

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**Estudos citogenéticos para detecção de marcadores  
de diagnóstico e prognóstico em sarcomas ósseos**

**BRUNA PAES DE BARROS**

**BOTUCATU - SP  
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**Estudos citogenéticos para detecção de marcadores de  
diagnóstico e prognóstico em sarcomas ósseos**

**BRUNA PAES DE BARROS**

Orientador: Marcelo Razera Baruffi

MONOGRAFIA APRESENTADA AO INSTITUTO  
DE BIOCÊNCIAS, CAMPUS DE BOTUCATU,  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHAREL  
EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**BOTUCATU - SP  
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Barros, Bruna Paes de.

Estudos citogenéticos para detecção de marcadores de diagnóstico e prognóstico em sarcomas ósseos / Bruna Paes de Barros. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcelo Razera Baruffi

Capes: 20205007

1. Citogenética. 2. Osteossarcoma. 3. Ossos – Tumores. 4. Marcadores biológicos.

Palavras-chave: Citogenética; Marcadores; Neoplasias; Prognóstico; Sarcomas ósseos.

Ao meu avô Arnaldo Loyola.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Virgem Maria por me acompanharem e me abençoarem nessa trajetória. Junto com eles, meus avós e familiares que também estiveram presentes e me acompanharam, através de espírito.

Aos meus pais, Marcia e Anibal, minha avó Carmem e minha madrinha, tia Ângela. Eles são as minhas bases e forneceram todo o apoio possível para que eu chegasse até aqui. Sem vocês eu não seria quem eu sou. Serei eternamente grata. Amo vocês.

Agradeço muito ao meu namorado Neto, que esteve comigo desde o desafio de entrar na faculdade e continuou comigo durante esses quatro anos. Obrigada pelo ombro amigo, pela compreensão, pelo carinho, pela dedicação, pela paciência e principalmente, pelo amor.

Não poderia deixar de agradecer aos profissionais do Departamento de Genética. Rô e Val, com toda a calma e serenidade, me ensinaram tudo o que eu desenvolvi no laboratório e estavam sempre dispostas, sorrindo e com muita, mas muita paciência, para me auxiliar no que eu precisasse. Obrigada por tudo meninas, vocês são demais! Também gostaria de lembrar da Betina e do Zé, que foram muito importantes em vários momentos. Obrigada.

Obrigada ao João (Tokinha) e à Elisa (Sulfite) por me aguentar cantando, falando e contando piadas no laboratório. Nos tornamos parceiros de trabalho e, mais do que isso, amigos.

Por fim, mas não menos importante, e mesmo que pareça loucura, agradeço ao meu coelho Pongo. Sei que ele não sabe ler, mas ele pode me compreender, pois todo dia quando eu chegava em casa e olhava em seus olhos, ele era o único que conseguia me dar o que eu mais precisava: paz.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

**Albert Schweitzer (Nobel da Paz - 1952)**

## RESUMO

A busca pela identificação de fatores que possam apontar o diagnóstico, a resposta terapêutica e a sobrevida dos pacientes portadores de sarcoma ósseos tem sido incessante. Presumir a agressividade tumoral, capacidade de invasão tecidual, probabilidade de recidiva, propensão ao desenvolvimento de metástases e resposta ao tratamento, poderá ser valioso expediente na escolha da proposta terapêutica. Embora fatores ambientais e dietéticos contribuam para a etiologia do câncer, as neoplasias se originam de um processo de múltiplos passos envolvendo alterações de genes e seleção clonal da progênie variante. Estas mutações ocorrem em classes de genes reguladores da proliferação celular como os oncogenes, genes supressores de tumor, fatores de crescimento, vias de sinalização e genes de reparo de DNA. Os conhecimentos sobre a biologia tumoral melhoraram o entendimento sobre os múltiplos aspectos da carcinogênese. No entanto, embora as perspectivas permaneçam, até agora, há poucos benefícios para prevenção, diagnóstico, tratamento e seguimento dos pacientes com sarcomas ósseos. Este trabalho teve por objetivo detectar e descrever alterações cromossômicas consistentes e recorrentes, através da utilização de análises com a citogenética clássica. Também descreveu o envolvimento dessas alterações com o prognóstico em sarcomas ósseos primários e secundários, na tentativa de contribuir para a realização de estratégias mais eficazes para melhorar as taxas de sobrevida e beneficiar maior número de pacientes portadores de sarcomas ósseos. As lesões ósseas apresentaram alterações citogenéticas clonais e recorrentes, das quais as principais foram: sarcoma pouco diferenciado, o qual apresentou del(7)(p21); osteossarcoma metastático, apresentando del(4)(q32), add(13)(p13), add(14)(p13); tumor de células gigantes com add(14)(p13); osteomielite, a qual continha add(12)(q24.3), del(17)(p13) e o condrossarcoma, apresentando del(6)(q22). Os resultados obtidos evidenciam a importância de se analisar um maior número de casos destas lesões para que se possa estabelecer uma maior e mais eficiente caracterização genética. Mostra-se importante realizar análises moleculares nos genes descritos para confirmar o envolvimento dos mesmos na tumorigênese dessas lesões.

**Palavras-chave:** Citogenética; Marcadores; Neoplasias; Prognóstico; Sarcomas ósseos.

# SUMÁRIO

1- Introdução.....	9
1.1- Tecido ósseo.....	10
1.2- Osteomielite.....	10
1.3- Biogênese das células neoplásicas.....	12
1.4- Tumores ósseos.....	15
1.5- Osteossarcoma.....	18
1.6- Prognóstico em osteossarcoma.....	19
1.7- Condrossarcoma.....	22
1.8- Fibrossarcoma.....	24
1.9- Aspectos clínicos da genética em neoplasias.....	25
2- Objetivos.....	26
3- Justificativa.....	27
4- Materiais e Métodos.....	28
4.1- Coleta das amostras.....	28
4.2- Processamento das amostras.....	28
4.3- Cultura celular e colheita de cultura.....	28
4.4- Preparação das lâminas e coloração.....	29
4.5- Análises cromossômicas.....	30
5- Resultados.....	31
5.1- Análises citogenéticas.....	33
5.2- Resultados finais.....	55
6- Discussão.....	56
7- Conclusão.....	63

8- Referências bibliográficas.....	64
9- Anexos.....	70

## 1 – INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de células anormais provindo da desordem do crescimento celular que resulta em um “desbalanço” da homeostase tecidual, com invasão e destruição de tecido sadio adjacente; cujo crescimento excede e é incoordenado em relação àquele dos tecidos normais, que persiste da mesma maneira excessiva após a parada do estímulo que provocou a alteração (1).

Embora atualmente conhecida como uma doença relacionada ao meio ambiente e de aparecimento mais esporádico, o câncer é considerado como uma doença genética baseada na presença de mutação genética como um fator consistente (2). Esse conceito vem, entre outros, dos achados de anormalidades cromossômicas, as quais podem ocorrer como consequência de randômicos erros de replicação; exposição a carcinógenos ou processos de reparo de DNA danificados (2).

Há mais de um século, têm sido levantadas hipóteses sobre a existência de uma base genética para o desenvolvimento do câncer humano e somente nas últimas três ou quatro décadas foram obtidas evidências diretas de que o câncer é uma doença genética, cuja origem está relacionada a mutações que podem ser herdadas ou ocorrerem preferencialmente nas linhagens de células somáticas (1). É o resultado de transformações genéticas múltiplas de efeito cumulativo nas células (3).

No ano de 2003 houve 402.190 novos casos de neoplasias diagnosticadas em todo Brasil, com 129.960 mortes, possuindo a incidência de 357,1 casos novos a cada 100.000 homens e 403,5 novos casos no sexo feminino; sendo a segunda maior causa de óbitos com 12,7%, ficando atrás somente das patologias relacionadas com o aparelho circulatório (4).

Os tumores ósseos têm sua maior ocorrência nos adolescentes, sendo os mais frequentes o tumor de Ewing e o osteossarcoma (5). Os sarcomas de partes moles correspondem de 4% a 8% de todas as neoplasias malignas na infância, sendo o rabdmiossarcoma (RMS) o tipo mais frequente (5).

O câncer contribui de maneira significativa para o alto índice de mortalidade na população mundial, chegando a assumir características de problema de Saúde Pública (6).

## 1.1 – Tecido ósseo

O aparelho locomotor é formado de tecido conjuntivo, onde o osso não mineralizado é denominado de tecido osteóide; constituído de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%), que perfazem 99% do cálcio, 85% do fósforo e 65% sódio e magnésio do corpo humano (3).

O componente orgânico é formado de células ósseas e de proteínas da matriz óssea; as células formadoras de ossos são as osteoprogenitoras, os osteoblastos e osteócitos (3). A geração e estimulação dessas células são reguladas por citocinas e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (3). A formação de osteoblastos a partir das células osteoprogenitoras é vital para o crescimento, remodelação e reparo ósseo (3).

Os osteoblastos localizam-se na superfície óssea e sintetizam, transportam e organizam as muitas proteínas da matriz óssea, como também iniciam o processo da mineralização óssea. Exibem receptores de membrana que se ligam a hormônios (paratormônios, vitamina D e estrogênio), citocinas, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular. Após serem circundados por matriz passam a se chamar osteócitos (3).

Os osteócitos são as mais numerosas células formadoras de tecido ósseo e se comunicam por uma rede de túneis onde passam produtos séricos, cálcio e fósforo (3).

Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea e são derivadas das células progenitoras hematopoiéticas, que também originam os monócitos e macrófagos, mas participam também do processo de liberação de substâncias que iniciam a renovação óssea (3).

As proteínas ósseas incluem o colágeno do tipo I e proteínas que se formam principalmente dos osteoblastos. O colágeno tipo I forma o arcabouço da matriz e corresponde a 90% do componente orgânico do osso (3).

## 1.2 – Osteomielite

A osteomielite (OM) é uma infecção causada por microorganismos que invadem e destroem progressivamente o osso no local da infecção. Em adultos, a OM ocorre usualmente após complicações decorrentes de fraturas e cirurgias. O grau de acometimento da OM é influenciado por fatores como o local de acometimento, a natureza, a severidade da injúria óssea e a virulência do microorganismo isolado no osso (7;8).

Os microorganismos mais frequentemente isolados na osteomielite bacteriana são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli* (9).

Em ossos, a OM se inicia nas alças capilares dilatadas da metáfise, onde o fluxo sanguíneo é lento o suficiente para permitir a multiplicação do microorganismo e formação do abscesso bacteriano (10).

Como os microorganismos por si só são incapazes de destruir o tecido ósseo, tem sido postulado que a reação inflamatória, as alterações metabólicas e as alterações vasculares desencadeadas pela invasão bacteriana possuem papéis fundamentais no desenvolvimento da osteomielite, na destruição e na regeneração óssea. Morfologicamente, as principais alterações identificadas são:

a) Necrose óssea, com morte dos constituintes celulares e desaparecimento da massa óssea; ocasionalmente o osso desvitalizado persiste como um fragmento morto, denominado de seqüestro;

b) Reação inflamatória importante, onde inicialmente predominam os granulócitos, os quais, com o tempo, são substituídos por um infiltrado mononuclear;

c) Deposição de osso novo, originário da ativação periosteal (7).

Além dos sinais inflamatórios e infecciosos locais, as OMs apresentam sinais sistêmicos como febre, irritabilidade e letargia. Os achados clínicos característicos incluem dor óssea, eritema e drenagem de secreção, áreas com acúmulo de secreções, deformidades, instabilidade e sinais de alterações vasculares, incapacidade funcional, distúrbios neurológicos e incapacidade funcional das articulações adjacentes (9).

A OM crônica apesar de ser uma entidade distinta, apresenta um grande grau de similaridade com muitos tumores ósseos e de partes moles, e sua razão de malignização no

trato sinusóide é de 0,5%, com o intervalo de malignização variado de curto a longo, de 1 a 10 anos (11). Há ligação da OM com outras patologias ósseas, como a no caso da osteopetrose, indicando que esta classe de lesão possui uma etiologia complexa (12).

Não é rara a presença de neoplasias ocorrendo como uma das complicações da osteomielite crônica como nos casos do osteossarcoma fibroblástico, osteossarcoma osteoclástico, mieloma, angiossarcoma, linfoma, rabdomiossarcoma, sarcoma de células reticulares, histiocitoma fibroso maligno, fibrossarcoma, síndrome mielodisplásica, carcinoma de células escamosas e sarcoma de tecido granulomatoso, podendo causar a morte em curto espaço de tempo (13-19).

Os indícios clínicos para a malignização da OM são: aumento da massa óssea, aumento da dor, hemorragia, descarga purulenta pelo longo do trato de escape do foco infeccioso. Radiograficamente ocorre à aceleração da natureza destrutiva da lesão e de massa de partes moles (8).

A incidência de carcinomas e sarcomas ocorrendo em área de drenagem das osteomielites crônicas é de 1,6%, com predileção pelas extremidades ósseas (13-16;18).

O diagnóstico diferencial de osteomielite crônica em atividade ou superposta a outras patologias é complicado, bem como o seu próprio conceito de cura, podendo ocorrer prolongados intervalos assintomáticos (20). Este diagnóstico baseia-se no exame físico com achados clínicos, na história do paciente, nos exames por imagem e nos exames laboratoriais (leucocitose e elevação nos níveis de proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação, análises das culturas bacterianas) (9).

A íntima similaridade entre a osteomielite e algumas neoplasias ósseas proporcionam dúvidas na obtenção de um diagnóstico diferencial definitivo através de exames de imagem (21). Não raro os testes laboratoriais (sedimentação de eritrócitos, proteína C reativa, cálcio sérico total, albumina sérica, fosfato sérico, fosfatase alcalina, desidrogenase láctica e eletroforese de proteínas do plasma e urina) e radiológicos diagnosticam a lesão suspeita como sendo benigna, mas a evolução clínica demonstra a agressividade da lesão, o que indica a realização de uma biópsia cirúrgica (17;19).

### **1.3 - Biogênese das células neoplásicas**

Para compreender o processo carcinogênico e planejar formas mais eficazes de tratamento, é necessário entender a biologia da célula e suas interações nos tecidos, principalmente no que tange aos eventos genéticos envolvidos (6). Dentre esses eventos, as mutações ocorrem em classes de genes como os proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo a danos no DNA, fatores celulares de crescimento e vias de sinalização tirosina quinases (6).

Considera-se que a proliferação de células normais seja regulada por proto-oncogenes, que são promotores de crescimento, contrabalançada pelos genes supressores de tumor, que restringem o crescimento (3). O objetivo de grande parte da pesquisa do câncer é identificar genes que são afetados na transformação de uma única célula normal em uma neoplasia totalmente maligna e entender como cada uma destas alterações contribui para o fenótipo neoplásico (3).

Fisiologicamente, a proliferação celular apresenta as seguintes etapas: a) ligação de um fator de crescimento a seu receptor específico na membrana celular; b) ativação transitória e limitada do receptor do fator de crescimento, que, por sua vez, ativa várias proteínas transdutoras de sinais na parte interna da membrana plasmática; c) transmissão do sinal transduzido pelo citosol para o núcleo através de segundos mensageiros; d) indução e ativação de fatores reguladores nucleares que iniciam a transcrição do DNA; e) entrada e progressão da célula no ciclo celular resultando em sua divisão celular. (6;3)

Os oncogenes derivam dos proto-oncogenes. Os mecanismos pelos quais os proto-oncogenes são transformados em oncogenes ocorrem através de duas grandes categorias de alterações: 1- Alterações na estrutura do gene, ocorridas por rearranjos cromossômicos estruturais, resultando na síntese de um produto gênico anormal (oncoproteína), que exerce uma função aberrante. 2- Alterações na regulação da expressão gênica, ou na amplificação gênica pelos DMs ("double minutes") ou HSRs (regiões homogeneamente coradas) resultando em uma produção aumentada ou inapropriada da proteína que promove o crescimento celular normal (3).

Rearranjos cromossômicos, alterando proto-oncogenes podem acarretar em fusões gênicas, como no caso da leucemia mieloide crônica (LMC), com o cromossomo Philadelphia (Ph) (22), envolvendo o rearranjo cromossômico específico: a translocação t(9;22)(q34;q11) (23).

Genes supressores tumorais, por uma definição operacional, são elementos genéticos com uma função de regulação negativa da proliferação celular, cuja sua perda ou inativação permite à célula apresentar um descontrole desta regulação negativa. Os seus produtos são componentes das vias de sinalização intercelular que permitem à célula receber e processar sinais inibidores que controlam o ciclo celular e a transcrição nuclear. Estes produtos detêm a chave para a divisão celular. Quando as células perdem componentes críticos desta rede de sinalização, ela perde a capacidade de responder a certos sinais extracelulares inibidores da proliferação, mesmo que estes sinais ainda estejam presentes no meio celular (6).

Os produtos de vários genes neoplásicos e as cascatas regulatórias a que eles pertencem estão localizados no núcleo, como as moléculas que regulam a transdução de sinais e receptores de superfície celular. Incluem-se nessa categoria, de receptores de fatores inibidores de crescimento, o TGF-  $\beta$  e proteínas que regulam a adesão celular, como as caderinas. A perda dessas proteínas pode favorecer o fenótipo maligno ao facilitar a desagregação das células (3).

A homeostase de organismos multicelulares é criticamente dependente da correta interpretação dos abundantes sinais, aos quais as células são expostas durante sua vida (6). O controle da diferenciação e do crescimento celular ocorre por sinais conhecidos como fatores de crescimento (FC). São polipeptídeos considerados como moléculas sinalizadoras que agem como mediadores positivos da divisão celular, exercendo vários efeitos biológicos (24;25). Estes fatores têm grande afinidade de interação pelos receptores transmembrana pertencentes à família dos receptores de tirosina quinase (receptor tyrosine Kinases-RTKs) (26). Suspeita-se que a grande maioria dos FC desempenha algum papel na carcinogênese (3).

Sabe-se que os genes que impedem ou que induzem a morte celular programada também constituem importantes variáveis na equação do câncer. O primeiro gene antiapoptótico identificado foi o gene *BCL-2*, um membro de uma família de proteínas de homodimerização e heterodimerização, algumas das quais inibem a apoptose, enquanto outras a favorecem (3).

Mutações que alteram a sequência de nucleotídeos na cadeia de DNA, como transição ou transversão, acarretam um pareamento inadequado das bases nucleotídicas, promovendo distorções na configuração da dupla hélice de DNA. Erros no reparo do DNA danificado, se não forem imediatamente corrigidos, podem levar a célula ao longo da via de transformação

neoplásica. Os genes de reparo do DNA são uma classe de genes que produzem proteínas relacionadas com a função reparadora destas mutações (27). Mutações que levam à perda de função nos genes de reparo do DNA possuem papel importante na carcinogênese (28).

Estudos citogenéticos desempenham um papel essencial na identificação de recorrentes anormalidades cromossômicas que são características de vários cânceres (29), demonstrando pontos críticos do genoma em classes de genes importantes na regulação do ciclo celular, como no caso dos genes *TP53*, *MDM2*, *hMSH2*, *CDK4*, entre outros (28). Além disso, também podem desenvolver papel importante no prognóstico e no acompanhamento de pacientes com câncer, na determinação de possíveis alterações cariotípicas adicionais, o que pode indicar uma doença mais agressiva (29).

#### **1.4 – Tumores ósseos**

Esta classe de neoplasias tem sido associada a alguns tipos de lesões ósseas que rompem o equilíbrio metabólico do tecido osteocartilaginoso, como: 1) Distúrbios genéticos da cartilagem pré-óssea (exostoses osteocartilaginosas e encondromatoses); 2) Lesões por radiação; 3) Doença de Paget; 4) Infartos ósseos; 5) Osteomielite crônica; 6) Erros genéticos específicos (30).

A incidência destas lesões é de 0,8/100.000 habitantes e não apresenta tendência em aumentar ou diminuir, sendo que o maior número de seus diagnósticos primários é representado pelos osteosarcomas (35,1%), seguido por condrossarcomas (25,8%), sarcomas de Ewing (16,0%) e cordomas (8,4%) (30). Na faixa etária entre 10 e 24 anos, representam a terceira maior incidência entre os tumores pediátricos (31). Possui incidência de 4 casos do sexo masculino para 3 casos do sexo feminino e 10 casos afetando a raça branca para 8 de outras raças (32).

Patologias como a doença de Paget, osteomielites, infartos intraósseos e lesão osteofibrosa (pseudotumores) foram associados clinicamente ao osteosarcoma, condrossarcoma, fibrossarcoma entre outros. Embora seja frequente a incidência dos processos inflamatórios e degenerativos ósseos, os processos neoplásicos ósseos não são tão freqüentes, representando 0,6% de todas as neoplasias, mas 1% das neoplasias malignas fatais (32).

As neoplasias ósseas possuem uma grande variedade de subtipos histológicos, revelando a grande heterogeneidade de diferenciação celular nestes tumores. Fato este que torna difícil o diagnóstico histológico diferencial, bem como o clínico-radiológico. Todas as dificuldades refletem-se na terapêutica e no prognóstico destes tumores (33).

A maioria dos tumores sólidos exibe múltiplas anormalidades cromossômicas e são elas que levam a uma proliferação celular anormal (expansão clonal); a invasão dos tecidos circundantes e a metástases em locais distantes. O acúmulo de anomalias cromossômicas que, em sua grande maioria ocorrem por um período de anos, é subjacente aos processos de tumorigênese (transição de células normais a câncer invasivo) e progressão tumoral (a transição para um câncer metastático e quase sempre resistente ao tratamento) (34).

O conhecimento do padrão cariotípico destas lesões é importante para a constituição de indicadores de prognósticos mais precisos para estes grupos de lesões ósseas (30). Importantes e significativos resultados derivados das análises citogenéticas, em neoplasias, explicam porque é utilizada pela sua simplicidade e robustez, propiciando à obtenção de uma amostragem de anormalidades cariotípicas, acumulando um arsenal de alterações cromossômicas consistentes e recorrentes de células neoplásicas (28).

Análises citogenéticas de mais de 2000 casos revelaram numerosas alterações cromossômicas que podem ser amplamente classificadas em quatro categorias: 1- Translocações específicas que resultam em produtos de fusão oncogênica ou expressão ectópica de proto-oncogenes; 2- Amplificação de *loci*/genes genômicos específicos, como a amplificação de *MDMS/CDK4* em lipossarcomas bem diferenciados e dediferenciados; 3- Amplificação de regiões bem definidas como cromossomos marcadores gigantes e/ou cromossomos em anel e; 4- Cariótipos complexos e heterogêneos com múltiplas anormalidades estruturais e numéricas, como no leiomiossarcoma, sarcoma pleomórfico e tumores de células gigantes (34).

Um dos tumores ósseos mais conhecidos é o sarcoma de Ewing, o qual ocorre predominantemente em ossos longos, de crianças e adultos jovens, em tecidos de partes moles na parede torácica, região paravertebral, retroperitônio e extremidades inferiores (35). A anormalidade genética  $t(11;22)(q24;q12)$ , leva a expressão da proteína quimérica Ewsr1-Fli1, que ocorre em aproximadamente 90% destes tumores (36).

Alexander Lazar et al (2006) (35) realizaram algumas análises moleculares iniciais, as quais mostraram que o ponto de quebra do cromossomo 22 está localizado no gene *EWSR1*, enquanto que o ponto de quebra do cromossomo 11 está localizado o gene *FLI1*. O gene quimérico *EWSR1-FLI1* é transcrito sob o controle do promotor *EWSR1*, mas a expressão de ambos os genes individualmente é praticamente onipresente em tecidos humanos normais (35).

Os tumores cartilagenosos, ou também denominados de tumores de partes moles, constituem um subgrupo das neoplasias do sistema músculoesquelético. Estas entidades tumorais podem exemplificar de forma real a aplicação da citogenética no melhor conhecimento da biologia destes tumores, auxiliando de forma significativa para o melhor diagnóstico e prognóstico destas patologias que se apresentam de uma forma heterogênea em relação a sua clínica, histomorfologia e comportamento biológico (36). A maioria dos condrossarcomas é de lesões ósseas e constitui 25% dos sarcomas ósseos primários, perdendo apenas para osteossarcoma (37). Os cariótipos de condrossarcoma podem variar, desde simples mudanças numéricas, para abundantes e complexas anormalidades numéricas e estruturais (37). Um exemplo está nas anormalidades encontradas nos cromossomos 5, 6, 7 e 12 e das regiões cromossômicas 6q13, 12q13 e 17p13, as quais são compartilhadas por ambos os tumores cartilagenosos malignos e benignos (36). Estudos como esse podem, eventualmente, contribuir no estabelecimento de um diagnóstico diferencial preciso entre lesões cartilagenosas benignas e de baixo grau de malignidade (36).

Padrões alterados da expressão e mutações em *TP53* vêm sendo detectadas primeiramente em tumores avançados de alto grau (37). Inativação funcional do tipo selvagem da proteína p53, pela expressão de *MDM2*, parece ser a principal causa de acúmulo de p53 no condrossarcoma e destaca o papel desses parâmetros como indicadores adicionais de malignidade (37).

Estas alterações não possuem potenciais somente para a classificação desta classe neoplásica, mas servem para o diagnóstico diferencial onde há natureza histológica confusa, e como guia para estudos moleculares, para o melhor entendimento e estabelecimento de genes envolvidos na gênese do câncer (38). Esta chave biológica é crucial para a compreensão da relação dos processos neoplásicos benignos e sarcomatosos com os processos precursores de neoplasias, e também para a classificação de neoplasias únicas e seus subgrupos específicos

(38;39), possibilitando assim o desenvolvimento de um melhor entendimento e tratamento das neoplasias mesenquimais.

A detecção precoce, com um diagnóstico preciso, ainda possui uma aplicação limitada em relação a algumas neoplasias ósseas malignas que se encontram relativamente avançadas quando são reconhecidas clinicamente. O atraso na sua detecção e diferenciação pode significar a diferença entre a cura e o desenlace fatal (40).

### **1.5 – Osteossarcoma**

Osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo primário maligno, derivado da forma óssea primitiva mesenquimal. Acomete geralmente a metáfise de ossos longos, fêmur distal e tíbia proximal; o seu mais comum subtipo é o osteossarcoma convencional intramedular (75% dos casos). É o câncer mais comum não hematológico. Acomete crianças e adultos e representa 56% de todas as malignidades nos EUA, com 1000 novos casos por ano. Em pacientes com mais de 40 anos de idade é considerado ser potencialmente secundário (41). O pico de maior incidência é na segunda década de vida, ocorrendo durante o crescimento do adolescente, o que sugere uma relação entre o crescimento ósseo rápido e o desenvolvimento da malignidade (42-44).

Podem existir várias causas relacionadas à etiologia desta classe de neoplasias, entre elas os fatores genéticos que podem ser potencializados, em algumas condições, por traumas causados pelas próteses metálicas ortopédicas, radiação ionizante, doença de Paget óssea, encondromatoses, exostoses e displasia fibrosa (42-44). O seu tratamento utiliza quimio e radioterapia com intervenção cirúrgica.

Muitos tipos de osteossarcoma são comumente reconhecidos pela classificação primária baseada no local da lesão ou na patologia relacionada. O tipo convencional de OS surge na cavidade intramedular do osso e representa, aproximadamente, 75% de todos os osteossarcomas. Esses, frequentemente, penetram e destroem o córtex do osso e se estendem pelo tecido mole adjacente (45). Os subtipos mais comuns reconhecidos são: osteoblástico, condroblástico e fibroblástico, e os menos comuns são: epitelial, rico em células gigantes, de pequenas células e telangiectásico (45).

O OS central de alto grau é a variante histológica mais comum dos osteossarcomas (41). Esta neoplasia maligna é caracterizada por produção osteóide direta pelas células tumorais e por se localizar “no início” da região intramedular, predominantemente nas metáfises de ossos longos (41). Em particular, tumores de alto grau são quase sempre hiperplóides invariáveis e demonstram mais ampliações do que perda de material genético. Isto é contrastante com outros tipos de sarcomas, os quais têm como característica uma translocação balanceada e algumas alterações genéticas somáticas adicionais (41).

O OS periférico deriva de um tecido fibro-ósseo bem diferenciado, mas com perfil de malignidade, que surge da superfície do osso. Essa variante de osteossarcoma é relativamente incomum e representa por volta de 5% de todos os osteossarcomas estudados (43). O OS periférico pode ser distinguido do OS convencional pela presença do cromossomo em anel, o qual contém material amplificado de 12q13-q15 como única anomalia ou acompanhado de algumas outras anormalidades (43).

A análise citogenética dos osteossarcomas apresenta cariótipos complexos, com pronunciada heterogeneidade de célula a célula, similar ao condrossarcoma. A descoberta de cariótipos normais em osteossarcoma deve ser mencionada, aonde as linhagens destas células provavelmente vieram de origem normal; fato raro em neoplasias ósseas e de partes moles (28).

Mesmo não sendo específico de osteossarcoma, um número de genes importantes foi identificado, incluindo vários genes supressores tumorais, oncogenes e genes codificantes de fatores de crescimento. A relativa importância de muitos desses fatores para a tumorigênese dos osteossarcomas continua sem resposta, mesmo com a relação entre certos perfis de expressão genética para o prognóstico e a resposta a quimioterapia ficando mais evidentes (45).

O limitado entendimento do mecanismo molecular da oncogênese do osteossarcoma, levando a um bom diagnóstico e prognóstico clínico e a detecção de marcadores para esta patologia, vêm estimulando estudos genéticos nestas entidades tumorais (46).

## **1.6 - Prognóstico em Osteossarcoma**

Apesar da grande quantidade de publicações que apontam, sugerem ou discutem a associação entre vários fatores e prognóstico, atualmente, não há um único fator ou combinação de fatores que possam, acuradamente, predizer quais pacientes apresentarão boa resposta ao tratamento e, conseqüentemente, maior sobrevida (47;48).

Mankin et al. (2004) (49) sugeriram que pacientes com menos de vinte anos de idade, com lesão de pequena dimensão, localizada abaixo do joelho ou do cotovelo, estadio I ou II, com 90% ou mais de necrose tumoral após a quimioterapia neo-adjuvante, provavelmente, apresentarão sobrevida longa. Por sua vez, pacientes com idade mais avançada, com grandes lesões, estadio II ou III, localizadas em região pélvica, fêmur ou úmero proximal e resposta à quimioterapia menor que 90%, apresentariam alto risco de desenvolvimento de metástases e óbito em três anos.

Os fatores mais frequentemente investigados, como preditivos de prognóstico, nos pacientes portadores de osteossarcoma, são comentados a seguir:

a) Idade: De acordo com Huvos (1991) (50), 60% dos pacientes com osteossarcoma se situam na faixa etária abaixo de 21 anos. Varan et al. (2007) (51), encontraram média de idade de 13,3 anos. Petrilli (2005) (52) encontrou 70,7% dos pacientes entre dez e 18 anos, 16,9% com idade menor que dez anos e 12,4% maiores que 18 anos. Entretanto, para Taylor et al. (1985) (53), a ocorrência da doença em pacientes com idade menor que dez anos, indica prognóstico desfavorável.

b) Sexo: A maioria dos pacientes portadores de osteossarcoma é do sexo masculino. De acordo com Huvos (1991) (50), na série reportada no Memorial Sloan-Kettering Câncer Center a proporção é de 1,3 pacientes do sexo masculino para um do sexo feminino e na Clínica Mayo, de 1,6:1 (54).

c) Localização do tumor: Os osteossarcomas localizam-se, mais frequentemente, nas regiões metafisária distal do fêmur e metafisária proximal da tíbia. Os ossos longos são os mais acometidos, sendo mais frequentes no fêmur, tíbia, úmero e fibula (55;32;50;56). Há controvérsia acerca da relação entre localização e prognóstico em tumores de extremidades. Para Bacci et al. (2006b) (57), não há associação entre sítio tumoral e sobrevida nos pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades e de alto grau.

d) Dimensão do tumor: A dimensão do tumor é considerada importante fator prognóstico (57;58). Para Simon (1978) (59) quanto menor o tumor, melhor o prognóstico. Tumores maiores provavelmente têm maior tempo de evolução ou crescem mais rapidamente, indicando maior agressividade, o que pode interferir no prognóstico. Não há, no entanto, consenso acerca de parâmetros para se estabelecer a partir de qual dimensão tumoral, o paciente terá melhor ou pior prognóstico, porque os métodos de aferição não são uniformes. Da mesma maneira, entre tumores do mesmo tamanho, não é possível prever quais terão curso clínico favorável ou desfavorável.

e) Classificação: Sob a denominação de osteossarcoma, inclui-se amplo espectro de lesões com aspectos clínicos, anatomopatológicos e comportamentos biológicos distintos. Quanto à localização no osso, os osteossarcomas podem ser classificados em centrais e periféricos (59). Os tipos histológicos dos osteossarcomas centrais são: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, telangectásico, de pequenas células e intra-ósseo bem diferenciado (59). Petrilli (2005) (55) encontrou 81,3% dos pacientes com tumores de predominância osteoblástica, 11,6%, condroblástica e 3,3%, fibroblástica. Os tumores periféricos são classificados em paraostal, periostal e de alto grau de superfície, sendo mais raros que os centrais. O osteossarcoma paraostal é o tipo mais comum dos osteossarcomas de superfície (60-63).

f) Estadiamento: Os sistemas de estadiamento são importantes para o planejamento terapêutico, pois possibilitam comparação entre os diferentes métodos de tratamento e facilitam a troca de informação entre os diversos centros (64). O sistema mais aceito é o proposto por Enneking e adotado desde 1980 pela Musculoskeletal Tumor Society (65) e pelo American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting (66;67).

g) Outros fatores: Alguns autores consideraram que a elevação dos níveis séricos de fosfatase alcalina é preditiva de mau prognóstico em pacientes portadores de osteossarcoma (68;69;58). Em relação à desidrogenase láctica sérica, Bacci et al. (2004a) e Rech et al. (2004) (70) encontraram associação entre níveis elevados e pior prognóstico. As alterações cromossômicas encontradas em pacientes com osteossarcomas acometem, com maior frequência, as regiões cromossômicas 8q, 17p12, 13q14 e 13q21. Segundo Trieb & Kotz (2001) (71), tais aberrações não estão associadas ao curso clínico e à resposta à quimioterapia e seu eventual valor prognóstico precisa ser confirmado com mais estudos. Há descrição de

envolvimento de alguns genes como o *ABCB1* (72), *RB1* (73;74), *ERBB* (69), e os genes da família *MMP* e *MDM2* (75).

### 1.7 – Condrossarcoma

Condrossarcomas são tumores ósseos malignos formadores de cartilagem (38) e representam um grupo de tumores de histopatologia e comportamento clínico variáveis, composto pelo tipo esquelético (central) e extraesquelético (periférico). Dentro dos condrossarcomas centrais estão inclusos os subtipos convencional, desdiferenciado, mesenquimal e de células claras. Os periféricos são constituídos pelo condrossarcoma mixóide (EMC) e alguns condrossarcomas derivados de osteocondromas solitários ou associados com a síndrome hereditária de múltiplas exostoses (HME) (76). A classificação é importante, porque as diferentes características genéticas e moleculares representam alvos distintos para futuras estratégias terapêuticas (38).

O condrossarcoma convencional representa, aproximadamente, 90% de todas as variáveis de condrossarcomas. Adultos, em sua maioria, na terceira a sexta décadas de vida são afetados; a incidência é a mesma em homens e mulheres. Isto é notório em relação ao seu comportamento agressivo local e à resistência à quimio e radioterapia; na medida em que a cirurgia é a única opção efetiva de tratamento (38).

Aproximadamente 13% dos condrossarcomas recorrentes possuem um grau de malignidade superior à neoplasia original, o que sugere que os condrossarcomas podem progredir biologicamente. Adicionalmente, a recorrência de condrossarcomas de baixo grau indica a progressão do tumor em direção a uma desdiferenciação de grau superior ou, ainda, a um pior prognóstico. Essas observações levam a crer que tumores cartilagosos têm uma série de características clínicas e morfológicas (38).

O diagnóstico é geralmente baseado na combinação dos achados clínicos, radiológicos e histológicos, algo que é ligeiramente subjetivo (38). A análise citogenética de condrossarcoma convencional demonstrou grande heterogeneidade em relação à complexidade cariotípica, com constante envolvimento de 1p36, 1p13-p22, 4, 5q13-q31, 6q22-qter, 9p22-pter, 10p, 10q24-qter, 11p13-pter, 11q25, 13q21-qter, 14q24-qter, 18p, 18q22-qter e 22q13 (perdas) e 7p13-pter (38), 8q24-qter (76), 12q15-qter, 19, 20pter-q11 (38), 20q12-qter

(76) e 21q (ganhos) (38). Aneuploidia também está associada com o aumento do grau histológico do tumor. Nearidiploidia e perda de heterozigossidade limitada são típicas de condrossarcomas centrais de baixo grau, apontando para um mecanismo oncogênico com algumas alterações, suficientes para a oncogênese (38). A perda do cromossomo Y também foi descrita e pode ocorrer em homens mais velhos como um fenômeno normal da idade e, por isso há dificuldade em interpretar esse achado nos tumores, ou seja, se ele está relacionado com a gênese do condrossarcoma ou se representa um fenômeno do envelhecimento (76).

Um exemplo de anormalidade citogenética clara é a translocação entre os cromossomos 9 e 22, encontrada em, pelo menos, 75% dos condrossarcomas extraesqueléticos mixóides (EMC). A translocação resulta na fusão dos genes EWS e TEC. Essa translocação origina uma proteína de fusão com propriedades oncogênicas. EWS é uma proteína de ligação ao RNA e TEC é um receptor nuclear putativo (parte da família de receptores tiroideanos e esteroides), que também possui um sítio de ligação ao DNA. O ponto exato do splicing entre esses dois genes pode ocorrer em dois locais distintos, mas o resultado final é a ativação de genes relacionados à proliferação celular, pelo gene TEC (39).

Translocações encontradas nos outros 25% casos de EMC envolvem alternativas ao EWS: *TAF2N/TEC* e *TCF12/TEC* (39) ou  $t(9;17)(q22;q11)$  e  $t(9;15)(q22;q21)$ , resultando em *RBP56/CHN* e *TCF12/CHN*, respectivamente (76). Mas, as proteínas anormais que resultam dessa fusão aberrante de genes afetam a transcrição genética e as vias de sinalização celular, as quais têm indícios de serem as responsáveis pelo início da formação sarcomatosa (76). A atividade biológica dessas variantes de splicing pode diferir e, portanto a análise pode permitir prognósticos mais precisos e prever alvos terapêuticos únicos (39). Essas anormalidades adicionais variam de caso a caso, enquanto algumas (por exemplo, as trissomias dos cromossomos 18, 12 e 1q) são mais comuns do que outras (76).

De qualquer forma, foi demonstrado que um expressivo número de cromossomos é afetado pela perda e/ou ganho de material, possivelmente carregando algum significado clínico ou prognóstico. Por exemplo, mudanças em 6q13-21 em condrossarcoma (e tumores cartilagosos benignos) aparentam estar associados com comportamento agressivo local; perda de 13q pode ser um preditor de metástases; e ganho em 8q24.1 pode indicar menor sobrevida (76).

Conhecer cada evento sem informação genética necessária às razões que levam ao desenvolvimento pleno da biologia do tumor pode ser insuficiente para o planejamento e aplicação da terapia adequada, a qual deve ser baseada nas aberrações genéticas encontradas. Isto ocorrerá até que as consequências dessas alterações genéticas sejam completamente compreendidas e o seu padrão seja estabelecido (76).

### 1.8 – Fibrossarcoma

O fibrossarcoma (FS) ósseo é um tumor maligno extremamente raro e não caracterizado geneticamente, que representa menos de 5% de todas as neoplasias malignas ósseas primárias. Com base nas características clinicopatológicas, o FS aparenta estar intimamente relacionado tanto ao osteossarcoma fibroblástico quanto ao histiocitoma fibroso maligno (MFH) ósseo (77). Esse raro tumor usualmente surge em metáfises de ossos longos, especialmente próximo ao joelho, em pacientes com 20 a 70 anos de idade. Atualmente, e comumente considerado uma entidade tumoral distinta (77).

O FS ósseo pode ser classificado de acordo com o aumento da malignidade e diminuição da diferenciação. FS ósseo de alto grau é uma neoplasia agressiva que desenvolve metástase, mais frequentemente no pulmão, em 55-65% dos pacientes e com uma taxa de sobrevivência de 10 anos em, no máximo, 40% dos casos. O tratamento consiste em ampla excisão cirúrgica ou amputação, geralmente associada com regime quimioterápico adjuvante, o qual é similar, ou mesmo idêntico, ao utilizado para os osteossarcomas de alto grau (77).

Em fibrossarcoma congênito,  $t(12;15)(p13;q25)$  e trissomias dos cromossomos 8, 11, 17 e 20 são os achados mais comuns. Em FS de adultos, estudos cromossômicos demonstraram que aneuploidias e múltiplos rearranjos estruturais são mais comuns. Entretanto, nenhuma translocação recorrente específica foi identificada em fibrossarcomas (78).

A aberração mais frequente descrita por Hattinger et al (77) foi o ganho da região cromossômica 22q. Análises de DNA *microarray* demonstraram que o gene do fator de crescimento beta derivado de plaquetas (*PDGF-B*), localizado em 22q12.3-q13.1, é o desequilíbrio genético mais comum deste tipo de tumor (77). Deleções foram mais frequentes do que ampliações. Amplificações de alto nível foram detectadas em 17p11.2, 17q24 e 22q11.2-q12 (artigo 14). Análises de *microarray* identificaram somente ganhos de cópias numéricas afetando

seis diferentes genes: *PDGF-B* (22q12.3-q13.1), *FGR* (1p36.1-p36.2), *FES* (15q26.1), *MYC* (8q24.12-q24.13), *YES* (18p11.3) e *BCR* (22q11.21) (77).

No passado, alguns autores negaram a existência de fibrossarcomas surgindo em ossos e sustentaram que essa lesão era um sarcoma osteogênico indiferenciado. Entretanto, estudos mais recentes indicaram que o FS ósseo poderia ser considerado uma entidade clinicopatológica distinta, a qual surge como um tumor primário do esqueleto, tanto na medula central quanto na periférica (77).

Diferentemente do OS de alto grau, poucos dados biológicos ou genéticos foram relatados até agora para FS ósseo em função de sua raridade, da ausência de modelos experimentais adequados e da falta de técnicas que permitissem análise genética em material estocado (77).

### **1.9 – Aspectos clínicos da genética em neoplasias**

As estratégias para o tratamento do câncer são criticamente dependentes de um diagnóstico preciso. Nos casos em que a histopatologia, a clínica e os exames tradicionais não conseguem determinar exatamente o tipo tumoral, outras investigações se fazem necessárias, como a análise genética (73).

A análise genética pode abreviar o período gasto na formulação de diagnósticos, reduzir o tempo médio de internação, antecipar a escolha de tratamentos adequados, impedir ou minimizar possíveis sequelas, além de evitar desperdícios decorrentes da realização de exames caros e inadequados. Tais benefícios justificam o investimento necessário para que este tipo de serviço funcione (74).

## 2 – OBJETIVOS

Este trabalho se propôs a analisar citogeneticamente os sarcomas ósseos, que constituem um grupo heterogêneo de neoplasias quanto a sua manifestação clínica, considerando-se os seus sítios anatômicos, a sua história natural de etiologia, a dificuldade de diferenciar os subtipos histológicos e o comportamento agressivo, objetivando a:

- Detectar alterações cromossômicas (aneuploidias e marcadores cromossômicos) clonais características consistentes e recorrentes envolvidas, vislumbrando a obtenção de possíveis marcadores genéticos destas neoplasias ósseas verdadeiras, que proporcionem uma ajuda no seu diagnóstico diferencial e no seu prognóstico.

- Identificar alterações que possam ser eventos críticos na gênese e na evolução destas lesões, descrevendo os pontos de quebra cromossômicos e sua relação com genes envolvidos com o controle da regulação da proliferação celular, que podem estar atuando na etiologia e evolução destas patologias.

- Apontar regiões genômicas críticas para investigação com análises moleculares.

- Associar dos dados obtidos com as análises clínico-radiológicas e histopatológicas, auxiliando no melhor entendimento, diagnóstico, e elaboração de terapias mais precoces e eficazes.

### 3 – JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença genética, relacionada a um alto índice de morbidade e mortalidade, causada pelo acúmulo de mutações no DNA que ocorre por um processo de diversas etapas. Estas alterações que caracterizam as células neoplásicas podem ser investigadas em nível genético.

O estudo genético, em neoplasias ósseas, visando à caracterização dos marcadores de prognóstico, pode ser utilizado como parâmetro para diagnóstico, prognóstico e auxílio da escolha de uma terapia mais adequada nos casos de neoplasias ósseas.

Apesar das neoplasias ósseas estarem sendo estudadas geneticamente na literatura, ainda são pouco conhecidas as alterações genéticas em lesões ósseas. A maioria dos tumores ósseos e de tecidos moles não possuem alterações genéticas específicas conhecidas, mas mostram combinações características de alterações cromossômicas, não-balanceadas, numéricas e estruturais (79). Assim, a triagem genômica obtida pela análise de bandas cromossômicas de células cultivadas pode fornecer informação genética adicional.

Os conhecimentos sobre a citogenética melhoraram o entendimento sobre os múltiplos aspectos da carcinogênese. No entanto, embora, as perspectivas permaneçam, não houve até agora, benefícios para prevenção, diagnóstico, tratamento e seguimento dos pacientes em vários subtipos de sarcomas ósseos.

Este trabalho visou estudos na tentativa de contribuir mais efetivamente com estratégias eficazes para melhorar as taxas de sobrevida e beneficiar maior número de pacientes portadores de sarcomas ósseos.

## **4 – MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 – Coleta das amostras**

O material foi coletado pela equipe de cirurgiões e médicos patologistas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu, São Paulo, Brasil e do Hospital Amaral Carvalho da cidade de Jaú, São Paulo, Brasil.

Todos os procedimentos eram posteriores à assepsia, de modo a evitar possíveis contaminações. As amostras são de tecido fresco obtido através de atos cirúrgicos em pacientes virgens de tratamento quimio ou radioterápico prévio, ou por obtenção de parte de material retirado do paciente pelo patologista, através de biópsia aspirativa simples ou guiada por Tomografia Computadorizada ou Ultrassonografia. As amostras destas biópsias foram aproveitadas nos pacientes que não foram anteriormente submetidos à quimioterapia ou radioterapia.

### **4.2 – Processamento das amostras**

Imediatamente após a coleta por punção aspirativa, o material foi semeado em frascos de cultura contendo meio de cultura HAM F10 (Sigma) suplementado e Soro Bovino Fetal a 15%, além de antibióticos.

As amostras de tecido a fresco, coletadas sob condições estéreis, foram processadas prontamente em fluxo laminar de forma estéril. Os fragmentos de tecidos foram primeiramente seccionados com pinças e tesouras cirúrgicas em placas de Petri, depois dissociados enzimaticamente com uma solução de colagenase (tipo IV, Sigma) 0,4% e transferidos para frascos de cultura contendo meio HAM F-10 (Sigma) suplementado com 15% de soro bovino fetal, vitaminas e antibióticos.

As amostras coletadas através de biópsia, não necessitaram de processamento e foram, automaticamente, semeadas em cultura.

### **4.3 – Cultura celular e colheita de cultura**

As culturas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C e alimentadas, com meio de cultura, em média duas vezes por semana. O tempo de cultura foi ajustado individualmente para cada caso, dependendo do índice mitótico observado em microscópio invertido, evitando a superpopulação celular, que poderia favorecer o aparecimento de alterações cromossômicas “*in vitro*”.

As amostras de sarcomas ósseos foram analisadas citogeneticamente após cultura *in vitro* de curta e média duração. Para a análise citogenética, deve ser feita a colheita das células.

O processo de colheita ocorreu da seguinte maneira: células em fase de crescimento exponencial foram primeiramente tratadas com colchicina 0,0016% por pelo menos quatro horas e, após esse tempo, foi adicionada tripsina-EDTA ao frasco, para que as células se desgrudassem deste. Em seguida, a solução de células e tripsina foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos e, após o processo, descartou-se o sobrenadante, para que se adicionasse 5ml de solução hipotônica de KCl 0,075M, a qual agiu por 50 minutos, na estufa a 37°C. Por fim, ocorreram três fases de centrifugação e homogeneização com solução de metanol:ácido acético (3:1), que foi usada como fixador. Assim, 1ml da amostra em fixador foi congelada em eppendorf para aguardar a montagem das lâminas.

#### **4.4 – Preparação das lâminas e coloração**

O estudo cromossômico foi realizado somente nas culturas primárias. As lâminas histológicas usadas no processo foram rigorosamente limpas e mantidas úmidas em béquer; o material fixado foi devidamente ressuspensionado com pipeta Pasteur e pingado a uma distância de aproximadamente 1m das lâminas úmidas e levemente inclinadas; as lâminas foram então colocadas para secar a temperatura ambiente.

Essas lâminas foram submetidas à técnica por bandamento cromossômico no padrão de coloração para Bandamento G, que é a técnica de bandeamento GTG descrita por Scheres (1972) com algumas modificações: as lâminas foram submetidas à ação da solução de tripsina (0,01% diluída em tampão fosfato 0,06M) por um tempo de poucos segundos, que varia de acordo com o tempo desde o preparo das lâminas (quanto maior este tempo, maior o tempo de

imersão das lâminas na solução de tripsina). A ação da tripsina foi interrompida mergulhando-se as lâminas em água destilada.

Após secas, as lâminas foram coradas com corante Giemsa (Merck) e tampão fosfato, na proporção de duas gotas de corante Giemsa para cada ml de tampão, por dois minutos. Foram feitas lavagens com água corrente e as lâminas secaram a temperatura ambiente.

#### **4.5 – Análises cromossômicas**

A análise das lâminas se realizou através de microscópio óptico, capturando imagens de metáfases em sistema de microscopia. A identificação e classificação dos cromossomos foram baseadas nas recomendações do ISCN (1985,1991,1995). Para a determinação de clone citogenético, utilizou-se o critério definido pelo ISCN (1991) onde, na determinação dos clones numéricos, não são incluídas as metáfases consideradas como poliplóides, ou seja,  $2n > 57$  e por analogia de critérios, também não foram consideradas as metáfases com  $2n < 35$ .

## 5 – RESULTADOS

As atividades científicas no laboratório dependeram diretamente da coleta das amostras de tecido para as análises, que foram obtidas através de biópsias ou cirurgias de exérese de tecidos patológicos de pacientes aceitos para tratamento no Departamento de Ortopedia e Cirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu e do Hospital do Câncer Amaral Carvalho, da cidade de Jaú. Em anexo, estão as autorizações dos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa.

As tabelas abaixo identificam as amostras do laboratório:

**Tabela 1 – Análises parciais dos casos do Hospital das Clínicas da UNESP**

<b>Hospital das Clínicas da UNESP – Botucatu/SP</b>		
<b>Amostra</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Situação Atual</b>
T06	Tumor de células gigantes	Nenhuma metáfase
T08	Sarcoma de alto grau, tumor de Triton	Nenhuma metáfase
T10	Osteoporose	Nenhuma metáfase
T12	Osteossarcoma condroblástico	Nenhuma metáfase
T15	Metástase de adenocarcinoma	Nenhuma metáfase
T16	Schwanoma	Nenhuma metáfase
T17	Condroblastoma	Nenhuma metáfase
T18	Mieloma múltiplo/plasmocitoma	Nenhuma metáfase
T20	Fibrolipoma	Poucas metáfases
T23	Condroblastoma	Poucas metáfases
T24	Metástase de adenocarcinoma	Poucas metáfases
T25	Condrossarcoma central primário	Analisado
T28	Osteossarcoma metastático	Analisado
T29	Fibrolipoma	Banda de baixa qualidade

Continuação - Tabela 1

T30	Fratura (ausência de neoplasia)	Banda de baixa qualidade
T31	Sarcoma pouco diferenciado	Analisado
T35	Osteomielite	Analisado
T36	Osteomielite	Analisado
T37	Fibrose e osteogênese reacional	Poucas metáfases
T40	Fibrossarcoma	Analisado
T41	Osteossarcoma úmero	Nenhuma metáfase

Tabela 2 – Análises parciais dos casos do Hospital Amaral Carvalho

<b>Hospital Amaral Carvalho – Jaú/SP</b>		
<b>Amostra</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Situação Atual</b>
ACO 01	*	Congelado
ACO 02	*	Poucas metáfases
ACO 03	Tumor de células gigantes	Poucas metáfases
ACO 04	Adenocarcinoma metastático	Poucas metáfases
ACO 05	Tumor mesenquimal	Congelado
ACO 07	Osteocondroma	Poucas metáfases
ACO 09	Tumor de células gigantes	Poucas metáfases
ACO 11	Ausência de neoplasia	Congelado
ACO 16	*	Congelado
ACO 17	Carcinoma metastático	Congelado
ACO 18	Plasmocitoma	Congelado
ACO 19	*	Congelado

Continuação - Tabela 2

ACO 20	Lipoma intramuscular	Congelado
ACO 21	Metástase de carcinoma ductal	Congelado
ACO 22	Osteoblastoma	Analisado
ACO 23	Ausência de neoplasia	Congelado
ACO 24	Fibrohistiocitoma	Congelado
ACO 25	Tumor de células gigantes	Analisado
ACO 26	*	Congelado
ACO 27	Encondroma	Analisado
ACO 29	*	Congelado
ACO 31	*	Congelado
* Casos em que não foi possível se obter o diagnóstico, pois a pasta desses pacientes não estava disponível no momento da consulta.		

## 5.1 – Análises citogenéticas

### Caso T28 - Osteossarcoma metastático

Fórmula cariotípica de 16 metáfases, após bandamento GTG:

**M1)** 43,XX,del(1)(q42),-19,-20,-20

**M2)** 45,XX,-12,add(13)(p13),add(14)(p13)

**M3)** 46,XX,del(4)(q32),add(13)(p13),add(14)(p13),

**M4)** 46,XX,+9,-17

**M5)** 45,XX,add(4)(p16),-8,-11,+mar1

**M6)** 45,X,-X

**M7)** 43,X,-X,del(4)(q32),-5,del(6)(q22),-13,-15,-16,-19,+mar2,+mar3,+mar4

**M8)** 54,X,-X,+16,+17,+17,+18,+18,+20,+20,+mar5,+mar6

**M9)** 44,XX,add(14)(p13),-21,-21

**M10)** 46,XX,del(4)(q32)

**M11)** Descartada

**M12)** 45,X,-X,del(4)(q32),-22,+mar7

**M13)** 45,X,-X,del(4)(q32),add(14)(p13),+16,-21,-22,+mar8

**M14)** 46,XX,add(13)(p13),-20,+mar9

**M15)** 46,XX

**M16)** 45,XX,-6,-11,-15,+mar10,+mar11

Alterações cromossômicas não clonais:

del(1)(q42)[1],add(4)(p16)[1],-5[1],del(6)(q22)[1],-6[1],-8[1],+9[1],-11[2],-12[1],-13[1],-15[2],-16[1],+16[2],-17[1],+17[1],+18[1],-19[2],-20[2],+20[1],-21[2],-22[2],+mar1[1],+mar2[1],+mar3[1],+mar4[1],+mar5[1],+mar6[1],+mar6[1],+mar6[1],+mar7[1],+mar8[1],+mar9[1],+mar10[1],+mar11[1]

Alterações cromossômicas clonais:

-X[5],del(4)(q32)[5],add(13)(p13)[3],add(14)(p13)[4]

Cariótipo composto:

43~54,XX,-X[5],del(4)(q32)[5],add(13)(p13)[3],add(14)(p13)[4]

46,XX[1]/cp[11]

<b>Caso T28 – Número Modal e Variação Cromossômica</b>	
<b>Número modal = 46 (28% das células analisadas)</b>	
<b>Número de células analisadas = 39</b>	
<b>Níveis de ploidia: Hipodiplóides = 59% / Diplóides = 28% / Hiperdiplóides = 13%</b>	
<b>M1 = 45 cromossomos</b>	<b>M21 = 42 cromossomos</b>
<b>M2 = 42 cromossomos</b>	<b>M22 = 43 cromossomos</b>
<b>M3 = 49 cromossomos</b>	<b>M23 = 46 cromossomos</b>
<b>M4 = 46 cromossomos</b>	<b>M24 = 43 cromossomos</b>
<b>M5 = 43 cromossomos</b>	<b>M25 = 47 cromossomos</b>
<b>M6 = 41 cromossomos</b>	<b>M26 = 46 cromossomos</b>
<b>M7 = 44 cromossomos</b>	<b>M27 = 43 cromossomos</b>
<b>M8 = 40 cromossomos</b>	<b>M28 = 46 cromossomos</b>
<b>M9 = 45 cromossomos</b>	<b>M29 = 49 cromossomos</b>
<b>M10 = 45 cromossomos</b>	<b>M30 = 44 cromossomos</b>
<b>M11 = 47 cromossomos</b>	<b>M31 = 46 cromossomos</b>
<b>M12 = 46 cromossomos</b>	<b>M32 = 42 cromossomos</b>
<b>M13 = 45 cromossomos</b>	<b>M33 = 46 cromossomos</b>
<b>M14 = 44 cromossomos</b>	<b>M34 = 43 cromossomos</b>
<b>M15 = 45 cromossomos</b>	<b>M35 = 46 cromossomos</b>
<b>M16 = 43 cromossomos</b>	<b>M36 = 46 cromossomos</b>
<b>M17 = 54 cromossomos</b>	<b>M37 = 43 cromossomos</b>
<b>M18 = 45 cromossomos</b>	<b>M38 = 42 cromossomos</b>
<b>M19 = 44 cromossomos</b>	<b>M39 = 46 cromossomos</b>
<b>M20 = 46 cromossomos</b>	-

Figura 1 - Cariótipo 44,XX,add(14)(p13),-21,-21

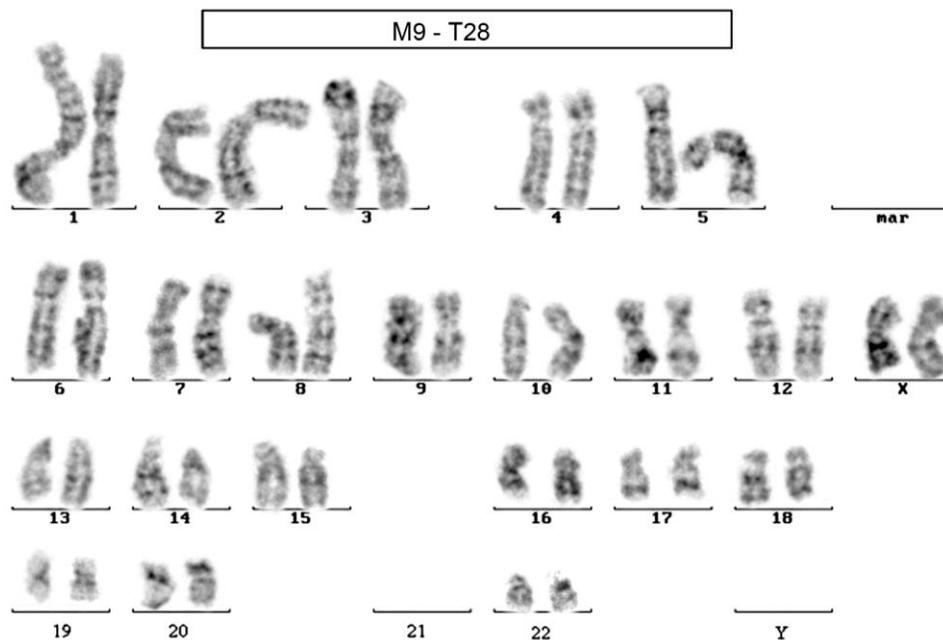


Figura 2 - Cariótipo 45,X,-X,del(4)(q32),-22,+mar7

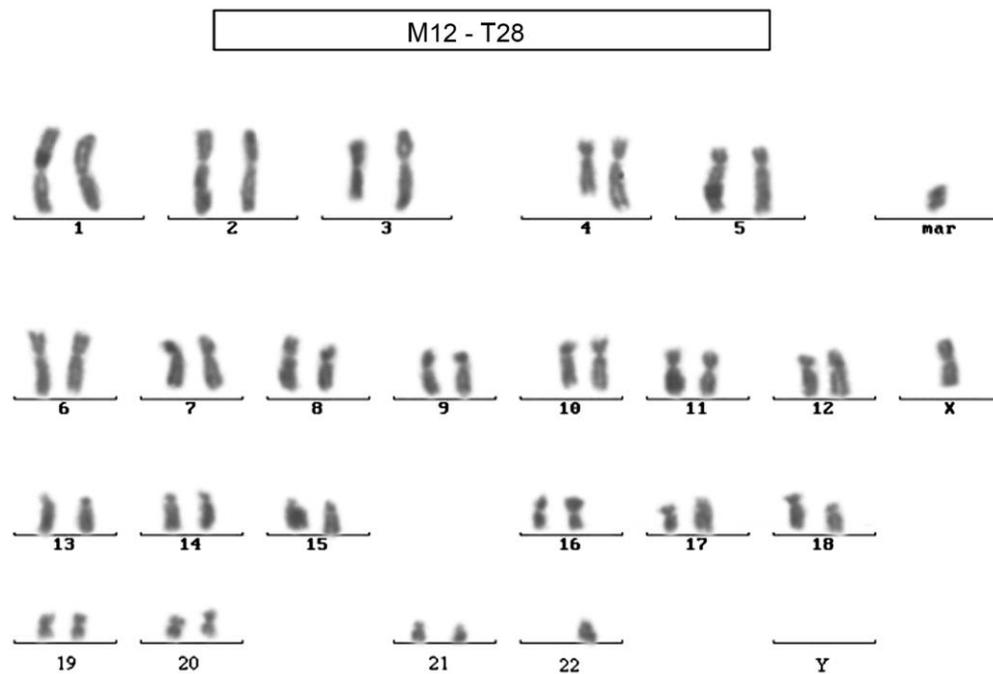
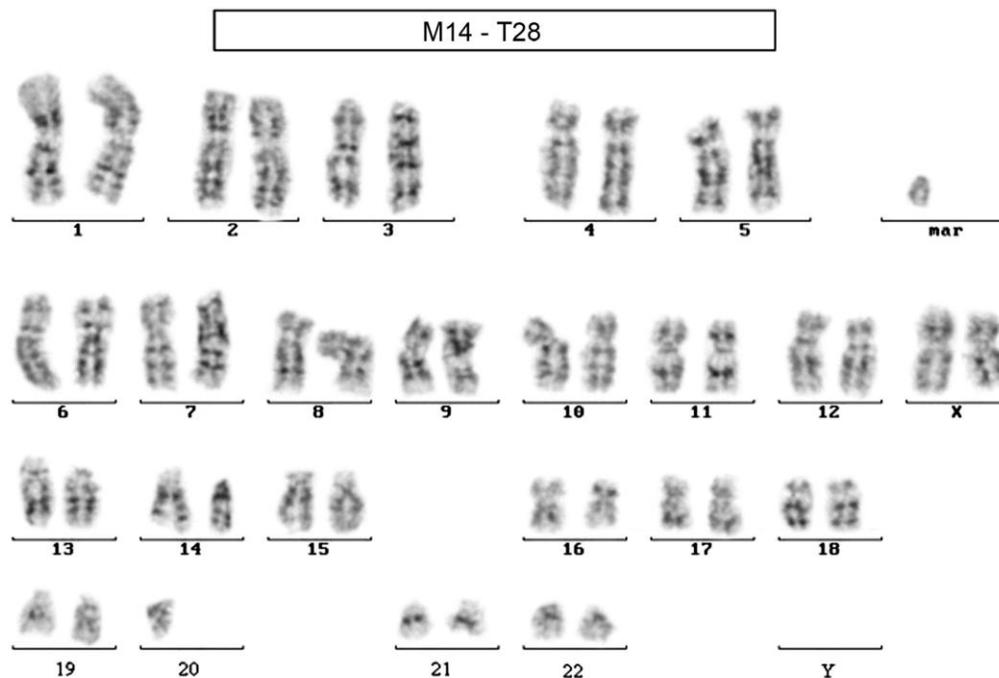


Figura 3 – Cariótipo 46,XX,add(13)(p13),-20,+mar9



### Caso T31 - Sarcoma pouco diferenciado

Fórmula cariotípica de 8 metáfases, após bandamento GTG:

**M1)** 47,XX,+mar1

**M2)** 46,XX

**M3)** 43,XX,-5,del(7)(p21),-9,-15

**M5)** 46,XX,-2,del(7)(p21),-20,+mar2,+mar3

**M6)** 46,XX

**M7)** 45,X,-X,del(7)(p21)

**M8)** 46,XX,del(7)(p21)

Alterações cromossômicas não clonais:

-X[1],-2[1],-5[1],-20,+mar1[1],+mar2[1],+mar3[1]

Alterações cromossômicas clonais:

del(7)(p21)[4]

Cariótipo composto:

43~47,XX,del(7)(p21)[4]

46,XX[2]/cp[4]

<b>Caso T31 – Número Modal e Variação Cromossômica</b>	
<b>Número modal = 46 (40% das células analisadas)</b>	
<b>Número de células analisadas = 20</b>	
<b>Níveis de ploidia: Hipodiplóides = 30% / Diplóides = 40% / Hiperdiplóides = 30%</b>	
<b>M1 = 46 cromossomos</b>	<b>M11 = 44 cromossomos</b>
<b>M2 = 45 cromossomos</b>	<b>M12 = 46 cromossomos</b>
<b>M3 = 47 cromossomos</b>	<b>M13 = 47 cromossomos</b>
<b>M4 = 42 cromossomos</b>	<b>M14 = 46 cromossomos</b>
<b>M5 = 43 cromossomos</b>	<b>M15 = 46 cromossomos</b>
<b>M6 = 49 cromossomos</b>	<b>M16 = 45 cromossomos</b>
<b>M7 = 48 cromossomos</b>	<b>M17 = 47 cromossomos</b>
<b>M8 = 46 cromossomos</b>	<b>M18 = 46 cromossomos</b>
<b>M9 = 46 cromossomos</b>	<b>M19 = 47 cromossomos</b>
<b>M10 = 46 cromossomos</b>	<b>M20 = 45 cromossomos</b>

Figura 4 – Cariótipo 43,XX,-5,del(7)(p21),-9,-15

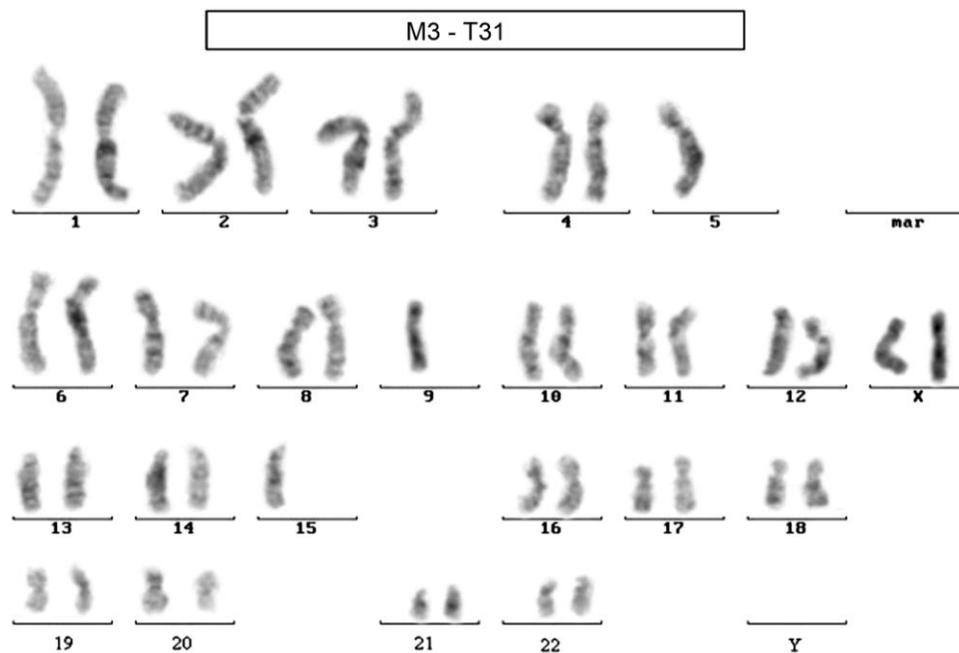
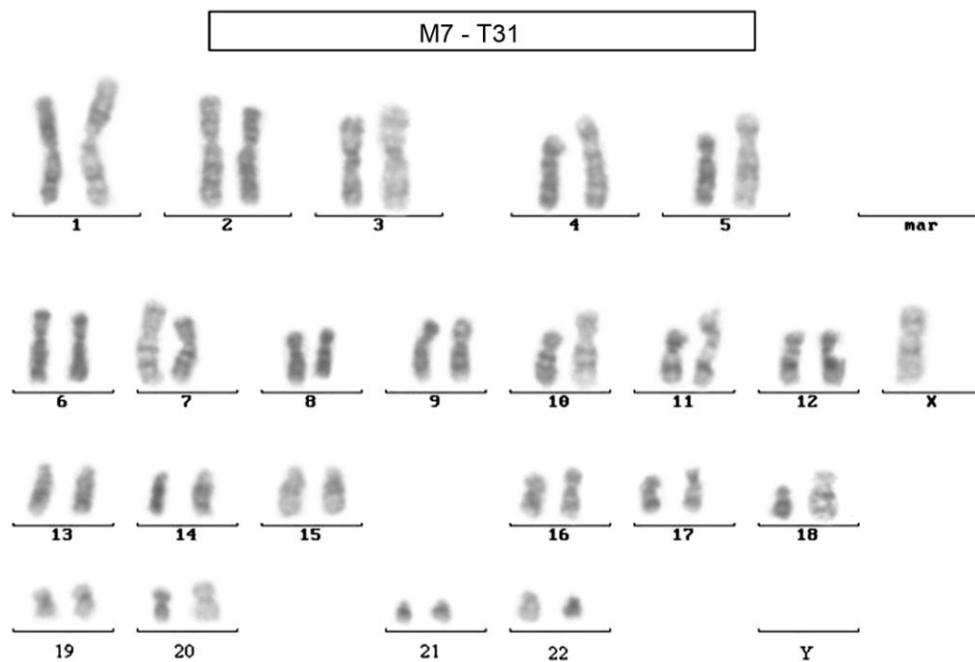


Figura 5 – Cariótipo 45,X,-X,del(7)(p21)



**Caso T35 – Osteomielite**

Fórmula cariotípica de 21 metáfases, após bandamento GTG:

**M1)** 43,XX,-3,-15,del(17)(p13),-18,-19,+mar1

**M2)** 42,X,-X,-8,-11,-20,-21,+mar1

**M3)** end 46,XX

**M4)** 46,X,-X,-2,-21,+mar1,+mar2,+mar3

**M5)** 44,X,-X,add(12)(q24.3),-20 – Figura 1

**M6)** 44,X,-X,-11,add(12)(q24.3)

**M7)** 44,X,-X,-3

**M8)** 41,X,-X,tas(5;7)(p15.3;q36),-10,-14,-15,-16,+mar4

**M9)** 45,X,-X,t(17;18)(q25;p11)

**M10)** 44,XX,-1,-2,-2,-4,-4,-22,+mar1,+mar5

**M11)** 45,XX,-1,-17,+mar6

**M12)** 44,X,-X,-11,-12,del(17)(p13)-22,+mar2,+mar7,+mar8 – Figura 2

**M13)** 42,X,-X,-4,-10,-19,-21,+mar3

**M14)** 43,XX,-1,del(17)(p13),-10,-20,+mar1

**M15)** 42,X,-X,-22,-22,+mar2

**M16)** 38,-X-X,-1,-2,-10,-11,-12,-19,t(19;7)(p13;q36)

**M17)** 46,XX

**M18)** 47,XX,-1,-1,+15,+16,-20,+mar2,+mar9

**M19)** 44,XX,-1,-2,-8,-22,+mar10,+mar11

**M20)** 46,X,-X,+mar3

**M21)** 47,X,-X,+mar2,+mar12

Alterações cromossômicas não clonais:

-3[2],-4[2],tas(5;7)(p15.3;p11)[1],-8[2],-12[2],-14[1],-15[2],+15[1],-16[2],-17[1],  
t(17;18)(q25;p11)[1],[-1],t(19;7)(p13;q36)[1],end46,XX,+mar4[1],+mar5[1],+mar6[1],+mar7[1],  
+mar8[1],+mar9[1],+mar10[1],+mar11[1],+mar12[1]

Alterações cromossômicas clonais:

-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],-19[3],-20[4],-21[3],-22[4],  
+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3]

Cariótipo composto:

38~47,XX,-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],-19[3],-20[4],-21[3],  
-22[4],+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3]

46,XX[1]/cp[19]

<b>Caso T35 – Número Modal e Variação Cromossômica</b>		
<b>Número modal = 46 (25% das células analisadas)</b>		
<b>Número de células analisadas = 75</b>		
<b>Níveis de ploidia: Hipodiplóides = 60% / Diplóides = 25% / Hiperdiplóides = 15%</b>		
<b>M1 = 46 cromossomos</b>	<b>M26 = 46 cromossomos</b>	<b>M51 = 44 cromossomos</b>
<b>M2 = 46 cromossomos</b>	<b>M27 = 45 cromossomos</b>	<b>M52 = 46 cromossomos</b>
<b>M3 = 46 cromossomos</b>	<b>M28 = 48 cromossomos</b>	<b>M53 = 47 cromossomos</b>
<b>M4 = 47 cromossomos</b>	<b>M29 = 45 cromossomos</b>	<b>M54 = 48 cromossomos</b>
<b>M5 = 43 cromossomos</b>	<b>M30 = 41 cromossomos</b>	<b>M55 = 45 cromossomos</b>
<b>M6 = 43 cromossomos</b>	<b>M31 = 42 cromossomos</b>	<b>M56 = 49 cromossomos</b>
<b>M7 = 45 cromossomos</b>	<b>M32 = 39 cromossomos</b>	<b>M57 = 44 cromossomos</b>
<b>M8 = 44 cromossomos</b>	<b>M33 = 42 cromossomos</b>	<b>M58 = 44 cromossomos</b>
<b>M9 = 37 cromossomos</b>	<b>M34 = 42 cromossomos</b>	<b>M59 = 40 cromossomos</b>
<b>M10 = 40 cromossomos</b>	<b>M35 = 49 cromossomos</b>	<b>M60 = 46 cromossomos</b>
<b>M11 = 40 cromossomos</b>	<b>M36 = 44 cromossomos</b>	<b>M61 = 38 cromossomos</b>
<b>M12 = 42 cromossomos</b>	<b>M37 = 43 cromossomos</b>	<b>M62 = 46 cromossomos</b>
<b>M13 = 46 cromossomos</b>	<b>M38 = 42 cromossomos</b>	<b>M63 = 38 cromossomos</b>
<b>M14 = 46 cromossomos</b>	<b>M39 = 46 cromossomos</b>	<b>M64 = 42 cromossomos</b>
<b>M15 = 46 cromossomos</b>	<b>M40 = 40 cromossomos</b>	<b>M65 = 37 cromossomos</b>
<b>M16 = 42 cromossomos</b>	<b>M41 = 46 cromossomos</b>	<b>M66 = 45 cromossomos</b>
<b>M17 = 43 cromossomos</b>	<b>M42 = 44 cromossomos</b>	<b>M67 = 39 cromossomos</b>
<b>M18 = 43 cromossomos</b>	<b>M43 = 46 cromossomos</b>	<b>M68 = 48 cromossomos</b>
<b>M19 = 42 cromossomos</b>	<b>M44 = 43 cromossomos</b>	<b>M69 = 47 cromossomos</b>
<b>M20 = 45 cromossomos</b>	<b>M45 = 39 cromossomos</b>	<b>M70 = 46 cromossomos</b>
<b>M21 = 47 cromossomos</b>	<b>M46 = 44 cromossomos</b>	<b>M71 = 48 cromossomos</b>
<b>M22 = 46 cromossomos</b>	<b>M47 = 39 cromossomos</b>	<b>M72 = 46 cromossomos</b>
<b>M23 = 46 cromossomos</b>	<b>M48 = 38 cromossomos</b>	<b>M73 = 46 cromossomos</b>
<b>M24 = 48 cromossomos</b>	<b>M49 = 40 cromossomos</b>	<b>M74 = 44 cromossomos</b>
<b>M25 = 38 cromossomos</b>	<b>M50 = 38 cromossomos</b>	<b>M75 = 46 cromossomos</b>

Figura 6 – Cariótipo 44,X,-X,add(12)(q24.3),-20

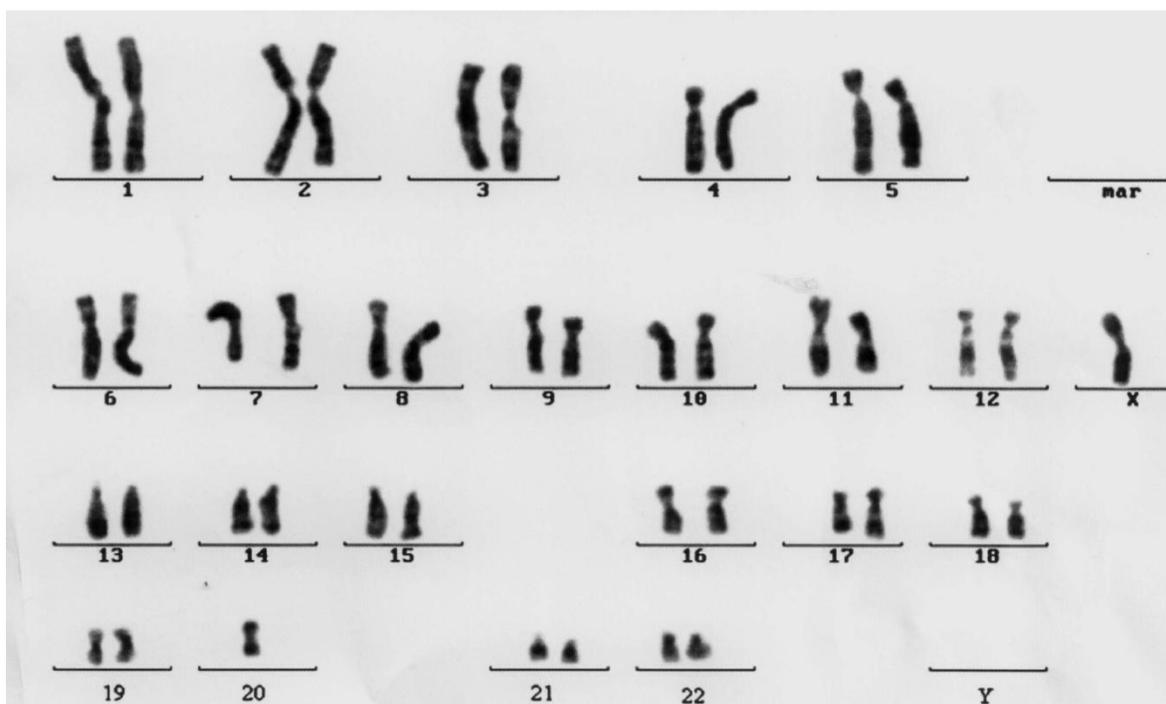
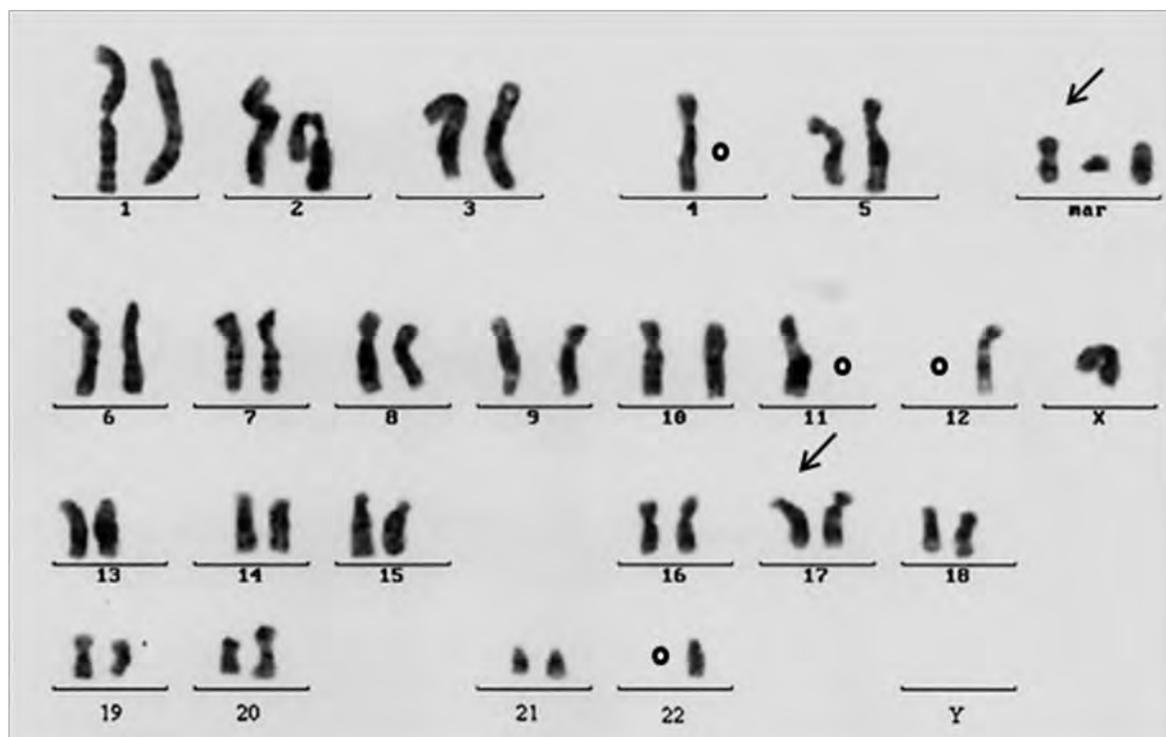


Figura 7 – Cariótipo 44,X,-X,-4-11,-12,del(17)(p13)-22,+mar2,+mar7,+mar8



**Caso T40 – Fibrossarcoma**

Fórmula cariotípica de 23 metáfases, após bandamento GTG:

- M1)** 42,-X,-Y,-6,-9,-19,-21,+mar1,+mar2
- M2)** 46,XY,-19,+mar3
- M3)** 47,XY,+mar4
- M4)** Descartada
- M5)** 46,XY,-13,-15,+mar5,+mar6
- M6)** 43,XY,+12,t(17;22)(p13;p13)
- M7)** 43,XY,+2,-7,-13,t(15;22)(p13;p13),-17,-19,-19,-22,+mar7,+mar8
- M8)** Descartada
- M9)** 44,XY,-18,-19
- M10)** 44,X,-Y,-18
- M11)** 47,XY,-11,-17,+t(16;21)(p13;p13),+mar9,+mar10
- M12)** 40,X,-Y,-3,-9,-15,-18,-19
- M13)** 45,XY,-2,-16,+mar11
- M14)** Descartada
- M15)** 43,X,+X,-Y,-1,-19,-19,-22
- M16)** Descartada
- M17)** 46,X,+X,-Y,-2,-4,+mar12
- M18)** 43,X,-Y,-20,-22
- M19)** 46,X,+X,-Y
- M20)** 45,Y,-X,-17,+20,-21,+mar13
- M21)** 44,X,+X,-Y,-3,+4,-5,+9,-10,+15,-22,-22
- M22)** 43,X,-Y,-4,-9,-9,-17,+mar14,+mar15

**M23)** 45,X,+X,-Y,-7,t(13;21)(p13;p13)

Alterações cromossômicas não clonais:

-X[2],-1[1],-2[2],+2[1],-3[2],-4[2],+4[1],-5[1],-6[1],-7[2],+9[1],-10[1],-11[1],+12[1],-13[2],  
+t(13;21)(p13;p13),-15[2],+15[1],t(15;22)(p13;p13),-16[1],+t(16;21)(p13;p13),t(17;22)(p13;p13),  
-20[2],+20[1],-21[2],+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,+mar8,+mar9,+mar10,  
+mar11,+mar12,+mar13,+mar14,+mar15,+mar16

Alterações cromossômicas clonais:

+X[5],-Y[10],-9[3],-17[4],-18[4],-19[7],-22[5]

Cariótipo composto:

40~47,XY,+X[5],-Y[10],-9[3],-17[4],-18[4],-19[7],-22[5]

46,XY[0]/cp[16]

<b>Caso T40 – Número Modal e Variação Cromossômica</b>		
<b>Número modal = 46 (17% das células analisadas)</b>		
<b>Número de células analisadas = 74</b>		
<b>Níveis de ploidia: Hipodiplóides = 60% / Diplóides = 17% / Hiperdiplóides = 23%</b>		
<b>M1 = 46 cromossomos</b>	<b>M26 = 43 cromossomos</b>	<b>M51 = 45 cromossomos</b>
<b>M2 = 45 cromossomos</b>	<b>M27 = 46 cromossomos</b>	<b>M52 = 40 cromossomos</b>
<b>M3 = 46 cromossomos</b>	<b>M28 = 43 cromossomos</b>	<b>M53 = 46 cromossomos</b>
<b>M4 = 43 cromossomos</b>	<b>M29 = 47 cromossomos</b>	<b>M54 = 46 cromossomos</b>
<b>M5 = 49 cromossomos</b>	<b>M30 = 42 cromossomos</b>	<b>M55 = 46 cromossomos</b>
<b>M6 = 44 cromossomos</b>	<b>M31 = 48 cromossomos</b>	<b>M56 = 41 cromossomos</b>
<b>M7 = 44 cromossomos</b>	<b>M32 = 43 cromossomos</b>	<b>M57 = 45 cromossomos</b>
<b>M8 = 45 cromossomos</b>	<b>M33 = 46 cromossomos</b>	<b>M58 = 45 cromossomos</b>
<b>M9 = 49 cromossomos</b>	<b>M34 = 47 cromossomos</b>	<b>M59 = 46 cromossomos</b>
<b>M10 = 45 cromossomos</b>	<b>M35 = 47 cromossomos</b>	<b>M60 = 40 cromossomos</b>
<b>M11 = 40 cromossomos</b>	<b>M36 = 45 cromossomos</b>	<b>M61 = 45 cromossomos</b>
<b>M12 = 41 cromossomos</b>	<b>M37 = 40 cromossomos</b>	<b>M62 = 41 cromossomos</b>
<b>M13 = 45 cromossomos</b>	<b>M38 = 44 cromossomos</b>	<b>M63 = 47 cromossomos</b>
<b>M14 = 43 cromossomos</b>	<b>M39 = 40 cromossomos</b>	<b>M64 = 42 cromossomos</b>
<b>M15 = 46 cromossomos</b>	<b>M40 = 47 cromossomos</b>	<b>M65 = 45 cromossomos</b>
<b>M16 = 43 cromossomos</b>	<b>M41 = 43 cromossomos</b>	<b>M66 = 49 cromossomos</b>
<b>M17 = 47 cromossomos</b>	<b>M42 = 44 cromossomos</b>	<b>M67 = 44 cromossomos</b>
<b>M18 = 45 cromossomos</b>	<b>M43 = 46 cromossomos</b>	<b>M68 = 44 cromossomos</b>
<b>M19 = 47 cromossomos</b>	<b>M44 = 46 cromossomos</b>	<b>M69 = 45 cromossomos</b>
<b>M20 = 43 cromossomos</b>	<b>M45 = 48 cromossomos</b>	<b>M70 = 52 cromossomos</b>
<b>M21 = 42 cromossomos</b>	<b>M46 = 46 cromossomos</b>	<b>M71 = 47 cromossomos</b>
<b>M22 = 44 cromossomos</b>	<b>M47 = 43 cromossomos</b>	<b>M72 = 47 cromossomos</b>
<b>M23 = 44 cromossomos</b>	<b>M48 = 45 cromossomos</b>	<b>M73 = 39 cromossomos</b>
<b>M24 = 45 cromossomos</b>	<b>M49 = 47 cromossomos</b>	<b>M74 = 39 cromossomos</b>
<b>M25 = 48 cromossomos</b>	<b>M50 = 45 cromossomos</b>	<b>M68 = 44 cromossomos</b>

Figura 8 – Cariótipo 47,XY,+mar4

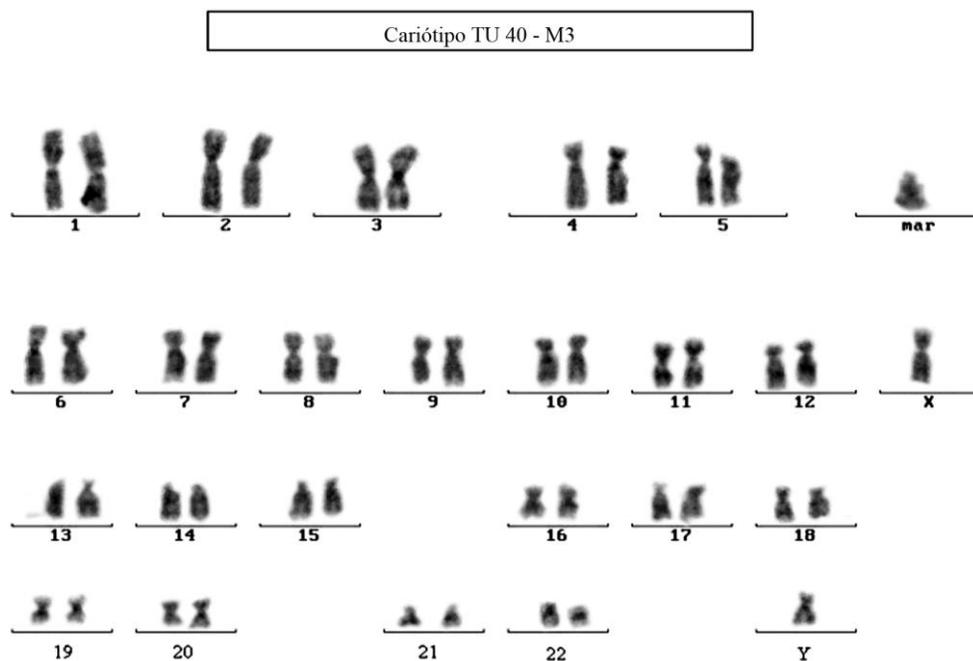
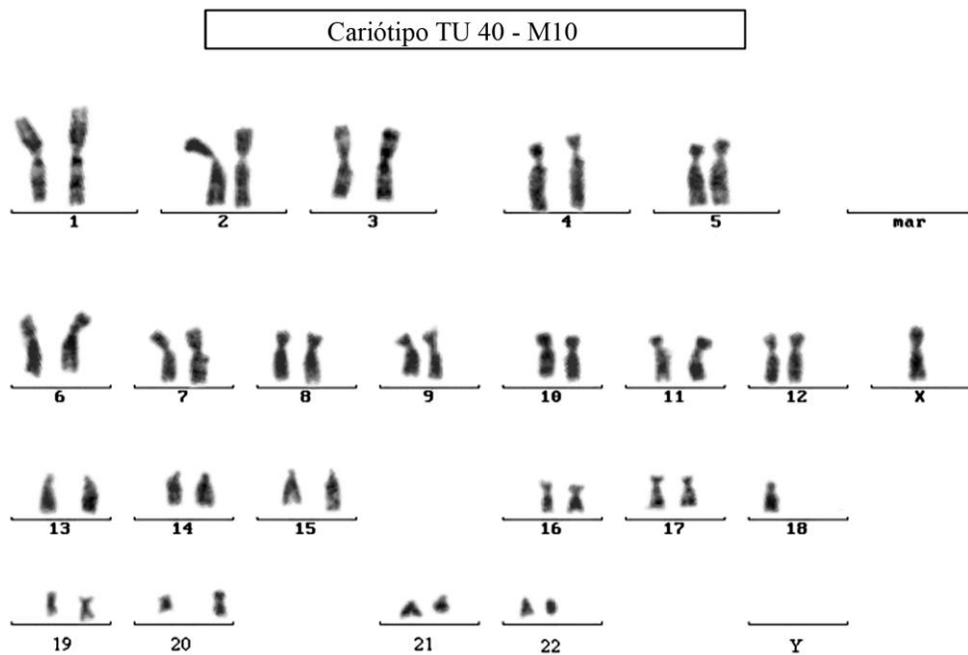


Figura 9 – Cariótipo 44,X,-Y,-18



**Caso ACO 25 - Tumor de células gigantes**

Fórmula cariotípica de 21 metáfases, após bandamento GTG:

**M1)** 40,XY,-11,-12,-14,-19,-19,-20

**M2)** 40,Y,-X,-4,-8,-11,-19,-19

**M3)** 45,XY,add(14)(p13),-17: FOTO

**M4)** 42,X,-Y,-4,-5,-6,-13,-13,+18,+20,-22,+mar1

**M5)** 41,XY,-11,-11,-12,-12,add(14)(p13),del(16)(q22),-19,-19,+mar2

**M6)** 40,X,-Y,-1,-15,-16,-18,-19

**M7)** 50,XY,+1,+2,+5,+6,+10,+12,-22,-22

**M8)** 43,XY,-6,-7,add(14)(p13),del(16)(q22),-19

**M9)** 46,XY

**M10)** 46,XY

**M11)** 45,XY,+X,-1,-7,-17,+mar3

**M12)** 37,XY,-1,-10,-11,-12,-12,-13,-18,-18,-19

**M13)** Descartada

**M14)** 45,XY,-2

**M15)** 46,X,-Y,add(14)(p13),+mar4

**M16)** 45,X,-Y

**M17)** 45,XY,-19

**M18)** 43,X,-Y,-4,add(14)(p13),-15

**M19)** 45,XY,add(14)(p13),-19,-20,+mar5

**M20)** 46,XY,del(1)(p21),+13,+14,add(14)(p13),-19,-19

**M21)** 43,XY,-5,-21,-21

Alterações cromossômicas não clonais:

-X[1],+X[1],del(1)(p21)[1],+1[1],-2[1]+2[1],-5[2],+5[1],-6[2],+6[1],-7[2],-8[1],-10[1],+10[1],+12[1],-13[2],+13[1],-14[1],+14[1],-15[2],-16[1],del(16)(q22)[2],-17[2],-18[2],+18[1],-20[2],+20[1],-21[1],-22[2],+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5

Alterações cromossômicas clonais:

-Y[5],-1[3],-4[3],-11[4],-12[3],add(14)(p13)[7],-19[8]

Cariótipo composto:

37~50,XY,-Y[5],-1[3],-4[3],-11[4],-12[3],add(14)(p13)[7],-19[8]

46,XY[2]/cp[14]

<b>Caso ACO.25 – Número Modal e Variação Cromossômica</b>		
<b>Número modal = 46 (22% das células analisadas)</b>		
<b>Número de células analisadas = 55</b>		
<b>Níveis de ploidia: Hipodiplóides = 49% / Diplóides = 22% / Hiperdiplóides = 29%</b>		
<b>M1 = 35 cromossomos</b>	<b>M20 = 37 cromossomos</b>	<b>M39 = 45 cromossomos</b>
<b>M2 = 39 cromossomos</b>	<b>M21 = 43 cromossomos</b>	<b>M40 = 47 cromossomos</b>
<b>M3 = 47 cromossomos</b>	<b>M22 = 31 cromossomos</b>	<b>M41 = 46 cromossomos</b>
<b>M4 = 44 cromossomos</b>	<b>M23 = 47 cromossomos</b>	<b>M42 = 48 cromossomos</b>
<b>M5 = 41 cromossomos</b>	<b>M24 = 47 cromossomos</b>	<b>M43 = 48 cromossomos</b>
<b>M6 = 37 cromossomos</b>	<b>M25 = 47 cromossomos</b>	<b>M44 = 47 cromossomos</b>
<b>M7 = 44 cromossomos</b>	<b>M26 = 42 cromossomos</b>	<b>M45 = 46 cromossomos</b>
<b>M8 = 49 cromossomos</b>	<b>M27 = 48 cromossomos</b>	<b>M46 = 46 cromossomos</b>
<b>M9 = 46 cromossomos</b>	<b>M28 = 42 cromossomos</b>	<b>M47 = 44 cromossomos</b>
<b>M10 = 45 cromossomos</b>	<b>M29 = 47 cromossomos</b>	<b>M48 = 43 cromossomos</b>
<b>M11 = 39 cromossomos</b>	<b>M30 = 47 cromossomos</b>	<b>M49 = 46 cromossomos</b>
<b>M12 = 45 cromossomos</b>	<b>M31 = 44 cromossomos</b>	<b>M50 = 48 cromossomos</b>
<b>M13 = 47 cromossomos</b>	<b>M32 = 41 cromossomos</b>	<b>M51 = 46 cromossomos</b>
<b>M14 = 41 cromossomos</b>	<b>M33 = 39 cromossomos</b>	<b>M52 = 46 cromossomos</b>
<b>M15 = 43 cromossomos</b>	<b>M34 = 39 cromossomos</b>	<b>M53 = 46 cromossomos</b>
<b>M16 = 48 cromossomos</b>	<b>M35 = 40 cromossomos</b>	<b>M54 = 46 cromossomos</b>
<b>M17 = 42 cromossomos</b>	<b>M36 = 43 cromossomos</b>	<b>M55 = 46 cromossomos</b>
<b>M18 = 38 cromossomos</b>	<b>M37 = 46 cromossomos</b>	-
<b>M19 = 46 cromossomos</b>	<b>M38 = 47 cromossomos</b>	-

Figura 10 – Cariótipo 46,X,-Y,add(14)(p13),+mar4

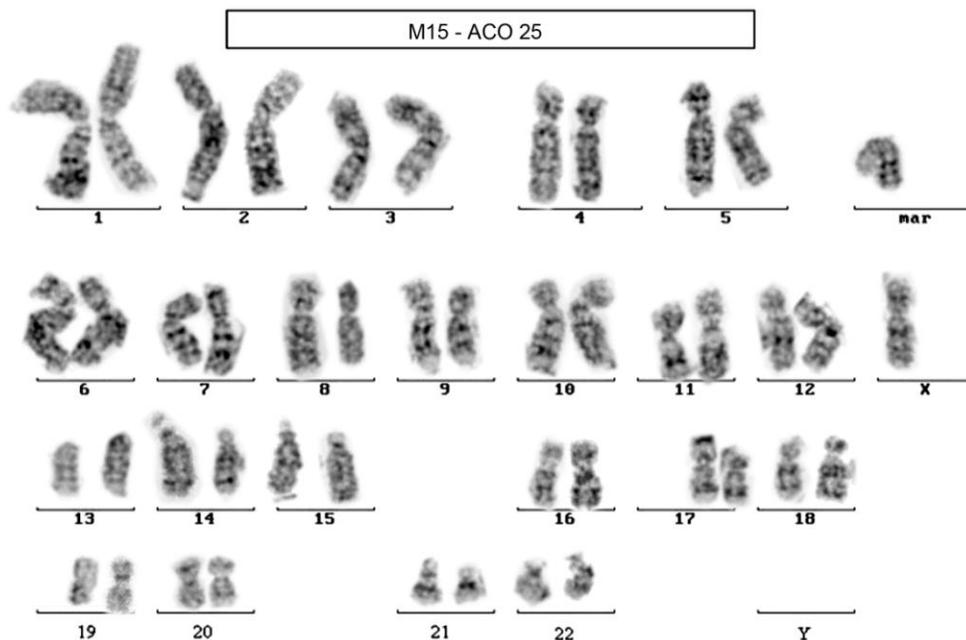
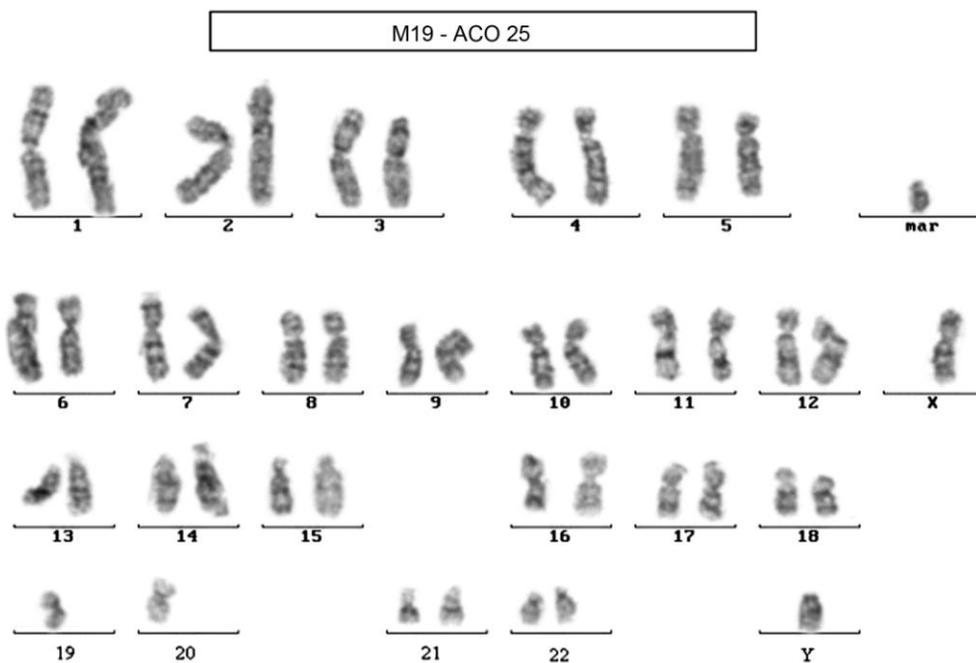


Figura 11 – Cariótipo 45,XY,add(14)(p13),-19,-20,+mar5



**Caso T25 – Condrossarcoma**

Fórmula cariotípica de 22 metáfases, após bandamento GTG:

- M1)** 40,X,-Y,-5,del(6)(q22),-9,-11,-16,-19
- M2)** 45,X,-Y,del(6)(q22)
- M3)** 47,XY,del(9)(q22),-21,+mar1,+mar2
- M4)** 46,XY,del(18)(q22)
- M5)** 46,XY,-15,+mar3
- M6)** 46,XY,del(6)(q22)
- M7)** 46,XY
- M8)** 46,XY,del(6)(q22)
- M9)** 43,XY,-5,+13,-17,-17,-22
- M10)** 45,XY,t(8;20)(q24;q13),-20
- M11)** 47,XY,+mar2
- M12)** 46,XY
- M13)** 46,XY,del(7)(q31)
- M14)** Descartada
- M15)** 46,XY
- M16)** 45,Y,-X
- M17)** 41,XY,-6,-10,-11,-13,t(17;19)(p13;q13),-19
- M18)** 43,XY,-1,-3,-7,-15,+21
- M19)** 44,XY,-10,-17

**M20)** Descartada

**M21)** 46,XY,-9,+mar4

**M22)** 45,XY,-8,-9,+mar5

Alterações cromossômicas não clonais:

-X[1],-Y[2],-1[1],-3[1],-5[2],-6[1],-7[1],del(7)(q31)[1],-8[1],t(8;20)(q24;q31)[1],del(9)(q22)[1],-10[2],-11[2],-13[1],+13[1],-15[2],-16[1],-17[2],t(17;19)(p13;q13)[1],del(18)(q22)[1],-19[2],-21[1],+21[1],+mar1[1],+mar2[1],+mar3[1],+mar4[1],+mar5[1]

Alterações cromossômicas clonais:

del(6)(q22)[4],-9[3]

Cariótipo composto:

40~46,XY,del(6)(q22)[4],-9[3]

46,XY[3]/cp[6]

<b>Caso T25 – Número Modal e Variação Cromossômica</b>		
<b>Número modal = 46 (38% das células analisadas)</b>		
<b>Número de células analisadas = 74</b>		
<b>Níveis de ploidia: Hipodiplóides = 42%% / Diplóides = 38% / Hiperdiplóides = 20%</b>		
<b>M1 = 45 cromossomos</b>	<b>M26 = 46 cromossomos</b>	<b>M51 = 46 cromossomos</b>
<b>M2 = 42 cromossomos</b>	<b>M27 = 46 cromossomos</b>	<b>M52 = 45 cromossomos</b>
<b>M3 = 47 cromossomos</b>	<b>M28 = 43 cromossomos</b>	<b>M53 = 46 cromossomos</b>
<b>M4 = 47 cromossomos</b>	<b>M29 = 46 cromossomos</b>	<b>M54 = 46 cromossomos</b>
<b>M5 = 45 cromossomos</b>	<b>M30 = 44 cromossomos</b>	<b>M55 = 48 cromossomos</b>
<b>M6 = 46 cromossomos</b>	<b>M31 = 48 cromossomos</b>	<b>M56 = 46 cromossomos</b>
<b>M7 = 46 cromossomos</b>	<b>M32 = 45 cromossomos</b>	<b>M57 = 46 cromossomos</b>
<b>M8 = 43 cromossomos</b>	<b>M33 = 46 cromossomos</b>	<b>M58 = 44 cromossomos</b>
<b>M9 = 45 cromossomos</b>	<b>M34 = 46 cromossomos</b>	<b>M59 = 45 cromossomos</b>
<b>M10 = 44 cromossomos</b>	<b>M35 = 43 cromossomos</b>	<b>M60 = 46 cromossomos</b>
<b>M11 = 46 cromossomos</b>	<b>M36 = 46 cromossomos</b>	<b>M61 = 43 cromossomos</b>
<b>M12 = 46 cromossomos</b>	<b>M37 = 47 cromossomos</b>	<b>M62 = 43 cromossomos</b>
<b>M13 = 43 cromossomos</b>	<b>M38 = 41 cromossomos</b>	<b>M63 = 48 cromossomos</b>
<b>M14 = 46 cromossomos</b>	<b>M39 = 47 cromossomos</b>	<b>M64 = 45 cromossomos</b>
<b>M15 = 47 cromossomos</b>	<b>M40 = 45 cromossomos</b>	<b>M65 = 42 cromossomos</b>
<b>M16 = 41 cromossomos</b>	<b>M41 = 44 cromossomos</b>	<b>M66 = 46 cromossomos</b>
<b>M17 = 44 cromossomos</b>	<b>M42 = 46 cromossomos</b>	<b>M67 = 46 cromossomos</b>
<b>M18 = 47 cromossomos</b>	<b>M43 = 46 cromossomos</b>	<b>M68 = 50 cromossomos</b>
<b>M19 = 45 cromossomos</b>	<b>M44 = 41 cromossomos</b>	<b>M69 = 46 cromossomos</b>
<b>M20 = 46 cromossomos</b>	<b>M45 = 48 cromossomos</b>	<b>M70 = 47 cromossomos</b>
<b>M21 = 46 cromossomos</b>	<b>M46 = 47 cromossomos</b>	<b>M71 = 44 cromossomos</b>
<b>M22 = 48 cromossomos</b>	<b>M47 = 45 cromossomos</b>	<b>M72 = 45 cromossomos</b>
<b>M23 = 46 cromossomos</b>	<b>M48 = 46 cromossomos</b>	<b>M73 = 42 cromossomos</b>
<b>M24 = 44 cromossomos</b>	<b>M49 = 46 cromossomos</b>	<b>M74 = 50 cromossomos</b>
<b>M25 = 41 cromossomos</b>	<b>M50 = 46 cromossomos</b>	-

Figura 12 – Cariótipo 46,XY,del(6)(q22)

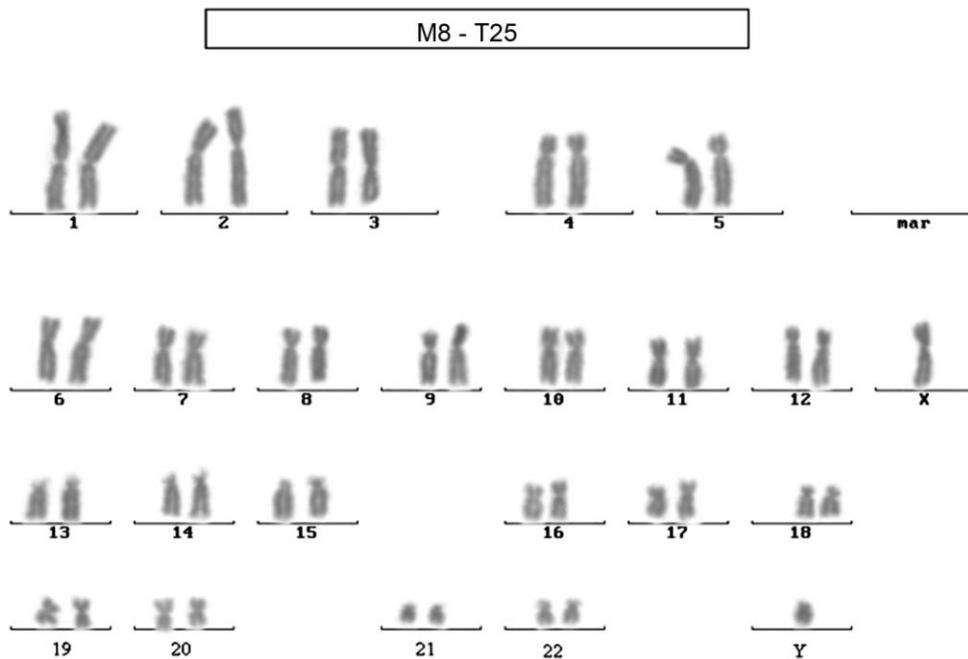
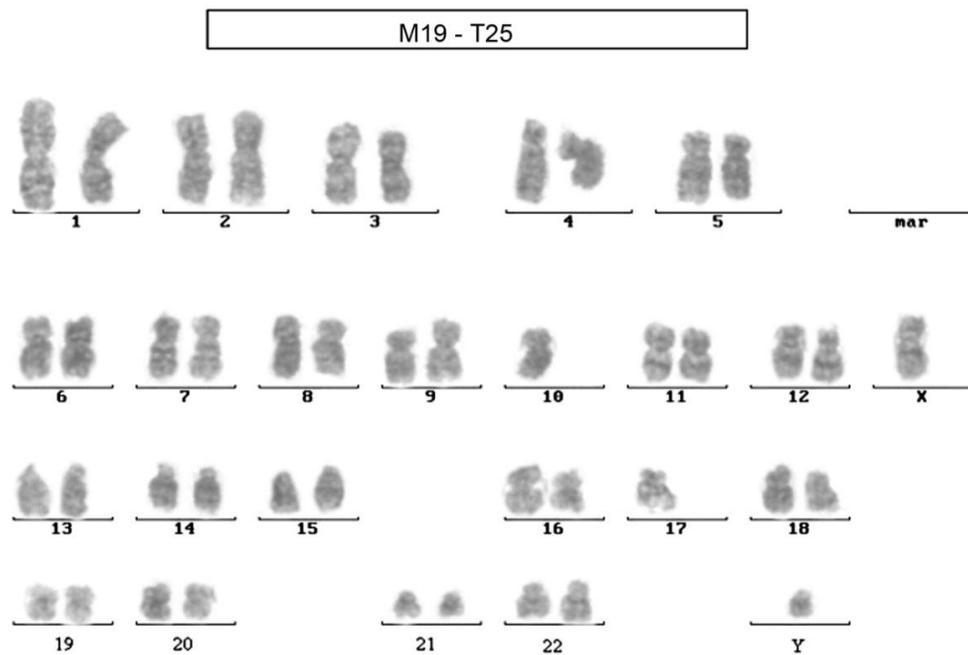


Figura 13 – Cariótipo 44,XY,+X,-10,-17



## 5.2 – Resultados finais

Tabela 3 – Dados clínicos, histopatológicos e resultados citogenéticos dos seis casos estudados

Caso	Sexo	Diagnóstico Histopatológico	NºModal (%) / Variação Cromossômica	Cariótipo Composto
T28	F	Osteossarcoma metastático	46 (28%) / 43-54	43~54,XX,-X[5],del(4)(q32)[5],add(13)(p13)[3],add(14)(p13)[4] / [cp 11]
T31	F	Sarcoma pouco diferenciado	46 (40%) / 43-47	43~47,XX,del(7)(p21)[4] / [cp 4]
T35	F	Osteomielite	46 (25%) / 38-47	38-47,XX,-X[13],-1[6],-2[4],-10[4],-11[4],add(12)(q24.3)[2],del(17)(p13)[3],-19[3],-20[4],-21[3],-22[4],+mar1[4],+mar2[5],+mar3[3] / [cp 19]
T40	M	Fibrossarcoma	46 (17%) / 40-47	40~47,XY,+X[5],-Y[10],-9[3],-17[4],-18[4],-19[7],-22[5] / [cp 16]
ACO 25	M	Tumor de células gigantes	46 (22%) / 37-50	37~50,XY,-Y[5],-1[3],-4[3],-11[4],-12[3],add(14)(p13)[7],-19[8] / [cp 14]
T25	M	Condrossarcoma	46 (38%) / 40-46	40~46,XY,del(6)(q22)[4],-9[3] / [cp 6]

## 6 – DISCUSSÃO

### Sarcoma pouco diferenciado e Osteossarcoma metastático

A maioria dos tumores sólidos exibe múltiplas anormalidades cromossômicas e são elas que levam a uma proliferação celular anormal (expansão clonal); a invasão dos tecidos circundantes e a metástases em locais distantes. O acúmulo de anomalias cromossômicas que, em sua grande maioria ocorre por um período de anos, é subjacente aos processos de tumorigênese (transição de células normais a câncer invasivo) e progressão tumoral (transição para um câncer metastático e quase sempre resistente ao tratamento) (34).

Análises citogenéticas de mais de 2000 casos revelaram numerosas alterações cromossômicas que podem ser amplamente classificadas em quatro categorias: 1- Translocações específicas que resultam em produtos de fusão oncogênica ou expressão ectópica de proto-oncogenes; 2- Amplificação de *loci*/genes genômicos específicos, como a amplificação de *MDMS/CDK4* em lipossarcomas bem diferenciados e desdiferenciados; 3- Amplificação de regiões bem definidas como cromossomos marcadores gigantes e/ou cromossomos em anel e; 4- Cariótipos complexos e heterogêneos com múltiplas anormalidades estruturais e numéricas, como no leiomiossarcoma, sarcoma pleomórfico e tumores de células gigantes (34).

As células de OS demonstram uma instabilidade cromossômica relativamente alta durante a cultura *in vitro*. Entretanto, elas possuem rápido crescimento e demonstram níveis de expressão genética consistentes, ao invés de alterações cromossômicas (41). Através de estudos antigos sobre ploidia, ficou evidente que os osteossarcomas têm uma significativa propensão pela aneuploidia (45), apesar de ganhos predominarem sobre as perdas cromossômicas e de haver mais eventos com baixos níveis de amplificação do que aneuploidias (41). Este é um forte indício da instabilidade genômica desses tumores (41).

A associação entre osteossarcoma e o gene *RB1* (localizado em 13q) é bem reconhecida, com pacientes afetados pelo retinoblastoma hereditário tendo 1000 chances a mais de possuir incidência de osteossarcoma, comparado com a população em geral. Adicionalmente, OS esporádicos mostram alterações no gene *RB1* em, aproximadamente, 70% dos casos. A perda de heterozigosidade (LOH) no locus do gene *RB1* no cromossomo 13 está presente em 60-70% dos tumores, enquanto rearranjos estruturais e mutações pontuais

ocorrem menos comumente. Recentemente, foi descrito que LOH no *locus RB1* sugere um pior fator prognóstico em osteossarcoma (45).

O gene *TP53* (localizado em 17p) está mutado em 22% dos OS centrais de alto grau, mas a presença de mutação não está associada com resultados clínicos, como em outros tumores. Foi descrito que as mutações em *TP53* estão correlacionadas com uma instabilidade genômica aumentada em OS (41). O gene p53 está localizado em 17p13, local frequentemente identificado como anormal em OS, por estudos citogenéticos e de CGH (45). O produto deste gene é um fator de transcrição que induz a transcrição de muitos genes que estão envolvidos no controle do ciclo celular e na apoptose (45). Alterações no *locus* de p53 pode ter um significado no prognóstico, porque essas mudanças podem indicar sensibilidade diminuída aos agentes quimioterápicos (45).

Alta frequência de perdas alélicas foi encontrada em 3q, 13q, 17p e 18q sugerindo que, em adição ao p53 (17p) e RB (13q), dois outros genes supressores tumorais podem existir em 3q e 18q (45). Mutações genéticas foram também identificadas para *CDKN2A*, *CDK4*, *MDM2* e *CHK2* e podem, em alguns casos, serem herdadas através da linhagem germinativa (41). *CDKN2A/p16* é um gene importante no controle da sinalização do ciclo celular; está localizado em 9p e foi demonstrado que está mutado em OS que não possuem mutações em *RB1*. Já o gene *CDK4* afeta negativamente a função de *RB1* e foi demonstrado que está amplificado em OS (41).

Algumas regiões aparentam ser mais afetadas do que outras (exemplo: amplificação de 6p, 12q13-15, 17p11.2-12, 19q12-13 (artigo 11), Xp11.2-21 e Xq12 (45)). Amplificação da região 17p11.2-12 foi descrita em 13-29% dos OS de alto grau, sugerindo a presença de um (*TP53*) ou mais oncogenes que podem contribuir para o desenvolvimento de OS (43). Amplificação de 1q21-22, 8q21-22 e 17p12 foram propostas como indicador de prognóstico desfavorável (43).

As bandas cromossômicas a seguir são as mais comumente envolvidas em anormalidades estruturais: 1p11-12, 1q11-12, 1q21-22, 11p14-15, 14p11-13, 14q24-qter, 15p11-13, 17p e 19q13. Ganhos no cromossomo 1 e perdas dos cromossomos 9, 10, 13 e 17, além da deleção de sequências de DNA de 2q, 6p, 8q e 10p (45) são as mais globalmente vistas. Regiões cromossômicas menos frequentemente envolvidas em OS são 13q14 (*locus* de *RB1*), 12p12-pter (*locus* de *KRAS*), 6q11-4 e 8p23 (43).

Alterações cariotípicas únicas são vistas em menos de 5% dos tumores e consistem em anomalias estruturais como add(11)(p15), add(14)(q32), t(2;13)(p13;q24), t(10;13)(q22;q21), t(2;4)(p23;q21) e inv(6)(p23q15) ou alterações numéricas (+17) (artigo11). Finalmente, translocação entre os cromossomos 11 e 22, idêntica à translocação do sarcoma de Ewing, foi demonstrada em OS de células pequenas (45).

No presente estudo, foram identificados dois casos de osteossarcoma. O caso T28 foi diagnosticado como um osteossarcoma metastático. Já o caso T31 é um sarcoma pouco diferenciado. Este último apresentou as seguintes alterações cromossômicas não clonais -X, -2,-5,-20,+mar1,+mar2,+mar3 e, apesar de poucas células analisadas, em 50% delas foi encontrada del(7)(p21). Nesta região está localizado o gene da interleucina 6 (*IL-6*), a qual é produzida pelos osteoblastos, regulando a produção óssea e o seu remodelamento. Dessa maneira, o crescimento ósseo fica descompensando, o que pode levar ao surgimento do tumor.

As alterações cromossômicas clonais encontradas no OS metastático foram: -X, del(4)(q32),add(13)(p13),add(14)(p13). Dentre as não clonais, as alterações -5 e -20 também foram encontradas no OS pouco diferenciado. Portanto, as alterações clonais encontradas no OS metastático e não encontradas no OS pouco diferenciado podem estar envolvidas com o potencial metastático desse tumor e merecem mais estudos, pelo fato de ainda não terem sido descritas em literatura.

### Tumor de células gigantes

O tumor de células gigantes (GCT) é considerado uma neoplasia benigna (80), mas é frequentemente uma lesão agressiva com uma tendência distinta para recorrência local e, raramente, para uma transformação maligna (81). Alguns são neoplasias verdadeiras, enquanto outros representam um heterogêneo grupo de reações reparativas ou reativas (49).

O tumor de células gigantes representa 5% de todos os tumores ósseos primários e ocorre tipicamente nas terceira e quarta décadas de vida (81). Mais de 80% dos GCT ocorre em pacientes com mais de 20 anos de idade, isto é, em indivíduos com esqueleto já maduro. Mais de 75% dos GCT estão situados perto da região articular final dos ossos tubulares longos e em suas respectivas epífises (80). O fêmur distal, a tíbia proximal e a fíbula são afetados em

metade dos casos (49). O comportamento clínico do GCT é imprevisível. Uma porcentagem variada irá retornar e alguns irão metastatizar (81).

A literatura citogenética indica que esses tumores não são geralmente caracterizados por alguma aberração cromossômica particular, com notável exceção das associações teloméricas (tas) ou fusões teloméricas (80). Associações teloméricas (tas) ou fusões teloméricas são achados citogenéticos comuns que implicam na iniciação da instabilidade cromossômica e tumorigênese (80). Os achados citogenéticos mais frequentes, já descritos, foram: fusões teloméricas clonais dos cromossomos 11 e 19 (80). Os telômeros mais comumente envolvidos, em ordem decrescente de frequência, foram: 11p, 15p, 19q, 21p, 18p, 13p e 20q (80). Aberrações específicas encontradas clonalmente em mais de um tumor incluíram: tas em 11p15, tas em 19q13 e del(11)(p11) (80).

Análises citogenéticas de tumores de células gigantes revelaram que 18p11 é uma das regiões envolvidas em rearranjos estruturais ou em associações teloméricas e em alguns tipos tumorais como adenocarcinomas, ependinomas, leucemia mieloide aguda e osteossarcomas (49). Em um caso, foi registrada a fusão telomérica clonal de 11p15 com 14pter e der(11;14)(p11;q10) (80). Em contraste com as raras aberrações numéricas, fusões teloméricas são um achado característico, ocorrendo em quase 75% desses tumores (80).

Aberrações numéricas e estruturais recorrentes são raras em GCT, além de cópias extras dos cromossomos 3 e 7 e perdas de 11, 13 e 22 (80). As alterações numéricas observadas mais frequentemente envolvem a deleção dos cromossomos 17 e 18. Entre as anomalias estruturais observadas, há um envolvimento preferencial dos cromossomos 6 e 10. Alguns casos descritos tiveram em comum del(10)(p13) (49). GCT apresenta alterações cromossômicas com múltiplas associações teloméricas envolvendo 4p, 8q, 11p, 14p, 17p, 14q, 19q e 20q e translocações envolvendo cromossomos 1, 2, 11p, 12, 18p, 13p, 15p e 19. Monossomias e trissomias envolvem, em sua maioria, os cromossomos 11, 18, 19, 20 e 22, em ordem decrescente de frequência (artigo 18). Outras alterações descritas foram del(6)(q25), del(7)(q33), del(10)(p13) e del(18)(p11.2) (49).

O presente estudo relatou um caso de tumor de células gigantes (caso ACO.25), o qual apresentou como principais alterações, -Y,-1,-4,-11,-12,add(14)(p13),-19. A monossomia do cromossomo 11 já foi anteriormente descrita (49) assim como associações teloméricas em 14p

(49;80). Portanto, devido a essa instabilidade genética telomérica altamente descrita em literatura, a alteração add(14)(p13) pode ser um forte indício de uma associação telomérica.

A identificação dessas deleções pode ser utilizada como base para abordagens moleculares que estabeleçam os genes afetados e reconheçam as consequências associadas a estas alterações genéticas, no desenvolvimento das lesões de células gigantes do osso (49).

### Osteomielite e Fibrossarcoma

A osteomielite (OM) é uma infecção causada por microorganismos que invadem e destroem progressivamente o osso no local da infecção. Em adultos, a OM ocorre usualmente após complicações decorrentes de fraturas e cirurgias (7).

Não é rara a presença de neoplasias ocorrendo como uma das complicações da osteomielite crônica, como nos casos de fibrossarcoma (18). Existe uma ligação entre as células neoplásicas e processos inflamatórios, onde a inflamação é reconhecida como um importante componente da carcinogênese, apesar dos mecanismos envolvidos não serem totalmente caracterizados. Em ambos os processos, estão presentes eventos envolvendo o complexo metabolismo utilizando o oxigênio (82).

O fibrossarcoma (FS) ósseo é um tumor maligno extremamente raro e não caracterizado geneticamente, que representa menos de 5% de todas as neoplasias malignas ósseas primárias (77).

Em fibrossarcoma congênito, t(12;15)(p13;q25) e trissomias dos cromossomos 8, 11, 17 e 20 são os achados mais comuns. Em FS de adultos, estudos cromossômicos demonstraram que aneuploidias e múltiplos rearranjos estruturais são mais comuns. Entretanto, nenhuma translocação recorrente específica foi identificada em fibrossarcomas (78).

A aberração mais frequente descrita por (77) foi o ganho da região cromossômica 22q. Análises de DNA *microarray* demonstraram que o gene do fator de crescimento beta derivado de plaquetas (PDGF-B), localizado em 22q12.3-q13.1, é o desequilíbrio genético mais comum deste tipo de tumor (77). Deleções foram mais frequentes do que adições. Amplificações de alto nível foram detectadas em 17p11.2, 17q24 e 22q11.2-q12 (77). Análises de *microarray* identificaram somente ganhos de cópias de números de genes afetando seis diferentes genes:

*PDGF-B* (22q12.3-q13.1), *FGR* (1p36.1-p36.2), *FES* (15q26.1), *MYC* (8q24.12-q24.13), *YES* (18p11.3) e *BCR* (22q11.21) (77).

O presente caso de fibrossarcoma (T40) é do mesmo paciente que contraiu anteriormente a osteomielite, descrito no caso T35. Os principais achados citogenéticos encontrados no caso de osteomielite descrito são: -X,-1,-2,-10,-11,add(12)(q24.3),del(17)(p13),-19,-20,-21,-22,+mar1,+mar2,+mar3. Os principais achados citogenéticos do caso de fibrossarcoma são +X,-Y,-9,-17,-18,-19,-22. As únicas alterações presentes em ambos os casos são -19 e -22, sugerindo que as alterações presentes no fibrossarcoma que estão ausentes na osteomielite, podem indicar o processo de progressão tumoral.

A add(12)(q24.3), encontrada na osteomielite, pode ter levado a disfunções do gene da ubiquitina-C, o qual é encontrado nessa região. A ubiquitina-C tem como função marcar proteínas mal formadas para que elas sejam degradadas pelo complexo ubiquitina-proteossoma. Se a ubiquitina-C não auxilia na destruição de proteínas defeituosas, essas vão se acumular na célula podendo levar a um desenvolvimento carcinogênico.

Já na região 17p13, deletada no caso da osteomielite descrita, localiza-se o gene TP53, o qual é um gene supressor tumoral já bem descrito em literatura. Este é o mais forte indício da transformação desta osteomielite em posterior fibrossarcoma.

Na osteomielite, pelo fato de haver infecções por microorganismos, o sistema imunológico ativa os linfócitos, monócitos e macrófagos, na tentativa de sanar a infecção, gerando a inflamação tecidual. Entretanto, a degeneração óssea já estava em andamento e o organismo, na tentativa de sanar o problema, inicia um processo de proliferação celular reparativa emergencial. Portanto, pode-se sugerir que a carcinogênese se inicia a partir da tentativa de reparar o tecido ósseo lesado pela infecção, o que pode ter ocorrido nesse caso da transformação da osteomielite (caso T35) em fibrossarcoma (caso T40).

### Condrossarcoma

Condrossarcomas são tumores ósseos malignos formadores de cartilagem (38) e representam um grupo de tumores de histopatologia e comportamento clínico variáveis (76). O condrossarcoma convencional representa, aproximadamente, 90% de todos os condrossarcomas (38).

A análise citogenética de condrossarcoma convencional demonstrou grande heterogeneidade em relação à complexidade cariotípica, com constante envolvimento de 1p36, 1p13-p22, 4, 5q13-q31, 6q22-qter, 9p22-pter, 10p, 10q24-qter, 11p13-pter, 11q25, 13q21-qter, 14q24-qter, 18p, 18q22-qter e 22q13 (perdas) e 7p13-pter (38), 8q24-qter (artigo 2), 12q15-qter, 19, 20pter-q11 (38), 20q12-qter (76) e 21q (ganhos) (38). Aneuploidia também está associada com o aumento do grau histológico do tumor (38).

A análise do presente caso de condrossarcoma (caso T25) revelou, com mais frequência, as seguintes alterações: del(6)(q22), como já descrito em literatura, e -9, que pode estar associada ao aumento do grau histológico tumoral, conforme anteriormente citado em literatura.

## 7 – CONCLUSÃO

Apesar de estudos genéticos sobre neoplasias ósseas estarem em constante desenvolvimento, as alterações genéticas recorrentes e específicas desses tumores ainda são pouco conhecidas, o que prejudica a determinação do prognóstico e, por consequência, a aplicação de um tratamento eficaz.

A análise cromossômica de biópsias por agulha fina aparenta ser um elegante método para obter cariótipos de sarcomas metastáticos ou recorrentes, assim como de tumores com diagnóstico histológico duvidoso, dos quais nenhum tecido fresco está disponível, como nos casos de pacientes encaminhados (83). E foi com esse objetivo que passamos a aproveitar esse tipo de amostra.

Descrevemos pontos de quebras cromossômicas que podem estar relacionados com genes envolvidos com o controle da proliferação celular irregular. Adicionalmente, constatamos aneuploidias importantes e algumas das quais ainda não foram descritas.

Relatamos também, um significativo caso onde uma osteomielite (infecção bacteriana óssea) se transformou em um fibrossarcoma, que é um tumor maligno. Discutimos as principais alterações dos dois diagnósticos e constatamos que as mutações encontradas na osteomielite já possuíam um forte indício de potencial maligno. Isto é devido à *add(12)(q24.3)*, região do gene da ubiquitina, responsável pelo bom funcionamento estrutural das proteínas, e à *del(17)(p13)* que contém o gene *TP53*, o qual é supressor tumoral. Juntas, essas alterações podem ter levado à malignização da lesão infecciosa.

Portanto, foi realizada pesquisa científica em uma área da Genética que, no Brasil, raramente se encontra em atividade, visto às dificuldades científicas, burocráticas e de obtenção de material.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) BARUFFI MR, VOLPON JB, CASARTELLI C: Osteoid osteomas with chromosome alterations involving 22q. **Cancer Genet. Cytogenet.** V.Jan 15, n. 124(2), p. 127-31. 2001.
- 2) SUDOYO, A.W.; HARDI. F. Cytogenetics in Solid Tumors: Lessons from the Philadelphia Chromosome. **Cytogenetics in Solid Tumors.** v. 43, 2011
- 3) KUMAR, V. COTRAN V., COLLINS, R.S., ET AL. **Patologia Estrutural e Funcional – Robbins.** ed. 6a, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., Brasil, p.1252, 2000.
- 4) INCA. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil <http://www.inca.org.br>, 2006.
- 5) INCA. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil <http://www.inca.org.br>, 2006.
- 6) BARUFFI, M.R., BAHIA, M.O., CARDOSO, P.C.S. ET AL. Genes e Câncer: Revisão. **Revista Paraense de Medicina.** v.16(2): p.52- 56, 2002 b.
- 7) WYNGAARDEN, J.B., SMITH, L.H., BENNET, J.C. **Cecil – Tratado de Medicina Interna. 19<sup>th</sup> edição.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro , R.J., Brasil, v.1, p.1038, 1993
- 8) ASENSI, V.; MONTES, A.H.; VALLE, E.; et al. The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis. **Nitric Oxide**, v.16: p.44-53, 2007
- 9) ALMEIDA E. Avaliação da atividade inflamatória na osteomielite crônica. *Lincx Serviços de Saúde*, disponível em: <mailto:drabetty@lincx.com.br?cc=siqueira@lincx.com.br>, 2007
- 10) YAMAGUCHI, C.K.; TSUNODA, A.; MATOS, P.G.; et al. Avaliação da osteomielite crônica pela tomografia computadorizada e ressonância magnética. *Revista de Reumatologia*. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/revista>, 2007
- 11) LAVIS, J.F.; GIGON, S.; MICHOT, C.; et al. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis of the mandible. A case report. **Arch Pediatr**, v. 9: p. 1252-1255, 2002
- 12) ALBUQUERQUE, M.A.P.; MELO, E.S.; JORGE W.A., et al. Osteomyelitis of the mandible associated with autosomal dominant osteopetrosis: A case report. **Oral Surg Med pathol Oral Radiol Endod**, v.102, p. 94-98, 2006
- 13) JOHNSTON, R;M.; MILLES, J.S. Sarcomas arising from chronic osteomyelitis sinuses. **J Bone Joint Surg Am.**, v.55(1), p:162-168, 1973
- 14) AKBARNIA, B.A.; WIRTH, C.R.; COLMAN, N. Fibrossarcoma arising from chronic osteomyelitis. **J Bone Joint Surg Am.**,v. 58-A(1), p.123-125
- 15) KENEDY, C.; STOKER, D.J. Case report: Malignant fibrous histiocitoma complicating chronic osteomyelitis. **Clin Radiol.**v.41(6):p. 435-4366, 1990
- 16) MCGREGORY, J.E.; PRITCHARD, D.J.; UNNI, K.K.; et al. Malignant lesions arising in chronic osteomyelitis. **Clin Osthop Relat Res**, v.362: p.181-189, 1999

- 17) PURI, A.; PARANIS, S.A.; UDUPA, K.V.; et al. Fibroblastic osteosarcoma arising in chronic osteomyelitis. **Clin Radiol**, v.58(2): p.170-172, 2003
- 18) YOSHIDA, C.; KOJIMA, H.; ISHIGAKI, T.; et al. Association of pyoderma gangrenosum and sterile osteomyelitis in a patient having myelodysplastic syndrome with der(1;7)(q10;q10). **Eur J Haematol**, v.72: p. 149-153, 2004
- 19) CAMELLA, C.; ROUJEAU, T.; DRAPÉ J.L. ; et al. Osteosarcoma presenting as a solitary focus of osteolysis in the calvarium. **Joint Bone Spine**, v. 73: p. 459-461, 2006
- 20) SAPIENZA, M.T., HIRONAKA, F., LIMA, A.L.L.M., et al. Avaliação de atividade inflamatória na osteomielite crônica. Contribuição da cintilografia com anticorpos policlonais. **Rev. Assoc. Med. Brás**, São Paulo, vol.46(2). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-4230200000200004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-4230200000200004). 2005
- 21) CARAWAY, N.P.; FANNING, C.V.; STEWART, J.M.; et al. Coccidioidomycosis osteomyelitis masquerading as a bone tumor. **Acta Cytol**, v. 47: p.777-782, 2003
- 22) NOWELL, P.C. and HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**. v. 132, p. 1497, 1960.
- 23) KONOPKA, J.B., WATANABE, S.M., SINGER, J.W., et al. Cell lines and clinical isolates derived from Ph-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl protein with a common structural alteration. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 82: p. 1810-1814, 1985.
- 24) SWEENEY C, FAMBROUGH D, HUARD C, et al. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. **J Biol Chem**. v. 276(25), p. 22685-22698, 2001.
- 25) ZWICK, E.; BANGE, J.; ULLRICH, A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. **Endocr Relat Cancer**. 2001 Sep;8(3):161-73. Review.
- 26) LONGATTI P, COMOGLIO PM, BARDELLA. Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets: the model of the met oncogene. **Curr Drug Targets**, v. 2(1), 4p. 1-45, 2001.
- 27) LODISH H, BERCK A, ZIPURSKY SL, MATSUDARIA P, BALTIMORE D, DORNELL J. **Molecular Cell Biology**, 4<sup>th</sup> edition. New York; w.h. Freeman and Company 1055-1081, 2000.
- 28) NISHIO, J.; CENTRY, J.D.; NEFF, J.R.; et al. Monoallelic deletion of the p53 gene through chromosomal translocation in a small cell osteosarcoma. **Virchows Arch**, v. 448(6): p. 852-856, 2006.
- 29) SANDBERG, A.A.; MELONI-EHRIG, A.M. Cytogenetic and genetics of human cancer: methods and accomplishments. **Cancer Genet Cytogenet**. v.203: p. 102-126, 2010.
- 30) DORFMAN HD, and CZERNIAK B: General Considerations. In: Bone Tumors. **Mosby, Inc., St Louis**, 1998.
- 31) DE VITA JR VT, HELLMAN S, ROSENBERG SA: Cancer principles & practice of oncology. **Lippincott-Raven, Inc New York**, 1997.

- 32) SCHAJOWICZ F. Tumores de huesos y articulaciones: malignos. In: Schajowicz F. Tumores y lesiones pseudotumorales de huesos y articulaciones. **Buenos Aires: Panamericana**; 1982. p.72-119.
- 33) MALAWER MM, LINK MP, DONALDSON SS: Sarcomas of bone. In: Cancer Principles & practice of oncology. **Lippincott-Raven, Inc Philadelphia**, 1997.
- 34) NANJANGUD, G.; AMARILLO, I.; RAO, P.N. Solid Tumor Cytogenetics: Current Perspectives. **Clin Lab Med**, v.31, p. 785-811, 2011
- 35) LAZAR, A; ABRUZZO, L.V.; POLLOCK, R.E; LEE, S; CZERNIAK, B. Chromosomal Translocations in Sarcomas. **Arch Patol Lab Med**. v.130, 2006
- 36) SAKAI Jr, N.; ABE, K.T.; FORMIGLI, L.M.; PEREIRA, M.F.; OLIVEIRA, M.D.V.; CORNELIO, D.A.; FERREIRA, A.L.R.; KALIL, R.K. Cytogenetic findings in 14 benign cartilaginous neoplasms. **Cancer Genetics**. v. 204: p. 180-186, 2011
- 37) SANDBERG, A.A.; BRIDGE, J.A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: chondrosarcoma and other cartilaginous neoplasms. **Cancer Genet Cytogenet**. v.143: p. 1-31, 2003
- 38) BOUVÉE, J.V.W.G.; CLETON-JASSEN, A.M.; TARMINAU, A.H.M.; et al. Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment. **Lancet Oncol**, v.6: p.599-607, 2005
- 39) TEREK, R.M. Recent advances in the basic science of chondrosarcoma. **Orthop Clin North Am**. 2006 Jan;37(1):9-14. Review
- 40) LICHTENSTEIN L. Bone Tumors. **St Louis, C.V. Mosby Co**, cap16, p.461, 1975
- 41) CLETON-JANSEN, A.M.; BUERGER, H.; HOGENDOORN. P.C.W. Central high-grade osteosarcoma of bone: diagnostic and genetic considerations. **Current Diagnostic Pathology**. V.11, p. 390-399, 2005
- 42) STOCK, C.; KARGER, L.; FINK, F.M; et al. Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas. **Genes Chromosomes Cancer**. v. 28(3): p.329-336. 2000
- 43) SANDBERG, A.A.; BRIDGE, J.A. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. **Cancer Genet Cytogenet**. v.145: p. 1-30, 2003
- 44) THÉOLEYRE, S.; MORI, K.; CHERRIER, B.; et al. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes infiltrating osteolytic tumors: use as a possible therapeutic approach of osteosarcoma. **BMC Cancer**, v.5: p.1-10, 2005
- 45) RAGLAND, B.D.; BELL, W.C.; LOPEZ, R.R.; SIEGAL, G.P. Cytogenetics and Molecular Biology of Osteosarcoma. **Laboratory Investigation**. v. 82, p. 365-373, 2002

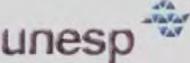
- 46) SADIKOVIC B; THORNER P; CHILTON-MACNEILL S, ET AL. Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. **BMC** 2010 may,13;10:202
- 47) WUNDER JS, BULL SB, ANELIUNAS V, LEE PD, DAVIS AM, BEAUCHAMP CP, et al. MDR1 Gene expression and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. **J Clin Oncol.** 2000;18:2685-94
  
- 48) KUBISTA B, EROVIC BM, KLINGER H, SULZBACHER I, TRIEB K. CD9 expression is not a prognostic factor in human osteosarcoma. **Cancer Lett.** 2004;209:105-10
- 49) MANKIN, M.; ATHANASOU, N. Osteofibrous dysplasia and adamantinoma: correlation of proto-oncogene, product and matrix protein expression. **Human Pathol**, v. 35(1): p.69-74, 2004
- 50) HUVOS AG. Osteogenic sarcoma. In: Huvos AG. Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis. **2nd.ed. Philadelphia: Saunders;** 1991. p.85-155
- 51) VARAN A, YAZICI N, AKSOY C, GEDIKOLU G, YALCIN B, AKYUZ C, et al. Treatment results of pediatric osteosarcoma: twenty-year experience. **J Pediatr Orthop.** 2007;27:241-6.
- 52) PETRILLI AS. Experiência brasileira em osteossarcoma: fatores prognósticos e impacto na sobrevida [Thesis – Livre-docência]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 2005
- 53) TAYLOR WF, IVINS JC, PRITCHARD DJ, DAHLIN DC, GILCHRIST GS, EDMONSON JH. Trends and variability in survival among patients with osteosarcoma: a 7-year update. **Mayo Clin Proc.** 1985;2:91-104.
- 54) KLEIN MJ, KENAM S, LEWIS MN. Osteossarcoma considerações clínicas e patológicas. **Clin Ortop Am Norte.** 1989;20:329-48
- 55) URIBE-BOTERO G, RUSSELL WO, SUTOW WW, MARTIN RG. Primary osteosarcoma of bone. Clinicopathologic investigation of 243 cases, with necropsy studies in 54. **Am J Clin Pathol.** 1977;67:427-35
- 56) MARINA N, GEBHARDT M, TEOT L, GORLICK R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. **Oncologist.** 2004;9:422-41
- 57) BACCI G, LONGHI A, VERSARI M, MERCURI M, BRICCOLI A, PICCI P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. **Cancer.** 2006b;106:1154-61.
- 58) PETRILLI AS, DE CAMARGO B, ODOE FILHO V, BRUNIERA P, BRUNETTO AL, JESUS-GARCIA R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. **J Clin Oncol.** 2006;24:1161-8
- 59) SIMON R. Clinical prognostic factors in osteosarcoma. **Cancer Treat Rep.** 1978;62:193-7.
- 60) SCHAJOWICS F. Histological typing of bone. **2nd ed. Berlin: Springer;** 1993.

- 61) UNI KK, KNUUTILA S. Parosteal osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. **Lyon: IARC**; 2002. p.279-81
- 62) DAMRON TA, WARD WG, STEWART A. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. **Clin Orthop**. 2007; 459:40-7
- 63) ECKHARDT S. DIAGNÓSTICO, ESTADIAMENTO E PRINCÍPIO DE TRATAMENTO. IN: HOSSFELD DK, SHERMAN CD, LOVE RR, BOSH FX. **Manual de oncologia clínica. 2.ed.** São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo; 1993. p.93-110
- 64) ENNEKING WF. Musculoskeletal tumor surgery. New York: **Churchill Livingstone**; 1983. v.1.
- 65) HEARE, M.M.; HEARE, T.C.; GILLEPSY, T. Diagnostic imaging of pelvic and chest wall trauma. 3rd. **Radiol Clin North Am**. 1989 Sep;27(5):873-89
- 66) DORFMAN HD, CZERNIAK B, KOTZ R, VANEL D, PARK YK, UNNI KK. WHO classification of tumors of bone: introduction. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. **Lyon: IARC**; 2002. p.225-32
- 67) GAJEWSKA J, ABROSZKIEWICZ J, RYCHLOWSKA-PRUSZYNSKA M, LASKOWSKA-KLITAT. [Markers of bone formation in children with osteosarcoma]. **Med Wieku Rozwoj**. 2004;8:235-43
- 68) BRAMER JÁ, ABUDU AA, TILLMAN RM, CARTER SR, SUMATHI VP, GRIMER RJ. Pre- and post-chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localised osteosarcoma. **Eur J Cancer**. 2005;41:2846-52
- 69) HUGO Gene Nomenclature Committee. [updated March 2007]; cited 26 Apr 2008. Available from: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>
- 70) RECH, A.; CASTRO, C.G.JR.; MATTEI, J.; GREGIANIN, L, DI LEONE, L.; DAVID, A.; RIVERO, L.F.; TARRAGO, R.; ABREU, A. BRUNETTO, A.L. Clinical features in osteosarcoma and prognostic implications. **J Pediatr (Rio J)**. 2004 Jan-Feb;80(1):65-70. Portuguese
- 71) TRIEB, K.; KOTZ, K. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. *Int. J. Biohem Cell Biol.*, 2001. Jan; 33(1):11-7
- 72) GLEICH LL, SALAMONE FN. Molecular genetics of head and neck cancer. **Cancer Control**. 2002;9:369-78
- 73) BARUFFI MR, BARBIERI-NETO J, PINA-NETO et al: Distinct nonrandom patterns of chromosomal deletions in Giant-cell lesions of bone. **Genet. Mol. Biology**, v. 25,n. 3, p. 265-270, 2002a
- 74) ALBANO, L.M.J. Importância da genética no serviço público: relato da extinção de um setor de genética no Município de São Paulo, Brasil. **Pan Am J Public Health**, v.7(1): p.29-34, 2000
- 75) LADANYI M, CHA C, LEWIS R, JHANWAR SC, HUVOS AG, HEALEY JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. **Cancer Res**. 1993;53:16-8
- 76) SANDBERG, A.A. Genetics of chondrosarcoma and related tumors. **Current Opinion in Oncology**. v.16, p. 342-354, 2004

- 77) HATTINGER, C.M.; TARKKANEN, M; BENINI, S.; PASELLO, M.; STOICO, G.; BACCHINI, P.; KNUUTILA, S.; SCOTLANDI, K.; PICCI, P.; SERRA, M. Genetic analysis of fibrosarcoma of bone, a rare tumor entity closely related to osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone. **Eur. J. Cell Biol.**, v.83, p. 483-491, 2004
- 78) SAWYER, J.R.; BINZ, R.L.; GILLILAND, J.C.; NICHOLAS, R.W.; THOMAS, J.R. A novel reciprocal (10;17)(p11.2;q23) in myxoid fibrosarcoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.124, p. 144-146, 2001
- 79) WALTHER, C.; DOMANSKI, H.A.; STEYERN, F.V.; MANDAHL, N.; MERTENS, F. Chromosome banding analysis of cells from fine-needle aspiration biopsy samples from soft tissue and bone tumors: is it clinically meaningful? **Cancer Genetics**. v. 204: p. 203-206, 2011
- 80) SAWYER, J.R.; GOOSEN, L.S.; BINZ R.L.; SWANSON, C.M.; NICHOLAS, R.W. Evidence for telomeric fusions as a mechanism for recurring structural aberrations for chromosome 11 in giant cell tumor of bone. **Cancer genetics and Cytogenetics**, v.159, p. 32-36, 2005
- 81) BRIDGE, J.A.; NEFF, J.R.; BHATIA, P.S.; SANGER, W.G.; MURPHEY, M.D. Cytogenetics findings and biologic behavior of giant cell tumors of bone. **Cancer**, v.65, p. 2697-2703, 1990
- 82) ARIAS J-I; ALLER, M-A; ARIAS J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. **Mol Cancer**, v.16: p.06-29, 2007
- 83) MOLENAAR, W.M.; BERG, E. van den; DOLFIN, A.C.; ZORGDRAGER, H.; HOEKSTRA, H.J. Cytogenetics of fine needle aspiration biopsies of sarcomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v.84, p. 27-31, 1995
- 84) BOURGOUIN, P.M.; TAMPIERI, D.; ROBITAILLE, Y.; ROBERT, F.; BERGERON, D.; DEL CARPIO, R.; MELANCON, D.; ETHIER, R. Low-grade myxoid chondrosarcoma of the base of the skull: CT, MR and histopathology. **J Comput Assist Tomogr** 1992;16:268-73

## 9- ANEXOS

## Anexo 1 – Parecer do CEP do Hospital das Clínicas da UNESP – Botucatu/SP

 **Universidade Estadual Paulista**  
**Faculdade de Medicina de Botucatu** 

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

---

Botucatu, 05 de maio de 2008 Of. 144/08-CEP

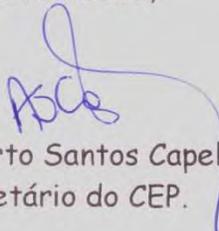
Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi  
Departamento de Genética do  
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezado Dr. Marcelo,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "**Estudo genético em lesões pseudotumorais e pré-neoplásicas e sua relação com sarcomas ósseos**", a ser conduzido por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05 de maio de 2008, não sendo necessário seu envio à CONEP, haja vista cumprir a Resolução 340/2004 de Genética Humana.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.

**Anexo 2 – Parecer do CEP do Hospital Amaral Carvalho – Jaú/SP**

UNESP  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
JULIO DE MESQUITA FILHO

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**Fundação Hospital Amaral Carvalho**

F U N D A Ç Ã O      Rua Dr. Miranda Junior, 16, Jardim Alvorada – CEP 17.210-300 – Jaú / SP - ☎ (014) 3602-1194 – Ramal - 1552.

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA

**Parecer CEPFHAC – 074/11 - Recurso.**

**Projeto de Pesquisa:**  
"Estudo Genético em Lesões Pseudotumorais e Pré-neoplásicas e Sua Relação com Sarcomas Ósseos"

**Documentos Analisados:**  
✓ Recurso datado de 25 de agosto de 2011, referente ao Parecer CEPFHAC nº. 74/11, datado de 17 de junho de 2011.

**Responsável pelo Estudo:**

Coordenador do Estudo: Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi - responsável pelo GECAN  
Investigador Principal no HAC: Dr. Pedro Luis Budin - médico ortopedista  
Colaboração: Dra. Ana Lúcia Coradazzi – Médica hematologista oncologista clínico; Dr. José Getúlio Martins Segalla – Médico oncologista clínico; Dr. Gustavo Garcia de Aruda Falcão – Médico ortopedista.

Trata-se de recurso ao Parecer CEPFHAC nº. 74/11, datado de 17 de junho de 2011, onde os documentos analisados foram considerado aprovados com recomendação, sendo esta a manifestação do pesquisador responsável quanto a sugestão de CEP da alteração do título da pesquisa para: "Estudo *Citogenético* em Lesões Pseudotumorais e Pré-neoplásicas e Sua Relação com Sarcomas Ósseos".

O pesquisador informa que: "A justificativa para inicialmente ser colocado o termo Genética, se deve pelo motivo de que a citogenética abrange alguns procedimentos científicos utilizados dentro da Ciência Genética, sendo que os achados preliminares destas metodologias científicas as vezes devem ser confirmados, ou melhores estudados através de outras técnicas que se fizerem necessárias para que haja a validação dos achados citogenéticos iniciais, assim achamos mais indicado utilizar o termo mais abrangente "Genético", que engloba todas as possíveis metodologias a serem empregadas se necessário".

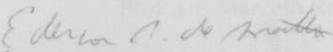
Por trata-se de simples sugestão, entendemos que não subsiste qualquer entrave ético que possa impossibilitar o início da pesquisa.

**Diante do exposto, manifestamo-nos pela aprovação sem restrições dos documentos avaliados.**

Informamos que os referidos documentos são rubricados pelo colaborador do CEPFHAC, Ricardo Augusto Sartori, e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Jaú, 29 de agosto de 2011.

  
**Dr. Ederson Roberto de Mattos**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Fundação Hospital Amaral Carvalho