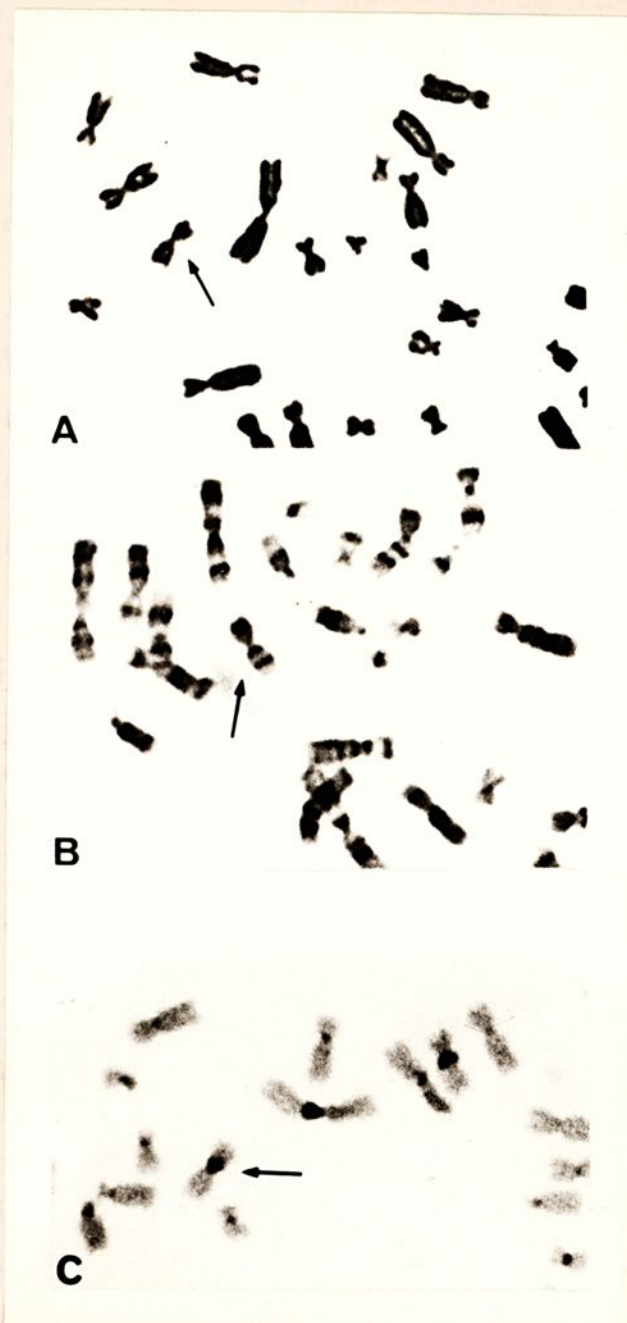


Figura 6.. Metáfases parciais do caso 15, em coloração usual (A), banda G(B) e banda C(C); as flexas indicam um cromossomo 9 com inversão total da heterocromatina.

caracterizado como carcinoma espinocelular, grau II, invasivo, apresentou cariótipo anormal em 100% de suas células, identificado como 46,XX,-D,+C em coloração usual (Figura 7.A). A análise em bandas G, C e Ag-NOR revelou um cromossomo 15 com material extra em seu braço curto. Esse braço apresentava duas bandas G escuras (Figura 7.B-C), era inteiramente heterocromático (Figura 7.D) e não apresentava regiões organizadoras do nucléolo ativas, porque não marcou com a técnica Ag-NOR (Figura 7.E).

Esse cromossomo deve ser derivado de um rearranjo cromossômico em um ancestral da paciente, podendo seu cariótipo ser representado pela fórmula 46,XX,-15,der(15),t(15;?)(p11;?). Pelos padrões de banda apresentados acredita-se que o material extra seja a porção distal do braço longo do cromossomo Y. No entanto, até o momento, não foi possível a aplicação de outras técnicas citogenéticas que pudessem caracterizar melhor o fenômeno.

Esta paciente esteve casada por mais de 50 anos, não tendo filhos. Seus pais já eram falecidos na época do exame citogenético. Foi relatada a presença de outros dois membros estêreis na família, uma tia materna e uma sobrinha. No entanto, tais pessoas residiam em locais muito distantes e não houve possibilidade de serem submetidas a uma investigação citogenética.

A paciente foi diagnosticada em setembro de 1986. Ela apresentava tosse seca com expectoração amarelada, dispnéia, tonturas frequentes, fraqueza, emagrecimento, cefaléia esporádica na região cervical direita que se estendia para tórax e membro superior direito e roncos pulmonares disseminados, que se manifestavam à cerca de dois meses. O diagnóstico foi realizado através de radiografias e broncoscopia com biópsia. Logo após a paciente recebeu aplicações de radioterapia, obtendo melhora no estado geral. Em abril de 1987 sofreu uma recaída e foi submetida à quimioterapia com cloridrato de procarbazina, ciclofosfamida e vincristina, obtendo sensível melhora.

Esta paciente nunca fumou ou foi exposta ocupacionalmente a produtos tóxicos.



Figura 7. Metáfase do caso 16 em coloração usual, com apenas cinco cromossomos do grupo D(A), metáfases parciais em bandas G(B-C) e C(D), com setas indicando o cromossomo anômalo; metáfase em banda Ag-NOR, ilustrando a marcação de cinco cromossomos do grupo D(E).

Os demais pacientes tinham cariótipo normal e evoluíram clinicamente dentro do esperado. Com exceção do caso 12, nenhum destes pacientes apresentava história de neoplasias na família. Esse indivíduo, com linfoma linfocítico, tinha seis irmãos vivos e um falecido também em decorrência de linfoma. Os bisavós paternos dessa criança tiveram onze filhos e apenas o avô da mesma sobreviveu. Segundo informações da família, tais indivíduos foram a óbito após um quadro muito semelhante de fortes dores abdominais. Na época do estudo do paciente, seu avô também sofria de dores abdominais intensas, não tendo, todavia, sido examinado. Um dos irmãos do pai apresentou sintomas semelhantes há cerca de oito anos atrás, sendo diagnosticado como portador de um câncer abdominal, cuja localização não foi possível precisar.

Em relação aos aspectos profissionais dos pacientes com cariótipo normal, o caso 2 era lavrador, também sofrendo exposição a agrotóxicos sem qualquer proteção e o caso 14, apesar de nunca ter tido uma profissão definida, não relata contacto com produtos tóxicos. Ambos fumavam intensamente desde a adolescência. Os outros 8 casos eram crianças, sem qualquer indicação de exposição a agentes carcinogênicos.

Dos 16 pacientes foi analisado um total de 5.137 metáfases. O número de metáfases consideradas em cada tratamento e a frequência percentual dadas com quebras e falhas de cada paciente estão contidos na Tabela 9. Verifica-se que vários apresentaram frequências elevadas de metáfases com anomalias ($>8\%$) nas culturas desenvolvidas em TC 199, sem adição de drogas, como os casos 1, 5, 8, 9, 11 e 14. Mesmo nas culturas desenvolvidas em meio RPMI 1640, as frequências de metáfases anômalas foram iguais ou maiores que 8% nos casos 1, 2 e 9.

Tabela 9. Frequências de metáfases analisadas por caso e tratamento (A) e frequências percentuais de metáfases com quebras (B).

Caso	RPMI s/ PHA		RPMI		RPMI c/ BrdU		RPMI c/ HOECHST		199		199 c/ MTX		199 c/ BrdU		199 c/ HOECHST	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	50	8	68	15			50	26	300	10	285	25	98	20	50	10
2	36	5,5	100	8					100	1			100	20	110	4,5
3	112	3,5	111	8	100	8			123	4						
4			110	2					100	0						
5			24	2					100	20						
6									112	6	100	2	50	42		
7									100	3	90	12	100	10		
8									110	16						
9			105	8,6					50	8						
10			100	0	107	5,6	100	2								
11									105	12						
12			100	3					100	6	103	23	100	18	100	6
13			110	1			85	1								
14							95	13	50	16						
15			100	2					100	1			100	3	100	1
16			112	6	100	7	114	4	112	6	100	21				

A distribuição de quebras e falhas por cromossomo ou grupo cromossômico ao longo dos braços curtos e longos e na região centromérica, em metáfases com e sem bandamento, para cada caso, pode ser observada na Tabela 10. Nenhum deles parece apresentar regiões cromossômicas preferencialmente envolvidas naquelas anomalias, com exceção dos casos 1 e 5, portadores de quebras cromossômicas preferenciais.

A Tabela 11 apresenta a distribuição dessas anomalias ao longo do braço curto, braço longo e região centromérica dos cromossomos, nos diferentes tipos de tratamento, somando-se todos os pacientes, exceto os casos 1 e 5, que eram portadores de quebras preferenciais. A distribuição das quebras e falhas observadas em células cultivadas em TC 199 e RPMI 1640, assim como nas tratadas com MTX, difere significativamente do esperado pelo tamanho relativo dos cromossomos metafásicos conforme se verifica na Tabela 12 (TC 199 + RPMI 1640; $\chi^2 = 16,71$; 6 g.l.; $P < 0,05$; MTX: $\chi^2 = 15,82$; 6 g.l.; $P < 0,05$). O mesmo, contudo, não acontece nas culturas submetidas a 5-BrdU. De modo geral, os cromossomos menores, dos grupos E, F e G, têm quebras menos frequentemente do que o esperado, enquanto os maiores, dos grupos A, B, C e D, têm mais anomalias que o esperado. Os cromossomos 3 e os do grupo D foram os que, em termos proporcionais, apresentaram mais quebras.



Tabela 10. Distribuição das quebras e falhas ao longo dos braços curto (p), longo (q) e da região centromérica (c) dos cromossomos ou grupos cromossômicos, dos diferentes tipos de tratamento.

Caso	Tratamento	Total de Quebras	1		2			3		B			C + X			D	16			17 + 18			F		G + Y
			p+q	c	p	q	c	p+q	c	p	q	c	p	q	c	q	p	q	c	p	q	c	p+q	c	q
1	RPMI s/ PHA	3														2						1			
	RPMI	10	1		1					3	1		2		1								1		
	199	35	3	1	1	3		3		2	7		1	2	1	7						1			1
	199 + MTX	90	2	3	1	5	1	4		2	11		4	22	3	23						1	1		3
	199 + BrdU	29	1	1	1	1	4	1			1	1		3	4	5						3	1		1
	199 + HOECHST	18	1	1	1			1						2	8	4							2		
2	RPMI s/ PHA	2						1							1										
	RPMI	9	1		1				1		2					3	1								
	199	1				1																			
	199 + BrdU	28	3	4	1	1					2		2	7	1	4		1					1		1
	199 + HOECHST	6						1	1				1	3											
3	RPMI s/ PHA	4			1	2		1																	
	RPMI	12						1					3	5		2			1						
	RPMI + BrdU	11	1		2			1		2	1			2			1					1			
	199	6						1			1			1		2						1			
4	RPMI	2												1											1
	199	11			1			5		1			1	3											
5	RPMI	2											1												
	199	31	2	1	2	2	1	9		1			3	9								1			
6	199	7	1											3		3									
	199 + MTX	11	1			1		2					2	3		1		1							
	199 + BrdU	32	2			1		5		4			1	12	1	4						1			1
7	199	3									1			2											
	199 + MTX	15	1			1		3		1	1			3		1		1		1	1		1		
	199 + BrdU	10	2		1					1				1		4		1							
8	199	24	2			2		1		3	3		1	9		3									
9	RPMI	10	1		1			1		1			1	2		2	1								
	199	4	1											2									1		
10	RPMI																								
	RPMI + BrdU	7								2			3				1	1							
	RPMI + HOECHST	2	1				1																		
11	199	18	1		1			4		3			1	6	1	1									
12	RPMI	3			1								1												1
	199	6	1					1		1	1		1												1
	199 + MTX	31	3			3	1	2		1	5	1	1	7		6		1							
	199 + BrdU	22	1			1				2	2		7		1	4		4							
	199 + HOECHST	6	1							1			3									1			
13	RPMI	1												1											
	RPMI + HOECHST	1			1																				
14	RPMI + HOECHST	13			1			2		1			4	1	3	1	1					1		1	
	199	8	2			1		1			1														
15	RPMI	2	1										1												
	199	1											1												
	199 + BrdU	3								1						2									
	199 + HOECHST	1														1									
16	RPMI	7	1										1	4								1			
	RPMI + BrdU	8	1			1				2			2	1		1									
	RPMI + HOECHST	6						1					4	4								1			
	199	8	2			1				1			1	2			1								
	199 + MTX	25	1		1			3		3	1			9		6						1			
TOTAL			42	11	21	27	8	54	2	15	60	8	28	153	22	96	6	15	1	1	14	3	7	1	10

Tabela 12. Valores de qui-quadrado (χ^2) para comparação das frequências de quebras e falhas observadas (O) e esperadas (E), em relação ao tamanho dos cromossomos metafásicos. (*) $P < 0,05$.

Tabela 11. Distribuição das quebras e falhas, observadas em 14 pacientes, ao longo dos braços curto (p) e longo (q) e da região centromérica (c) dos cromossomos ou grupos cromossômicos, nos diferentes tipos de tratamento.

Tratamento	Nº de metáfases analisadas	1		2			3		B			C+X			D	16			17+18			F		G+Y
		p+q	c	p	q	c	p+q	c	p	q	c	p	q	c	q	p	q	c	p	q	c	p+q	c	q
RPMI	1.096	4		4	2		4	1	1	2		6	14	1	7	2	1		1					2
199	1.162	10		2	5		13		3	10	3	4	30	1	10	1			2			1	1	1
MTX	393	6		1	5	1	10		2	9	2	3	22		14		3		1	2		1		
BrdU	757	10	4	4	4		6		3	15	1	5	33	3	19	2	7		1	1		1		2
HOECHST	704	2		2		1	3	1	2	1		1	14	1	4	1			2					
TOTAL	4.112	32	4	13	16	2	35	2	11	37	6	19	113	6	54	6	10	1	1	8	1	3	1	5

Tabela 12. Valores de qui-quadrado (χ^2) para comparação das frequências de quebras e falhas observadas (O) e esperadas (E), em relação ao tamanho dos cromossomos metafásicos, (*) = $P < 0,05$.

Tratamento	Distribuição	Cromossomo ou Grupo Cromossômico							Total	χ^2	G.L.
		1	2	3	B	C + X	D	E+F+G+Y			
TC 199 + RPMI 1640	O	14	13	18	19	56	17	12	149	16,52(*)	6
	E	12	11	10	18	55	15	28			
MTX	O	6	7	10	13	25	14	7	82	15,82(*)	6
	E	7	6	5	10	30	9	15			
5-BrdU	O	14	8	6	19	41	19	14	121	11,73	6
	E	10	9	8	14	44	13	23			
Tamanho relativo no lote 2n*		16,88	16,04	13,66	24,76	76,42	21,52	38,90	208,18		

* Com base nos dados de LUBS e col (Paris Conference, 1971).



IV. DISCUSSÃO

Entre os 16 casos analisados, foram encontrados dois com alterações cromossômicas estruturais, do tipo translocação ou duplicação, dois com quebras preferenciais e dois com heteromorfismos de posição do bloco heterocromático do cromossomo 9. Discutir-se-á, a seguir, as informações da literatura relativas à associação desses fenômenos citogenéticos com as neoplasias humanas.

IV.1. Anomalias cromossômicas e neoplasias

A presença de anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais em aproximadamente 98% dos neoplasmas animais é um forte indício de que a transformação neoplásica está relacionada com alterações no material genético da célula normal (PATHAK & GOODACRE, 1986). Essas anomalias podem ser diferenciadas em dois tipos básicos: as primárias ou específicas, que seriam responsáveis pela iniciação e desenvolvimento do neoplasma, e as secundárias ou não específicas, que surgem durante a progressão do neoplasma, podendo ser responsáveis pelo crescimento, heterogeneidade e capacidade proliferativa do mesmo (PATHAK, 1986, para referências).

As anomalias identificadas como primárias podem ser constitucionais ou adquiridas. A associação de anomalias cromossômicas constitucionais com maior risco de desenvolvimento do processo maligno, é bem conhecida em vários tipos de neoplasias. Desde 1958 foi referida, por exemplo, a associação entre mongolismo e leucemias agudas, por STEWART e col (cf TOUGH

e col, 1961). Esses autores observaram 18 casos de mongolismo em uma amostra de 677 crianças falecidas de leucemias agudas. Tal associação, posteriormente, foi confirmada por outros pesquisadores (TOUGH e col, 1961; CONEN & ERKMAN, 1966).

Em relação às alterações estruturais, as translocações e deficiências são mais comumente encontradas em neoplasias como já referido na Introdução. A associação destas com a predisposição à formas específicas de neoplasias, verificada pela coincidência no padrão de segregação ao longo das gerações, foi documentada em várias famílias de afetados.

Uma dessas situações foi descrita por COHEN e col (1979), que estudaram 22 adultos de três gerações sucessivas de uma família com história de carcinoma renal. Entre estes, 10 apresentaram o cariótipo 46,XY(ou XX),t(3;8)(p21;q24). Os outros 12 membros tinham cariótipo normal. A translocação foi observada em 5 membros portadores do referido câncer, que ainda estavam vivos e foi inferida, pela análise do heredograma, a outros 3 de 5 membros já falecidos com o mesmo problema. Nenhum dos portadores do câncer tinha cariótipo normal.

Outra observação interessante foi feita por VANDYKE e col (1981), que detectaram a deficiência da banda 20p12.2 em todos os 10 membros afetados por neoplasia endócrina múltipla do tipo 2 (câncer de tiróide), em 5 famílias nas quais a característica segregava com padrão de herança autossômica dominante.

Dois outros excelentes exemplos de processos malignos com envolvimento de aberrações cromossômicas constitucionais são o retinoblastoma, um tumor intra-ocular, e o complexo WAGR, constituído de tumor de Wilms, aniridia, anomalias de genitália e retardo mental. Estas neoplasias apresentam-se nas formas hereditária e esporádica, e ambas podem apresentar uma defi

ciência específica das bandas 13q14 e 11p13, respectivamente (referências em SOLOMON, 1984; SPARKES, 1985; SLATER, 1986). KNUDSON (1971) e KNUDSON & STRONG (1972), hipotetizaram que tais cânceres poderiam ser causados por dois passos mutacionais. Os portadores da forma hereditária já possuiriam uma primeira mutação e só necessitariam da ocorrência da segunda, no órgão alvo, para desenvolverem o neoplasma. Nos casos esporádicos, onde a primeira mutação não é herdada, seriam necessários dois eventos mutacionais. Tal hipótese foi reforçada por uma série de autores, que observaram que as células tumorais dos pacientes frequentemente são homozigotas para aquelas deficiências citadas (YUNIS & RAMSAY, 1978; NAKAGOME e col, 1984).

Essas observações levaram à sugestão da existência de um tipo especial de genes naquelas bandas, os oncogenes recessivos, também chamados anti-oncogenes (KNUDSON, 1983; cf KNUDSON, 1985), que seriam supressores de oncogenes. Uma alteração do oncogene recessivo em ambos os homólogos e, consequentemente, de sua função, levaria ao desenvolvimento do processo maligno, o que não aconteceria na presença de um único alelo normal (KNUDSON, 1985; CAVENEE e col, 1986).

Uma das formas de envolvimento das aberrações cromossômicas específicas no processo maligno, relaciona-se com os oncogenes celulares. Um dos casos mais estudados é o do linfoma de Burkitt, uma neoplasia que afeta os linfócitos B do sistema imune, que são responsáveis pela produção de imunoglobulinas (Ig). Nesse linfoma, é característica a ocorrência de translocação entre os cromossomos 8 e 14 e, menos frequentemente, entre os cromossomos 8 e 2 ou 8 e 22. Na banda 8q24, envolvida em todas essas translocações, localiza-se o oncogene c-myc (DALLA-FAVERA e col, 1982; NEEL e col, 1982) e as outras bandas envolvidas, 14q32,

2p12 e 22q11, contêm os genes que codificam as cadeias leves e pesadas das Ig (CROCE e col, 1979, ERICSON e col, 1982; McBRIDE e col, 1982). designados por genes IGK, IGLV, IGLC, IGHJ, IGHV (HELSINKI CONFERENCE, 1985, para referências).

A introdução do oncogene c-myc em uma posição próxima aos genes citados, pode ter uma importância reguladora. Como estes genes são ativamente transcritos durante a diferenciação da célula B, é possível que os mecanismos que aumentam a sua transcrição nessas células, também influenciam a transcrição do c-myc (GILLIES e col, 1983). No entanto, como pode haver variação na localização dos pontos de quebra entre os introns e exons dos genes na banda 14q32, KORSMEYER & WALDMANN (1984), inferem que a mudança do ambiente do local c-myc é o aspecto mais importante desse fenômeno.

Uma vez que o produto do c-myc não difere qualitativamente entre as células normais e transformadas, mas o faz quantitativamente, sendo encontrado em níveis excessivamente altos nestas últimas, é possível, também, que a translocação permite a liberação do c-myc dos mecanismos que normalmente controlam sua expressão no cromossomo 8, levando assim, a malignização (CROCE & KLEIN, 1985). Entretanto, em alguns casos o envolvimento do c-myc parece improvável, sugerindo que apenas alterações nos genes para imunoglobulinas desencadeariam o processo maligno (PIMENTEL, 1985).

Neste estudo, dois pacientes eram portadores de alterações cromossômicas estruturais em todas as suas células: o caso 3, apresentando material extra no braço curto do cromossomo 22, originado por duplicação ou translocação de outro acrocêntrico, é o caso 16, apresentando material extra no braço curto do cromossomo 15, provavelmente derivado do braço longo do cromossomo Y.

Os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos humanos estão entre as regiões que mais frequentemente apresentam

heteromorfismos, ou seja, variantes da morfologia normal da heterocromatina (VERMA & DOSIK, 1980), sendo a presença de satélites duplos interpretada, na maioria das vezes, como a expressão de polimorfismo natural (BALICEK e col, 1982). É nas constrições secundárias que se localizam as regiões organizadoras do nucléolo (NORs), seqüências gênicas repetidas, que codificam o RNA ribossômico, e que podem ser consideradas homólogas nos cinco pares de acrocêntricos.

Por causa desta homologia, THERMAN e col (1981) propuseram que a duplicação do braço curto possa se originar por um processo de recombinação mitótica entre as bases dos satélites dos cromossomos acrocêntricos, cuja ocorrência confirmaram em pacientes com Síndrome de Bloom. Após a segregação, uma das células filhas apresenta cromossomos acrocêntricos com as regiões dos satélites aumentadas, em consequência da recombinação, e a outra apresenta acrocêntricos com satélites pequenos. A localização do quiasma é altamente específica, entretanto, a troca entre as cromátides dos acrocêntricos é mais ou menos casual. Muitas vezes o centrômero está presente no segmento trocado, o que condiz com o que foi observado no cromossomo 22 anormal, detectado no presente trabalho. Tal cromossomo apresenta duplicação da região centromérica, evidenciada por bandamento G e C e duplicação de RONS, evidenciada pelo bandamento Ag-NOR. A presença do cromossomo alterado em todas as células do paciente e de sua mãe poderia sugerir que uma recombinação mitótica teria ocorrido em um ancestral desses indivíduos, originando tal característica. Entretanto, esta mesma característica pode ter se originado simplesmente por recombinação meiótica ou translocação de outro acrocêntrico.

Ainda não se tem conhecimento suficiente da rela

ção da atividade dos genes ribossômicos com a origem e o desenvolvimento do processo maligno. Os vários trabalhos que a abordam têm resultados contraditórios. SCHULZE e col (1984), por exemplo, examinaram pacientes com doenças linfáticas malignas e pré-malignas e não encontraram diferença significativa na frequência de RONS ativas. Por outro lado, MURTY e col (1985), observaram uma diminuição estatisticamente significativa de RONS ativas em pacientes com lesões pré-cancerosas e cancerosas de cérvix uterino. KIVI & MIKELSAAR (1985), ao contrário, observaram um aumento significativo nas frequências de RONS ativas em mulheres com carcinoma de ovário e mama, com especial destaque para as dos cromossomos do grupo G.

Vários rearranjos cromossômicos observados em neoplasias humanas envolvem o cromossomo 22.

Entre os mais comuns estão a $t(8;22)(q24;q11)$, no linfoma de Burkitt e na LLA-L3, a $t(9;22)(q34;q11)$ em LMC, LMA e LLA e a $del(22)(q11)$ em tumores do sistema nervoso central (MITELMAN, 1983; BERGER e col, 1985a; LE BEAU & ROWLEY, 1986, para referências). Em todos esses casos, os rearranjos envolvem a banda 22q11, na qual está mapeado o oncogene c-sis (DALLA-FAVERA e col, 1982).

No presente caso, a participação desse oncogene no evento neoplásico poderia ser inferida se o cariótipo fosse 46,XY,dir dup(22p)(pter→q11::p13→qter), com quebra em 22q11. Todavia, pelo fato de que a mãe do paciente também é portadora dessa anomalia, não há indícios suficientes para admitir que ela tenha contribuído para a iniciação ou o desenvolvimento da condição neoplásica do paciente.

Em relação ao caso 16, não foi possível ampliar o estudo com outras técnicas, o que deverá ocorrer oportunamen-



te, mas se tem fortes indícios de que o material translocado no cromossomo 15 seja proveniente do braço longo do cromossomo Y .

A frequência de translocações Y/autossomos está em torno de 0,05% em amostras de recém nascidos (NIELSEN & RASMUSSEN, 1976; SMITH e col, 1979) e na população geral (SCHMID e col, 1983). Entretanto, SPOWART (1979) acredita que alguns dos casos descritos como translocação Y/autossomo sejam, de fato, duplicações de braço curto ou de satélite de acrocêntricos, o que reduziria a frequência dessa característica ao nível populacional.

Apesar das translocações envolvendo o cromossomo Y serem de vários tipos, conforme destacado nas revisões de SMITH e col (1979) e de DAVIS (1981), apenas 12 dos 22 autossomos ser vem como receptores do Yq, e desses, o cromossomo 15 é o mais comum, sendo observado em 42% das 63 translocações constantes da revisão de COHEN e col (1981).

Em relação aos efeitos fenotípicos destas translocações, não há qualquer conclusão definitiva. A maioria dos portadores de translocações Y/autossomos é fenotipicamente normal, entretanto, há descrições de tal característica em casos de infertilidade, genitália ambígua, retardo mental e hipogonadismo, entre outras anomalias congênitas (cf SMITH e col, 1979; COHEN e col, 1981; DAVIS, 1981). O estudo de cinco famílias com t(15;Y) realizado por NIELSEN e RASMUSSEN (1976), refere a não ocorrência de anomalias fenotípicas nos seus portadores e também não fornece indicações de que as mulheres com o cromossomo Y extra fossem menos férteis ou tivessem um aumento na taxa de abortos ou natimortos, comparadas com as mulheres de cariótipo normal da mesma família.

Com base em seus dados e na revisão da literatu-



ra, VIGUIÉ e col (1982) enquadraram as translocações Y/autossomos em três categorias, em função do achado citogenético e do fenótipo. A primeira, mais comumente observada, engloba translocações não recíprocas da região heterocromática do braço longo do Y para o braço curto de um cromossomo acrocêntrico, que não apresentam consequências patológicas evidentes e algumas vezes são transmitidas por várias gerações a indivíduos de ambos os sexos. A segunda categoria compreende as translocações entre Y/autossomos desequilibradas ou associadas a outras anomalias cromossômicas, que levam a malformações ou ambiguidades na determinação ou diferenciação sexuais. A terceira categoria é constituída por translocações recíprocas equilibradas entre Y e autossomos, que levam à infertilidade primária.

O caso 16 parece se enquadrar nessa terceira categoria. A paciente, portadora de uma translocação envolvendo um cromossomo 15 e, possivelmente, um cromossomo Y, é infértil, relatando que nunca sofreu abortamentos e que menstruou normalmente. Não foi possível o estudo citogenético de outros membros da família, mas soube-se da presença de outras duas mulheres estéreis (uma tia e uma prima), ligadas à família da mãe da paciente. Não houve informações de qualquer outro caso de câncer nesta família.

Frequentemente são encontradas alterações afetando o cromossomo Y nas neoplasias humanas, embora nenhuma delas seja primariamente relacionada com qualquer tipo de neoplasia. Em um excelente artigo de revisão, SANDBERG (1985) observou que, destas alterações, a mais frequente é a perda do cromossomo, o que já foi observado em quase todos os tipos de leucemias (em células de medula óssea e linfócitos) e de linfomas. Essa perda, geralmente, vem acompanhada por outras anomalias cariotípicas e

o seu significado é incerto, pois também tem sido descrita em células de medula óssea de homens idosos, hematologicamente normais, sendo relacionada com o processo de envelhecimento.

Por outro lado, HOLMES e col (1985), examinando 13 pacientes com leucemia mielóide aguda, cuja média de idade era 55 anos, encontraram em 9 deles a perda do cromossomo Y como evento único. Os autores então, sugeriram que a perda do cromossomo Y, embora incomum, seja um marcador cromossômico consistente na LMA em associação com um curso clínico agressivo e um prognóstico de sobrevida de aproximadamente 12 meses.

A presença de cromossomo Y extra em neoplasias é um fenômeno raro e, geralmente, vem acompanhado de cromossomos X extras, devido a algum mecanismo de falha na disjunção. As translocações envolvendo este cromossomo também são raras e o seu envolvimento na transformação neoplásica é incerto. Translocações constitucionais Y/17 e Y/15 foram encontradas em pacientes com leucemias e condições afins respectivamente, por ALIMENA e col (1985) e BENITEZ e col (1987), conforme referido por HECHT (1987). FUNDERBURK e col (1982) encontraram uma translocação familiar do tipo Y/15 em uma menina que faleceu de meduloblastoma e cuja autópsia revelou um neuroganglioma de adrenal, além de útero e ovários hipoplásticos. Como não houve recorrência familiar de neoplasias, os autores concluíram que as alterações afetando o cromossomo Y provavelmente constituem eventos citogenéticos secundários nas células neoplásicas.

Com relação às alterações do cromossomo 15 em processos malignos destaca-se a $t(15;17)$, característica da leucemia promielocítica aguda, cuja especificidade é como a da $t(9;22)$ em LMC ou da $t(8;21)$ em LMA (ROWLEY, 1978, para referências. Esta especificidade foi confirmada por vários autores como BERNSTEIN e col (1980), BERNARD e col (1982), HAGEMEIJER e col (1982) e SHEER e col (1985) e os pontos de quebra reconhecidos em 15q22 e 17q21 (BERGER e col, 1985a, para referências). MISAWA



e col (1986) observaram a t(15;17) em uma forma promielocítica da crise blástica de um paciente com LMC, que desapareceu das células da medula óssea após a quimioterapia. O aparecimento da t(15;17) em associação com o aumento de promielócitos anormais levou à sugestão de que a transformação promielocítica aguda ocorre durante o curso da LMC e, segundo os autores, contribui para reforçar a especificidade de atuação de certos rearranjos cromossômicos em células alvo particulares.

Assim, a associação da t(15;17) com uma célula específica, isto é, com os promielócitos malignos, inclusive em diagnósticos clínicos diferentes, sugere que os cromossomos afetados são portadores de genes importantes para função, maturação ou proliferação destas células. É interessante ressaltar que na banda 17q11 foi mapeado o oncogene c-erb-A (DAYTON e col, 1984; MITELMAN e col, 1986). No entanto, sua participação no processo leucêmico ainda não está confirmada (LE BEAU e col, 1986).

O caso 16 apresentou diagnóstico de câncer de pulmão. Os estudos das células malignas de portadores desta neoplasia têm sido realizados em preparações diretas de células metastáticas na medula óssea ou em linhagens celulares *in vitro* obtidas dos tecidos neoplásicos e revelam achados heterogêneos. Em quatro casos estudados por YUNIS (1983), foi encontrada uma deficiência de parte do braço curto de um cromossomo 3, del(3)(p14 → p23). Por outro lado, em 19 linhagens derivadas de 15 pacientes com esta neoplasia, WURSTER-HILL e col (1984), não observaram consistência nas anomalias cromossômicas. Foram observados segmentos cromossômicos amplificados (DM e HSR), regiões anormalmente bandeadas (ABR) e cromossomos marcadores identificados como sendo o 1, o 6 e o 11, mas o marcador 3p- foi observado apenas em uma minoria das células. No entanto, a grande maioria desses pacien-

tes já havia sido exposta à radioterapia anteriormente à retirada do material para montagem das culturas celulares o que pode ter levado à mudança nas alterações inicialmente existentes. Além disso, culturas de longa duração podem levar à perda seletiva de cromossomos (BARTINITZKE e col, 1982, também para referências), sendo que preparações diretas, como as utilizadas por YUNIS(1983), dão resultados mais confiáveis.

IV.2. Sítios frágeis e neoplasias

O papel dos SF no desenvolvimento de neoplasias tem sido motivo de muita especulação. Vários pesquisadores (YUNIS, 1983; HECHT & SUTHERLAND, 1984; HECHT & HECHT, 1984a, b, 1985), sugeriram que eles podem atuar como um fator de predisposição a rearranjos cromossômicos, contrariando a idéia de que as quebras cromossômicas têm uma distribuição casual no genoma.

HECHT & SUTHERLAND (1984), baseados na localização de 21 SF e de 50 pontos de quebra encontrados em neoplasias, observaram que existe uma associação estatisticamente significativa entre eles. Dos 21 SF, 9 localizam-se nesses pontos de quebra ou próximos a eles. Tal associação não é limitada a uma única classe de SF, nem a um tipo de câncer, sendo observada em leucemias, linfomas e tumores sólidos.

DE BRAEKLIER e col (1985) analisaram a distribuição de 6630 pontos de quebras cromossômicas envolvidas em rearranjos estruturais descritos na literatura, dos quais 5714 observados em leucemias e linfomas e 916 em tumores sólidos. Nos casos de leucemia e linfoma, vinte braços cromossômicos apresentaram uma frequência alta de quebras, sendo que sete coincidiram

com a localização de SF raros e comuns que, aparentemente, estavam envolvidos nos rearranjos estruturais. Com relação aos tumores sólidos, três dos cinco braços cromossômicos que apresentavam uma frequência aumentada de quebras, continham sítios frágeis.

Reforçando tais resultados, DANIEL (1986) destacou a coincidência entre 31 pontos de quebra envolvidos em rearranjos cromossômicos específicos de certas neoplasias, com 20 SF comuns e 6 SF raros. A conclusão deste trabalho é que 84%(26/31) dos pontos de quebras específicos de neoplasias ocorrem em SF, e 39% (26/66) dos SF são pontos de quebra significativamente frequentes nos clones neoplásicos.

Já foram referidos vários casos de coincidência entre SF e os pontos de quebra envolvidos nos rearranjos observados nas células do mesmo paciente, como por exemplo: fra(11)(q13) e t(11;14)(q13;q32) em linfoma linfocítico, fra(3)(p14) e del(3p) em câncer de pulmão, fra(16)(q22) e inv(16)(p13q22) em LMA, entre outros (PATHAK e col, 1982; WANG-PENG e col, 1982; SESSAREGO e col, 1983; YUNIS, 1983; MURATA e col, 1987).

A relação entre SF, oncogenes e rearranjos cromossômicos nas células neoplásicas não é clara, principalmente, porque ainda não se tem informações suficientes sobre a localização subcromossômica dos oncogenes. No entanto, alguns deles, como o c-erb-B2, o c-bcl-1, o c-ets-1 e o c-sis, estão localizados em regiões de SF cromossômicos, ou seja, em 7p11, 11q13, 11q23 e 22q13, respectivamente (SWAN e col, 1982; ERIKSON e col, 1984; KHAN & SMITH, 1984; TAISNE e col, 1984).

Os dados citogenéticos do caso 1 e de seus familiares demonstraram a ocorrência de quebras preferenciais em 13q mediano. A qualidade dos cromossomos analisados após bandamento G não permite precisar se a quebra ocorre em 13q14 ou 13q21. A

fragilidade em 13q14 só foi descrita anteriormente por BAMEZAI (1984), em um paciente com retinoblastoma e em um outro com hipogonadismo e deficiência visual, mas como casos esporádicos. Nesses casos, o SF foi observado em uma frequência de 2% nas células cultivadas e independeu da presença de ácido fólico ou BrdU no meio. Na banda 13q21, por sua vez, é conhecido um SF comum, cuja expressão é aumentada pela cafeína (YUNIS & SORENG, 1984; BERGER e col, 1985a).

No presente caso, a fragilidade em 13q mediano foi observada em culturas desenvolvidas em RPMI 1640 e não teve sua expressão aumentada nas células cultivadas em TC199 com a adição de MTX. Além disso, sua expressão não foi alterada com a adição de 5-BrdU ou Hoechst 33258. Com base nestes resultados, não se pode referir tal fragilidade como pertencente a qualquer dos três grupos de SF raros, ou confirmá-la como o sítio frágil comum, devido à falta de estudos adicionais com substâncias químicas que aumentam sua expressão. Pode-se, contudo, sugerir que a família estudada apresente um sítio frágil na porção mediana do braço longo do cromossomo 13, na banda 13q14 ou 13q21.

Na banda 13q14 foram mapeados os genes para a susceptibilidade ao retinoblastoma (Rb1), um câncer de retina, e para a esterase D (ESD), uma enzima encontrada na maioria dos tecidos humanos, cuja função ainda permanece desconhecida (SPARKES e col, 1980; SPARKES, 1985). Nessa família não há indicações do envolvimento da fragilidade em tais características, não há casos de retinoblastoma e os níveis de esterase D são normais. No entanto, como BAMEZAI (1984) encontrou um SF em 13q14 muito raro em um paciente com retinoblastoma, é possível que a fragilidade facilite a perda dessa banda, que é uma condição para o desenvolvimento de tal neoplasia.

Como já referido, vários autores sugeriram que os SF pre

disponham ao aparecimento de anomalias cromossômicas estruturais relacionadas com neoplasias, pelas inúmeras associações entre os SF e os pontos de quebra nas aberrações cromossômicas específicas de certas condições neoplásicas. Entretanto, nem sempre fica claro o envolvimento da fragilidade na evolução do cariótipo anormal, como o observado em pacientes analisados por HAAS e col (1985), SHABTAI e col (1985a) e por MULERIS e col (1987).

Os rearranjos envolvendo a banda 13q14 aparecem frequentemente nas alterações hematológicas malignas e pré-malignas (JOHNSON e col, 1985). Segundo MORGAN & HECHT (1985) a deficiência da banda 13q14 parece constituir um evento primário na iniciação da pré-leucemia, que pode evoluir para LMA em decorrência de um rearranjo adicional, envolvendo outro cromossomo. No caso 1, é possível que a fragilidade em 13q mediano tenha levado a uma deficiência dessa banda em uma célula eritromielóide, originando o primeiro passo da malignização. A t(8;21), frequente em pacientes com LMA-M2 (cf LE BEAU & ROWLEY, 1986), teria ocorrido posteriormente em uma célula do clone pré-leucêmico.

A expressão das quebras em 13q mediano não foi alterada nas células malignas do paciente, mas há descrição de um paciente com LMC, que apresentava o FRA10B, em 6% dos linfócitos normais e em 28% de suas células malignas (MORGAN e col, 1985). Nesse caso, embora o SF não estivesse envolvido na anomalia cromossômica observada nas células malignas, que era o cromossomo Ph¹, a malignidade parece ter atuado aumentando sua expressão.

Com relação à banda 13q21, não há referências de seu envolvimento específico nos rearranjos cromossômicos observados em neoplasias (BERGER e col, 1985a). Entretanto, há descrições de deficiências e translocações envolvendo tal banda, em indivíduos com diversos tipos de leucemias, inclusive leucemia mielóide aguda (MITELMAN, 1983).

As células do caso 5, portadora de LLA-L2, apresentaram uma frequência elevada de quebras em 3p14, todas observadas em cromossomos

submetidos ao bandamento G, descartando-se, portanto, a possibilidade de inclusão de quebras em 3q mediano nessa frequência. Como pode-se observar na Tabela 10, outros pacientes apresentaram frequências próximas à deste caso, porém, incluindo análise em coloração usual na grande maioria das vezes, que englobou quebras em ambos os braços e em diferentes regiões dos mesmos.

Inicialmente a região 3p14 foi descrita como um SF raro (WEGNER, 1983), mas essa idéia foi rapidamente ultrapassada por seu achado em grande número de indivíduos (HOWARD-PEEBLES, 1984; SUTHERLAND, 1985a; HECHT, 1986). Mais recentemente, este SF foi considerado o mais comum na espécie humana, acreditando-se que todos os indivíduos o possuam, pois tal região é a mais susceptível a quebras de todo o genoma. É possível, inclusive, que existam polimorfismos hereditários com relação à sua expressão (SMEETS e col, 1986, também para referências). Com base nisso, pode-se considerar que todos os pacientes da amostra estudada apresentam este SF. Entretanto, com a metodologia utilizada no presente trabalho, destacou-se a frequência com que as quebras aparecem nesta região na paciente 5, em relação aos demais indivíduos estudados.

Os estudos que utilizam marcadores centroméricos fluorescentes mostram que ambos os homólogos de um mesmo indivíduo pode ter lesões em 3p14 com igual frequência (SMEETS e col, 1986, também para referência). Com relação à paciente 5 e a seu pai, a frequência observada tanto pode se referir a ambos os homólogos como a um só deles, pois não foram realizados estudos com fluorescência para o esclarecimento deste fato.

O envolvimento da banda 3p14 já foi descrito em rearranjos cromossômicos observados em vários tipos de neoplasias, como tumores de glândula salivar, de pulmão e de rim (COHEN e col, 1979; WANG-PENG e col, 1982; YUNIS, 1983; WURSTER-HILL e col, 1984; YUNIS & SORENG, 1984). A investigação das células malignas da paciente não foi possível, mas na literatura não há descrições da participação da banda 3p14 em rearranjos encontrados em LLA, tipo da neoplasia por ela apresentada (MITELMAN, 1983; BERGER e col, 1985a; LE BEAU & ROWLEY, 1986). Como nada é conhecido sobre os genes contidos nesta banda, a casualidade da sua relação com determinados tipos de neoplasias continua questionável.

IV.3. Heteromorfismos e neoplasias

Na espécie humana, os heteromorfismos mais comuns envolvem os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, o braço longo do cromossomo Y, o centrômero dos cromossomos 3 e 4 e as regiões de constrição secundária (h) dos cromossomos 1, 9 e 16.

Os cromossomos heteromórficos podem ser classificados pelo tamanho, posição de intensidade de coloração da região heterocromática, avaliados com o uso de técnicas especiais de bandamento cromossômico como Q, C e Ag-NOR (VERMA & DOSIK,



1980). O bandamento C, por exemplo, cora as regiões de constrição secundária dos cromossomos 1, 9 e 16, a região distal (um a dois terços) do Yq, os centrômeros de todos os cromossomos e os satélites dos acrocêntricos.

Diversos estudos mostraram variações significativas na frequência de certos heteromorfismos em populações humanas, tendo a raça negra heteromorfismos mais proeminentes (VARELLA-GARCIA, 1982; ANDRADE, 1986, ambos para referências). Por exemplo, VERMA e col (1981), estudaram heteromorfismos cromossômicos em 160 americanos, negros e brancos, e observaram heteromorfismos de posição no cromossomo 9 em uma frequência duas vezes maior em indivíduos negros, comparada com a dos brancos. Considerando-se os dois grupos étnicos, as inversões pericêntricas do bloco heterocromático do cromossomo 9, como observado em dois dos pacientes estudados neste trabalho (casos 10 e 15), ocorrem em frequências variáveis de 1 a 3% (cf HOWARD-PEEBLES, 1932).

Há várias descrições de alterações no bloco heterocromático, especialmente dos cromossomos 1 e 9, em diversos tipos de neoplasias, e uma possível associação entre tais eventos foi proposta por diversos autores.

ATKIN (1977), foi o primeiro a sugerir uma relação entre heteromorfismo de tamanho no cromossomo 1 e susceptibilidade a algumas formas de câncer, como o carcinoma de ovário. Este autor observou que 32 dos 58 pacientes com neoplasias eram portadores da variante $1qh^+$, contra 17 dos 55 controles, havendo uma diferença significativa entre essas amostras. SHABTAI & HALBRECHT (1979), examinaram 120 pacientes com doenças hematológicas malignas e pré-malignas e observaram uma frequência aumentada de heteromorfismos dos tipos $1qh^+$, $9qh^+$, inversão parcial do 1 e do 9 e inversão total do 9, quando comparados com o grupo

controle. Tais autores sugeriram então, um possível envolvimento dos heteromorfismos no processo maligno.

Mais recentemente foram encontradas frequências aumentadas da variante $1qh^+$ em pacientes com carcinoma de cérvix uterino (ATKIN & BRITO-BABAPULLE, 1983) em pacientes com neoplasias de cabeça, pescoço, mama e órgãos genitais (PETKOVIC, 1983) e com neoplasias de origem epitelial (ATKIN & BRITO-BABAPULLE, 1985), assim como da variante $9qh^+$ em crianças com neoplasias de diversos tipos (PETKOVIC e col, 1985). No entanto, há autores que relatam aumento na frequência da variante $1qh^-$, como AGUILAR e col (1981) em carcinoma de mama e LABAL DE VINUESA e col (1984) em leucemias agudas e crônicas.

Frequências significativamente aumentadas de inversões parciais e totais dos blocos heterocromáticos dos cromossomos 1 ou 9 já foram referidas em pacientes com câncer de mama (BERGER e col, 1985b), de sistema nervoso central (REY e col, 1985), com carcinomas de cólon e reto (HEIM e col, 1985; SHABTAI e col, 1985b) e neoplasias primárias múltiplas (CHUDINA e col, 1985).

Entretanto, muitas outras investigações não confirmam qualquer correlação direta entre o aumento da susceptibilidade a doenças neoplásicas e alterações da heterocromatina constitutiva. Entre esses, destacam-se a análise de KIVI & MIKELSAAR (1980), com carcinoma de ovário e mama, o de SAMPAIO (1983) com leucemias e condições afins, o de BERGER e col (1983) com sarcomas de tecidos moles, o de SCHULZE e col (1984), com doenças linfáticas malignas e pré-malignas e o de KRISTOFFERSON e col (1985) com linfoma de Hodgkin.

Como se constata, a controvérsia entre os resultados obtidos impede que se estabeleça a associação de qualquer ti



po de heteromorfismo com qualquer tipo de neoplasia. No entanto, também não se pode considerá-los todos meramente casuais e a principal dificuldade no esclarecimento da questão acaba sendo o relativo desconhecimento das próprias funções da heterocromatina.

As principais hipóteses para estas funções incluem a proteção de áreas vitais do genoma, como centrômero e organizadores nucleolares, proteção da eucromatina contra agentes clastogênicos, controle do mecanismo de atração entre cromossomos homólogos e não homólogos, regulação da permuta meiótica e até um papel evolutivo, representado pelo envolvimento preferencial em inúmeros rearranjos cromossômicos (SAMPAIO, 1983, para referências).

Na tentativa de justificar alguns achados que relacionam os heteromorfismos com as condições neoplásicas, SHABTAI e col (1985b) propuseram que determinadas áreas eucromáticas pericentroméricas, próximas à heterocromatina, contivessem genes reguladores da expressão da malignidade e que alterações nessa pudessem reprimi-los ou ativá-los.

Neste trabalho, os heteromorfismos de tamanho e posição do bloco heterocromático só foram considerados em relação aos cromossomos 1 e 9, tendo sido encontradas inversões parcial e total de 9qh nos pacientes 10 e 15, respectivamente. Considerando que a inversão parcial do 9qh é encontrada em cerca de 10% dos caucasóides (VARELLA-GARCIA, 1982) e a inversão total do 9qh em cerca de 1% dos negróides (VERMA e col, 1981), pode-se considerar tais achados casuais.

Um aspecto interessante a destacar é que a pesquisa de heteromorfismos tem sido feita em linfócitos de sangue periférico dos pacientes com neoplasias. No entanto, para estabelecer uma possível relação causal entre tais heteromorfismos e

câncer seriam mais informativos os estudos comparativos entre as linhagens normal e maligna do mesmo paciente.

IV.4. Exposição ocupacional, hábito de fumar e neoplasias

Já foi referida, anteriormente, a possível associação das aberrações cromossômicas e dos SF com a origem e o desenvolvimento de neoplasias. Por outro lado, também já é bem conhecida a importância de determinados agentes ambientais na indução de aberrações cromossômicas (NATARAJAN, 1984, para referências) e na expressão dos SF (SUTHERLAND e col, 1985a). Por conseguinte, não se pode deixar de discutir a relação entre esses agentes e as neoplasias.

A relação das anomalias cromossômicas das células malignas humanas com determinados fatores externos, foi primeiramente destacada por MITELMAN e col (1978). Estes pesquisadores verificaram, em um estudo retrospectivo de 58 pacientes adultos com LMA, que as aberrações cromossômicas clonais eram significativamente mais comuns nos pacientes com exposição ocupacional prévia a agentes potencialmente mutagênicos e carcinogênicos, do que naqueles sem tal história de exposição ocupacional.

Esses resultados são corroborados pelos achados de pacientes que desenvolveram leucemias agudas, tanto após exposição ocupacional a agentes mutagênicos e carcinogênicos como a agentes terapêuticos, como radiação ou drogas citotóxicas (ROWLEY, 1983, 1985).

Dos seis pacientes adultos deste estudo, um (caso 1) trabalhou por bastante tempo em construção civil, com tintas e na aplicação de pisos de borracha, utilizando produtos de

rivados do petróleo altamente tóxicos, três (casos 2, 3 e 15) trabalhavam como lavradores desde a infância e relataram sua exposição a diversos agrotóxicos sem qualquer tipo de proteção. Dos dois restantes, um trabalhava em serviços gerais (caso 14) e o outro com serviços domésticos (caso 16).

Entre os agentes de exposição ocupacional mais frequentemente admitidos como prejudiciais à saúde do trabalha-dor, destacam-se os produtos derivados do petróleo, como o benzeno e o xileno, e os agrotóxicos. O papel dos primeiros na indução de neoplasias tem ficado bem caracterizado, sabendo-se que atuam sobre as células da medula óssea, ocasionando clones aberrantes (HOGSTEDT e col, 1981) diretamente responsáveis pela ocorrência de leucemia, ou mais susceptíveis a atuação de outros agentes (cf FORNI, 1984).

Um risco aumentado para o desenvolvimento de leucemias e linfomas tem sido associado com várias profissões que utilizam derivados de petróleo rotineiramente, na área da construção civil, manufatura de produtos de borracha, manufatura de sapatos, impressão de retrogravuras, manufaturas de produtos terapêuticos e outros (cf TSONGAS, 1985), o que confirma tais prejuízos.

Em relação aos agrotóxicos, sabe-se que alguns dos mais amplamente utilizados, como os organoclorados e os organofosforados, são potencialmente mutagênicos (cf WILD, 1975; GRANT, 1979 e VARELLA-GARCIA, 1980), o que sugere que também podem atuar na carcinogênese.

Apesar de não se poder excluir a interferência dos agrotóxicos, predispondo ou atuando de alguma forma nos passos iniciais do estabelecimento da lesão maligna, na amostra estudada deve-se destacar que o fator responsável pela incidência eleva-

da de aplicadores de agrotóxicos é o fato de que a maior parte dos pacientes provinha do Hospital de Base, conveniado com o FUNRURAL.

Outro aspecto a ser discutido é o do hábito de fumar. Os indivíduos fumantes apresentam uma frequência elevada de aberrações cromossômicas estruturais, comparados com os não fumantes (OBE e col, 1982, para referências). Os agentes contidos no cigarro que podem ser responsáveis por tal efeito, são desconhecidos. O cigarro contém contaminantes radioativos, e cerca de 1200 entidades químicas diferentes, muitas das quais mutagênicas ou carcinogênicas. É possível que tais agentes potencialmente tóxicos possam exercer uma atividade clastogênica *in vivo*, ou induzir danos *in vitro*, se estiverem presentes no soro dos indivíduos fumantes (OBE e col, 1982; LITTLEFIELD & JOINER, 1986, ambos também para referências). Além disso, as evidências epidemiológicas mostram que o cigarro esta seguramente estabelecido como a principal causa do câncer de pulmão (WALD, 1985, para referências). Embora os mecanismos envolvidos nesta relação sejam desconhecidos, o cigarro induz números consideráveis de quebras de cadeia única no DNA, que podem ser atribuídas ao oxigênio ativo gerado pela metabolização dos seus compostos (NAKAYAMA e col, 1985).

Dos seis pacientes adultos do presente estudo, cinco eram fumantes (casos 1, 2, 3, 14 e 15) e dois deles (casos 14 e 15) portadores de câncer de pulmão. Embora sugestivos, esses dados são insuficientes para se estabelecer relação entre o hábito de fumar e o desenvolvimento de neoplasias.

A indução de neoplasias, muitas vezes, decorre da interação entre diferentes agentes ocupacionais ou destes com agentes não ocupacionais, tais como aqueles derivados do hábito



de fumar. Um exemplo desta interação é a de asbestos e cigarro, no câncer de pulmão. Indivíduos expostos aos dois agentes apresentam uma frequência muito aumentada de neoplasias pulmonares, comparada com aquelas dos indivíduos expostos a apenas um desses agentes (SARACCI, 1985).

Há muito tempo é reconhecido que algumas regiões cromossômicas são mais sensíveis à ação de agentes mutagênicos, enquanto outras parecem ser mais resistentes (MEYNE e col, 1979). De grande interesse é o achado de que a banda 13q14 é uma das regiões mais sensíveis a agentes clastogênicos, e alguns autores mostraram que fibroblastos com del (13)(q14), derivados de pacientes com retinoblastoma, podem ter defeitos no mecanismo de reparo do DNA (cf FITCHETT e col, 1987). Tais dados sugerem que essa região seja particularmente sensível aos efeitos de determinados agentes, que podem resultar em alterações gênicas ou cromossômicas, levando à perda do controle da proliferação celular. Essas características também podem ser aplicadas no esclarecimento da origem do retinoblastoma (FITCHETT e col, 1987), e de alterações hematológicas pré-malignas e malignas (JOHNSON e col, 1985), inclusive da observada no caso 1 deste estudo.

IV.5. Condições de cultivo celular e clastogenicidade

A ocorrência aumentada de quebras, seguidas ou não de rearranjos é um fenômeno frequentemente observado em individuos expostos a agentes mutagênicos, como citado anteriormente, e em pacientes com síndromes de instabilidade cromossômica, como a síndrome de Bloom (SCHROEDER & GERMAN, 1974; KUHN & THERMAN, 1986). Um aumento na frequência de falhas e quebras casuais e

não casuais já foi descrito também em linfócitos de indivíduos com SF, em condições de cultivo sensíveis à sua expressão (SUTHERLAND, 1977; JACKY e col, 1983, ambos para referências) e de indivíduos com neoplasias (HART, 1983; LE BEAU e col, 1986, para referências).

Neste trabalho, a instabilidade cromossômica foi investigada em linfócitos cultivados nos meios RPMI 1640 e TC 199, este último com e sem a adição de MTX, 5-BrdU e Hoechst 33258. Esses meios possuem composições diferentes, inclusive na quantidade de determinadas vitaminas. O RPMI 1640, por exemplo, apresenta cem vezes mais ácido fólico que o TC 199 (DIFCO LABORATORIES, 1984).

Já está bem estabelecida a influência da composição do meio de cultura na incidência das quebras cromossômicas. Culturas incubadas com meio TC 199 mostram uma incidência aumentada destas anomalias quando comparadas com as desenvolvidas em RPMI 1640 (KECK & EMERIT, 1979, também para referências), o que tem sido atribuído à deficiência de ácido fólico, que é precursor de compostos fundamentais para a síntese do DNA. Sua baixa concentração é responsável, como já visto, também pelo aparecimento dos SF sensíveis ao folato (SUTHERLAND, 1979a; ERBE & WANG, 1984; REIDY & CHEN, 1984; BRANDA e col, 1984; LI e col, 1986).

Neste trabalho, seis pacientes apresentaram uma frequência aumentada de metáfases com anomalias, em culturas desenvolvidas em TC 199 e apenas três exibiram tal característica, naquelas cultivadas em RPMI 1640, correspondendo ao esperado com base na composição de tais meios e, provavelmente, sem qualquer relação com a condição neoplásica.

O metotrexato (ácido 4-amino-N¹⁰-methylpteroylglutâmico) é um antagonista do ácido fólico que altera a duplica-



ção normal do DNA, por inibir a enzima redutase do di-hidrofolato (CAMARGO & CERVENCA, 1980, para referências). A exposição de culturas de linfócitos ao MTX induz um bloqueio no ciclo celular, provavelmente antes ou durante a fase S. Tal composto exerce, então, um efeito clastogênico que parece ser particularmente grave quando a concentração da droga é alta, resultando, inclusive, na diminuição do índice mitótico (MONDELLO e col, 1984, também para referências). A adição de MTX durante as últimas 24 horas da cultura de linfócitos tem apenas um efeito moderado, mas leva à expressão aumentada dos SF sensíveis ao folato (SUTHERLAND, 1979a).

Outro composto utilizado neste trabalho foi a 5-BrdU. Tal composto é um análogo halogenado da timidina e apresenta uma variedade de efeitos sobre as células de mamíferos, incluindo toxicidade, mutagenicidade, clastogenicidade, supressão da diferenciação celular e indução das trocas entre cromátides irmãs (SINHA e col, 1984, também para referências). Seus efeitos na célula ocorrem por dois mecanismos: um dependente da substituição, que ocorre como consequência da incorporação da 5-BrdU no lugar da timidina e outro dependente da concentração, que resulta da perturbação dos níveis de trifosfato de desoxirribonucleotídeo. Neste caso, o efeito primário é uma diminuição de trifosfato de desoxicitidina, devido a inibição da enzima redutase do nucleotídeo (GOLLIN e col, 1985a, também para referências).

O Hoechst 33258 (bisbenzímide) é um fluorocromo usado para a diferenciação longitudinal dos cromossomos. Ele se liga especificamente às regiões de DNA ricas em A-T, levando a uma descondensação destas áreas (PIMPINELLI e col, 1976; ZIMMER & WÄHNERT, 1986, ambos para referências).

Como citado, o MTX e a 5-BrdU possuem potencial



clastogênico, ao passo que o Hoechst 33258 não exibe tal característica mesmo se adicionado em concentrações relativamente altas (cf BUSCH e col, 1979).

Apesar do pequeno número de pacientes analisados neste trabalho não há indicações de que a condição neoplásica tenha aumentado a frequência de quebras nas suas células sanguíneas.

Em relação à distribuição das anomalias pelos cromossomos metafásicos, verificou-se que ela não foi casual. Esses achados são compatíveis com os da literatura. Muitos estudos já demonstraram a não casualidade na distribuição das quebras no cariótipo humano, destacando o envolvimento preferencial de alguns cromossomos, como o 1, 3, 7, 9, 11, 14 e 16, e um deficit em outros, como o 13, 18, 19, 20, 21 e 22 (AULA & KOSKULL, 1976; MATTEI e col, 1979, também para referências). Parte dessa não casualidade pode resultar da presença de SF comuns, como mencionado anteriormente.



V. RESUMO E CONCLUSÕES

Os estudos na área da citogenética das neoplasias vêm despertando grande interesse científico, no sentido de auxiliarem no entendimento do fenômeno da transformação celular a serem utilizados no diagnóstico, prognóstico e esclarecimento da etiologia dessas doenças. Espera-se que, futuramente, até possibilitem a identificação de indivíduos com alto risco de desenvolverem neoplasias, para prevenção e melhor tratamento dessas.

O presente projeto objetivou investigar a ocorrência de alterações cromossômicas constitucionais, inclusive de sítios frágeis, em portadores de neoplasias. Foram analisados citogeneticamente 16 pacientes, dos quais 3 com leucemia mielóide aguda, 7 com leucemia linfóide aguda, 3 com linfoma e 3 com carcinoma de pulmão.

A avaliação cariotípica foi realizada em linfócitos do sangue periférico, cultivados em TC 199 e RPMI 1640, com ou sem a adição de metotrexato, 5-bromodesoxiuridina e Hoechst 33258.

Entre os 16 casos analisados, dois apresentaram quebras cromossômicas preferenciais, o caso 1 em 13q mediano e o caso 5 em 3p14. O caso 3 apresentou um cromossomo 22 com braço curto aumentado, provavelmente resultante de duplicação de todo o braço curto, inclusive a região organizadora nucleolar, e da região centromérica. O caso 16 era portador de um derivado do cromossomo 15, formado por todo o seu braço longo e, possivelmente, com uma translocação do segmento distal do cromossomo Y no seu braço curto. Dois pacientes apresentavam variantes de posição da heterocromatina constitutiva, um com inversão parcial (caso 10) e outro com inversão total (caso 15) da região 9qh.

O exame cariotípico dos pais de quatro desses pa-



cientes (casos 1,3,5 e 10) mostrou que tais características eram hereditárias. Dos casos 15 e 16 não foi possível a investigação dos progenitores.

No caso 1 e em seus familiares, foi observada uma frequência elevada de quebras em 13q mediano, sugerindo a presença de um sítio frágil na banda 13q14 ou 13q21. Com base nos resultados obtidos, não se pode referir tal fragilidade como pertencente a qualquer dos três grupos de sítios frágeis raros, ou confirmá-la como um sítio frágil comum, devido à falta de estudos adicionais com substâncias que aumentam sua expressão.

Os rearranjos da banda 13q14 têm sido observados com frequências elevadas nas desordens malignas e pré-malignas e deficiências nesta banda são consideradas eventos primários na pré-leucemia. Caso a fragilidade ocorra em 13q14, poderia relacionar-se, embora indiretamente, com o desenvolvimento da condição neoplásica do caso 1. Com relação à banda 13q21 tal relação parece menos provável pois, embora existam referências de seu envolvimento em alterações observadas em vários tipos de câncer, verifica-se que ela não participa de rearranjos cromossômicos específicos associados com neoplasias.

A paciente 5 apresentou uma frequência aumentada de quebras em 3p14. Embora sugestivo, não se pode afirmar que tal fragilidade se refira a um dos homólogos do cromossomo 3, tanto na paciente como em seu pai, devido à ausência de estudos com marcadores centroméricos fluorescentes. Tal fragilidade deve estar presente nos demais indivíduos analisados, contudo, com a metodologia utilizada no presente trabalho, ela se manifestou de forma destacada apenas nas células desta paciente.

O envolvimento da banda 3p14 já foi descrito em rearranjos observados em vários tipos de neoplasias, contudo, não no tipo da leucemia apresentada pela paciente. Como as informações sobre os genes localizados em 3p14 não são esclarecedoras para se sugerir a participação dos mesmos no desenvolvimento do processo neoplásico, a casualidade da sua relação com determinados tipos de neoplasias continua questionável.

A alteração do cromossomo 22, observada no caso 3, apesar de sua ocorrência também na mãe do afetado pode estar relacionada ao seu processo maligno, se o ponto de quebra tiver sido 22q11, onde se localiza o oncogene c-sis.

O cromossomo anômalo do caso 16, provavelmente originado por $t(15;Y)$ é um achado raro na população. Associando ao fato de que essa paciente, portadora de carcinoma de pulmão, nunca foi fumante, essa anomalia cariotípica pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento da condição neoplásica.

O papel dos heteromorfismos do cromossomo 9, como observado nos casos 10 e 15, na etiologia da malignidade celular tem sido objeto de muita discussão e os resultados até o momento não levam a qualquer conclusão definitiva. A frequência elevada com que essas variantes são observadas na população, especialmente em negróides, como é o caso da paciente 15, indica que sua presença em pacientes com neoplasias pode ser casual.

Apenas o paciente 12, com cariótipo normal, portador de linfoma, apresenta uma possível história de câncer familiar.

Entre os seis pacientes adultos, quatro foram expostos ocupacionalmente a agentes possivelmente mutagênicos ou carcinogênicos (casos 1, 2, 3 e 15), e cinco eram fumantes (casos 1, 2, 3, 14 e 15). Não se pode excluir a participação desses agentes no desenvolvimento do processo neoplásico dos pacientes, uma vez que tal relação já está bem estabelecida pelos dados da literatura.

Além dos pacientes portadores de quebras preferenciais (casos 1 e 5), alguns outros também apresentaram frequências elevadas ($\geq 8\%$) de metáfases com quebras ou falhas cromossômicas, tanto em culturas desenvolvidas em TC 199 (casos 8, 9, 11 e 14), como em RPMI 1640 (casos 2 e 9), o que deve refletir condições biológicas particulares.

VI. SUMMARY

O aumento na frequência de metáfases com anomalias em culturas desenvolvidas em TC 199, comparadas com aquelas desenvolvidas em RPMI 1640, é compatível com o esperado com base na composição específica de cada um destes meios. As frequências mais elevadas de quebras e falhas cromossômicas foram encontradas nas culturas tratadas com o metotrexato, um antagonista dos folatos. Naquelas submetidas à 5-bromodesoxiuridina não se observou o efeito clastogênico do composto, devido à baixa concentração com que foi adicionado.

Os resultados relativos à distribuição das quebras ao longo dos cromossomos, exceto para os casos de fragilidade, concordam com aqueles descritos na literatura. Sendo assim, não se pode estabelecer qualquer relação entre localização preferencial de anomalias e processo neoplásico, na amostra estudada.

Não foi possível indicar uma associação direta de qualquer das características observadas com a condição neoplásica; entretanto, há sugestões de que algumas tenham desempenhado papel importante no desenvolvimento maligno de seus portadores.



VI. SUMMARY

Cytogenetic studies of neoplasias have aroused a great interest as a means to better understand the phenomenon of cellular transformation and for the diagnosis, prognosis and understanding of the etiology of these conditions. It is hoped that in the future it will even be possible to identify individuals with high risk of developing neoplasias, for their prevention and better treatment.

The present project has the objective of investigating the occurrence of constitutional chromosomal alterations including fragile sites, in persons having neoplasias. Sixteen patients were analyzed cytogenetically, 3 with acute myeloid leukemia, 7 with acute lymphoid leukemia, 3 with lymphoma and 3 with lung carcinoma.

The karyotypic analysis was realized in lymphocytes of peripheral blood cultivated in TC 199 and RPMI 1640, with or without the addition of metotrexate 5-bromodeoxyuridine and Hoechst 33258.

Two of the sixteen analyzed cases revealed preferential chromosomic breaks, the case 1 at the middle of the 13q and the case 5 at 3p14. Case 3 revealed one chromosome 22 with an increased short arm, probably caused by the duplication of the whole arm, including the nucleolar organizer and the centromeric regions. Case 16 manifested a derived form of chromosome 15 which possessed all of its long arm and a possible translocated distal segment of the Y chromosome on its short arm. Two patients revealed variance in the position of constitutive heterochromatin, one with a partial inversion (case 10) and the other (case 15) with a total inversion of the 9qh region.

The karyotypic examination of the parents of four of these patients (cases 1,3,5 and 10) demonstrated the characteristics to be hereditary. A family investigation was not possible in cases 15 and 16.



Case 1 and her relatives revealed elevated frequencies of breaks at median 13q, suggesting the presence of a fragile site at band 13q14 or 13q21. Based on the results obtained, it is not possible to refer such fragility as belonging to any of the three groups of rare fragile sites or to classify it as a common fragile site, due to the lack of further studies with substances which increase its expression.

The rearrangements of band 13q14 have been observed with high frequencies in malignant and premalignant disorders and deficiencies of this band are considered primary events in pre-leukemia. If the fragility occurs in 13q14, it could be related indirectly with the development of the neoplastic condition of case 1. With relation to band 13q21, such relation appears to be less probable since, although there are references to its involvement in alterations observed in several types of cancer, it has been verified that it does not participate in specific chromosome rearrangements associated with neoplasms.

Patient 5 showed a small increase in breaks in 3p14, however, although suggestive, it cannot be affirmed that such fragility refers to one of the homologs of chromosome 3, neither in the patient or in her father, due to the lack of studies with fluorescent centromere markers. Such fragility must be present in the other individuals analysed, however, with the methodology used in the present study, its occurrence was manifested in a distinct manner only in the cells of this patient.

The covering of band 3p14 has already been described in rearrangements observed in various types of neoplasms, however, not in the type of leukemia presented by this patient. Since information about the genes localized in 3p14 do not contribute to suggest their involvement in the development of the neoplastic

process, the fortuitousness of their relation with certain types of neoplasms continues questionable.

The alteration of chromosome 22, observed in case 3, despite its occurrence also in the mother of the patient, could be related to the malignant process if the break point had been 22q11, where the oncogene c-sis is located.

The anomalous chromosome of case 16, probably originated by t(15;Y) is a rare find in the population. Considering that this patient had a lung carcinoma and was never a smoker, this karyotypic anomaly could be considered a risk factor for the development of the neoplastic condition.

The role of the heteromorphisms of chromosome 9, as observed in cases 10 and 15, in the etiology of cellular malignity has been the subject of much discussion and the results until the present have not led to any definite conclusion. The elevated frequency of these variances observed in the population, especially in negroids, as in the case of patient 15, indicate that their presence in patients with neoplasias could be casual.

Only patient 12, with a normal karyotype and lymphoma, revealed a possible family history of cancer.

Of the six adult patients, four were occupationally exposed to possible mutagenic or carcinogenic agents (cases 1, 2, 3 and 15) and five were smokers (cases 1, 2, 3, 14 and 15). It is not possible to exclude the influence of these agents in the development of the neoplastic process of the patients, considering that such a relationship has been well established in the literature.

Besides the patients carrying preferential breaks (cases 1 and 5), some others also revealed elevated frequencies ($\geq 8\%$) of metaphases with chromosomal breaks and gaps, both in



cultures with TC 199 (cases 8,9,11 and 14) and with RPMI 1640 (cases 2 and 9), which must reflect particular biological conditions.

The increased frequency of metaphases with anomalies in cultures with TC 199, compared with those with RPMI 1640, is compatible with the expected considering the specific composition of each of these mediums. The highest frequencies of chromosomal breaks and gaps were found in cultures treated with metotrexate, an antagonist of the folates. In cultures submitted to 5-bromodeoxyuridine the clastogenic effect of the compound was not observed of the low concentration applied.

The results relative to the distribution of the breaks along the chromosomes, except for the cases of fragility, agree with those reported in the literature. This being the case, it is not possible to establish any relation between preferential localization of anomalies and neoplastic processes in the sample studied.

It was not possible to indicate a direct association of any of the observed characteristics with the neoplastic condition, however, there are suggestions some played an important role in the development of the malignant process.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, L.; LISTER, R.; RUZ, L. & MUTCHINICH, O. Constitutive heterochromatin polymorphisms in patients with malignant diseases. *Cancer*, 47: 2437-2439, 1981.
- ANDRADE, J.A.D. *Heteromorfismos Q em uma amostra de recém-nascidos negróides da cidade de São Paulo*. Tese de Doutorado, Departamento de Morfologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1986.
- ARINAME, T.; KONDO, I. & NAKAJIMAS, S. Frequency of the fragile X syndrome in Japanese mentally retarded males. *Hum. Genet.*, 73: 309-312, 1986.
- ATKIN, N.B. Chromosome 1 heteromorphism in patients with malignant disease: a constitutional marker for a high-risk group? *British Medical Journal*, 1: 385, 1977.
- ATKIN, N.B. & BRITO-BABAPULLE, V. Heterochromatin polymorphism and human cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 3: 261-272, 1981.
- ATKIN, N.B. & BRITO-BABAPULLE, V. Chromosome 1 C-band heteromorphisms in patients with carcinoma in situ and invasive carcinoma of the cervix uteri. *Aust. NZ J. Obstet. Gynaec.*, 23: 73-76, 1983.
- ATKIN, N.B. & BRITO-BABAPULLE, V. Chromosome 1 heterochromatin variants and cancer: a reassessment. *Cancer Genet. Cytogenet.* 18: 325-331, 1985.
- AULA, P. & KOSKULL, H. Distribution of spontaneous chromosome breaks in human chromosomes. *Hum. Genet.* 32: 143-148, 1976.
- BALÍCEK, P.; ZIZKA, J. & SKALSKÁ, R.H. G-band polymorphism of the short arms of human acrocentric chromosomes and relationship of variants of satellite associations. *Hum. Genet.*, 62: 237-239, 1982.
- BAMEZAI, R. New fragile sites in a D group chromosome 13 in human lymphocytes. *Indian J. Exp. Biol.*, 22: 479-481, 1984.

- BARTNITZKE, S.; BULLERDIEK, J.; WUESTENBERG, B. & SCHLOOT, W.
In vitro selection of tumor cells obtained from patients with ovarian carcinoma. A cytogenetic study. *Anticancer Research*, 2: 75-78, 1982.
- BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. & SULTAN, C. Proposal for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br. J. Haematol.* 33: 451-458, 1976.
- BERG, J.M.; FAUNCH, J.A. PENDREY, M.J.; PENROSE, L.S.; RIDLER, M.A.C. & SHAPIRO, A. A homozygous chromosomal variant. *Lancet*, 1: 531, 1969.
- BERGER, R.; BERNHEIM, A.; MITELMAN, F. & RYDHOLM, A. C-band pattern in lymphocytes of patients with soft tissue sarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 9: 145-150, 1983.
- BERGER, R.; BERNHEIM, A.; KRISTOFFERSSON, U.; MITELMAN, F. & OLSSON, H. C-band heteromorphism in breast cancer patients. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 18: 37-42, 1985b.
- BERGER, R.; BLOOMFIELD, C.D. & SUTHERLAND, G.R. Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites. *Cytogenet. Cell Genet.*, 40: 490-535. 1985a.
- BERNARD, P.; FIALON, P.; LONGY, M.; BOISSEAU, M.R. & BROUSTET, A. Acute promyelocytic leukemia with (15;17) translocation and chromosome n° 11 deletion (q23). *Leukemia Research*, 6: 869-871, 1982.
- BERNSTEIN, R.; MENDELOW, B.; PINTO, M.R.; MARCOM, G. & BEZWODA, W. Complex translocations involving 15 and 17 in acute promyelocytic leukaemia. *Br. J. Haemat.* 46: 311-314, 1980.
- BLOOMFIELD, C.D. Chromosomal abnormalities in acute leukemia. *Schweiz. Med. Wschr.*, 115: 1501-1505, 1985.
- BRANDA, R.F.; ARTHUR, D.C.; WOODS, W.G.; DANZL, T.J. & KING, R.A. Folate metabolism and chromosomal stability in the fragile X syndrome. *Am. J. Med.*, 77: 602-611, 1984.
- BRODEUR, G.M. & SEEGER, R.C. Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implication. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19: 101-111, 1986.

- BRYANT, E.M.; MARTINS, G.M. & HOEHN, H. Fragile X expression studies by clonal analysis and somatic cell hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 35: 223-225, 1983.
- BULLERDIEK, J.; BARTNITZKE, S.; KAHRS, E. & SCHLOOT, W. Cytogenetic observations on two ovarian carcinomas with double minutes, one with a 6q⁻ marker chromosome. *Cytobios* 42: 15-24, 1985.
- BUSCH, H.; CROOKE, S.T. & DASKAL, Y. Bristol -Myers Cancer Symposia. Volume 1. IN: GORDON, M. & CROOKE, S.T. (Eds.). *Effects of Drugs on the Cell Nucleus*. Academic Press, New York, 568 p., 1979.
- CAMARGO, M. & CERVENKA, J. Pattern of chromosomal replication in synchronized lymphocytes. *Hum. Genet.* 54: 47-53, 1980.
- CALVA-MERCADO, M.P.; MAUNOURY, C.; RETHORE, M.O. & LEJEUNE, J. Fragilite de l'X et inhibition de la dihydrofolate reductase. Comparaison des effets de deux antibiotiques: trimethoprim et pyrimetamine. *Ann. Genet.*, 26: 147-149, 1983.
- CAVENEY, W.K.; KOUFOS, A. & HANSEN, M.F. Recessive mutant genes predisposing to human cancer. *Mutation Research*, 168: 3-14, 1986.
- CHUDINA, A.P.; SELCHUK, V.J. & AKULENKO, L.V. C-heterochromatin variants in patients with primary malignant neoplasms. *Clin. Genet.*, 19: 497, 1981.
- COHEN, M.M.; FREDERICK, R.W.; BALKIN, N.E. & SIMPSON, S. The identification of Y chromosome translocations following distamycin A treatment. *Clin. Genet.* 19: 335-342, 1981.
- COHEN, A.; LI, F.P.; BERG, S.; MARCHETTO, D.J.; TSAI, S.; JACOBS, S.C. & BROWN, R.S. Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N. Engl. J. Med.*, 301: 592-595, 1979.
- CONEN, P.E. & ERKMAN, B. Combined mongolism and leukemia. *Am. J. Dis. Child.* 112: 429-443, 1966.
- CÔTÉ, G.B. & KATSANTONI, A. The fragile site on the long arm of chromosome 16. *Ann. Génét.* 23: 241-243, 1980.

- CÔTÉ, G.B.; PAPADAKOU-LAGOYANNI, S. & PANTELAKIS, S. A cascade of chromosomal aberrations in three generations: a fragile 16q, an extra fragment and a rearranged 20. *Ann. Génét.*, 21: 209-214, 1978.
- CROCE, C.M. & KLEIN, G. Chromosome translocations and human cancer. *Scientific American*, 252, 44-50, 1985.
- CROCE, C.M. & KOPROWSKI, H. La genética del cáncer humano. *Investigacion y Ciencia*, 19: 68-77, 1978.
- CROCE, C.M. ; SHADNER, M.; MARTINIS, J.; CICUREL, L. D'ANCONA, G.G.; DOLBY, T.W. & KOPROWSKY, H. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 76: 3416, 1979.
- CROCI, G. BrdU-sensitive fragile site on long arm of chromosome 16. *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 530-533, 1983.
- DALLA-FAVERA, R.; BREGNI, M.; ERICKSON, J.; PATTERSON, D.; GALLO, R. & CROCE, C.M. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. USA*, 79: 7824-7827, 1982.
- DALLA-FAVERA, R.; MARTINOTTI, S.; GALLO, R.C.; ERICKSON, J. & CROCE, C.M. Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science*, 219: 963-967, 1983.
- DANIEL, A. Clinical implications and classification of the constitutive fragile sites. *Am. J. Clin. Genet.*, (1-2): 419-427, 1986.
- DANIEL, A.; EKBLOM, L. & PHILLIPS, S. Constitutive fragile sites 1p31, 3p14, 6q26, and 16q23 and their use as controls for false-negative results with the fragile (X). *Am. J. Med. Genet.*, 18: 483-491, 1984.
- DAVIS, R.M. Localization of male determining factors in man: a thorough review of structural anomalies of the Y chromosome. *J. Med. Genet*, 18: 161-195, 1981.
- DAYTON, A.I.; SELDEN, J.R.; LAWS, G.; DORNEY, D.J.; FINAN, J. ; TRIPPUTI, P.; EMANUEL, B.S.; ROVERA, G.; NOWELL, P.C. & CROCE, C.M. A human c-erb-A oncogene homologue is closely

- proximal to the chromosome 17 breakpoint in acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4495-4499, 1984.
- DE BRAEKELEER, M.; SMITH, B. & LIN, C.C. Fragile sites and structural rearrangements in cancer. *Hum. Genet.* 69: 112-116, 1985.
- DE CLEIN, A.; VAN KESSEL, A.G.; CROSUELD, G.; BARTRAM, C.R.; HAGEMEIJER, A.; BOOTSMA, D.; SPURR, N.K.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; STEPHENSON, J.R. A celular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 300: 765-767, 1982.
- DE GROUCHY, J. & TURLEAU, C. *Atlas des Maladies Cromossomiques*. Paris, Expansion Scientifique Française, 1977.
- DE LA CHAPELLE, A. & BERGER, R. Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites. *Cytogenet. Cell Genet.* 37: 274-311, 1984.
- DEWALD, G.W.; NOWEL, P.; DAHL, R.F. & SPURBECK, J.L. Chromosome abnormalities in malignant hematologia disorders. *Mayo Clin. Proc.*, 60: 675-689, 1985.
- DIAMANDOPOULOS, G.T. & MEISSNER, W.A. IN: KISSANE, J.M. & ANDERSON, W.A.D. (Eds.). *Anderson's Pathology*. The C.V. Mosby Company, Missouri, St. Louis, pp. 514-559, 1985, 8^a edição.
- DIFCO LABORATORIES. *Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology*. Detroit, Difco Laboratories Inc., 1155p, 1984. 10^a edição.
- DUNNER, J.; MARTIN, A.O.; TRAISMAN, E.S.; TRAISMAN, H.S. & ELIAS, S. Enhancement of a fra(16)(q22) with distamycin A: a family ascertained through on abnormal proposita. *Am. J. Med. Genet.* 16: 277-284, 1983.
- ERBE, R.W. & WANG, J.C.C. Folate metabolism in humans. *Am. J. Med. Genet.* 17: 277-287, 1984.
- ERIKSON, J.; FINAN, J.; NOWELL, P.C. & CROCE, C.M. Translocation of immunoglobulin V_H genes in Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 5611-5615, 1982.

- ERIKSON, J.; FINAN, J.; TSUJIMOTO, Y.; NOWELL, P.C. & CROCE, C.M. The chromosome 14 breakpoint in neoplastic B cells with the t(11;14) translocation involves the immunoglobulin heavy chain locus. *Proc. Natl. Acad., Sci. USA*, 81: 4144-4148, 1984.
- EVANS, H.J. Cytogenetics of heritability in cancer. *IARC Sci. Publ.*, 39: 35-57, 1982.
- FITCHETT, M.; GRIFFITHS, M.J.; OSCIER, D.G.; JOHNSON, S. & SEABRIGHT, M. Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 24: 143-150, 1987.
- FOON, K.A. & TODD, R.F. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood*, 68: 1-31, 1986.
- FORNI, A. Chromosomal aberrations in monitoring exposure to mutagens-carcinogens. *IARC Sci. Publ.*, 59:325-337, 1984.
- FRIEDMAN, J.M. & HOWARD-PEEBLES, N. Inheritance of fragile X syndrome: an hypothesis. *Am. J. Hum. Genet.*, 23: 701-713, 1986.
- FRYNS, J.P. & PETIT, P. Population cytogenetics of autosomal fragile sites. *Clin. Genet.*, 31: 61-63, 1987.
- FUNDERBURK, S.J.; KLISAK, I.; SPARKES, R.S. & CARREL, R.E. Familial Y/autosome translocation in two unrelated girls. *Ann. Genet.*, 25: 119-122, 1982.
- GEBHART, E. Chromosomal aberrations in lymphocytes of patients under chemotherapy. IN: Obe. G. (Ed.) *Mutations in Man*, Berlin, Springer-Verlag, 1984.
- GEBHART, E.; TULUSAN, A.H.; MAILLOT, K.V. & MULZ, D. Double minutes - new markers in cells of human solid tumors. *J. Génét. Hum.*, 31: 45-47, 1983.
- GILBERT, F. Chromosomes, genes and cancer: a classification of chromosome abnormalities in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71:1107-1114, 1983.

- GILBERT, F. Chromosome abnormalities, genes amplification and tumor progression. IN: *Advances in Neuroblastoma Research*. Alain R. Liss, Inc. pp. 151-159, 1985.
- GILLIES, S.D.; MORRISON, S.L.; OI, V.T. & TONEGAWA, S. A tissue specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy-chain gene. *Cell*, 33: 717, 1983.
- GIRAUD, F.; AYME, S.; MATTEI, J.F. & MATTEI, M.G. Constitutional chromosomal breakage. *Hum. Genet.*, 34: 125-136, 1976.
- GLOVER, T.W. FUDR Induction of the X chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am. J. Hum. Genet.*, 33: 234-242, 1981.
- GLOVER, T.W., BERGER, C. & ECHO, B. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* 67: 136-142, 1984.
- GLOVER, T.W. & HOWARD-PEEBLES, P.N. The Effects of FUDR addition and methionine depletion on the X-chromosome fragile site. *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 117-122, 1983.
- GLOVER, T.W.; MORRIS-COYLE, J. & MORGAN, R. Fragile sites: overview, occurrence in acute nonlymphocytic leukemia and effects of caffeine on expression. *Cancer Genet. Cytogenet.* 19: 141-150, 1986.
- GLOVER, T.W. & STEIN, C.K. Induction of SCE at common fragile sites. in press, 1987.
- GOLLIN, S.M.; BOCK, H.G.O.; CASKEY, C.T. & LEDBETTER, D.H. A new family with fra (10) (q25): spontaneous expression and 100% expression with 100 μ M BrdU. *Am. J. Med. Genet.*, 21: 643-648, 1985b.
- GOLLIN, S.M.; HOLMQUIST, G.P. & LEDBETTER, D.H. Fra(10)(q25): The BrdU effect is substitution-dependent. *Am. J. Hum. Genet.*, 37: 208-214, 1985a.
- GORDON, H. Oncogenes. *Mayo Clin. Proc.*, 60: 697-713, 1985.
- GUICHAOUA, M.; MATTEI, M.G.; MATTEI, J.F. & GIRAUD, F. Aspects genetiques des sites fragiles autosomiques. A propos de 40 Cas. *J. Génét. Hum.* 30: 183-197, 1982.

- GRANT, W. The genotoxic effects of 2,4,5-T, *Mutation Research*, 65: 83-119, 1979.
- HAAS, O.A.; NACHEVA, E. & SCHWARZMEIRER, J.D. Noninvolvement of chromosome 16 in karyotype evolution of acute myeloid leukemia in a patient with a heritable fragile site on 16q22. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 17: 1-12, 1985.
- HAGEMEIJER, A.; LÖWENBERG, B. & ABELS, J. Analysis of the breakpoints in translocation (15;17) observed in 4 patients with acute promyelocytic leukemia. *Hum. Genet.*, 61: 223-227, 1982.
- HARNDEN, D.G. Familial susceptibility to cancer. *British Medical Journal*, 286: 1531-1532, 1983.
- HARNDEN, D.G. Inherited factors in leukaemia and lymphoma. *Leukemia Research*, 9: 705-707, 1985.
- HARPER, M.E.; FRANCHINI, G.; LOVE, J.; SIMON, M.I.; GALLO, R.C. & WONG-STAAAL, F. Chromosomal sublocalization of human c-myc and c-fes cellular onc genes. *Nature*, 304: 169-171, 1983.
- HART, J.S. Chromosome abnormalities in human neoplasia. *Cancer Treatments Reviews*, 10: 173-183, 1983.
- HARRISON, C.; JACK, E.M.; ALLEN, T.D. & HARRIS, T.D. The fragile X: a scanning electron microscope study. *J. Med. Genet.*, 20: 280-285, 1983.
- HECHT, F. Rare, polymorphic, and common fragile sites: a classification. *Hum. Genet.*, 74: 207-208, 1986.
- HECHT, F. Risks of hematologic malignancy with constitutional chromosome abnormalities. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 24: 375-377, 1987.
- HECHT, F. & GLOVER, T.W. Cancer chromosome breakpoints and common fragile sites induced by aphidicolin. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 13: 185-188, 1984.
- HECHT, F. & HECHT, B.K. Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements I. Amniocentesis. *Clin. Genet.*, 26: 169-173, 1984a.
- HECHT, F. & HECHT, B.K. Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements II. Spontaneous abortions, stillbirths and newborns. *Clin. Genet.* 26: 174-177, 1984b.

- HECHT, F. & HECHT, B.K. Autosomal fragile sites and cancer. *Am. J. Hum. Genet.*, 36: 718-720, 1984c.
- HECHT, F. & HECHT, B.K. Fragile sites and chromosome break-points in constitutional rearrangements. *Clin. Genet.* 28: 94, 1985.
- HECHT, F. & SUTHERLAND, G.R. Fragile sites and cancer breakpoints. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 12: 179-181, 1984.
- HEIM, S.; BERGER, R.; BERNHEIM, A. & MITELMAN, F. Constitutional C-band pattern in patients with adenomatosis of the colon and rectum. *Cancer Genet. Cytogenet.* 18, 31-35, 1985.
- HELSINKI CONFERENCE (1985): *Eight International Workshop on Human Gene Mapping. Cytogenet. Cell Genet.*, 40: 1-824, 1985.
- HOEGERMAN, S.F. & RARY, J.M. Speculation of the role of transposable elements in human genetic disease with particular attention to achondroplasia and the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 23: 685-699, 1986.
- HÖGSTEDT, B.; GULLBERG, B.; MARK-VENDEL, E.; MITELMAN, F. & SKERFVING, S. Micronuclei and chromosome aberrations in bone marrow cells and lymphocytes of humans exposed mainly to petroleum vapors. *Hereditas*, 94: 179-187, 1981.
- HOLMES, R.I.; KEATING, M.J.; CORK, A. TRUJILLO, J.M.; MCCREDIE, K.B. & FREIREICH, E.J. Loss of the Y chromosome in acute myelogenous leukemia: a report of 13 patients. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 17: 269-278, 1985.
- HOPKINSON, D.A.; MESTRINER, M.A.; CORTNER, F. & HARRIS, H. Esterase D: a new human polymorphism. *Ann. Hum. Genet.*, 37: 119-137, 1973.
- HOWARD-PEEBLES, P.N. X-linked mental retardation with a fragile sites in Xq and an inversion of chromosome nº 9. *Hum. Hered.*, 32: 139-141, 1982.
- HOWARD-PEEBLES, P.N. Autosomal lesions versus fragile sites. *Hum. Genet.*, 65: 408, 1984.
- HOWELL, W.M.; BLACK, A.D. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015, 1980.

- HUNTER, T. The proteins of oncogenes. *Scientific American*, 251: 70-79, 1984.
- ISCN (1978): *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (1978). *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 309-404, 1978.
- IZAKOVIC, V. Homozygosity for fragile site at 17p12 in a 28-year-old healthy man. *Hum. Genet.*, 68: 340-341, 1984.
- JACKY, P.B.; BEEK, B. & SUTHERLAND, G.R. Fragile sites in chromosomes: possible model for the study of spontaneous chromosome breakage. *Science*, 220: 69-70, 1983.
- JACKY, P.B. e DILL, F.J. Expression in fibroblasts culture of the satellited-X chromosome associated with familial sex-linked mental retardation. *Hum. Genet.*, 53: 267-269, 1980.
- JACKY, P.B. & SUTHERLAND, G.R. Thymidylate synthetase inhibitors and fragile site expression in lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 1276-1283, 1983.
- JACOBS, P.A.; HUNT, P.A.; MAYER, M.; WANG, J. C.; BOSS, G.C. & ERBE, R.W. Expression of the marker (Xq28) in lymphoblastoid cell lines. *Am. J. Hum. Genet.*, 34:552-557, 1982.
- JAMRA, M. & LORENZI; T.F. *Leucôcitos, Leucemias e Linfomas*. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1983.
- JENKINS, E.C.; BROWN, W.T.; DUNCAN, C.J.; BROOKS, J.; BENYISHAY, A.; GIORDANO, F.M. & NITOWAKY, H.M. Feasibility of fragile X chromosome prenatal diagnosis demonstrated. *Lancet*, II: 1292, 1981.
- JHANWAR, S.K. Localization of c-ras oncogene family on human germline chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4794-4797, 1983.
- JOHNSON, D.D.; DEWALD, G.W.; PIERRE, R.V.; LETENDRE, L. & SILVERSTEIN, M.N. Deletions of chromosome 13 in malignant hematologic disorders. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 18:235-241, 1985.



- KECK, M. & EMERIT, I. The influence of culture medium composition on the incidence of chromosomal breakage. *Hum. Genet.*, 50: 277-283, 1979.
- KHAN, P.M. & SMITH, M. Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 7,8 and 9. *Cytogenet. Cell Genet.*, 37: 71-102, 1984.
- KIVI, S. & MIKELSAAR, A.V. Q - and C-band polymorphisms in patients with ovarian or breast carcinoma. *Hum. Genet.*, 56: 111-114, 1980.
- KIVI, S. & MIKELSAAR, A. -V. Polymorphism of Ag-stained nucleolus organizer regions in lymphocytes of patients with ovarian or breast adenocarcinoma. *Hum. Genet.*, 69: 350-352, 1985.
- KNUDSON, A.G. J . Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68: 820-823, 1971.
- KNUDSON, A.G.J. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research*, 45: 1437-1443, 1985.
- KNUDSON, A.G. & STRONG, L.C. Mutation and cancer: a model for Wilm's tumor of the Kidney. *J. Natl. Cancer Inst.* 48: 313-324, 1972.
- KORSMEYER, S.J. & WALDMANN, T.A. Immunoglobulin genes: rearrangement and translocation in human lymphoid malignancy. *Journal of Clinical Immunology* 4: 1-11, 1984.
- KRISTOFFERSSON, U.; BERGER, R.; BERNHEIM, A.; AKERMAN, M.; OLSSON, H. & MITELMAN, F. C-band polymorphism in non-Hodgkin lymphoma. *Hereditas*, 103: 77-84, 1985.
- KUHN, E.M. & THERMAN, E. Cytogenetics of Bloom's syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 22: 1-18, 1986.
- LABAL DE VINUESA, M.; LARRIPA, I.; PARGAMENT, M.M.D. & SALUM, S.B.D Heterochromatic variants and their association with neoplasias. I. Chronic and acute leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 13: 297-302, 1984.

- LE BEAU, M.M. & ROWLEY, J.D. Heritable fragile sites in cancer. *Nature*, 308: 607-608, 1984.
- LE BEAU, M.M. & ROWLEY, J.D. Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma; Clinical and biological significance. *Advances in Human Genetics*, 15: 1-54, 1986.
- LE BEAU, M.M.; ROWLEY, J.D.; FERRO, M.T. & ROMAN, C.S. Constitutional t(15;17): clarification of the chromosomal breakpoints. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 20: 175-177, 1986.
- LEJEUNE, J.; LEGRAND, N.; LAFOURCADE, J.; RETHORÉ, M-O; RAOUL, O. & MAUNOURY, C. Fragilité du chromosome X et effets de la triméthoprine. *Ann. Génét.* 25: 149-151, 1982.
- LEVAN, G. & MITELMAN, F. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. *Hereditas*, 79: 156-160, 1975.
- LI, X-Z.; REIDY, J.A.; WHEELER, V.A. & CHEN, A.T.L. Folic acid and chromosome breakage. III. Types and frequencies of spontaneous chromosome aberrations in proliferating lymphocytes. *Mutation Research*, 173: 131-134, 1986.
- LI, N. & ZHOU, X. Human chromosome hot points. IV. Uridine-induced hot-point breaks at 3p14 and 16q23-24 and increased expression of fragile site Xq27 in folate - free medium. *Hum. Genet.* 71: 363-365, 1985.
- LITTLEFIELD, L.G. & JOINER, E.E. Analysis of chromosome aberrations in lymphocytes of long-term heavy smokers. *Mutation Research*, 170: 145-150, 1986.
- LUBS, H.A. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.*, 21: 231-244, 1969.
- MAGENIS, R.E.; HECHT, F. & LOVRIEN, E.W. Heritable fragile sites on chromosome 16: Probable localization of haptoglobin locus in man. *Science*, 170: 85-86, 1970.
- MARKS, P. Genetically determined susceptibility to cancer. *Blood*, 58: 415-419, 1981.
- MATTEI, M.G.; AYME, S.; MATTEI, J.F.; AURRAN, Y. & GIRAUD, F. Distribution of spontaneous chromosome breaks in man. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 23: 95-102, 1979.



- McBRIDE, O.W.; HIETER, P.A.; HOLLIS, G.F.; SWAN, D.; OTEY, M. C. & LEDER, P. Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *J. Exp. Med.*, 155: 1480, 1982.
- McDOUGALL, J.K. Adenovirus-induced chromosome aberrations in human cells. *J. Gen. Virol.*, 12: 43-51, 1971.
- MELTZER, P.; KINZLER, K.; VOGELSTEIN, B. & TRENT, J.M. Gene amplification in cancer: a molecular cytogenetic approach. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19: 93-99, 1986.
- MEYNE, J.; LOCKHART, L.H. & ARRIGHI, F.E. Nonrandom distribution of chromosomal aberrations induced by three chemicals. *Mutation Research*, 63: 201-209, 1979.
- MIALE, J.B. *Laboratory Medicine Hematology*. Mosby Company, ST Louis, Missouri, 1977, 5^a edição.
- MICHELIS, V.V. Fragile sites on human chromosomes: Description and clinical significance. *Mayo Clin. Proc.*, 60: 690-696, 1985.
- MISAWA, S.; LEE, E.; SCHIFFER, C.A.; LIU, Z. & TESTA, J.R. Association of the translocation (15; 17) with malignant proliferation of promyelocytes in acute leukemia and chronic myelogenous leukemia at blastic crisis. *Blood*, 67: 270-274, 1986.
- MITELMAN, F. Catalogue of chromosome aberrations in cancer. *Cytogenet. Cell Genet.*, 36: 4-15, 1983.
- MITELMAN, F. Chromosomal changes in cancer in relation to exposure to carcinogenic agents. *IARC Sci. Publ.*, 59: 351-360, 1984.
- MITELMAN, F. Clustering of chromosomal breakpoints in neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19: 67-71, 1986.
- MITELMAN, F. & LEVAN, G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. III. Incidence and geographic distribution of chromosome aberrations in 856 cases. *Hereditas*, 89: 207-232, 1978.

- MITELMAN, F. & LEVAN, G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1,871 cases. *Hereditas*, 95: 79-139, 1981.
- MITELMAN, F.; MANOLOV, G.; MANOLOVA, Y.; BILLSTRÖM, S.H.; KRISTOFFERSSON, U.; MANDAHN, N.; FERRO, M.T. & ROMAN, S. High resolution chromosome analysis of constitutional and acquired t(15:17) maps c-erb-A to subband 17q11.2. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 22: 95-98, 1986.
- MONDELLO, C.; GIORGI, R. & NUZZO, F. Chromosomal effects of methotrexate on cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 139: 67-70, 1984.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M. & HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl. Cell. Res.*, 20: 613-616, 1960.
- MORGAN, R. & HECHT, F. Deletion of chromosome band 13q14: a primary event in preleukemia and leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 18: 243-249, 1985.
- MORGAN, R.; MORGAN, S.S. & HECHT, F. Enhanced expression on chromosome fragile site 10q25 in chronic myelogenous leukemia. *Am. J. Med. Genet.* 21: 347-350, 1985.
- MULERIS, M.; DUTRILLAUX, A.; LOMBARD, M. & DUTRILLAUX, B. Noninvolvement of a constitutional heritable fragile site at 10q24.2 in rearranged chromosomes from rectal cells. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 25: 7-14, 1987.
- MURATA, M.; TAKAHASHI, E.; ISHIHARA, T.; MINAMIHISAMATSU, M.; TAKAGI, T.; KANEKO, Y. & HORI, T. Heritable fragile sites and cancer: fra(16)(q22) in lymphocytes of an acute nonlymphocytic leukemia patient with inv(16)(p13q22). *Cancer Genet. Cytogenet.*, 25: 81-86, 1987.
- MURTY, V.V.V.S.; MITRA, A.B.; SHARMA, J.K. & LUTHRA, U.K. Nucleolar organizer regions in patients with precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 18: 275-279, 1985.



- NAKAGOME, Y.; ISE, T.; SAKURAI, M.; NAKAJO, T.; OKAMOTO, G.; TAKANO, T.; NAKAHORI, Y.; TSUCHIDA, Y.; NAGAHARA, N.; TAKADA, Y.; OHSAWA, Y.; SAWAGUCHI, S.; TOYOSAKA, A.; KOBAYASHI, N.; MATSUNAGA, E. & SAITO, S. High-resolution studies in patients with aniridia-Wilms tumor association, Wilms tumor or related congenital abnormalities. *Hum. Genet.*, 67: 245-248, 1984.
- NAKAYAMA, T.; KANEKO, M.; KODAMA, M. & NAGATA, C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, 314: 462-464, 1985.
- NATARAJAN, A.T. Origin and significance of chromosomal alterations. IN: Obe, G. (Ed.). *Mutations in Man*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1984.
- NEEL, B.G.; JHANWAR, S.C.; CHAGANTI, R.S.K. & HAYWARD, W.S. Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7842-7846, 1982.
- NERI, G. Some question on the significance of chromosome alterations in leukemias and lymphomas: a review. *Am. J. Med. Genet.*, 18: 471-481, 1984.
- NIELSEN, J. & RASMUSSEN, K. Y/autosomal translocations. *Clin. Genet.* 9: 609-617, 1976.
- NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23-28, 1976.
- NOWELL, P.C. & HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia. *Science*, 132: 1497, 1960.
- NUSSBAUM, R.L.; AIRHART, S.D. & LEDBETTER, D.H. Expression of the fragile (X) chromosome in an interspecific somatic cell hybrid. *Hum. Genet.*, 64: 148-150, 1983.
- NUSSBAUM, R.L.; AIRHART, S.D. & LEDBETTER, D.H. Recombination and amplification of pyrimidine-rich sequences may be responsible for initiation and progression of the Xq27 fragile site: an hypothesis. *Am. J. Med. Genet.*, 23: 715-721, 1986.
- OBE, G.; VOGT, H.-J.; MADLE, S.; FAHNING, A. & HELLER, W.D. Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo. *Mutation Research*, 92: 309-319, 1982.

- OPITZ, J.M. & SUTHERLAND, G.R. Conference report: International workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 17: 5-94, 1984.
- PARIS CONFERENCE (1971): *Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects*, 8, 1972.
- PARIS CONFERENCE (1971), SUPPLEMENT (1975): Standardization in human cytogenetics. *Birth Defects*, 11, 1975.
- PATHAK, S. Cytogenetics of solid tumors. Renal cell carcinoma, malignant melanoma, retinoblastoma and Wilms' tumor. IN: Luderer, A.A. & Weetall, H.W. (Eds.) *The Human Oncogenic Viruses*. The Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey. pp. 43-87, 1986.
- PATHAK, S. & GOODACRE, S. Specific chromosome anomalies and predisposition to human breast, renal cell and colorectal carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19: 29-36, 1986.
- PATHAK, S.; HSU, T.C.; SAMMAN, N. & HICKEY, R.C. Cytogenetic abnormalities in a patient with hypercalcemia and papillary thyroid carcinoma. *Hum. Genet.*, 60: 291-293, 1982.
- PEGORARO, L.; PALUMBO, A.; ERIKSON, J.; FALDA, M.; GIOVANAZZO, B.; EMANUEL, B.S.; ROVERA, G.; NOWELL, P.C. & CROCE, C.M. A 14;18 and 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7166-7170, 1984.
- PETIT, P. & FRYNS, J.P. Expression of fragile site at 10q25 in normal culture conditions. *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 126-127, 1983.
- PETIT, P.; FRYNS, J.P.; VAN DEN BERGHE, H. & HECHT, F. Population cytogenetics of autosomal fragile sites. *Clin. Genet.*, 29: 96-100, 1986.
- PETKOVIĆ, I. Constitutive heterochromatin of chromosomes n°1, 9 and 16 in 90 patients with malignant disease and 91 controls. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 10: 151-158, 1983.
- PETKOVIĆ, I.; NAKIC, M.; CEPULI, Č, M.; TIEFENBACH, A. & KONJA, J. Variability of chromosomes 1, 9, and 16 in children with malignant diseases. *Cancer Genet. Cytogenet.* 16: 169-173, 1985.



- PIMENTEL, E. Oncogenes and human cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 14: 347-368, 1985.
- PIMPINELLI, S.; PRANTERA, G.; ROCCHI, A. & GATTI, M. Effects of Hoechst 33258 on human leukocytes in vitro. *Cytogenet. Cell Genet.*, 17: 114-121, 1976.
- POPESCU, N.C. & DIPAOLO, J.A. Relationship of chromosomal alterations to gene expression in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 10: 419-431, 1985.
- POTLURI, U.R.; HELSON, L.; ELLSWORTH, R.W.; REID, T. & GILBERT, F. Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma. *Cancer*, 58: 663-671, 1986.
- RADMAN, M.; JEGGO, P. & WAGNER, R. Chromosomal rearrangement and carcinogenesis. *Mutation Research*, 98: 249-264, 1982.
- REIDY, J.A. & CHEN, A.T.L. Folic acid and chromosome breakage. II. A methionine effect similar to that in fragile X expression. *Hum. Genet.*, 68: 189-190, 1984.
- REY, J.A.; BELLO, M.J.; CAMPOS, J.M. de.; BENÍTEZ, J.; VALCÁRCEL, E. & CASTRO, P.M. C-banding in lymphocytes from patients with tumors of the nervous system. *Cancer Genet. Cytogenet.* 15: 129-136, 1985.
- ROBBINS, S.L.; RAMZI, S.C.; KUMAR, V. *Patologia Estrutural e Funcional*. Ed. Interamericana Ltda, Rio de Janeiro. pp. 207-266, 1986, 3^a edição.
- ROMAIN, D.R.; COLUMBANO-GREEN, L.M.; SMYTHE, R.H.; PARFITT, R. G.; GEBBIE, O.B. & CHAPMAN, C.F. Studies on three rare fragile sites. 2q13, 12q13, and 17p12 segregating in one family. *Hum. Genet.*, 73: 164-170, 1986.
- ROMAIN, D.R.; FRASER, A.G.; COLUMBANO-GREEN, L.M.; PARFITT, R. G.; SMYTHE, R.H. & CHAPMAN, C.J. Direct intrachromosomal duplication of 16q and heritable fragile site fra(10q25) in the same patient. *Am. J. Med. Genet.* 19: 507-513, 1984.
- ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*, 243: 290-293, 1973.

- ROWLEY, J.D. Chromosomes in leukemia and lymphoma. *Semin. Hematol.* 15: 301-319, 1978.
- ROWLEY, J.D. Chromosome changes in leukemic cells as indicators of mutagenic exposure. *Chromosomes and cancer*, Academic Press, Inc., pp. 139-158, 1983.
- ROWLEY, J.D. Chromosome abnormalities in human leukemia as indicators of mutagenic exposure. IN: Huberman, E. & BARR, S.H. (Eds). *Carcinogenesis*, Vol. 10. Raven Press, New York, pp. 409-418, 1985.
- SANDBERG, A.A. Chromosomal alterations associated with neoplasia. *Transplantation Proceedings*, 16: 366-369, 1984.
- SANDBERG, A.A. The Y chromosome in Human Neoplasia. IN: *The Y chromosome, Part B: Clinical Aspects of Y chromosome*. Alan R. Liss, Inc. pp. 377-393, 1985.
- SANDBERG, A.A.; HECHT, B.K. & HECHT, F. Contemporary management of lymphoma: chromosome studies. *Med. Genet.*, 41: 164-169, 1984.
- SAMPAIO, D.A. *Avaliação quantitativa da variação de heterocromatina constitutiva em leucemias e condições afins*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1983.
- SARACCI, R. Occupation. IN: VESSEY, M.P. & GRAY, M. (Eds). *Cancer Risks and Prevention*. Oxford University Press, pp. 99-118, 1985.
- SASAKI, M. Role of chromosomal mutation in the development of cancer. *Cytogenet. Cell Genet.*, 33: 160-168, 1982.
- SCHERES, J.M.J.C. & HUSTINX, T.W.J. Heritable fragile sites and lymphocyte culture medium containing BrdU. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 628-639, 1980.
- SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; JEBBER, A.; KÖHLER, J. & LANGE, R. The fragile site (16)(q22). I. Induction by AT-specific DNA-ligands and population frequency. *Hum. Genet.*, 74:67-73, 1986.
- SCHMID, M.; HUNGERFORD, D.A.; POPPEN, A. & ENGEL, W. The use of distamycin A in human lymphocyte cultures. *Hum. Genet.*, 65: 377-384, 1984.

- SCHMID, M.; KLETT, C. & NIEDERHOFER, A. Demonstration of a heritable fragile site in human chromosome 16 with distamycin A. *Cytogenet. Cell Genet.*, 28: 87-94, 1980.
- SCHMID, M.; OTT, G.; IAAF, T. & SCHERES, J.M.J.C. Evolutionary conservation of fragile sites induced by 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine in man, gorilla, and chimpanzee. *Hum. Genet.*, 71: 342-350, 1985.
- SCHMID, M.; SCHMIDTKE, J.; KRUSE, K. & TOLKSDORF, M. Characterization of a Y/15 translocation by banding methods, distamycin A treatment of lymphocytes and DNA restriction endonuclease analysis. *Clin. Genet.* 24: 234-239, 1983.
- SCHROEDER, T.M. & GERMAN, J. Bloom's syndrome and Fanconi's anemia: demonstration of two distinctive patterns of chromosome disruption and rearrangement. *Humangenetik*, 25: 299-306, 1974.
- SCHULZE, B.; GOLINSKI, C. & FONATSCH, C. Heterochromatin and nucleolus organizer regions in cells of patients with malignant and premalignant lymphatic diseases. *Hum. Genet.*, 67: 391-395, 1984.
- SESSAREGO, M.; AJMAR, F.; RAVAZZOLO, R.; BIACHI-SCARRA, G.L. ; GARRÉ, C. & BOCCACCIO, P. Coincidence between fragile site expression and interstitial deletion of chromosome 11 in a case of myelofibrosis. *Hum. Genet.*, 63: 299-301, 1983.
- SHABTAI, F.; ANTEBI, E.; KLAR, D.; KIMCHI, D.; HART, J. & HALBRECHT, I. Cytogenetic study of patients with carcinoma of the colon and rectum: Particular C-band variants as possible marks for cancer proneness. *Cancer Genet. Cytogenet.* 14: 235-245, 1985b.
- SHABTAI, F.; BICHACHO, S. & HALBRECHT, I. The fragile site on chromosome 16(q21q22). Data on four new families. *Hum. Genet.*, 55: 19-22, 1980.
- SHABTAI, F. & HALBRECHT, I. Risk of malignancy and chromosomal polymorphism: a possible mechanism of association. *Clin. Genet.*, 15: 73-77, 1979.
- SHABTAI, F.; KLAR, D.; BICHACHO, S.; HART, J. & HALBRECHT, I. Familial fragility on chromosome 16(fra 16q22) enhanced by



- both interferon and distamycin A. *Hum. Genet.*, 63:341-344, 1983a.
- SHABTAI, F.; KLAR, D. & HALBRECHT, I. Chromosome 17 has a real fragile site at p12. *Hum. Genet.*, 61: 177-179, 1982.
- SHABTAI, F.; KLAR, D.; NISSIMOV, R.; VARDIMON, D.; HART, J. & HALBRECHT, I. A new familial "fragile sites" on chromosome 16(q23-24). Cytogenetic and clinical considerations. *Hum. Genet.* 64: 273-276, 1983b.
- SHEER, D.; LISTER, T.A.; AMESS, J. & SOLOMON, E. Incidence of the 15q⁺; 17q⁻; chromosome translocation in acute promyelocytic leukaemia (APL). *Br. J. Cancer*, 32: 55-58, 1985.
- SINHA, A.K.; LINScombe, V.A.; GOLLAPUDI, B.B.; McCLINTOCK, M. L.; FLAKE, R.E. & BODNER, K.M. The incidence of spontaneous cytogenetic aberrations in lymphocytes cultured from normal humans for 48 and 72h. *Can. J. Genet. Cytol.*, 26: 528-531, 1984.
- SLATER, R.M. The cytogenetics of Wilms' tumor. *Cancer Genet., Cytogenet.*, 19: 37-41, 1986.
- SMEETS, D.F.C.M.; SCHERES, J. M.J.C. & HUSTINX, T.W.J. Heritable fragility at 11q13 and 12q13. *Clin. Genet.*, 28: 145-150, 1985.
- SMEETS, D.F.C.M.; SCHERES, J.M.J.C. & HUSTINX, T.W.J. The most common fragile site in man is 3p14. *Hum. Genet.*, 72: 215-220, 1986.
- SMITH, A.; FRASER, I.S. & ELLIOT, G. An infertile male with balanced Y; 19 translocation. Review of Y; autosome translocations. *Ann. Génét.*, 22: 189-193, 1979.
- SMITH, A.; MANUEL, A.; DEN-DULK, G. & LAWRENCE, R. A male with two different familial autossomal fragile sites and a cytogenetically abnormal offspring. *Ann. Génét.* 28:245-247, 1985.
- SOLOMON, E. Recessive mutation in aetiology of Wilm's tumor. *Nature*, 309: 111-112, 1984.

- SPARKES, R.S. The genetics of retinoblastoma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 780: 95-118, 1985.
- SPARKES, R.S.; SPARKES, M.C.; WILSON, M.C.; TOWNER, J.W.; BENEDICT, W.; MURPHREE, A.L. & YUNIS, J.J. Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science*, 208: 1042-1044, 1980.
- SPARKES, R.S.; TAARGUM, S.; GERSHON, E.; SENSABAUGH, G.F.; SPARKES, M.C. & CRIST, M. Evidence for a *null* allele at the esterase D (EC 3.1.1.1.) locus. *Hum. Genet.*, 46: 319-323, 1979.
- SPOWART, G. Reassessment of presumed Y/22 and Y/15 translocations in man using a new technique. *Cytogenet. Cell Genet.*, 23: 90-94, 1979.
- SUMNER, A.T. A sample technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell. Res.*, 75: 304-306, 1972.
- SUTHERLAND, G.R. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*, 197: 265-266, 1977.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocytes culture. *Am. J. Hum. Genet.*, 31: 125-135, 1979a.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet.*, 31: 136-148, 1979b.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes. VII. Children homozygous for the BrdU-requiring fra(10)(q25) are phenotypically normal. *Am. J. Hum. Genet.*, 33: 946-949, 1981.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes. VIII. Preliminary population cytogenetic data on the folic-acid-sensitive fragile sites. *Am. J. Hum. Genet.*, 34: 452-458, 1982a.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes. IX. Population cytogenetics and segregation analysis of the BrdU-requiring fragile site at 10q25. *Am. J. Hum. Genet.*, 34: 753-756, 1982b.

- SUTHERLAND, G.R. The fragile X chromosome. *Int. Rev. Cytol.*, 81: 107-143, 1983.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics. *Ann. Hum. Genet.*, 49: 153-161, 1985.
- SUTHERLAND, G.R. & BAKER, E. Effects of nucleotides on expression of the folate sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet.*, 23: 409-417, 1986.
- SUTHERLAND, G.R.; BAKER, E. & FRATINI, A. Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet.*, 22: 433-443, 1985b.
- SUTHERLAND, G.R.; BAKER, E. & SESHADRI, R.S. Heritable fragile sites on human chromosomes. V. A new class of fragile site requiring BrdU for expression. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 542-548, 1980.
- SUTHERLAND, G.R. & HINTON, L. Heritable fragile sites on human chromosomes VI. Characterization of the fragile site at 12q13. *Hum. Genet.*, 57: 217-219, 1981.
- SUTHERLAND, G.R.; JACKY, P.B.; BAKER, E. & MANUEL, A. Heritable fragile sites on human chromosomes. X. New folate-sensitive fragile sites: 6q23, 9q21, 9q32 and 11q23. *Am. J. Hum. Genet.* 35: 432-437, 1983.
- SUTHERLAND, G.R.; JACKY, P.B. & BAKER, E.G. Heritable fragile sites on human chromosomes. XI. Factors affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22, and 17p12. *Am. J. Hum. Genet.*, 36: 110-122, 1984.
- SUTHERLAND, G.R.; PARSLow, M.I. & BAKER, E. New classes of common fragile sites induced by 5-azacytidine and bromodeoxyuridine. *Hum. Genet.*, 69: 233-237, 1985a.
- SWAN, D.C.; McBRIDE, O.W.; ROBBINS, K.C.; KEITHLEY, D.A.; REDDY, E.P. & AARONSON, S.A. Chromosomal mapping of the simian sarcoma virus onc gene analogue in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 4691-4695, 1982.
- TAISNE, C.D.; GEGONNE, A.; STEHELIN, D.; BERNHEIM, A. & BERGER, R. Chromosomal Localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature*, 310: 581-583, 1984.



- TAKAHASHI, E.; HORI, T. & MURATA, M. A BrdU requiring fragile site, fra(10q)(25), in a japanese population. *Proc. Japan Acad.*, 61: 165-168, 1985.
- TAUB, R.; KIRSCH, I.; MORTON, C.; LENOIR, G.; SWAN, D.; TRONICK, S.; AARONSON, S. & LEDER, P. Translocation of c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells. *Proc. Acad. Sci. USA*, 79: 7837-7841, 1982.
- TAYLOR, A.M.R. & BUNDEY, S. Spontaneous expression of the chromosome fragile site fra(10)(q25). *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 123-125, 1983.
- THERMAN, E.; OTTO, P.G. & SHAHIDI, N.T. Mitotic recombination and segregation of satellites in Bloom's syndrome. *Chromosoma*, 82: 627-636, 1981.
- THESTRUP-PEDERSEN, K.; ESMANN, V.; JENSEN, J.R.; HASTRUP, J.; THORLING, K.; SAEMUNDSEN, A.K.; BISBALLE, S.; PALLESEN, G.; MADSEN, M.; GRAZIA-MASUCCI, M. & ERNBERG, I. Epstein-Barr-virus induced lymphoproliferative disorder converting to fatal Burkitt-like lymphoma in a boy with interferon-inducible chromosomal defect. *The Lancet*, II:997-1001, 1980.
- TOMMERUP, N.; POULSEN, H. & BRONDUM-NIELSEN, K. 5-fluoro-2'-deoxyuridine induction of the fragile site on Xq28 associated with linked mental retardation. *Journal of Medical Genetics*, 18: 374-376, 1981.
- TOUGH, I.M.; BAIKIE, A.G.; HARNDEN, D.G.; KING, M.J.; BROWN, W.W.C.; BUCKTON, K.E.; JACOBS, P.A. & McBRIDE, J.A. Cytogenetic studies in chronic myeloid leukaemia and acute leukaemia associated with mongolism. *The Lancet*, 1: 411-417, 1961.
- TRENT, J.; CRICKARD, K.; GIBAS, Z.; GOODACRE, A.; PATHAK, S.; SANDBERG, A.A.; THOMPSON, F.; WANG-PENG, J. & WOLMAN, S. Methodologic advances in the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19: 57-66, 1986.

- TSONGAS, T.A. Occupational factors in the epidemiology of chemically induced lymphoid and hemopoietic cancers. IN: Irons, R.D. (Ed). *Toxicology of the Blood and Bone Marrows*. Raven Press, New York. pp 149-177, 1985.
- TURNER, G.; OPITZ, J.M.; BROWN, T.; DAVIES, K.E.; JACOBS, P.A.; JENKINS, E.C.; MIKKELSEN, M.; PARTINGTON, W. & SUTHERLAND, G.R. Conference report: second international workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 23: 11-67, 1986.
- VAN DYKE, D.L.; JACKSON, C.E. & BABU, V.R. Possible chromosome 20 deletion in multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN-2). *The 6th International Congress of Human Genetics*. Jerusalem, Israel, 13-18, 1981.
- VARELLA-GARCIA, M. Avaliação da atividade mutagênica de pesticidas organofosforados e organoclorados. *Ci. e Cult.*, 32: 95-102, 1980.
- VARELLA-GARCIA, M. *Heteromorfismos cromossômicos em oligofrênicos com anomalias congênitas e cariótipo normal*. Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 1982.
- VERMA, R.S. & DOSIK, H. Human chromosomal heteromorphisms: nature and clinical significance. *International Review of Cytology*, 62: 361-383, 1980.
- VERMA, R.S.; RODRIGUES, J. & DOSIK, H. Human chromosome heteromorphisms in american blacks: II. higher incidence of pericentric inversions of secondary constriction regions(h). *Am. J. Med. Genet.*, 8: 17-25, 1981.
- VIGUIÉ, F.; ROMANI, F. & DADOUNE, J.P. Males infertility in a case of (Y;6) balanced reciprocal translocation. Mitotic and meiotic study. *Hum. Genet.*, 62: 225-227, 1982.
- WALD, N.J. Smoking. IN: VESSEY, M.P. & GRAY, M. (Eds.). *Cancer Risks and Prevention*. Oxford University Press, Oxford. pp. 44-67, 1985.
- WEBB, T. & THAKE, A. Fragile 22q13 segregation in a family. *Clin. Genet.* 26: 125-128, 1984.

- WEGNER, R.D. A new inducible fragile site on chromosome 3(p14.2) in human lymphocytes. *Hum. Genet.*, 63: 297-298, 1983.
- WEINBERG, R.A. A molecular basis of cancer. *Scientific American*, 249: 102-116, 1983.
- WHANG-PENG, J.; KAO-SHAN, C.S.; LEE, E.C.; BUNN, P.A.; CARNEY, D.N.; GAZDAR, A.F. & MINNA, J.D. Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer:deletion 3p(14-23). *Science*, 215: 181-182, 1982.
- WILD, D. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research*, 32: 133-150, 1975.
- WILLECKE, K. & SCHAFER, R. Human oncogenes. *Hum. Genet.* 66: 132-142, 1984.
- WINTROBE, M.M. *Clinical Hematology*. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1981.
- WURSTER-HILL, D.H.; CANNIZZARO, L.A.; PETTENGILL, O.S.; SORENSEN, G.D.; CATE, C.C. & MAURER, L.H. Cytogenetics of small cell carcinoma of the lung. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 13: 303-330, 1984.
- YUNIS, J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, 221: 227-236, 1983.
- YUNIS, J.J. Fragile sites and predisposition to leukemia and lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 12: 85-88, 1984.
- YUNIS, J.J. Genes and chromosomes in human cancer. *Prog. Med. Virol.*, 32: 58-71, 1985a.
- YUNIS, J.J. Genomic rearrangements in human cancer. IN: *Leukemia: Recent Advances in Biology and Treatment*. Alan R. Liss, Inc. pp 99-105, 1985b.
- YUNIS, J.J.; BLOOMFIELD, C.D. & ENSRUD, K. All patients with acute nonlymphocytic leukemia may have a chromosomal defect. *N. Engl. J. Med.*, 305: 135-139, 1981.
- YUNIS, J.J.; OKEN, M.M.; KAPLAN, M.E.; ENSRUB, K.M. & HOWE, R. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 307: 1231-36, 1982.

- YUNIS, J.J. & RAMSAY, N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am. J. Dis. Child*, 132: 161-163, 1978.
- YUNIS, J.J. & SORENG, A.L. Constitutive fragile sites and cancer. *Science*, 226: 1199-1204, 1984.
- ZIMMER, C. & WÄHNERT, U. Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 47: 31-112, 1986.

DATA DA ENTREGA

Mod. 105 - 10.200 - 27/84



