

MIRIAM LACERDA BARBOSA

ESTUDO CITOGENÉTICO EM LESÕES EXPANSIVAS MAMÁRIAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglênir João Cavalli

Co-orientadora: Profª. Drª. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

CURITIBA
2003

MIRIAM LACERDA BARBOSA

ESTUDO CITOGENÉTICO EM LESÕES EXPANSIVAS MAMÁRIAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

**CURITIBA
2003**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Barbosa, Miriam Lacerda

Estudo citogenético em lesões expansivas mamárias / Miriam Lacerda Barbosa. – Curitiba, 2003.

x, 100f. : il ; 30cm.

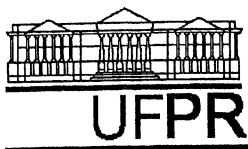
Orientador: Iglénir João Cavalli

- Co-orientadora: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas.

1. Genética 2. Citogenética 3. Mamas - Câncer I.Título II.
Cavalli, Iglénir João III. Ribeiro, Enilze Maria de Souza IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20.ed.) 575.1



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética

P A R E C E R

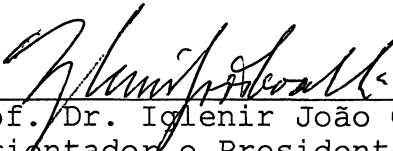
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **MIRIAM LACERDA BARBOSA**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito " **A** ".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

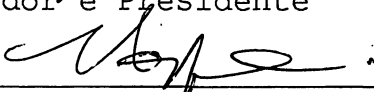
Curitiba, 29 de agosto de 2003.

Banca Examinadora:

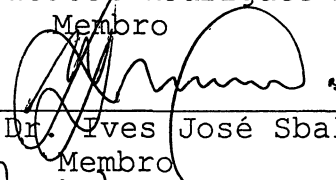




Prof. Dr. Iolenir João Cavalli
Orientador e Presidente

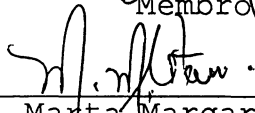


Profa. Dra. Neiva Isabel Rodrigues Magdalena
Membro



Prof. Dr. Yves José Sbalqueiro
Membro

Visto:



Profa. Dra. Marta Margarete Cestari
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

Aos pacientes,

Caminhos

“Percorremos muitos
e longos caminhos
caminhos de possibilidades,
de conquistas, de fragilidade...

Sempre buscamos
o inexplicável, o incompreendido...
muitos desses caminhos
nos levam ao mundo dos sonhos
dos devaneios, do inesquecível.

Precisamos percorrê-los
e vivê-los com intensidade
o que vamos encontrar?
não importa
o que importa é que caminhemos sempre

A cada caminho
vivemos e crescemos
sonhamos e acreditamos
sofremos e aprendemos

Nos tornamos fortes, capazes
dignos e merecedores.

Nos tornamos verdadeiramente
Especiais.”

(Conceição / Copyright © 1999 *Laur@'s Poesias®)

Aos meus pais,
Ruy e Leni,
ao meu esposo
José Renato e
a Deus pela vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof^o. Dr^o Iglenir J. Cavalli e Prf^a. Dr^a Enilze M. S. F. Ribeiro pela dedicação, amizade, paciência e toda contribuição para minha formação científica e confiança ao me aceitarem na realização deste trabalho.

À Dr^a Neiva I. R. Magdalena minha eterna gratidão pelo profissionalismo, grande amizade e incentivo durante todo o tempo de realização deste trabalho.

À Coordenação e todos os professores do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da UFPR pelos conhecimentos transmitidos com eficiência e consideração no momento mais difícil pelo qual passei.

Aos funcionários do Departamento de Genética da UFPR por terem sido atenciosos e prestativos em todos os momentos em que foram solicitados.

Às equipes dos Laboratórios de Citogenética Humana e Citogenética Animal do Departamento de Genética da UFPR pelo ótimo convívio, tanto pessoal quanto profissional, durante a realização deste trabalho.

Às equipes de médicos e auxiliares dos Serviços de Oncologia do Hospital de Clínicas da UFPR e do Hospital Nossa Senhora das Graças sempre prestativos nos momentos em que foram solicitados.

Às amigas Déborah A. Cornélio e Guaracira F. da Silva pela orientação no início da parte prática deste trabalho, ao ensinarem toda a técnica de obtenção cromossômica em tumores de mama.

Às amigas Lismeri Wuicik e Virgínia Coser que me ajudaram na obtenção de grande parte dos periódicos utilizados no levantamento bibliográfico.

Aos amigos José Luiz Leite e Neide Iara S. S. de Oliveira pela valiosa ajuda no trabalho fotográfico dos cariótipos apresentados.

A todos os colegas do Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas da UFPR em nome do Drº Mitsuru Miyaki e, em especial, a Unidade de Genética Médica pelo apoio incondicional durante todo o período que cursei o Mestrado.

A todas as colegas do Laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas da UFPR pelo constante apoio e por estarem sempre prontas a ajudar.

A toda minha família, em especial meus pais, minhas irmãs, meu irmão, todos os sobrinhos e meu marido, pelo amor incondicional, companheirismo, cumplicidade, dedicação, pela presença constante de todos em minha vida e compreensão quando precisei estar ausente.

A todos os meus amigos, obrigada pelo carinho, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis, pelas risadas e lágrimas que damos juntos, pelos cutucões quando preciso e por descobrir que com vocês minha vida tem um sabor diferente...

“Aqueles que passam por nós,
não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”

(Antoine de Saint-Exupery)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I INTRODUÇÃO.....	1
1-HISTÓRICO.....	1
2- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE CÂNCER DE MAMA.....	3
3- ANATOMIA E HISTOPATOLOGIA DA MAMA.....	5
3.1- ANATOMIA.....	5
3.2- ANOMALIAS CONGÊNITAS DA MAMA.....	7
3.3- INFLAMAÇÃO DA MAMA.....	8
3.4- HISTOPATOLOGIA DA DOENÇA FIBROCÍSTICA.....	9
3.5- HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES BENIGNOS DA MAMA..	10
3.6- HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA..	12
3.7- TNM – CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MALIGNOS.....	14
3.8- G – GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	14
4- CITOGENÉTICA DOS TUMORES BENIGNOS DA MAMA.....	15
5- CITOGENÉTICA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA.....	20
II OBJETIVOS.....	32
III MATERIAL E MÉTODOS.....	33
1- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	33
2- COLETA DO MATERIAL.....	34
3- CULTURA CELULAR.....	34
3.1- Dissociação do Material e Desagregação Enzimática.....	35
3.2- Método e Colheita da Cultura.....	35
4- BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO.....	37
5- ANÁLISE CROMOSSÔMICA E FOTOMICROGRAFIA.....	37
6- MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	38
7- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39

IV RESULTADOS	40
1- LESÕES BENIGNAS DA MAMA.....	40
Síntese dos Resultados das Lesões Benignas da Mama.....	51
2- TUMORES MALIGNOS DA MAMA.....	55
Síntese dos Resultados dos Tumores Malignos da Mama.....	64
V DISCUSSÃO	68
1- Aberrações Cromossômicas Clonais Numéricas e Estruturais	
Observadas nas Lesões Benignas da Mama.....	68
2- Aberrações Cromossômicas Clonais Numéricas e Estruturais	
Observadas nos Tumores Malignos da Mama.....	73
VI CONCLUSÕES	80
VII REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estruturas Anatômicas e Principais Lesões Benignas e Malignas da Mama.....	6
Figura 02: Cariótipos Parciais Mostrando a del(17)(p12) Observadas no Caso 1....	41
Figura 03: Metáfase 49,XX,+15,+16,+18 Observada no Caso 2.....	43
Figura 04: Metáfase 47,XX,+21 Observada no Caso 3.....	45
Figura 05: Metáfase 45,XX,-16,-17,+18,-19,+20 Observada no Caso 4.....	47
Figura 06: Metáfase 61,XX,+1,+3,+4,+6,+8,+9,+11,+16,+17,+18,+19,+20,+21, +mar1x2 Observada no Caso 5.....	50
Figura 07: Cromossomos Marcadores Observados no Caso 5.....	50
Figura 08: Gráfico da Distribuição Cromossômica das Aberrações Clonais Observadas nas Lesões Benignas da Mama.....	54
Figura 09: Metáfase 46,XX,-7,-12,+21,+22 Observada no Caso 6.....	56
Figura 10: Metáfase 46,XX, del(11)(q23) , del(17)(p12) Observada no Caso 7.....	58
Figura 11: Cariótipos Parciais Mostrando a del(11)(q23) e a del(17)(p12) Observadas no Caso 7.....	58
Figura 12: Metáfase 45,X,-X,+16,-20 Observada no Caso 8.....	60
Figura 13: Metáfase 45,X,-X,-8,-10,+21,+22 Observada no Caso 9.....	61
Figura 14: Metáfase 46,XX,-19,+21 Observada no Caso 10.....	63
Figura 15: Cariótipos Parciais Mostrando a del(2)(p23) e a del(11)(q23) Observadas no Caso 10.....	63
Figura 16: Gráfico da Distribuição Cromossômica das Aberrações Clonais Observadas nos Tumores Malignos da Mama.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Idade das Pacientes, Características Histológicas e Clínicas das Lesões Benignas.....	33
TABELA 2- Idade das Pacientes, Características Histológicas e Clínicas dos Tumores Malignos.....	33
TABELA 3- Idade das Pacientes, Tipo Histológico e Resumo dos Dados Citogenéticos das Cinco Lesões Benignas da Mama.....	52
TABELA 4- Aberrações Cromossômicas Clonais Numéricas e Estruturais Observadas nas Lesões Benignas da Mama.....	53
TABELA 5- Idade das Pacientes, Tipo Histológico e Resumo dos Dados Citogenéticos dos Cinco Tumores Malignos da Mama.....	65
TABELA 6- Aberrações Cromossômicas Clonais Numéricas e Estruturais Observadas nos Tumores Malignos da Mama.....	66

RESUMO

Com o principal objetivo de contribuir para o conhecimento citogenético das lesões benignas e malignas da mama humana, foram analisadas citogeneticamente amostras de cinco lesões benignas da mama e cinco carcinomas mamários. As amostras de tecidos de lesões mamárias foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e no Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba, PR) e foram processadas no laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, utilizando-se a técnica de desagregação enzimática pela colagenase, seguida de cultura celular a curto prazo. Nas cinco lesões benignas mamárias foram analisadas 111 metáfases com bandeamento GTG ($\bar{x}=22,2\pm 3,1$), das quais 31 (27,9%) apresentaram cariótipos normais e 80 (72,1%) possuíam aberrações cromossômicas. Destas, 67 (83,7%) eram clonais e 13 (16,3%) não clonais. Das 333 aberrações clonais observadas (excluindo-se os cromossomos marcadores), as numéricas (331) foram mais freqüentes do que as estruturais (2), e entre as numéricas as trissomias (280) foram mais comuns que as monossomias (51). As aberrações clonais foram observadas mais freqüentemente nos cromossomos 21 (11,1%), 16 (8,4%), 19 (8,1%), 17 (7,5%), 20 (7,2%) e 18 (6,9%). Nos cinco carcinomas mamários foram analisadas 126 metáfases com bandeamento GTG ($\bar{x}=25,2\pm 17,4$), das quais 26 (20,6%) apresentaram cariótipos normais e 100 (79,4%) possuíam aberrações cromossômicas. Destas, 84 (84%) eram clonais e 16 (16%) não clonais. Das 136 aberrações clonais, as numéricas (106) foram muito mais freqüentes do que as estruturais (30) e entre as numéricas as trissomias (78) foram mais comuns que as monossomias (28). Os cromossomos mais freqüentemente envolvidos nas aberrações clonais foram: 21 (16,2%), X (15,4%), 8, 11 (9,6%) e 17 (8,8%). Comparando as aberrações cromossômicas clonais observadas nas lesões benignas e nos tumores malignos mamários, nas primeiras constatou-se em média $74,6\pm 125,8$ aberrações por lesão e nos últimos, uma média igual a $27,2\pm 22,7$ aberrações por tumor. Verificou-se também que as aberrações clonais numéricas e estruturais não se distribuem igualmente nos dois tipos de lesões ($\chi^2_1=69,9$; $p<0,001$) sendo a diferença devida principalmente às aberrações estruturais, as quais foram mais freqüentes nos tumores malignos da mama. O mesmo foi observado em relação à distribuição das monossomias e das trissomias ($\chi^2_1=6,6$; $p<0,05$), as quais foram mais freqüentes nas lesões benignas da mama. Nas lesões benignas e nos tumores mamários estudados verificou-se que as aberrações cromossômicas clonais não ocorreram ao acaso nos diferentes cromossomos do genoma e que os pontos de quebras 2p23; 11q23; 17p12 e 17q21-23, identificados neste trabalho, coincidem com a localização de genes relacionados ao câncer de mama como o *ETS1* e *BRCATA* em 11q23; *ATM* em 11q22.3-23; *ERBB2* em 17q21.1; *BRCA1* em 17q21; *NME1* em 17q21-22 e *BCAS3* em 17q23.

ABSTRACT

With the main objective of contributing for the cytogenetic knowledge of the benign and malignant lesions of the human breast, samples of five benign lesions and five mammary carcinomas of the breast were analyzed cytogenetically. The samples were collected at *the Hospital de Clínicas* of the *Universidade Federal do Paraná* and *Hospital Nossa Senhora das Graças* (both in *Curitiba, Paraná, Brazil*) and they were processed at the *Laboratório de Citogenética Humana* of the *Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná*, being used the technique of enzymatic disaggregation by the collagenase, following by short-term cell culture. In the five benign lesions of the breast, 111 metaphases were analyzed with GTG-banding ($x=22.2\pm 3.1$), 31 (27.9%) of these presented normal karyotypes and 80 (72.1%) chromosomal alterations. Of these, 67 (83.7%) were clonal and 13 (16.3%) were non-clonal. Of the 333 clonal chromosomal alterations observed (being excluded the markers chromosomes), the numerical changes (331) were more frequent than the structural changes (2), and among the numeric ones the trisomies (280) were more common than the monosomies (51). The clonal chromosome alterations were more frequently observed in the chromosomes 21 (11.1%), 16 (8.4%), 19 (8.1%), 17 (7.5%), 20 (7.2%) and 18 (6.9%). In the five mammary carcinomas 126 metaphases were analyzed with GTG-banding ($x=25.2\pm 17.4$), 26 (20.6%) of these presented normal karyotypes and 100 (79.4%) chromosomal alterations. Of these, 84 (84%) were clonal and 16 (16%) were non-clonal. Of the 136 clonal chromosomal alterations observed, the numerical changes (106) were more frequent than the structural changes (30), and among the numeric ones the trisomies (78) were more common than the monosomies (28). The chromosomes more frequently involved in the clonal alterations were: 21 (16.2%), X (15.4%), 8, 11 (9.6%) and 17 (8.8%). Comparing the clonal chromosomal alterations observed in the benign lesions of the breast and in the mammary malignant tumors, in the first ones it was verified an average 74.6 ± 125.8 abnormalities by lesion and in the last ones, an average 27.2 ± 22.7 abnormalities by tumor. It was also verified that clonal numerical and structural alterations were not distributed equally in the two types of lesions ($\chi^2_{1}=69.9$; $p<0.001$) being the difference owed mainly to the structural alterations, which were more frequent in malignant tumors. The same was observed in relation to the distribution of the monosomies and trisomies ($\chi^2_{1}=6.6$; $p<0.05$), which were more frequent in benign lesions of the breast. In the benign lesions and malignant tumors studied it was verified that the clonal chromosome abnormalities did not happen at random in the different chromosomes of the genome and that the breakpoints 2p23; 11q23; 17p12 and 17q21-23, identified in this study coincide with the location of genes related to the breast cancer as *ETS1* and *BRCATA* in 11q23; *ATM* in 11q22.3-23; *ERBB2* in 17q21.1; *BRCA1* in 17q21; *NME1* in 17q21-22 e *BCAS3* in 17q23.

I - INTRODUÇÃO

1- HISTÓRICO

Os primeiros estudos relevantes sobre a origem e o desenvolvimento do câncer datam de 1890, quando o patologista alemão DAVID VON HANSEMANN (citado por HEIM e MITELMAN, 1995) estudando biópsias de carcinomas, observou alta frequência de irregularidades nucleares e mitóticas nos tecidos malignos, sugerindo a importância das mesmas para o diagnóstico do câncer. Em 1914 THEODOR BOVERI (citado por HEIM e MITELMAN, 1995) postulou a Teoria Mutacional do Câncer onde, as aberrações cromossômicas seriam as responsáveis pelo comportamento maligno das células cancerosas. No entanto, esta teoria não pôde ser testada nas décadas subseqüentes, devido às dificuldades técnicas que impossibilitavam um estudo adequado dos cromossomos humanos.

A citogenética do câncer começou a evoluir, tendo como marco inicial, a descrição do cromossomo *Philadelphia* (Ph), por NOWELL e HUNGERFORD (1960), em pacientes com leucemia mielóide crônica. Esta foi a primeira anormalidade citogenética associada a uma neoplasia específica que confirmou a hipótese de Boveri.

A primeira indicação de que as alterações cariotípicas nos tumores sólidos também não ocorriam ao acaso datou de 1966, quando LEVAN e VAN STEENIS (citado por HEIM e MITELMAN, 1995), independentemente, analisaram formas ascíticas de tumores gástricos, mamários, uterinos e ovarianos, observando que determinados cromossomos apareciam em número aumentado e outros faltavam de forma sistemática.

A partir da década de 70, com o surgimento de técnicas de bandeamento dos cromossomos humanos (ZECH, 1969; CASPERSSON et al., 1970 a,b,c,d,e) os estudos citogenéticos do câncer apresentaram um notável desenvolvimento contribuindo de forma importante para o esclarecimento das aberrações cromossômicas envolvidas no câncer e para a formulação de novos conceitos sobre sua etiologia.

Os dados citogenéticos obtidos utilizando-se esta metodologia foram publicados num banco de dados estabelecido em 1975. O **Catálogo de Aberrações**

Cromossômicas em Câncer é continuamente atualizado e, na sua sexta edição, publicada em 1998, estão contidas informações de mais de 30000 casos neoplásicos obtidos de mais de 7000 artigos (MITELMAN, 2000).

Com o advento das técnicas citogenéticas moleculares, nas décadas de 80 e 90; como por exemplo, as de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e hibridização genômica comparativa (CGH), além de se ter ampliado o conhecimento sobre as aberrações cromossômicas adquiridas, têm-se esclarecido mecanismos moleculares que operam nos processos neoplásicos. Nos últimos 25 anos, os estudos de citogenética clássica e molecular revelaram mais de 600 rearranjos cromossômicos balanceados e associados a neoplasias. Atualmente, cerca de 100 genes parecem estar envolvidos em rearranjos cromossômicos. Contudo, estes dados resultam, principalmente, do estudo de malignidades hematológicas. De fato, os tumores sólidos constituem menos de um terço dos cânceres humanos estudados citogeneticamente. Primeiramente, atribui-se a isto a dificuldade e a baixa qualidade cromossômica obtida, particularmente, em neoplasias epiteliais. Segundo, ao contrário das doenças hematológicas, a maioria dos tumores sólidos já tem, no momento do diagnóstico, uma grande quantidade de aberrações cromossômicas adquiridas durante a progressão do tumor. Esta complexidade cariotípica dificulta a identificação das várias anormalidades. Assim, mesmo quando a qualidade é razoavelmente boa e cada anormalidade pode ser caracterizada, a diferença entre aberração primária, patogenticamente essencial, e aberrações evolutivamente secundárias é, via de regra, mais difícil em tumores sólidos do que em malignidades hematológicas. Finalmente, um número crescente de tumores epiteliais, em particular, carcinomas de pâncreas, pele e mama, parecem estar caracterizados por heterogeneidade cariotípica clonal.

Contudo, é sensato acreditar que estudos citogenéticos nos tumores sólidos terão, dentro de um futuro não muito distante, o mesmo papel essencial no monitoramento dos pacientes como o que acontece com os tumores hematológicos (MITELMAN, 2000).

2- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE CÂNCER DE MAMA

Atualmente o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente observado no mundo e o mais comum que acomete mulheres. Estima-se que ocorram mundialmente 999.000 novos casos de câncer de mama a cada ano (aproximadamente 22% dos casos, de câncer feminino) e 375.000 mortes (PARKIN et al., 2001).

O Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde (INCA/MS, 2003) estima que, para 2003, em todo o Brasil, ocorrerão 402.190 casos novos e 126.960 óbitos por câncer. Para o sexo masculino, são esperados 186.155 casos novos e 68.350 óbitos, enquanto que, para o sexo feminino, são estimados 216.035 casos novos e 58.610 óbitos. Estima-se que o principal câncer a acometer a população brasileira será o câncer de pele não melanoma (82.155 casos novos), seguido pelas neoplasias malignas da mama feminina (41.610 casos novos), próstata (35.240 casos novos), pulmão (22.085 casos novos) e estômago (20.640 casos novos).

Certamente, tanto devido aos procedimentos diagnósticos, como à melhoria da informação nos atestados de óbitos, observou-se um aumento considerável da taxa de mortalidade por câncer de mama entre mulheres, de 1979 a 2000, passando de 5,77/100.000 a 9,74/100.000. Os números de óbitos e de casos novos esperados para o ano 2003, na população feminina brasileira, são, respectivamente, 9.335 e 41.610. Estes números correspondem à taxa bruta de mortalidade de 10,40/100.000 mulheres e taxa bruta de incidência de 46,35/100.000 mulheres, respectivamente. No Estado do Paraná espera-se em 2003, 550 óbitos e 1.560 casos novos de câncer de mama, o que corresponde, respectivamente, as taxas de mortalidade e incidência estimada em 10,96/100.000 mulheres e 31,13/100.000 mulheres. Estima-se que o câncer da mama feminina manter-se-á como a primeira causa de morte em mulheres em todo Brasil, seguido pelo câncer de pulmão, câncer de cólon e reto, câncer do colo do útero e estômago.

As causas do câncer de mama são ainda desconhecidas. Contudo, há alguns fatores de risco relacionados à suscetibilidade da mulher. A história familiar se constitui em um fator importante (o risco é duas a três vezes maior), especialmente se o câncer ocorreu na mãe ou em irmã e se desenvolveu antes da menopausa. Outro fator é a exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade. Os

diferentes valores de incidência de câncer de mama no mundo são conseqüências de diferentes exposições ambientais e estilo de vida, comprovados em estudos de migração. Os fatores de risco reprodutivos e hormonais aumentam o risco de câncer de mama em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade), menopausa tardia (após os 50 anos de idade, em média), nuliparidade e idade da primeira gestação acima dos 30 anos. O risco é elevado devido à exposição a altas taxas de estrogênio endógeno. O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam sendo alvo de muita controvérsia. Aparentemente, certos subgrupos de mulheres, particularmente as que usam pílulas com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo, têm maior risco (PARKIN, et al., 2001).

A ingesta de dieta gordurosa e o consumo elevado de álcool, embora controversos, parecem elevar o risco de câncer de mama (PARKIN, et al., 2001).

A presença de doença proliferativa benigna da mama apresenta um risco relativo aumentado para o câncer de mama. As hiperplasias atípicas têm um risco maior do que as típicas (INCA/MS, 2003).

Apesar de ser considerado como um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada em estágios avançados (estádio III e IV). Investimentos tecnológicos e em recursos humanos no âmbito de um programa estruturado para detecção precoce desta neoplasia (mamografia), e a implementação de um sistema nacional de informações (auto-exame das mamas) constituem estratégias importantes no sentido de reverter este cenário (INCA/MS, 2003).

3- ANATOMIA E HISTOPATOLOGIA DA MAMA

3.1- ANATOMIA (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; INCA/MS, 2003)

As glândulas mamárias, que têm como principal função a secreção do leite, se compõem de:

- **Ácino** – unidade funcional definitiva da mama, responsável pela produção do leite durante a lactação. No início da menarca com a ação hormonal concomitante resultante da interação hipófise-ovário, ocorre o desenvolvimento dos ductos terminais para formar a unidade lobular do ducto terminal;
- **Lóbulo mamário** – conjunto de ácinos;
- **Lobo mamário** – conjunto de lóbulos mamários que se liga à papila através de um ducto;
- **Ductos mamários** – conduzem a secreção (leite) até a papila. Os ductos grandes, intermediários, bem como os ductos terminais das unidades lobulares são envolvidos por um denso estroma fibroso. Os ductos e lóbulos, juntamente com o tecido fibroso constituem o parênquima da mama;
- **Tecido Adiposo** – o restante da mama é preenchido por tecido adiposo, cuja quantidade varia com a característica física, o estado nutricional e idade da mulher;
- **Papila** – protuberância elástica onde desembocam os ductos mamários;
- **Aréola** – estrutura central da mama onde se projeta a papila (Figura-1).

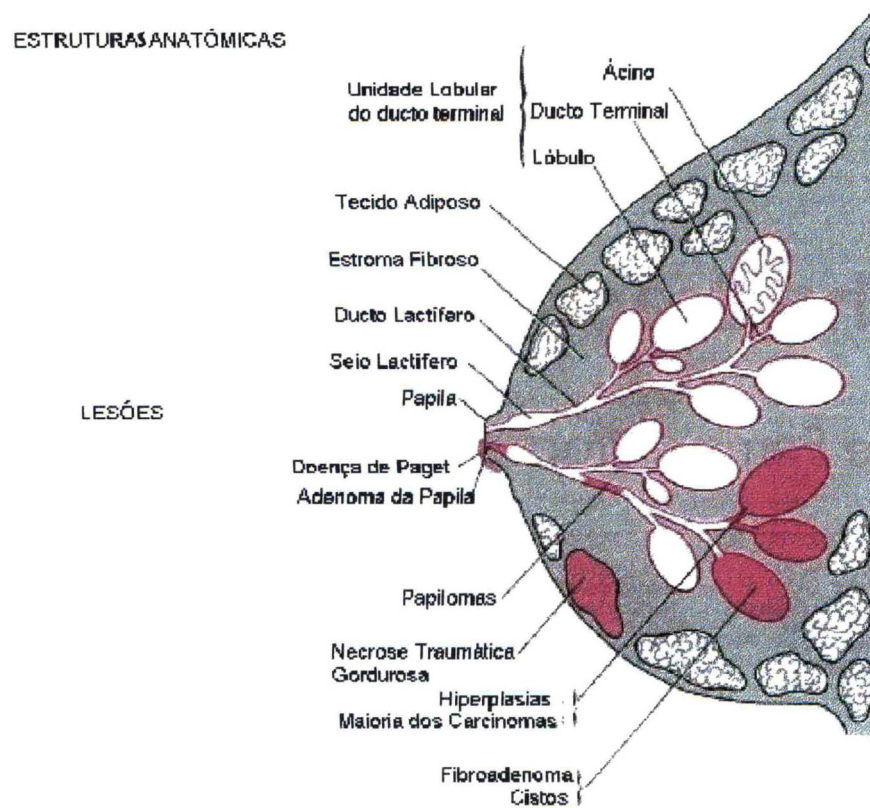


Figura 1- Estruturas Anatômicas e Principais Lesões Benignas e Malignas da Mama

Fonte: COTRAN; KUMAR; ROBBINS. The Breast. In: _____PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. p.1090.

3.2- ANOMALIAS CONGÊNITAS DA MAMA

É comum que uma extensão do tecido mamário funcional se prolongue até a borda da axila. Raramente pode ocorrer um desenvolvimento mais completo da mama ou do tecido papilar na axila ou em outra parte ao longo da linha láctea original (isto é; a crista láctea embrionária que se estende desde o broto do membro anterior até o posterior, ao longo de cada lado da superfície ventral do feto). A maior parte desta crista sofre uma atrofia completa. Por ocasião da nona semana de gestação, o único espessamento persistente é na área definitiva da mama do tórax anterior. Assim, pode-se encontrar tecido mamário ao longo do tronco anterior, acima ou abaixo da mama principal, até a área inguinal e, ocasionalmente, até nos genitais externos, como a vulva. Essas anomalias podem apresentar-se clinicamente como massa tecidual ou, às vezes, estão sujeitas às mesmas doenças que afetam a mama principal (BARTOW; FENOGLIO-PREISER, 1990).

Segundo COTRAN; KUMAR; ROBBINS (1994) as anomalias congênitas da mama constituem-se em:

mamas ou papilas supranumerárias – resultam do espessamento do tecido epidermal ao longo da linha láctea, estendendo-se desde a axila até a região inguinal, acima ou abaixo da mama principal. Raramente podem surgir doenças que afetam o tecido mamário principal e, casualmente, mudanças do ciclo menstrual causam dor intensa na mama, principalmente no período pré-menstrual.

tecido mamário axilar acessório – o sistema ductal normal se estende da parede torácica anterolateral até a fossa axilar. Normalmente, uma simples mastectomia não remove todo o tecido epitelial. Tal tecido pode dar origem a um tumor fora da mama e, portanto, são comumente identificadas lesões de linfonodos axilares ou metástase de câncer de mama oculto.

inversão congênita da papila – anomalia bastante freqüente em mulheres com hiperplasia mamária que pode ser corrigida por tração ou crescimento que ocorre durante a gravidez. É clinicamente importante devido à dificuldade que pode causar durante a lactação e porque pode ser observada em carcinomas e inflamações da mama.

3.3- INFLAMAÇÃO DA MAMA

Segundo COTRAN; KUMAR; ROBBINS (1994), a inflamação da mama é mais comum no pós-parto, durante o período de lactação. As mais comuns são:

mastite aguda e abscesso: comum no período lactante, embora possa ocorrer em qualquer idade. Rachaduras e fissuras na papila tornam a mama vulnerável à infecção bacteriana, principalmente o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus*. Normalmente a doença é unilateral, podendo ser tratada satisfatoriamente pelo aumento da sucção, esvaziamento freqüente da mama e antibioticoterapia. O processo inflamatório agudo pode evoluir para a formação de um ou mais abscessos, o que exige intervenção cirúrgica. Um abscesso firme, não doloroso, às vezes acompanhado por retração de pele e de papila pode ser confundido com o câncer de mama.

ectasia ductal mamária: é caracterizada pela dilatação dos ductos, obstrução de secreções da mama, e marcada por uma reação inflamatória periductal e granulomatosa crônica intersticial que, algumas vezes, está associada com um grande número de células infiltrantes (plasmócitos), recebendo o diagnóstico de mastite plasmocitária. Afeta geralmente as mulheres multíparas, mais idosas, que tiveram episódios repetidos e/ou prolongados de amamentação. Esta lesão está sujeita a biópsia devido à dificuldade de diferenciá-la clinicamente de um carcinoma.

necrose gordurosa: em geral, uma história de traumatismo precede os casos de necrose gordurosa. Ocorre necrose focal do tecido gorduroso, seguido por uma reação inflamatória. Tem importante significado clínico, pois pode ser confundida com carcinoma quando a massa gordurosa necrosada torna-se palpável e é vista na mamografia como calcificação focal.

3.4- HISTOPATOLOGIA DA DOENÇA FIBROCÍSTICA

Segundo GOMPEL; VAN KERKEM (1990), a ampla variedade de termos encontrados na literatura para descrever a doença fibrocística reflete seu alto polimorfismo e a dificuldade de integrar tantas lesões variadas sob um único título. A etiologia da doença fibrocística, a doença mais comum da mama, é parcialmente compreendida. O parênquima mamário está sob a influência de diferentes fatores que podem modificá-lo permanentemente. Patrimônio genético, balanço hormonal, idade, paridade, história de lactação, e possivelmente viroses e doenças psicossomáticas podem influenciar a morfologia da glândula mamária. A doença fibrocística é comum em mulheres jovens e a taxa de incidência aumenta com a idade, atingindo um pico entre 40 e 45 anos de idade. A doença pode aparecer numa forma localizada ou difusa, e com freqüência ambas as mamas estão envolvidas. Histologicamente, a doença fibrocística resulta de diferentes combinações das seguintes lesões básicas: proliferações epiteliais, que inclui epiteliase e papilomatose intraductal, cistos lactíferos, fibrose estromal, adenose esclerosante ou adenomatose mioepitelial e metaplasia apócrina.

Todos os graus de proliferação epitelial ductal podem ser observados na doença fibrocística. Quando a proliferação é moderada e não aparece acompanhada por atipia celular, o caráter benigno da lesão é evidente. O reconhecimento de uma hiperplasia atípica é importante, pois há dados pertinentes sugerindo que os pacientes estão sujeitos a um risco de 1,7 a cinco vezes maior de desenvolver câncer do que a população em geral.

A afinidade entre doença fibrocística e um risco aumentado de câncer de mama tem sido alvo de discussões. Constituem-se argumentos a favor, a freqüente localização dos espécimes cirúrgicos de doença fibrocística nas proximidades do câncer mamário, a incidência da doença em biópsias prévias de pacientes cujas mamas foram removidas por causa de câncer, e os estudos prospectivos de pacientes que mais tarde desenvolveram carcinoma.

Entretanto, excluindo-se as lesões de hiperplasia epitelial atípica ou doença fibrocística proliferativa, a evidência para uma ligação entre doença fibrocística e um risco aumentado de câncer não é consistente.

3.5- HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES BENIGNOS DA MAMA

Segundo GOMPEL; VAN KERKEM (1990), os tumores benignos da mama são:

fibroadenoma – constitui-se na neoplasia fibroepitelial mais freqüente da mama. Normalmente aparece em mulheres na faixa etária entre 15 e 35 anos, exibe crescimento lento com características hormônio-dependentes. Dismenorréia, tensão pré-menstrual e menstruação irregular são características mencionadas na história clínica da paciente, sugerindo um distúrbio hormonal. Geralmente manifesta-se como uma massa única, mas pode ser multifocal (20% dos casos) e podem ocorrer em ambas as mamas simultaneamente. Histologicamente, o fibroadenoma é uma proliferação benigna localizada de células epiteliais e fibroblastos estromais. Estes tumores tendem a se estabilizar ou regredir na menopausa, sendo que durante a gestação o seu crescimento é freqüente. Em 1996, HOULIHAN (citado por PETERSSON et al., 1997) sob controvérsias, estimou um risco duas a três vezes maior para o desenvolvimento de câncer mamário. Poucos casos de transformação maligna têm sido descritos na literatura, sendo o carcinoma lobular *in situ* o tipo mais freqüentemente associado. A incidência exata da transformação maligna é difícil de avaliar porque alguns carcinomas podem substituir totalmente um fibroadenoma pré-existente.

adenoma – proliferação bem delimitada do tecido mamário, envolvendo células epiteliais com estroma muito escasso. É uma lesão benigna rara que ocorre em mulheres jovens e parece que não está relacionada à terapia hormonal contraceptiva. A transformação maligna é muito rara.

papiloma intraductal – é uma proliferação benigna do epitélio ductal mamário. Não é uma lesão freqüente e pode ser confundida com carcinoma. Papilomas podem ser solitários ou múltiplos. No último caso, dá-se o nome de papilomatose intraductal. O solitário é mais freqüente e geralmente desenvolve-se na porção terminal de um ducto principal. Pode aparecer em qualquer idade, mas é mais comum entre os 30 e 50 anos. Há muita diversidade de opinião sobre o potencial maligno desta enfermidade. De um modo geral a evolução desta lesão é benigna e recomenda-se realizar a excisão completa deste tumor benigno para evitar o risco de recorrência local.

cistosarcoma filóide – também conhecido por tumor filóide e atualmente como fibroadenoma celular, é um tumor fibroepitelial, móvel, no qual os componentes do estroma ou do mesênquima mostram uma proliferação mais acentuada. É um tipo raro de neoplasia mamária, representando cerca de 1% de todos os tumores fibroepiteliais da mama, mais freqüente em mulheres de meia idade, pertencentes a uma faixa etária maior do que aquela encontrada em fibroadenomas. Outra característica é o seu crescimento rápido, podendo atingir um diâmetro de 15cm ou mais, em pouco tempo. Porém, ele não infiltra tecidos adjacentes e nem a pele, podendo ocorrer, no entanto, ulceração da pele, resultante da pressão exercida pelo tumor. Alguns tumores são classificados como histologicamente benignos, enquanto que outros são considerados malignos. Quando uma classificação histopatológica precisa do grau de malignidade não é obtida, eles são denominados limítrofes. No primeiro grupo, o padrão geral dos tumores lembra o fibroadenoma, exceto pela celularidade estromal aumentada, as mitoses são raras e atípicas celulares são muito discretas. No segundo grupo, o estroma é extremamente celular, todos os graus de atipia e hipertrofia nuclear estão presentes, com atividade mitótica aumentada. Recorrências locais não são raras em ambos os tipos, e metástases não são freqüentes nem mesmo no grupo histologicamente maligno. O tratamento adequado para as lesões benignas é a excisão local, e a mastectomia é necessária para tumores muito volumosos ou histologicamente malignos.

3.6- HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA

O exame histopatológico do câncer de mama fornece informações sobre o diagnóstico da lesão, ajuda na determinação do prognóstico da paciente e leva a uma melhor compreensão da natureza do processo.

Várias classificações histopatológicas estão em uso, sendo que as mais utilizadas são aquelas apresentadas pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP, 1967, citado por DeVITA et al., 1997) e pela Organização Mundial de Saúde (1982, citado por DeVITA et al., 1997).

Segundo estes institutos, os carcinomas mamários são classificados da seguinte forma:

carcinoma *in situ* - carcinoma ductal *in situ* (DCIS), também conhecido como carcinoma intraductal ou carcinoma não invasivo, e os carcinomas lobulares *in situ* (LCIS) são caracterizados por uma proliferação de células epiteliais malignas confinadas aos ductos ou lóbulos mamários, sem evidência microscópica de invasão da membrana basal do estroma vizinho.

carcinoma ductal infiltrante - uma grande variedade de tipos histológicos de carcinomas invasivos (infiltrantes) da mama tem sido descrita. O carcinoma infiltrante designado NOS ("not otherwise specified" = sem outra especificação), em que nenhuma característica histopatológica especial é reconhecida, compreende 70% dos cânceres de mama. Apresenta o pior prognóstico de todos os tipos ductais e cerca de 70% formam metástases nos linfonodos axilares.

carcinoma medular - apresenta lesões limitadas que podem alcançar grandes dimensões, mas demonstram propriedades infiltrativas de baixo grau. Constituem de 5 a 7% de todos os carcinomas mamários e são caracterizados por uma margem bem delimitada, núcleos pobremente diferenciados, padrão de crescimento sincicial e uma infiltração intensa por pequenos linfócitos e plasmócitos. O prognóstico é melhor do que aquele para carcinoma ductal NOS.

carcinoma tubular - um tumor bem diferenciado no qual a formação de túbulo é notável. Este diagnóstico é feito somente se 75% ou mais do tumor é composto destes elementos. Metástases axilares são incomuns, e o prognóstico é consideravelmente melhor que o do carcinoma ductal NOS.

carcinoma mucoso - outro tipo ductal, o carcinoma mucoso, mucinoso ou colóide, compreende 3% dos carcinomas mamários. Apresenta baixo crescimento e pode alcançar proporções volumosas. Quando o tumor é predominantemente mucoso, o prognóstico tende a ser favorável.

carcinoma lobular infiltrante - microscopicamente, caracteriza-se por apresentar pequenas células dispostas num arranjo linear (fila indiana) com tendência a crescer ao redor dos ductos e lóbulos. É relativamente incomum, representando apenas 5 a 10% dos casos de tumores de mama. A apresentação clínica é freqüente numa área de espessamento mal definido na mama, diferente da massa dominante característica do carcinoma ductal. Apresenta, ainda, uma proporção maior de tumores multicêntricos na mesma mama ou na mama oposta do que a encontrada em carcinoma ductal NOS. O carcinoma lobular infiltrante tem uma propensão a envolvimento de linfonodos axilares e o prognóstico é similar ao carcinoma ductal infiltrante. Entretanto, os sítios de metástases tendem a diferir, já que enquanto os carcinomas ductais metastatizam mais caracteristicamente para osso ou para sítios dentro dos parênquimas do pulmão, fígado ou cérebro, os carcinomas lobulares mostram uma predileção para meninges e superfícies serosas.

doença de Paget - ocorre em 1% de todas as pacientes com câncer de mama. Clinicamente, a paciente apresenta-se com uma história relativamente longa de alterações eczematosas no mamilo. As alterações no mamilo são associadas a um carcinoma subjacente na mama que pode ser apalpado em metade a 2/3 das pacientes. Este tumor pode ser do tipo intraductal ou invasivo, sendo o prognóstico relacionado ao tipo histológico do tumor associado.

carcinoma de mama inflamatório - caracteriza-se clinicamente por edema proeminente na pele, vermelhidão e ardor, uma visível margem erisipelóide e endurecimento do tecido subjacente. Em aproximadamente metade das pacientes a massa não é palpável. Estes critérios, no passado, eram suficientes para o diagnóstico, mas atualmente, pode ser obtida corroboração anátomo patológica por uma biópsia da pele demonstrando envolvimento dos linfáticos dérmicos com células cancerosas. Células inflamatórias raramente estão presentes. O prognóstico das pacientes com esta doença é ruim, mesmo quando ela está aparentemente localizada.

3.7- TNM – CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MALIGNOS

O sistema TNM para descrever a extensão anatômica da doença, foi desenvolvido e publicado pela UICC – União Internacional contra o Câncer, onde as localizações anatômicas nesta classificação estão listadas pelo código da Classificação Internacional das Doenças para Oncologia (CID-O, 2ª edição, Organização Mundial da Saúde, Genebra, 1990). A última edição foi traduzida pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA/MS, 2003).

O sistema TNM está baseado na avaliação de três componentes:

- **T** – a extensão do tumor primário
- **N** – a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais
- **M** – a ausência ou presença de metástase à distância

A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença maligna. Assim temos: To, T1, T2, T3, T4 / N0, N1, N2, N3 / Mo, M1.

3.8- G - GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Informações posteriores às localizações anatômicas relativas ao tumor primário, como a graduação histopatológica – G, são registradas sob os seguintes títulos (INCA/MS, 2003):

- **GX** – 0 grau de diferenciação; não pode ser avaliado
- **G1** – bem diferenciado
- **GII** – moderadamente diferenciado
- **GIII** – pouco diferenciado
- **GIV** – indiferenciado

4- CITOGENÉTICA DOS TUMORES BENIGNOS DA MAMA

Durante muito tempo foi universalmente aceito que os tumores benignos apresentavam uma constituição cromossômica normal, o que se baseava em estudos citogenéticos ocasionais realizados antes do desenvolvimento das técnicas de bandeamento cromossômico (SANDBERG, 1980).

A observação de determinadas aberrações cromossômicas em lipoma e no leiomioma uterino, além de caracterizá-los como entidades benignas, permitiu a diferenciação dos seus correspondentes malignos em casos onde parâmetros histopatológicos não são conclusivos (SANDBERG, 1990).

Após o emprego das técnicas de bandeamento cromossômico, a análise citogenética dos tumores benignos revelou que determinadas aberrações cromossômicas ocorrem com mais freqüência em regiões específicas de determinados cromossomos. Como exemplos, citamos: a monossomia do cromossomo 22 ou a deleção em 22q, presente em 50%–90% dos casos investigados de meningioma; alterações estruturais envolvendo regiões cromossômicas preferenciais como 3p21, 8q12 e 12q13-15, em adenomas pleomórficos da glândula salivar; a translocação $t(12;14)(q14-15;q23-24)$ em leiomiomas uterinos e o envolvimento da região cromossômica 12q13-15 em lipomas (SREEKANTIAH e SANDBERG, 1991).

A não casualidade da ocorrência de aberrações cromossômicas em tumores benignos sugere que, em determinados cromossomos, localizam-se genes responsáveis principalmente pela regulação do crescimento celular do que pela transformação maligna. Os trabalhos de CALABRESE et al.(1991), SREEKANTIAH e SANDBERG (1991), CAVALLI (1994), DAL CIN et al.(1998), CORNÉLIO (1999), TIBILETTI et al.(2000), CAVALLI et al.(2001) e AMIEL et al.(2003) indicam que os cromossomos 1, 6, 12, 20, 21 e 22 estão mais comumente envolvidos nas aberrações observadas em tumores benignos.

Anormalidades do cromossomo 1 são freqüentemente observadas em neoplasias humanas e são consideradas alterações secundárias associadas com a progressão tumoral. O envolvimento do 1p em diversos tumores benignos, os quais não evoluem para um processo maligno, contribui para o conceito de que rearranjos

envolvendo o cromossomo 1 conferem uma vantagem seletiva às células (SREEKANTIAH e SANDBERG, 1991).

Em 1990, SANDBERG estudando meningiomas, observou freqüentes rearranjos em 1p onde se localizam oncogenes, bem como fatores de crescimento, como o *MYCL1* em 1p32, *JUN* em 1p31-32, *ERPL1* em 1pter-p36, e *FGR* em 1p36.2-36.1 (GDB 2003). Estudos moleculares poderão contribuir para um melhor conhecimento da forma de atuação e dos mecanismos envolvidos na participação destes genes na tumorigênese humana.

PETERSSON et al. (1997) estudaram citogeneticamente 50 fibroadenomas, onde nove apresentaram aberrações clonais. As únicas aberrações recorrentes foram a trissomia do cromossomo 20 e translocações envolvendo o braço curto do cromossomo 1: t(1;4)(p34;p14) em um caso e t(X;1)(q26;p33) em outro. Alterações clonais do cromossomo 1 têm sido observadas em lesões benignas da mama bem como em carcinomas mamários (CALABRESE et al., 1991; FLETCHER et al., 1991; OZISIK et al., 1994; DIETRICH et al., 1995; ROHEN et al., 1996; MITELMAN et al., 1994; LUNDIN et al., 1998; BURBANO et al., 2000).

O envolvimento preferencial de 6q23 e 6q25 tem sido descrito por vários autores em neoplasias benignas de mama (BIRDSALL et al., 1992; CAVALIÉRI, 1993; CAVALLI, 1994; DAL CIN et al., 1996; CAVALLI et al., 2001). Vários genes que podem estar associados à progressão tumoral têm sido mapeados em 6q, como por exemplo, o gene receptor de estrogênio, *ERS1* em 6q25.1 (GOSDEN et al., 1986; GDB, 2003), o *MYB* em 6q22-23 (JANSSEN et al., 1986; GDB, 2003), o *MAS1* em 6q24-27 (RABIN et al., 1987; GDB, 2003), o gene receptor 1 do interferon gama *IFNGR1* em 6q23-24 (ALCIDE-LORIDAN et al., 1989; GDB, 2003) e o gene receptor do fator de crescimento *IGF2R* em 6q25.3 (HUMAN GENE MAPPING-HGM 11, 1991; GDB, 2003). A presença de deleções em 6q23-25 e em outras regiões do braço longo do cromossomo 6 (TIBILETTI et al., 2000) em tumores benignos de mama e a baixa freqüência (0,1%) de evolução dos fibroadenomas para carcinomas, sugerem que os genes localizados neste cromossomo estejam relacionados à proliferação celular e não necessariamente à transformação maligna. No entanto, MITELMAN (1994) considerando a alta freqüência e heterogeneidade de deleções em 6q21-25 em diferentes tumores, além dos mamários, admite como provável a localização nesta região de mais de um gene envolvido em diferentes passos da

tumorigênese humana, atuando através de diferentes mecanismos (ABDOLLAHI et al., 2003). TIBILETTI et al. (2000), em estudo comparado de análise citogenética clássica e molecular para avaliar se lesões benignas da mama são precursoras de carcinomas invasivos, observaram que 6q24-ter é uma região comum de deleções nas três classes de lesões mamárias (84% de fibroadenomas, 64% de hiperplasias atípicas e 77% de carcinomas). Entretanto, FRANCO et al. (2001) estudando lesões benignas de mama quanto à presença de mutações no gene *TP53*, pela análise da perda de heterozigosidade e através da instabilidade de microssatélites, não encontraram nenhuma alteração, sugerindo que a ocorrência de fibroadenomas não aumenta significativamente o risco relativo do aparecimento de câncer de mama.

Alterações no cromossomo 12 são freqüentes em neoplasias benignas (CALABRESE et al., 1991; SREEKANTAI AH e SANDBERG, 1991; BIRDSALL et al., 1992; CAVALIÉRI, 1993; CAVALLI, 1994; DIETRICH et al., 1995; STAATS et al., 1996; PETERSSON et al., 1997; CORNÉLIO, 1999; CAVALLI et al., 2001) e malignas da mama (CRUCIGER et al., 1976; RODGERS et al., 1984; GEBHART et al., 1986; TEYSSIER, 1989; DUTRILLAUX et al., 1990; MARS e SAUDERS, 1990; BULLERDIEK et al., 1993; ADEYINKA et al., 1997, 1998; PANDIS et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002).

SCHOENMAKERS et al., (1995) identificaram um grupo de proteínas de alta mobilidade, a HMGI-C, numa região de aberrações múltiplas (MAR) de 175Kb, descrita por VAN de VEM et al. (1995), codificada pelo gene *HMGA2*, mapeado em 12q15 (WANSCHURA et al., 1995; GDB, 2003) que desempenham importante papel na tumorigênese de origem mesenquimal. Também foi mapeado em 6p21, um gene que codifica para a família de proteínas de alta mobilidade (HMGI-Y) (FRIEDMAN et al., 1993). Ambas as regiões 6p21 e 12q15, têm sido detectadas em fibroadenomas mamários, e desta forma é razoável admitir que rearranjos em genes que codificam para a família protéica HMG possam estar envolvidos na origem de um subgrupo de fibroadenomas mamários (ROHEN et al., 1996). No entanto, permanece a questão se os genes localizados nas regiões citadas estão preferencialmente relacionados com o crescimento celular do que com a transformação maligna.

São também comuns alterações envolvendo o cromossomo 20. Aneuploidias (principalmente monossomias) deste cromossomo têm sido descritas tanto em neoplasias benignas (BURBANO, 1993; CAVALIÉRI, 1993; CAVALLI, 1994;

PETERSSON et al., 1997; CORNÉLIO et al., 1999; BURBANO et al., 2000; TIBILETTI et al., 2000; CAVALLI et al., 2001) como em neoplasias malignas de mama (RODGERS et al., 1984; DUTRILLAUX et al., 1990; GELEICK et al., 1990; CAVALLI et al., 1997; NAKOPOULOU et al., 2002b; TEIXEIRA et al., 2002).

A monossomia do cromossomo 21 foi descrita por CAVALIÉRI (1993) em um caso de displasia mamária, por CAVALLI (1994) em três dos oito casos de tumores benignos de mama estudados (identificando-se, também, trissomia do cromossomo 21), por BIRDSALL et al., (1995) e DIETRICH et al., (1997) em tumores filóides benignos de mama. Esta aneuploidia foi também descrita por BURBANO et al., (2000 e 2001) em duas de quatro hiperplasias epiteliais de mama e em fibroadenomas. Em 21q22.3 localiza-se o gene *TFF.1 (BCEI)* (HGM 11, 1991; GDB, 2003), relacionado à atividade mitogênica do estrogênio em células mamárias, pela regulação gênica de proteínas envolvidas no estímulo da proliferação celular mamária (COX e GODING, 1991). DAVIDOFF et al., (1991) descreveram que o gene *HSPA3*, localizado no cromossomo 21 (21pter-qter) (GDB, 2003) forma complexos com a proteína p53 e também poderia estar relacionado com o processo de proliferação celular.

A monossomia do cromossomo 22 foi a primeira aberração relacionada a um tumor sólido, quando ZANG e SINGER (1967) a descreveram em meningiomas. Estes autores citaram a falta de um cromossomo do grupo G, sendo identificado como o 22 por MARK et al. (1972) e por ZANKL e ZANG (1972) admitindo que a monossomia do 22 se constitui numa alteração primária nos meningiomas. SANDBERG (1990), relacionando um número superior a 300 meningiomas, demonstrou que em 50% a 90% dos casos ocorre a monossomia do cromossomo 22 ou deleções em 22q, as quais são também descritas em altas freqüências no mesmo tumor por TEYSSIER e FERRE (1989) e por KHAN e EVANS (1991). A monossomia do cromossomo 22 tem sido também descrita em leiomiomas uterinos (KHAN e EVANS, 1991; KIECHLE-SCHWARZ et al., 1991; SREEKANTIAH e SANDBERG, 1991; MITELMAN, 1994), em neurinomas onde se descreveu inclusive a perda parcial deste cromossomo (COUTURIER et al., 1990), e em tumores benignos de mama (CAVALIÉRI, 1993; CAVALLI, 1994; CORNÉLIO, 1999; BURBANO et al., 2000; CAVALLI et al., 2001).

CAVALIÉRI (1993) e CAVALLI (1994) descreveram a presença da trissomia do cromossomo 22 em três e em duas lesões mamárias benignas respectivamente, e BURBANO et al. (2000) a descreveram em duas de quatro hiperplasias epiteliais de mama, com alterações clonais. Nestes estudos, os autores sugerem que as alterações no cromossomo 22 possam estar relacionadas com a proliferação celular.

Além dos cromossomos acima citados, outros têm sido comumente descritos em tumores benignos de mama, como os cromossomos: 2, 11 e 13 (SREEKANTIAH e SANDBERG, 1991; PETERSSON et al., 1997; CAVALLI et al., 2001), 1, 8, 9 e 15 (CALABRESE et al., 1991; PETERSSON et al., 1997; BURBANO et al., 2001) e, X, 9 e 17 (CAVALLI, 1994; PETERSSON et al., 1997; CORNÉLIO, 1999; CORNÉLIO et al., 1999; BURBANO et al., 2000; CAVALLI et al., 2001). As alterações que ocorrem nos cromossomos 1 e 17 serão mais propriamente analisadas em seguida, nos tumores malignos de mama.

As informações acima apresentadas demonstram claramente que as alterações citogenéticas contribuem para o fenótipo tumoral benigno podendo se constituir num estágio inicial de progressão à malignidade. A especificidade e freqüência com que determinadas regiões cromossômicas são rearranjadas nas lesões benignas da mama indicam a importância das mesmas na tumorigênese, fornecendo evidências para a localização de oncogenes, genes supressores tumorais e de fatores de crescimento. Neste particular, CAVALLI et al. (2001) salientaram que aberrações cromossômicas em 6q e no cromossomo 12 começam a ser descritas com destaque nas lesões benignas de mama, apesar do limitado número de casos estudados. Desta forma, o emprego de metodologias moleculares pode fornecer importantes informações adicionais sobre a associação destas aberrações com um tipo específico de patologia benigna de mama.

5 - CITOGENÉTICA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA

O carcinoma mamário é a malignidade mais comum que afeta mulheres no mundo todo. Estima-se que ocorram mundialmente 999.000 novos casos de câncer de mama a cada ano (PARKIN et al., 2001).

No entanto, existe um grande contraste entre sua frequência e o conhecimento das alterações citogenéticas nestes tumores. Os estudos citogenéticos nas décadas de 50 e 60 são apenas de valor histórico, pois foram realizados antes do advento das técnicas de bandeamento cromossômico (TRENT, 1985). MITELMAN et al.(1998) listou pouco mais de 500 casos publicados de tumores mamários com alterações cromossômicas clonais identificadas por técnicas de bandeamento. Muitos destes dados são resultantes da análise de linhagens celulares, lesões metastáticas ou efusões de cânceres mamários avançados, onde a complexidade cariotípica não permite conclusões sobre os estágios iniciais da evolução citogenética tumoral. A análise citogenética de tumores primários de mama se faz necessária para o estabelecimento dos eventos cariotípicos primários que caracterizam a doença.

Apesar dos tumores mamários humanos ainda não terem sido associados a alterações cariotípicas específicas, vários autores têm descrito o envolvimento não ao acaso de certos cromossomos. CAVALLI (1994), por exemplo, analisando 12 tumores malignos de mama observou alterações principalmente nos cromossomos 7,8,11,17,18,19 e X. Alguns destes cromossomos, além dos cromossomos 1 e 3, foram também listados por CAVALLI et al.(1997) e por TEIXEIRA et al.(2002), entre os que mais frequentemente apresentam aberrações clonais em cânceres de mama.

São praticamente unânimes as observações de que as aberrações estruturais do cromossomo 1 são as mais frequentes em cânceres de mama (DUTRILLAUX et al., 1990; GELEICK et al., 1990; HAINSWORTH e GARSON, 1990; FERTI-PASSANTONOPOULOU et al., 1991; HAINSWORTH et al., 1991; SASI et al., 1991; THOMPSON et al., 1993; TRENT et al., 1993; CAVALLI, 1994; PANDIS et al., 1995, 1998; STEINARSDÓTTIR et al., 1995; ICHIKAWA et al., 1996; CAVALLI et al., 1997; ADEYINKA et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002), como também em outros tipos de cânceres de tecidos sólidos (ATKIN e BAKER, 1977, 1991; ATKIN e PICKTHALL, 1977; HUANG et al., 2002; VAZIMAKI et al., 2002). Nos cânceres de mama, as

alterações estruturais do cromossomo 1 aparecem com freqüências elevadas, estando envolvidas em 60% a 80% dos mesmos (TRENT et al., 1993; TEIXEIRA et al., 2002), sendo representadas principalmente pelos der(1;16)(q10;p10) e i(1)(q10) (TSAROUHA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2002). Os dados dos vários trabalhos acima mencionados demonstram também que deleções e translocações são freqüentes envolvendo ambos os braços do cromossomo 1, preferencialmente nas bandas p11-13 e q12-23, sem que, no entanto, se possa ainda estabelecer especificidade entre qualquer ponto de quebra e o câncer de mama. Como 67% dos pontos de quebra ocorrem na heterocromatina constitutiva onde não se conhece a presença de genes, os rearranjos que nela ocorrem não devem ser responsáveis por desregulações gênicas e sim pela perda do balanceamento gênico, resultando num efeito de posição pela transposição de genes para próximo da região heterocromática (DUTRILLAUX et al., 1990). Efetivamente, pouco se sabe sobre o significado da elevada freqüência de alterações no cromossomo 1 em cânceres de mama e de outros tumores sólidos, o que determina uma série de análises especulativas. Apesar dos poucos estudos realizados em tumores metastáticos mamários (BELLO e REY, 1989; TRENT et al., 1993), em relação aos tumores primários, a comparação das freqüências dos rearranjos cromossômicos encontrados e das regiões envolvidas fornecem algumas informações interessantes.

TRENT et al. (1993), observaram que as alterações estruturais do cromossomo 1, que se caracterizam principalmente por deleções em 1p e pela presença de material genético adicional em 1q, representam 53% das aberrações estruturais encontradas nos cânceres primários de mama e 81% das observadas nos metastáticos. Considerando os pontos de quebra em todos os cromossomos, foram observadas freqüências muito semelhantes nos primários (6,25%) e nos metastáticos (7,59%). Baseados nestas informações, os autores sugeriram que a passagem da fase primária para a metastática poderia ser devida a uma alteração gênica em 1p ou 6q, que determinaria uma condição fenotípica de instabilidade cromossômica. Numa etapa seguinte, metastática, haveria um acúmulo de aberrações estruturais com vantagens seletivas para 1q, 7 e 11. TLSTY et al. (1992) e TRENT et al. (1993), também admitem que a instabilidade gênica se constitua num dos passos essenciais para a transição de um tumor primário para metastático e argumentam, inclusive, que a mesma pode ser avaliada citologicamente pelo estudo

das regiões homogeneamente coradas (hrs) e dos “double minutes” (dmin) que são, em geral, mais freqüentemente observados nos estágios tardios da doença. Ainda neste sentido, TSUDA et al. (2002) apresentaram dados sugestivos de que mudanças da metilação nas regiões heterocêntricas dos cromossomos 1 e 16 são importantes não só por atuarem na regulação da expressão gênica como também por interferirem na instabilidade cromossômica, correlacionando-se positivamente com os estágios mais agressivos do câncer mamário.

DUTRILLAUX et al. (1990), identificando os cromossomos aberrantes em tumores de mama com poucas e com muitas aberrações cromossômicas, observaram que as dos cromossomos 1 e 16 são igualmente freqüentes nos dois tipos de tumores, não podendo, portanto, serem caracterizadas como secundárias. Por outro lado, aberrações envolvendo os cromossomos 6, 11, 13 e 17 raramente são observadas em tumores com poucas alterações o que sugere, segundo os autores, que as mesmas tendem a ocorrer durante a progressão tumoral, sendo consideradas então secundárias na tumorigênese mamária. Os autores concluem que se a perda de alelos recessivos está envolvida na tumorigênese, os genes localizados nestes cromossomos devem estar relacionados com a progressão tumoral, uma vez que as deleções observadas aparecem tardiamente. A sugestão de que a perda de genes supressores tumorais está relacionada com a progressão do processo neoplásico é substanciada pelo fato de que deleções em 17p, 13q e 11p onde se localizam, respectivamente, os genes supressores *TP53*, *RB1* e para o tumor de Wilms (GDB, 2003), são freqüentes e claramente secundárias ou de ocorrência tardia.

CUMMINGS et al. (2000) admitem que as alterações observadas no cromossomo 1 estejam relacionadas com a progressão do tumor, ao contrário das que ocorrem com os pontos de quebra em 16q21-24 que, por aparecerem mais freqüentemente em células com número cromossômico próximo ao diplóide estão mais provavelmente relacionadas com o início do processo tumoral.

Como já foram referidas, alterações em 1p são freqüentemente descritas em cânceres de mama. O oncogene *NRAS*, localizado em 1p13.2 (GDB, 2003) é um dos candidatos a estar etiologicalamente envolvido com o câncer de mama (MITCHELL e SANTIBANEZ-KOREF, 1990), o que ocorre também com os genes *ARHI* e *TTC4*, localizados em 1p31 (GDB, 2003), os quais estão freqüentemente

deletados em câncer de mama (PENG et al., 2000; SU et al., 2000). As regiões 1p11 e 1p22 também estão freqüentemente envolvidas nos cânceres de mama e de outros tumores sólidos (MERTENS et al., 1997), o que indica que há um ou mais genes envolvidos no início ou na progressão de mais de um tipo de câncer. DUTRILLAUX et al. (1990), observaram deleções em 50% dos casos estudados de cânceres de mama em 17p e 16q, 40% em 11q e 33% em 1p. Estas informações são corroboradas por estudos moleculares que indicam perda de heterozigosidade em 1p, como os 41% em 1p36 (GENUARDI et al., 1989) e 50% em 1p31 (SOSSEY-ALAOUI et al., 2001). Portanto, os estudos citogenéticos e moleculares, indicam a importância da região 1p na tumorigênese mamária.

No braço longo do cromossomo 1 são mais freqüentes as descrições da presença adicional de segmentos cromossômicos (RODGERS et al., 1984; FERTI-PASSANTONOPOULOU e PANANI, 1987; HILL et al., 1987; BELLO e REY, 1989; DUTRILLAUX et al., 1990; THOMPSON et al., 1993; TRENT et al., 1993; CAVALLI, 1994; COURJAL e THEILLET, 1997; KUUKASJÄRVI et al., 1997a,b; TEIXEIRA et al., 2002). Este fato levou vários autores (PATHAK, 1980; RODGERS et al., 1984; DUTRILLAUX et al., 1990) a sugerirem que duplicações no braço longo do cromossomo 1 possam conferir vantagem seletiva às células neoplásicas, que também pode ser determinada pela ocorrência de polissomias do cromossomo 1, relacionadas a um prognóstico desfavorável (NAKOPOULOU et al., 2002a). HILL et al. (1987), admitem que segmentos cromossômicos em 1q, mais especificamente em 1q21-qter, contenham genes responsáveis pela codificação de fatores de crescimento celular e o aumento da dose gênica teria um importante papel na proliferação de células cancerosas, independentemente do tecido. No entanto, a ocorrência concomitante de outras aberrações como +7 e +20 e duplicações de 1q, pode ser relevante para a progressão tumoral (TSAROUHA et al., 1999).

TRENT et al. (1993), ao sugerirem um modelo de progressão cariotípica para tumores mamários malignos baseado em pontos de transição (de acordo com o modelo proposto por TLSTY et al., 1992), admitem que num primeiro passo ocorrem alterações em um ou mais genes localizados em cromossomos que freqüentemente se encontram alterados em cânceres primários de mama (por exemplo, em 1p e 6q). Tais alterações determinariam uma instabilidade cromossômica que caracterizaria um segundo ponto de transição, onde alterações envolvendo 1q, 7 e 11 seriam

identificadas. Os autores propuseram este modelo baseando-se em estudos citogenéticos de tumores primários e metastáticos de mama. Os dados apresentados por CAVALLI (1994) concordam com este modelo. No entanto, esta autora apresentou também informações de tumores sem transformação maligna, estando num grau de evolução tumoral anterior aos estudados por TRENT et al. (1993). Desta forma, CAVALLI (1994) identificou alterações cromossômicas específicas, anterior ao processo de malignização como, por exemplo, alterações estruturais envolvendo 1p e 6q. Alterações em 6q foram também observadas em carcinomas infiltrantes, sugerindo que as mesmas ocorrem em estágios iniciais e são mantidas até estágios mais avançados da progressão tumoral, indicando que este cromossomo provavelmente não seja responsável pela transformação neoplásica. Informações no mesmo sentido foram apresentadas por KUUKASJÄRVI et al. (1997a) e por NISHIZAKI et al. (1997). Apesar das freqüentes propostas para estabelecer um modelo de progressão para os tumores de mama, TEIXEIRA et al. (2002), considerando tanto o número modal como aberrações cromossômicas (estruturais e numéricas), concluíram que a grande heterogeneidade cariotípica não permite estabelecer um modelo de progressão linear para a carcinogênese mamária.

TEIXEIRA et al. (2002), analisando 322 cariótipos anormais, descreveram as aberrações estruturais do cromossomo 3 como sendo as mais freqüentes. Em 3p14.2 localiza-se o gene *FHIT* (OTHA et al., 1986) candidato a um gene supressor tumoral. SANTOS (2003) utilizando o marcador D3S1300 detectou 24% de LOH em cânceres esporádicos de mama. Perdas de heterozigosidade neste marcador, intragênico ao *FHIT*, ocorreram em 66,7% concomitantemente ao marcador intragênico D17S855 do gene *BRCA1* sugerindo, segundo a autora, que perdas alélicas no gene *BRCA1* podem levar a uma instabilidade do sítio frágil FRA3B, no qual o gene *FHIT* está contido.

A trissomia do cromossomo 7 já foi descrita em tumores mamários por vários autores (SANDBERG, 1990; BULLERDIEK et al., 1993; PANDIS et al., 1993, 1995; THOMPSON et al., 1993; STEINARSDÓTTIR et al., 1995; CAVALLI et al., 1997; ADEYINKA et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2002), ocorrendo em cerca de 60% dos mesmos (SAUER et al., 1999). Segundo TEYSSEIER e FERRE (1989) e de acordo com os dados de MERTENS et al. (1997) e HIRATA et al. (1998), é provável que o aumento de cópias do cromossomo 7 represente um evento genético seletivo, que

confere uma vantagem proliferativa às células envolvidas nos diferentes estágios de crescimento benigno, pré-maligno a maligno.

Anormalidades estruturais envolvendo o cromossomo 7 são também freqüentemente descritas (GEBHART et al., 1986; FERTI-PASSANTONOPOULOU e PANANI,1987; GELEICK et al., 1990). Estes últimos autores CAVALLI (1994) sugeriram que as mesmas devem estar envolvidas em estágios iniciais da progressão tumoral. Pontos de quebras têm sido descritos tanto no braço curto como no longo deste cromossomo, sendo observados em 7p11 (SASI et al., 1991; THOMPSON et al.,1993), 7p12-14 (CAVALLI,1994; CAVALLI et al.,1997), 7p22-pter (TRENT et al.,1993), 7q32 (GEBHART et al.,1986; GELEICK et al.,1990; CAVALLI,1994; CAVALLI et al.,1997; TEIXEIRA et al., 2002), 7q36 (MERTENS et al.,1997). Em 7p12 foi descrito o gene *EGFR*, responsável pela codificação do fator de crescimento epidérmico (GDB, 2003), presente em pacientes EGFR positivos com tumores indiferenciados e com prognóstico desfavorável (SAINSBURY et al.,1985,1988; DELARUE et al.,1988). Em 7q31 está mapeado o proto-oncogene *MET* e o gene *TES*, um possível supressor tumoral (TOBIAS et al., 2001; GDB, 2003), os quais estão alterados em muitos tumores primários de mama. Nestes tumores, BIÈCHE et al.(1992) detectaram 41% de perda de heterozigosidade em 7q31. Esta perda estava significativamente associada à redução da sobrevida.

THOMPSON et al. (1993) e TRENT et al. (1993), analisando tumores primários e metastáticos de mama, observaram pontos de quebras no cromossomo 7 em 6,7% e 10,3%; no cromossomo 1 em 52,6% e 81,3% e no cromossomo 11 em 5,0% e 9,1%, respectivamente. Baseados nestes dados os autores concluíram que os cromossomos 7, 1 e 11 estão mais freqüentemente envolvidos na progressão cariotípica, caracterizando alterações cromossômicas "competentes" na evolução tumoral.

Monossomias (RODGERS et al.,1984; GELEICK et al.,1990; HAINSWORTH et al.,1991; MITELMAN,1994; PANDIS et al.,1995; CORNÉLIO,1999) e trissomias (HILL et al.,1987; BULLERDIEK et al.,1993; BIÈCHE et al.,1995; CAVALLI et al.,1997; MARK et al.,1999; TEIXEIRA et al., 2002) do cromossomo 8 são descritas com freqüência nos tumores mamários. Segundo BULLERDIEK et al. (1993), a trissomia do 8 deve representar uma alteração genética primária que fornece às células uma vantagem proliferativa que não está diretamente relacionada à

malignidade e que caracteriza um subtipo de carcinoma ductal mamário. Esta sugestão encontra apoio nos dados de CAVALLI (1994) que observou a trissomia do 8 em 56% (14/25) das aberrações cromossômicas encontradas num carcinoma ductal mamário. A hipótese de que a trissomia do 8 represente uma alteração genética primária é também reforçada pelo achado clonal da mesma em tumores benignos (MARK e DAHLENFORS, 1986; CAVALLI, 1994).

ZAFRANI et al. (1992), estudando as regiões homoganeamente coradas (hsr) em 33 tumores de mama, descreveram que 42% das mesmas ocorrem no cromossomo 8, sendo mais comuns em 8p11-22 (TEIXEIRA et al., 2002). Admitindo-se que as hsr sejam a representação citológica das amplificações gênicas, apesar da generalização deste conceito ter sido criticado por SAINT-RUF et al. (1991), as trissomias do cromossomo 8 podem ter a mesma expressão a nível gênico. No entanto, esta analogia não pode ser generalizada. BERNARDINO et al. (1998), por exemplo, verificaram que somente uma minoria das hsr (8)(p1) apresentavam seqüências de DNA do próprio cromossomo 8 e, portanto, o efeito patogênico das hsr (8)(p1) pode não ser o mesmo da trissomia deste cromossomo. No que se refere a monossomia do cromossomo 8, DUTRILLAUX et al. (1990) salientaram que a mesma é um evento secundário na progressão maligna, já que é freqüentemente observada em tumores com muitas aberrações cromossômicas, o que foi, também, descrito por CAVALLI (1994).

Alterações estruturais no cromossomo 8, principalmente as deleções, são comuns em cânceres de mama (GERBAULT-SEREAU, 1987; DUTRILLAUX et al., 1990; PANDIS et al., 1995; KUUKASJÄRVI et al., 1997a,b) e podem envolver a perda de genes supressores tumorais (DUTRILLAUX et al., 1990). A região cromossômica 8q24, onde se localiza o proto-oncogene *MYC* (GBD, 2003) é freqüentemente referida na etiologia do câncer mamário. Amplificações do mesmo têm sido associadas a um prognóstico desfavorável (VARLEY et al., 1987; GARCIA et al., 1989; TSUDA et al., 1989; BORG et al., 1992; COURJAL e THEILLET, 1997; NISHIZAKI et al., 1997). A amplificação do *MYC* deve ser um passo na diversificação e progressão tumoral, assim como para a aquisição de um comportamento biológico agressivo e autônomo (BORG et al., 1992). Recentemente, TAN et al. (2003) apresentaram dados sugestivos de que o gene *MOST-1* (localizado em 8q24.2) é superexpressado em cânceres mamários de alto grau histológico, indicando que o

mesmo esteja envolvido na proliferação e diferenciação celular. As alterações em 8p, também são comuns em cânceres humanos (MERTENS et al.,1997). Perda de heterozigossidade foi descrita em 8p22 (YAREMKO et al.,1995) e associada a um prognóstico desfavorável (TSUNEIZUMI et al., 2002).

Aberrações estruturais no cromossomo 11, tanto no braço curto como no longo, estão entre as mais observadas em tumores de mama (PANDIS et al.,1995; CAVALLI et al.,1997; KUUKASJÄRVI et al.,1997 a,b; CAVALLI et al., 2001), sendo encontradas em cerca de 35% dos tumores estudados (DUTRILLAUX et al.,1990; HAINSWORTH e GARSON,1990). No braço longo, têm sido identificados pontos de quebras principalmente em 11q21-24. Em 11q22.1-22.3, localiza-se o gene *PGR* (receptor de progesterona) e em 11q23.3 estão o gene *ETS1*, um sítio frágil raro (FRA11B) e um sítio frágil comum (FRA11G) (GDB, 2003). Alterações observadas em 11q têm sido associadas a um prognóstico desfavorável. TSUKAMOTO et al. (2001) detectaram uma alta freqüência de aneussomias deste cromossomo em cânceres mamários com metastáses em linfonodos e de alto grau histológico. Também a hipermetilação da região promotora do gene *TSLC1*, localizado em 11q21-24, candidato a supressor tumoral (ALLINEN et al., 2002) e a perda de heterozigossidade em 11q23-24 (NAGAHATA et al., 2002) são associadas a um prognóstico desfavorável. No braço curto, são mais freqüentes descrições de aberrações com ponto de quebra em 11p15 (GEBHART et al.,1986; FERTI-PASSANTONOPOULOU e PANANI,1987; BELLO e REY, 1989; DUTRILLAUX et al.,1990; GELEIK et al.,1990; HAINSWORTH e GARSON, 1990; MITCHELL, 1990; FERTI-PASSANTONOPOULOU et al.,1991; HAINSWORTH et al.,1991; SASI et al.,1991; PANDIS et al.,1993; THOMPSON et al.,1993; TRENT et al.,1993), onde se localizam o oncogene *HRAS*, o gene *IGF2* (fator de crescimento-insulina 2), um sítio frágil comum (FRA11I) e o gene *MYOD1* (fator miogênico 3) (GDB, 2003). Há locos próximos a 11p15 que poderiam ser envolvidos pelas deleções citadas, incluindo 11p12, onde se localiza o gene *ST2* (supressão de tumorigenicidade 2) (GDB, 2003). Em 11p14.2 há um sítio frágil comum (FRA11D) (GDB, 2003). O envolvimento de 11p15 em tumores mamários foi descrito por BELLO e REY (1989) no estudo de efusões metastáticas. CAVALIÉRI (1999) encontrou deleção em 11p15 em 21% das células de um carcinoma ductal infiltrante. A perda de material cromossômico localizado em 11p tem sido correlacionada com a perda de genes

supressores tumorais (THEILLET et al.,1986; MACKAY et al.,1988a; FERTI-PASSANTONOPOULOU et al.,1991; LICHY et al., 1998; ZHOU et al., 1998), principalmente em tumores mais agressivos (BELLO e REY,1989; CHEN et al.,1992; BIÈCHE e LIDEREAU, 1995; KORNIK et al., 1998; ZHOU et al., 1998), o que concorda com a sugestão inicial de DUTRILLAUX et al.(1990), que admitem que as alterações no cromossomo 11 estejam mais relacionadas com a progressão do que com o início dos cânceres de mama.

O cromossomo 17 contém vários genes importantes para o desenvolvimento e/ou progressão dos cânceres mamários, como o supressor tumoral *TP53* localizado em 17p13.1 (HOLLSTEIN et al.,1991; OSBORNE et al.,1991) e o oncogene *ERBB2* em 17q21.1 (SLAMON et al.,1987; ALI et al.,1989). Deleções e translocações em 17p, são as alterações estruturais descritas com maior frequência em tumores mamários (HAINSWORTH e GARSON, 1990; PANDIS et al.,1995; KUUKASJÄRVI et al.,1997a,b; MERTENS et al.,1997; CORNÉLIO,1999). Informações resultantes de estudos moleculares indicam que a maioria destas alterações está relacionada com a perda de heterozigosidade de locos específicos (ROSENBERG et al.,1994; NAGAHATA et al., 2002). Mutações no gene *TP53* e o resultante acúmulo da proteína p53 (que atua em G1, regulando a atividade de ciclinas dependentes de quinases-Cdks) têm sido associados a malignidade pela alta atividade proliferativa, alto grau histológico e ausência de receptores de estrogênio e progesterona (OSBORNE et al.,1991; THOMPSON et al., 1992; BERNARDINO et al.,1998). Perdas de seqüências em 17p parecem representar eventos iniciais na acumulação de alterações genéticas que ocorrem durante a progressão do câncer mamário (SATO et al.,1990; ANDERSEN et al.,1992; EIRIKSDOTTIR et al., 1998).

Em 17q21 está localizado o gene *BRCA1*, relacionado às formas de câncer familiar de mama (HALL et al.,1990) e de ovário (NAROLD et al.,1991). Também, alterações em 17q25 são comumente descritas (CAVALLI, 1994; CAVALLI et al.,1995). Próximo a esta região, foram mapeados os genes que codificam as proteínas tirosinas quinases (*TK1* em 17q23.2-25.3) e os hormônios de crescimento (*GH1* e *GH2* em 17q22-24) (GDB, 2003). Segundo SAITO et al. (1993), o braço longo do cromossomo 17, além de conter o gene responsável pelas formas hereditárias dos cânceres de mama e de ovário, parece conter um ou mais genes com importantes funções no desenvolvimento e/ou progressão do câncer mamário,

como o *ERBB2*, cuja amplificação tem sido considerada um importante fator prognóstico (BROSE et al., 2001; LUOH, 2002).

Um segundo gene, *BRCA2* relacionado ao câncer de mama familiar foi descrito em 13q12-13 (WOOSTER et al., 1994). Evidentemente que a descoberta destes genes e o estudo de outros genes como, por exemplo, o *TSG101* (BALZ et al., 2002), são de grande importância para a detecção populacional e familiar de mutações que determinam um risco aumentado para o desenvolvimento de cânceres de mama e de ovário (BROSE et al., 2002), por proporcionarem informações prognósticas (NAKOPOULOU et al., 2002) e, inclusive, para a avaliação do envolvimento dos mesmos em cânceres esporádicos (KWIATKOWSKA et al., 2002; SANTOS, 2003).

Monossomias e trissomias do cromossomo 18 têm sido descritas em carcinomas primários e metastáticos de mama (GEBHART et al., 1986; TEYSSER, 1989; GELEICK et al., 1990; PANDIS et al., 1993, 1995, 1998; BULLERDIEK et al., 1994; CAVALLI, 1994; BURBANO et al., 1996b; ADEYINKA et al., 1997, 1998; CAVALLI et al., 1997; BERNARDINO et al., 1998; CORNÉLIO, 1999; SCHMID-BRAZ, 2000; WUICIK, 2000; TEIXEIRA et al., 2002), podendo a ocorrência de monossomias estar relacionada à evolução e à agressividade tumoral (ADEYINKA et al., 1999; CLIMENT et al., 2002; DELLAS et al., 2002). No entanto, as informações disponíveis não permitem definir a importância das aneuploidias do cromossomo 18 na gênese primária ou secundária dos carcinomas mamários (CORNÉLIO, 1999).

Monossomias e trissomias do cromossomo 19 são também comuns em carcinomas primários e metastáticos de mama (GEBHART et al., 1986; FERTI-PASSANTONOPOULOU e PANANI, 1987; GELEICK et al., 1990; BURBANO, 1993; CAVALIÉRI, 1993; PANDIS et al., 1993, 1995; THOMPSON et al., 1993; CAVALLI, 1994; CAVALLI et al., 1997; ADEYINKA et al., 1998; CORNÉLIO, 1999; SCHMID-BRAZ, 2000; WUICIK, 2000; TEIXEIRA et al., 2002), e ainda em displasias e tumores benignos de mama (BURBANO, 1993; CAVALIÉRI, 1993; CAVALLI, 1994; CAVALLI et al., 1998). Estes últimos achados são sugestivos de que o cromossomo 19 esteja mais relacionado com estágios iniciais de tumorigênese mamária, do que com a transformação maligna destes tumores.

A monossomia do cromossomo X é uma aberração freqüentemente descrita em tumores benignos e malignos (CAVALLI, 1994; BURBANO et al., 1996a,b;

CAVALLI et al., 1997; BERNARDINO et al., 1998; CORNÉLIO, 1999; TEIXEIRA et al., 2002). O fato desta monossomia ser descrita em tecidos normais e em diferentes tumores benignos e malignos humanos, resultou no questionamento de que a mesma não seja uma alteração câncer-específica (ROGATTO et al., 1994), o que poderia indicar que ocorra preferencialmente a perda do X inativo. Embora sejam poucos os trabalhos sobre a avaliação da ausência preferencial do X ativo ou inativo, DUTRILLAUX et al. (1986) e ATKIN et al. (1989), já na década de 80, empregando BrdU para análise da replicação deste cromossomo em diferentes cânceres de tecidos sólidos indicaram que o cromossomo X inativo é o que se apresenta freqüentemente ausente. KRISTIANSEN et al. (2002), verificaram que pacientes jovens (27 a 45 anos de idade) com câncer de mama apresentam altas freqüências de inativação preferencial de um dos cromossomos X, com diferença significativa, quando comparado com o grupo controle. O padrão para inativação do cromossomo X foi estabelecido quando 90% ou mais células apresentaram inativação preferencial de um dos cromossomos X. Os autores sugeriram como uma das explicações que uma mutação em um gene supressor tumoral na linhagem germinativa pode proporcionar uma vantagem proliferativa às células com esta mutação no X ativo. Os dados apresentados por PIAO e MALKOSYAN (2002), analisando LOH em Xq25 reforçam esta sugestão e enfatizam a importância dos genes supressores tumorais na carcinogênese mamária (RONCUZZI et al., 2002).

São poucos os dados da literatura que se referem ao número modal em tumores benignos (ZHANG et al., 1989; CAVALLI, 1994). A maioria deles fornece informações sobre os tumores malignos e nestes, a freqüência de células com número cromossômico normal, descrito por diversos autores é bastante variável, sendo as diferenças devidas, provavelmente, à metodologia empregada (HAINSWORTH e GARSON, 1990). Além das diferenças introduzidas por análises cromossômicas com e sem bandeamento (CAVALLI, 1994), a forma como as metáfases são obtidas, se pelo método direto ou quando as células são cultivadas, interferem significativamente (HAINSWORTH e GARSON, 1990). Uma análise conjunta dos dados da literatura indica que uma freqüência média de cerca de 35% de células diplóides normais, como descrito por GELEICK et al. (1990), por CAVALLI (1994) e por TEIXEIRA et al. (2002) com o emprego do bandeamento G, nos tumores benignos e malignos, seja a que, provavelmente, esteja mais próxima do

esperado. A presença destas células em neoplasias malignas tem sido analisada por diferentes autores (BELLO e REY, 1989; GELEICK et al., 1990; PANDIS et al., 1993), sem uma resposta conclusiva. Também não são conclusivos os estudos sobre o número modal e a progressão tumoral (NOWELL, 1976,1986; GEBHART et al., 1986; NIELSEN et al., 1987, 1989; BELLO e REY, 1989; DUTRILLAUX et al., 1990; GELEICK et al., 1990; SANDBERG, 1990; THOMPSON et al., 1993; TRENT et al., 1993; CAVALLI, 1994). VAL et al. (2002) apresentaram dados demonstrando que a expressão dos genes *EGFr* e *ERBB2*, envolvidos na proliferação celular, é significativamente maior em carcinomas mamários aneuplóides do que nos diplóides. FABARIUS et al. (2003) descreveram que as aberrações estruturais aumentam exponencialmente com o grau de ploidia e concluem que as aneuploidias estão diretamente envolvidas na origem da instabilidade estrutural dos cromossomos. Estas últimas informações reforçam a importância de obtermos um maior número de dados sobre o número modal em tumores benignos e malignos humanos. Desta forma, uma análise mais precisa possibilitará uma melhor definição da relação entre os diferentes graus de ploidia e a progressão tumoral.

II - OBJETIVOS

1. Contribuir para o conhecimento citogenético das lesões mamárias humanas, analisando a casualidade da ocorrência das alterações cromossômicas observadas nos diferentes cromossomos do genoma.
2. Identificar as alterações cromossômicas recorrentes nas lesões mamárias benignas e malignas não tratadas, tentando estabelecer um possível papel destas alterações na gênese ou progressão tumoral.
3. Correlacionar as alterações cromossômicas recorrentes encontradas com aquelas descritas na literatura, inclusive com o quadro clínico, numa tentativa de auxiliar no diagnóstico e no prognóstico.
4. Associar os pontos de quebras encontrados com a localização de oncogenes, genes supressores tumorais, genes envolvidos no sistema de reparo do DNA, fatores de crescimento e sítios frágeis, descritos na literatura.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram estudadas, citogeneticamente, dez lesões mamárias provenientes de dez pacientes diferentes do sexo feminino. A amostra foi dividida em dois grupos: o grupo de lesões benignas da mama (tabela 1) e o grupo de tumores malignos da mama (tabela 2).

TABELA 1- IDADE DAS PACIENTES, CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E CLÍNICAS DAS LESÕES BENIGNAS

Caso	Idade	Tipo Histológico	Bilateralidade
1	19	fibroadenoma	não
2	17	fibroadenoma	não
3	22	fibroadenoma	não
4	19	Mama supranumerária	sim
5	77	tumor filóide	não

TABELA 2- IDADE DAS PACIENTES, CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E CLÍNICAS DOS TUMORES MALIGNOS

Caso	Idade	Tipo Histológico	Grau de Diferenciação	Envolvimento de Linfonodos
6	41	ca. ductal infiltrante	Grau II	sim
7	49	ca. ductal infiltrante	Grau III	não
8	84	ca. ductal infiltrante	Grau II	não
9	55	ca. ductal infiltrante	Grau I	não
10	25	ca. ductal infiltrante	Grau III	sim

ca. = carcinoma.

2- COLETA DO MATERIAL

As amostras de tecidos de lesões mamárias foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) (Casos 1, 2, 3, 7, 9 e 10) e no Hospital Nossa Senhora das Graças (Casos 4, 5, 6 e 8), ambos em Curitiba, PR.

As amostras provenientes de pacientes não tratadas foram obtidas por remoção cirúrgica e colocadas em frascos estéreis, devidamente etiquetados com o nome e idade das pacientes, data da cirurgia e nome do cirurgião responsável. Posteriormente, foram transferidas para o laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética da UFPR onde foram imediatamente processadas em câmara asséptica contendo fluxo laminar, luz UV, ambos ligados com 30 minutos de antecedência, e bico de Bunsen. Parte do material foi analisado histopatologicamente como rotina hospitalar e, em seguida, reavaliado por um único patologista. Cada amostra que chegou ao laboratório foi cuidadosamente registrada em um livro de controle de entrada de material.

3- CULTURA CELULAR

A técnica utilizada para o cultivo das células mamárias foi a de desagregação enzimática através da colagenase isolada da Clostridium histolyticum. A colagenase é uma enzima hidrolítica não citotóxica que mantém eficiência máxima em meio isotônico em pH 6,5 a 7,8 (LASFARQUES, 1975). A colagenase foi utilizada porque não afeta a estrutura das células tumorais e a sua introdução, juntamente com culturas primárias em curto prazo, tem possibilitado a obtenção de um bom número de metáfases, com boa qualidade dos cromossomos em vários tumores sólidos (WAKE et al., 1981).

3.1- Dissociação do Material e Desagregação Enzimática

Em fluxo laminar, o material foi colocado em placa de Petri estéril e, com auxílio de tesoura e pinça cirúrgicas estéreis, áreas necrosadas, gordurosas e sanguinolentas da peça foram cuidadosamente removidas.

O tecido limpo foi transferido para outra placa de Petri e seccionado com o auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril, em pequenos fragmentos. Em seguida, os fragmentos foram transferidos utilizando-se uma pipeta Pasteur estéril para um tubo de centrífuga estéril de 15ml onde foram adicionados 10ml de meio de cultura. O material foi ressuscitado e sedimentado por centrifugação (500 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e, caso o material apresentasse resíduos de gordura ou sangue, repetia-se o procedimento anterior quantas vezes fossem necessárias.

Em seguida procedeu-se à desagregação enzimática, onde o material foi ressuscitado em 5ml de solução de collagenase (WAKE et al., 1981) e incubado em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora.

3.2- Método e Colheita da Cultura

Após o período necessário para uma completa desagregação celular, onde o material apresentava um aspecto viscoso, retirou-se a solução de collagenase por centrifugação (500 rpm) durante 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 10ml de meio HAM F-10, ressuscitou-se delicadamente o botão celular e, em seguida, centrifugou-se novamente (500 rpm) por 15 minutos. Descartado o sobrenadante, acrescentou-se de 6 a 8 ml de meio HAM F-10 suplementado com 20% de soro bovino fetal. A suspensão celular resultante foi transferida para dois frascos de cultura de tecidos e incubado a 37°C por uma hora, tempo necessário para que os fibroblastos pudessem aderir à superfície dos frascos, ficando as células tumorais em suspensão, de acordo com a técnica de aderência celular (DASGUPTA et al., 1987), que considera que os macrófagos e células

mesoteliais aderem mais rapidamente ao frasco do que as células tumorais. Tal suspensão foi retirada cuidadosamente do frasco e redistribuída em novos frascos de cultura (3 a 5, dependendo da quantidade de células disponíveis) devidamente identificados, iniciando-se o cultivo celular em estufa a 37°C. Os frascos de cultura de cada tumor permaneciam sem ser manipulados por um período de 2 a 4 dias, tempo para que houvesse uma perfeita adesão celular à superfície do frasco. Após este período, as culturas eram alimentadas de 2 a 3 vezes por semana, descartando-se metade do meio antigo e adicionando-se 2,5ml de meio HAM F-10, suplementado com 20% de soro bovino fetal, a 37°C.

Os frascos de cultura eram observados diariamente através de um microscópio invertido para avaliar a atividade mitótica das células e estabelecer o momento certo para a colheita da cultura.

Para aumentar o número e a qualidade das metáfases, foi utilizado para a colheita o método de sincronização celular descrito por YUNIS (1976), com modificações. Quando a cultura continha um alto índice celular, sem áreas de confluência, adicionava-se 0,2ml de solução de metotrexato (MTX) por 17 horas, a fim de bloquear as células na fase S. Transcorrido este período, adicionou-se 0,2ml de solução de timidina que agiu durante 6 horas, e, em seguida, foi colocado 0,2ml da solução de colchicina por aproximadamente 13 horas.

Após este período, as células foram removidas da superfície do frasco com o auxílio de uma pipeta Pasteur e através de um tratamento com solução de tripsina. O material foi transferido para um tubo de centrifuga (15ml) e centrifugado a 800 rpm durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 5ml de solução hipotônica a 37°C (KCl 0,075M). O material foi ressuspenso gentilmente com auxílio de uma pipeta Pasteur e incubado a 37°C por 10 minutos. Decorrido este tempo, centrifugou-se durante 8 minutos a 800 rpm, descartou-se o sobrenadante e as células foram fixadas em 5ml de metanol e ácido acético glacial (3:1), ressuspendendo-se cuidadosamente o material que permaneceu por 15 minutos em temperatura ambiente. O fixador foi trocado pelo menos mais duas vezes, após centrifugação a 800 rpm durante 8 minutos, até obter um botão celular límpido. Ao sedimento final acrescentou-se aproximadamente 2ml de fixador para a confecção das lâminas.

4- BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

O bandeamento cromossômico GTG foi realizado segundo a técnica de SCHERES (1972), com modificações. As lâminas foram preparadas pingando-se duas ou três gotas do material fixado com um dia (em temperatura ambiente) ou com 2 a 24 horas (mantidas em estufa a 37°C) de antecedência. Após este período, as lâminas foram imersas em solução salina duplamente citratada (2SSC) por 5 minutos; lavadas com água destilada e, em seguida, mergulhadas em solução de tripsina 0,04% a 37°C diluída em tampão fosfato pH 6,8, por um tempo variável de 12 a 15 segundos, dependendo da preparação. Em seguida, a ação da enzima foi interrompida mergulhando-se as lâminas rapidamente em solução salina 0,9%, contendo 1ml de soro bovino fetal e, por último, coradas durante 8 a 10 minutos em solução de Giemsa, diluída em tampão fosfato pH 6,8, lavadas com água destilada e deixadas secar ao ar. Depois de secas, cada lâmina foi verificada em microscópio comum onde as metáfases com bom padrão de bandeamento foram analisadas.

5- ANÁLISE CROMOSSÔMICA E FOTOMICROGRAFIA

Após o bandeamento GTG, foram analisadas de 14 (caso 10) a 56 metáfases (caso 7) ($X=23,7\pm 11,89$). Em seguida, cada célula foi desenhada, classificada, fotomicrografada e cariotipada.

As metáfases foram fotomicrografadas em microscópio comum equipado com câmara fotográfica automática, com objetiva 100x e filtro verde. Foi utilizado o filme Imagelink (Kodak), 35mm e ASA 6. Para a revelação do filme, foram usados o revelador Dektol-Kodak (1 minuto e meio a 20°C) e fixador-Kodak (10 minutos a 20°C). As fotografias foram copiadas em papel Kodabrome Print RCF 3 Kodak, com revelador Kodak (1 minuto a 20°C) e fixador Kodak (15 minutos a 20°C). Depois de lavadas em água corrente e secas, as fotos foram recortadas e os cariótipos montados de acordo com os desenhos obtidos durante a análise ao microscópio.

Para identificação e classificação das aberrações cromossômicas clonais utilizou-se a nomenclatura recomendada pelo ISCN (1995). As aberrações

estruturais foram consideradas clonais quando uma mesma aberração foi detectada em duas ou mais células, e as numéricas foram consideradas clonais quando havia a presença adicional de um mesmo cromossomo em duas ou mais células ou a ausência de um mesmo cromossomo em três ou mais células (ISCN, 1995). Nos casos (4,5 e 8) onde havia tanto células monossômicas como nulissômicas para um mesmo cromossomo, consideraram-se também as últimas para a clonalidade da monossomia em questão. Na apresentação dos resultados, as aberrações cromossômicas clonais estão destacadas em negrito e os símbolos utilizados nas fotomicrografias como: "O" - indica a falta de um cromossomo; "L" - destaca as aberrações estruturais e o ganho de um cromossomo.

6- MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Meio de cultura: meio HAM F-10 da Sigma suplementado com 0,5ml/l de insulina (0,01 U/ml da Biobrás); 10U/ml de penicilina; 5ml/l de vitamina TC minimal Eagle 100x (Difco); 15µg/l de glutathione; 1ml/l de neomicina; 292mg/l de L-glutamina; 1,4 g/l de bicarbonato de sódio diluído em água ultra-pura autoclavada, pH final igual a 7,0. Depois de pronto, o meio foi esterilizado por filtração, aliquoteado em frascos de 45ml estéreis e conservado em geladeira. Na hora do uso, foi aquecido a 37°C e suplementado com 20% de soro bovino fetal para alimentar as culturas.

Solução de colagenase: 0,01g de colagenase tipo IV do Sigma dissolvido em 5ml de meio por tumor, concentração 0,4%. Após a dissolução, esta solução foi esterilizada por filtração e foi preparada sempre no momento do uso.

Solução de tripsina para cultura: 137mM de NaCl; 5,4mM de KCl; 0,42mM de Na₂HPO₄; 0,44mM de KH₂PO₄; 5,0mM de dextrose; 3mM de NaHCO₃; 2mg% de vermelho de fenol; 0,53mM de EDTA; 50mg% de tripsina Sigma 1:250, diluídos em água ultra-pura autoclavada, pH final a 7,4, esterilizada por filtração, aliquoteada em frascos de 45ml estéreis e conservada em geladeira.

Solução de metotrexato: 0,73ml de solução estoque (25mg de MTX/ml) diluídos em 39,27 ml de meio de cultura, numa concentração final de 10⁻⁵M. A solução foi estocada em frascos de 5ml, vedadas com papel alumínio e, então, guardadas em freezer a -20°C.

Solução de timidina: 5mg de timidina Sigma T 9250 dissolvidos em 20 ml de meio de cultura, numa concentração final de $10^{-3}M$, que foi dividida em frascos de 5ml, vedadas com papel alumínio e guardadas em freezer a $-20^{\circ}C$.

Solução de colchicina: em 1ml de solução estoque (1g/25ml de água destilada) foram adicionados 1,5ml de água destilada para o uso; concentração final de $0,016 \mu g/ml$.

Solução hipotônica 0,075M: 0,56g de KCl diluídos em 100ml de água destilada estéril.

Solução de Giemsa: diluiu-se 1ml da solução em 10ml de tampão fosfato Sorensen 0,06M, pH 6,8, mais 29ml de água destilada. A solução foi preparada no momento do uso e utilizada a temperatura ambiente.

Solução salina duplamente citratada (2SSC): 17,35g de cloreto de sódio, 8,82g de citrato de sódio diluídos em 1000ml de água destilada, pH 7,0. A solução foi conservada na geladeira, sendo usados 40ml de cada vez a temperatura ambiente.

Solução de tripsina para bandeamento GTG: 0,04g de tripsina (tipo II Sigma) diluída em 40ml de solução salina 0,9% (9,0g de NaCl em 1000ml de água destilada).

7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A casualidade da ocorrência das alterações cromossômicas clonais nos diversos cromossomos do genoma, as diferenças na proporção de aberrações numéricas e estruturais clonais foram avaliadas pelo teste χ^2 conforme as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1988).

IV - RESULTADOS

1- LESÕES BENIGNAS DA MAMA

Caso 1- Fibroadenoma

Vinte metáfases foram analisadas com bandeamento GTG, as quais apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

40,X,-X,+3,-8,-10,-11,-18,-20,-22

44,X,-X,-2

44,XX,-4,-19

44,XX,-7,-20

45,XX,-4

45,XX,-14

46,XX,+del(2)(p16),-8

46,XX,del(17)(p12)[2]

46,XX[11]

O cariótipo encontrado foi o seguinte:

46,XX,del(17)(p12)[2]/46,XX[11].

Das 20 células analisadas, 11 (55%) apresentaram cariótipo normal e 9 (45%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, duas (22,22%) possuíam aberrações clonais e sete (77,78%) possuíam aberrações não clonais. A aberração clonal observada foi a deleção no braço curto do cromossomo 17. A figura 2 ilustra a del(17)(p12) observada no caso 1.

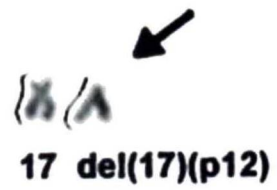
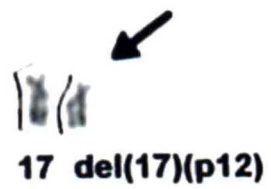


Figura 2- Cariótipos parciais mostrando a del(17)(p12) observadas no caso 1.

Caso 2- Fibroadenoma

Vinte e três metáfases foram analisadas com bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

39,XX,-1,-8,-12,-16,-19,-20,-21

41,XX,-1,-4,-10,-16,-21

41,XX,-6,-7,-12,-19,-22

42,X,-X,-7,-9,-15

44,XX,-4,-12

44,XX,-6,-13,-19,+21

45,XX,-15,-18,+21

46,XX,-1,+18

46,XX,+3,-16,+21,-22

47,X,-X,-3,+16,+17,+21

47,XX,-9,+16,+21

47,XX,-1,-6,-12,+16,+18,+21,+22

47,XX,-6,+17,+20

47,XX,+18

47,XX,+20

47,XX,+22

48,XX,+12,+21

48,XX,+16,+18

49,XX,+15,+16,+18

46,XX[4]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

39~49,XX,-1[4],-6[4],-12[4],+16[5],-16[3],+17[2],+18[5],-19[3],+20[2],+21[7],+22[2]

[cp18]/46,XX[4].

Das 23 células analisadas, 4 (17,4%) apresentaram cariótipo normal e, 18 (78,3%) apresentaram aberrações cromossômicas clonais, com onze clones com diferentes aberrações numéricas: cinco monossomias (dos cromossomos 1, 6, 12, 16 e 19) e seis trissomias (dos cromossomos 16, 17, 18, 20, 21 e 22). A figura 3 apresenta o cariótipo de uma célula com aberrações clonais numéricas dos cromossomos 16 e 18, observada no caso 2.

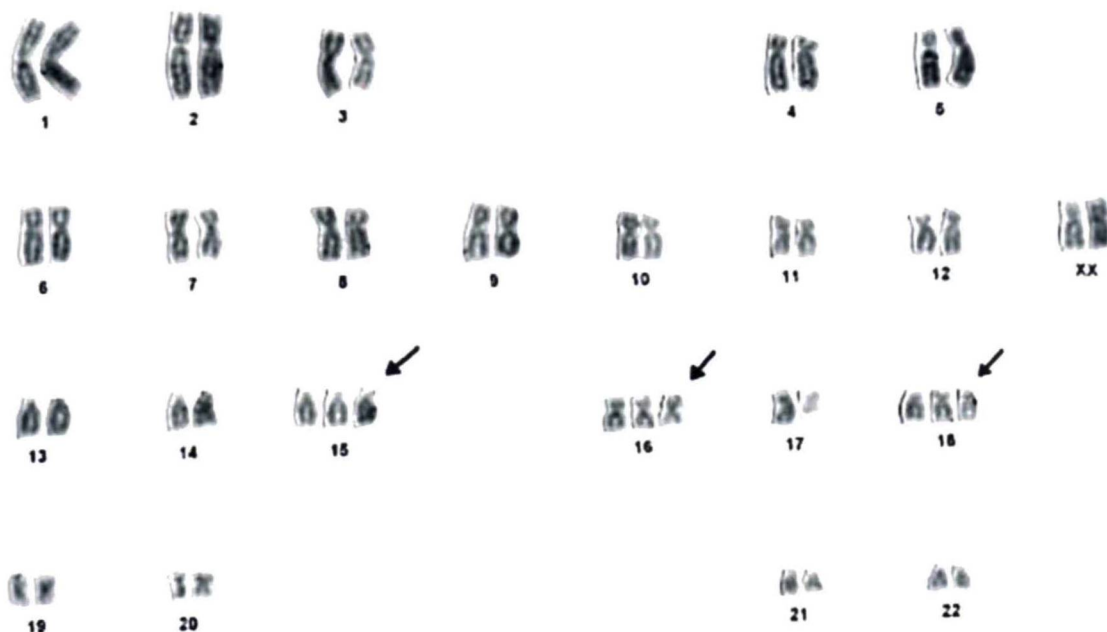


Figura 3- Metáfase 49,XX,+15,+16,+18 observada no caso 2.

Caso 3- Fibroadenoma

Vinte e duas metáfases foram analisadas com bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

42,X,-X,-2,-6,-11

44,XX,-12,-15

45,XX,-7

45,XX,-12

46,XX,-4,+16

47,XX,-2,-6,+15,+16,+21

47,XX,+21[3]

48,X,-X,+16,+18,+21

46,XX[12]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

46~48,XX,+16[3],+21[5][cp6]/46,XX[12].

Das 22 células analisadas, 12 (54,55%) apresentaram cariótipo normal e 10 (45,45%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, seis (60%) apresentaram aberrações clonais e quatro (40%) apresentaram aberrações não clonais. Doze diferentes aberrações foram observadas (oito monossomias e quatro trissomias), das quais, apenas duas formaram clone: uma trissomia do cromossomo 16 e uma trissomia do cromossomo 21. A figura 4 apresenta o cariótipo de uma das células com aberração clonal numérica do cromossomo 21, observada no caso 3.

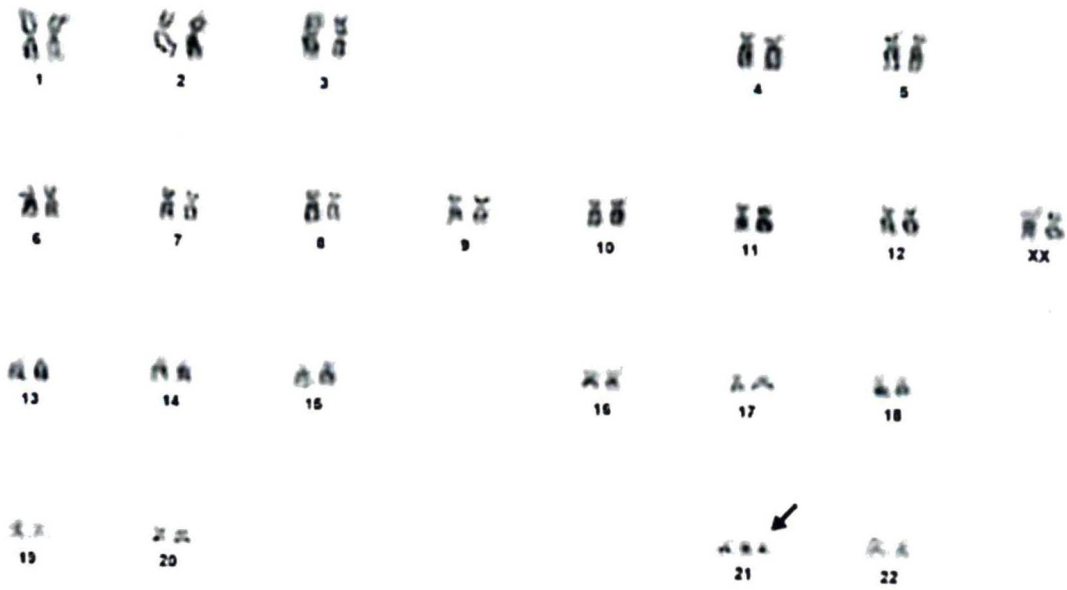


Figura 4- Metáfase 47,XX,+21 observada no caso 3.

Caso 4- Mama Supranumerária

Dezenove metáfases foram analisadas com bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

36,X,-X,-3,-7,-11,-13,-14,-16,-17,-19,-20

41,XX,-2,-8,-17,-21,-22

42,XX,-13,-14,-15,-21

43,XX,-8,-19,-21

43,XX,-17,-17,-20

43,XX,-19,-21,-22

44,XX,-13,-18

45,X,-X

45,XX,-6

45,XX,+16,-17,-17

45,XX,-16,-17,+18,-19,+20

45,XX,-17[2]

46,X,-X,+20

46,XX,-8,+20

46,XX[4]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

36~46,X,-X[3],-13[3],-17[7],-19[4],+20[3],-21[4][cp14]/46,XX[4].

Das 19 células analisadas, quatro (21,05%) apresentaram cariótipo normal e quinze (78,95%) apresentaram aberrações cromossômicas, das quais 14 apresentaram aberrações numéricas clonais: cinco monossomias (dos cromossomos X, 13, 17, 19 e 21) e uma trissomia (do cromossomo 20). A figura 5 apresenta o cariótipo de uma célula com aberrações clonais numéricas dos cromossomos 17, 19 e 20, observada no caso 4.

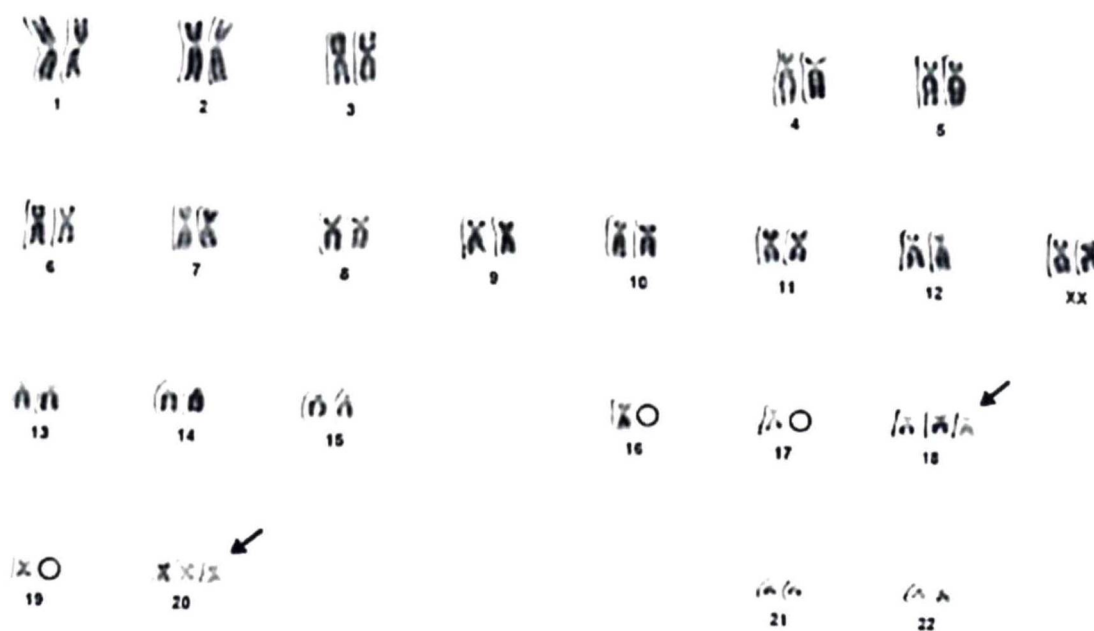


Figura 5- Metáfase 45,XX,-16,-17,+18,-19,+20 observada no caso 4.

Caso 5- Tumor Filóide

Vinte e sete metáfases foram analisadas com bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

45,X,-X,+3,-14,-14,+16,-17,+21,-22,+mar1

46,X,-X,+mar1

46,XX,-4,-6,+21,+mar1

47,X,-X,-11,+19,+21,+mar1

48,XX,-7,-11,+19,+mar1x3

50,X,-X,-1,+2,-6,+17,+18,+19,+20,+mar1,+mar2

52,X,-X,+2,+3,+16,+19,+20,+21,+mar1

54,X,-X,+3,+5,-7,-8,+12,+14,+15,+19,+20,+21,+22,+mar1x2

57,XX,+X,+2,+8,+9,+11,+12,+14,+15,+21,+mar1,+mar2

57,XX,+2,-4,+6,+8,+9,+11,+16,+17,+18,+19,+21,+mar1x2

58,XX,+1,+3,+8,+9,+10,+12,+17,+18,+20,+21,+mar1x2

59,X,-X,+2,+6,+7,+8,+9,+10,+11,+12,+16,+18,+19,+20,+mar1x2

59,XX,+1,+6,+7,+10,+11,+12,+16,+17,+18,+20,+21,+mar1x2

59,XX,+2,+8,+10,+11,+12,+14,+15,+17,+18,+19,+20,+21,+mar1

59,XX,+3,-4,-4,+7,+11,+12,+14,+15,+16,+17,+18,+19,+20,+21,+mar1x2,+mar3

59,XX,+3,+5,+10,+11,+12,+16,+18,+19,+21,+22,+mar1x2,+mar3

60,X,-X,+1,+2,+3,+8,+10,+11,+12,+16,+17,+18,+20,+21,+mar1x2,+mar2

60,XX,+1,+2,+6,+7,+10,+14,+16,+17,+18,+19,+20,+mar1x2,+mar3

60,XX,+3,+5,+10,+11,+12,+16,+18,+19,+20,+21,+22,+mar1x2,+mar3

60,XX,+4,+5,+8,+12,+14,+15,+17,+19,+20,+21,+22,+mar1x2,+mar2

61,X,-X,+7,+10,+11,+12,+14,+15,+16,+17,+18,+19,+20,+21,+mar1x2,+mar3,+mar4

61,XX,+X,+3,+6,+8,+11,+12,+16,+17,+18,+19,+20,+21,+22,+mar1x2

61,XX,+1,+3,+4,+6,+8,+9,+11,+16,+17,+18,+19,+20,+21,+mar1x2

61,XX,+3,+5,+6,+8,+9,+11,+12,+16,+18,+19,+20,+21,+22,+mar1x2

61,XX,+5,+11,+14,+15,+16,+17,+18,+19,+20,+21,+22,+mar1x2,+mar3,+mar4

62,XX,+3,+6,+8,+10,+11,+12,+15,+16,+18,+19,+20,+21,+22,+mar1x2,+mar3

63,XX,+X,+2,+6,+8,+10,+11,+12,+13,+14,+16,+17,+18,+19,+20,+mar1x3

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

45~63,X,-X[9],+X[3],+1[5],+2[9],+3[12],-4[3],+4[2],+5[6],+6[9],+7[5],+8[12],+9[6],

+10[11],+11[16],+12[16],+14[9],+15[8],+16[17],+17[14],+18[18],+19[20],+20[19],

+21[21],+22[8],+mar1[8],+mar1x2[17],+mar1x3[2],+mar2[4],+mar3[7],+mar4[2][cp27].

As 27 metáfases analisadas apresentaram aberrações cromossômicas. Foram observadas 39 diferentes aberrações numéricas, sendo que, 30 (76,92%) formaram clones e nove (23,08%) não. Dos 30 clones numéricos observados, 28 (93,33%) eram trissomias (dos cromossomos X, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e cromossomos marcadores) e duas (6,67%) monossomias (dos cromossomos X e 4). A figura 6 apresenta o cariótipo de uma célula com aberrações clonais numéricas e a figura 7 os cromossomos marcadores, observados no caso 5.

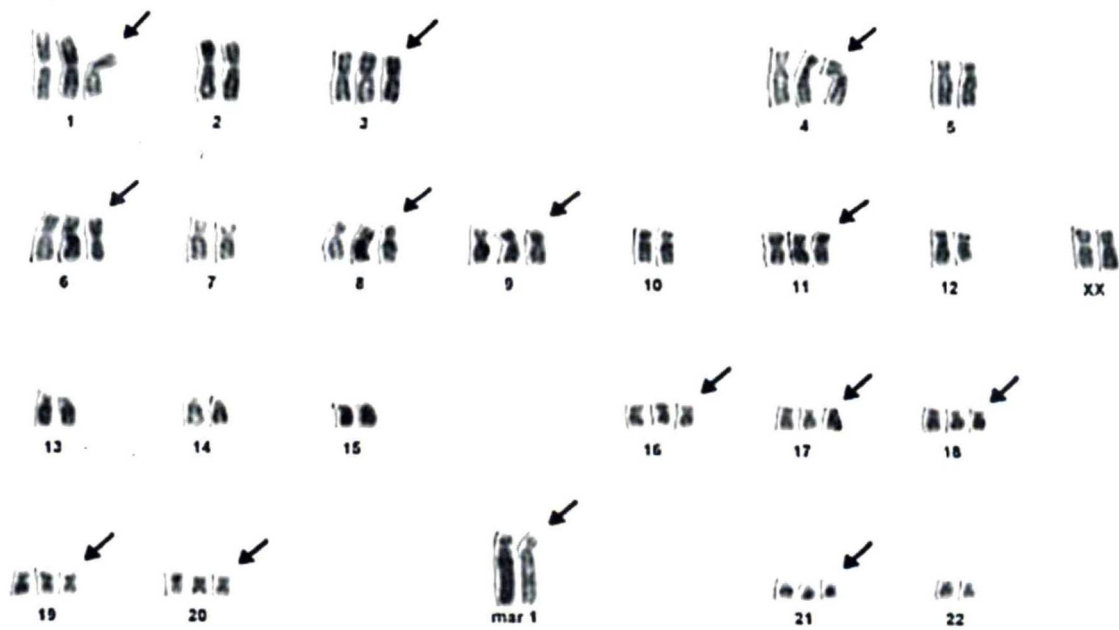


Figura 6- Metáfase 61,XX,+1,+3,+4,+6,+8,+9,+11,+16,+17,+18,+19,+20,+21,+mar1x2 observada no caso 5.



Figura 7- Cromossomos marcadores observados no caso 5.

Síntese dos Resultados das Lesões Benignas da Mama

A tabela 3 apresenta a idade das pacientes, o tipo histológico e o resumo dos dados citogenéticos das cinco lesões benignas da mama estudadas neste trabalho.

Foram analisadas 111 células metafásicas ($\bar{x} = 22,2 \pm 3,1$) com bandeamento GTG, das quais 31 (27,9%) apresentaram cariótipos normais e 80 (72,1%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, 67 (83,7%) apresentaram aberrações clonais e 13 (16,3%) apresentaram aberrações não clonais.

As aberrações cromossômicas clonais numéricas e estruturais por cromossomo, bem como suas frequências, observadas nas cinco lesões benignas, estão apresentados na tabela 4 e na figura 8. Nelas não foram incluídos os cromossomos marcadores.

As aberrações clonais ocorreram preferencialmente nos cromossomos 16, 17, 18, 19, 20 e 21, indicando que as mesmas não ocorreram ao acaso em todos os cromossomos do genoma, o que se confirmou quando os dados da tabela 4 foram submetidos ao teste do χ^2 que apresentou um valor significativo ao nível de 0,1% ($\chi^2_{22} = 123,44$; $p < 0,001$).

Das aberrações cromossômicas clonais numéricas as trissomias envolveram todos os cromossomos do genoma, com exceção do cromossomo 13, as quais podem ser evidenciadas nas tabelas 3 e 4 e no gráfico da figura 8. As trissomias recorrentes foram: +16 (casos 2, 3 e 5), +17 e +18 (casos 2 e 5), +20 (casos 2, 4 e 5) e +21 (casos 2, 3 e 5). As monossomias envolveram os cromossomos 1, 4, 6, 12, 13, 16, 17, 19, 21 e X, sendo que as mais recorrentes foram: -X (casos 4 e 5) e -19 (casos 2 e 4).

O caso 5 foi o principal responsável pela alta frequência de trissomias observadas nas lesões benignas da mama.

A única aberração estrutural clonal foi a deleção no braço curto do cromossomo 17 (del(17)(p12)) observada no caso 1.

TABELA 3- IDADE DAS PACIENTES, TIPO HISTOLÓGICO E RESUMO DOS DADOS CITOGENÉTICOS DAS CINCO LESÕES BENIGNAS DA MAMA

CASO	IDADE	TIPO HISTOLÓGICO	Nº DE CÉLULAS (GTG)	CARIÓTIPO
1	19	FIBROADENOMA	20	46,XX, del(17)(p12)[2]/46,XX[11].
2	17	FIBROADENOMA	23	39~49,XX,-1[4],-6[4],-12[4],+16[5],-16[3],+17[2],+18[5],-19[3],+20[2],+21[7],+22[2][cp18]/46,XX[4].
3	22	FIBROADENOMA	22	46~48,XX,+16[3],+21[5][cp6]/46,XX[12].
4	19	MAMA SUPRANUMERÁRIA	19	36~46,X,-X[3],-13[3],-17[7],-19[4],+20[3],-21[4][cp14]/46,XX[4].
5	77	TUMOR FILÓIDE	27	45~63,X,-X[9],+X[3],+1[5],+2[9],+3[12],-4[3],+4[2],+5[6],+6[9],+7[5],+8[12],+9[6],+10[11],+11[16],+12[16],+14[9],+15[8],+16[17],+17[14],+18[18],+19[20],+20[19],+21[21],+22[8],+mar1[8],+mar1x2[17],+mar1x3[2],+mar2[4],+mar3[7],+mar4[2][cp27].

TABELA 4- ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS CLONAIS NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS OBSERVADAS NAS LESÕES BENIGNAS DA MAMA

CROMOSSOMO	ABERRAÇÕES NUMÉRICAS		ABERRAÇÕES ESTRUTURAIS	TOTAL	FREQÜÊNCIAS (%)
	MONOSSOMIAS	TRISSOMIAS			
1	4	5	-	9	2,7
2	-	9	-	9	2,7
3	-	12	-	12	3,6
4	3	2	-	5	1,5
5	-	6	-	6	1,8
6	4	9	-	13	3,9
7	-	5	-	5	1,5
8	-	12	-	12	3,6
9	-	6	-	6	1,8
10	-	11	-	11	3,3
11	-	16	-	16	4,8
12	4	16	-	20	6,0
13	3	-	-	3	0,9
14	-	9	-	9	2,7
15	-	8	-	8	2,4
16	3	25	-	28	8,4
17	7	16	2	25	7,5
18	-	23	-	23	6,9
19	7	20	-	27	8,1
20	-	24	-	24	7,2
21	4	33	-	37	11,1
22	-	10	-	10	3,0
X	12	3	-	15	4,5
TOTAL	51	280	2	333	-

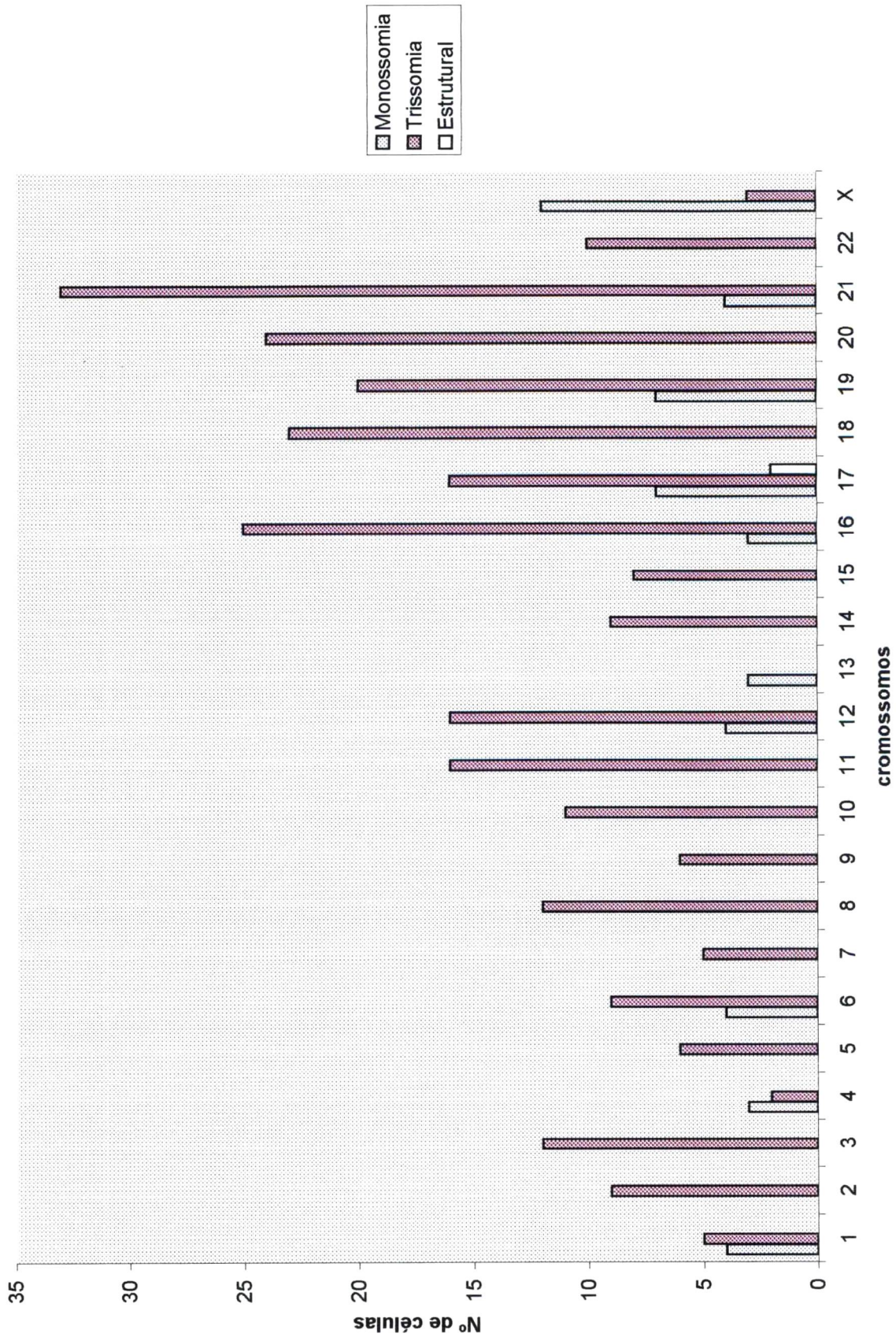


Figura 8- Distribuição, por cromossomo, das aberrações cromossômicas clonais observadas nas lesões benignas da mama.

2- TUMORES MALIGNOS DA MAMA

Caso 6- Carcinoma Ductal Infiltrante Grau II

Dezoito metáfases foram analisadas após bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

44,X,-X,-5,-18,+21
 44,XX,-6,-8,-20,+21
 44,XX,-9,-10
 45,XX,-13,-16,+21
 45,XX,-15,-16,+21
 45,XX,-19
 46,XX,-1,+21[2]
 46,XX,-2,-9,+15,-17,+20,+21
 46,XX,-7,-12,+21,+22
 46,XX,-18,+21
 46,XX,-20,+21
 46,XX,+21,-22
 46,XX,del(17)(p12)
 47,XX,-8,+21,+22
 48,X,-X,-1,+13,+18,+20,+22
 46,XX[2]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

44~48,XX,+20[2],+21[12],+22[3][cp13]/46,XX[2].

Das 18 células analisadas, duas (11,11%) apresentaram o cariótipo normal e 16 (88,89%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, 13 (81,25%) apresentaram aberrações clonais e três (18,75%) não. Foram observadas três aberrações numéricas clonais: trissomia dos cromossomos 20, 21 e 22. A figura 9 apresenta o cariótipo de uma célula com aberrações clonais numéricas dos cromossomos 21 e 22, observada no caso 6.



Figura 9- Metáfase 46,XX,-7,-12,+21,+22 observada no caso 6.

Caso 7- Carcinoma Ductal Infiltrante Grau III

Cinquenta e seis metáfases foram analisadas após bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

44,XX,-6,-9

44,X,-X,-7,-12,+19

45,X,-X[3]

45,X,-X,del(2)(p23)[2]

45,XX,-15

45,XX,-21

45,XX,-22

46,X,-X,del(1)(p22),+2

46,XX,+8,-13

46,XX,+8,+13,-17,-20

46,XX,del(11)(q23)[2]

46,X,-X,del(11)(q23),+13

46,XX,del(11)(q23),-17,+19
 46,X,-X,del(11)(q23),+20
 46,XX,del(11)(q23),del(17)(p12)[2]
 46,XX,del(11)(q23),del(17)(q21-q23)
 46,XX,del(17)(p12)[2]
 46,XX,-16,del(17)(p12),+19
 46,XX,del(17)(q21-q23)
 47,X,-X,-1,+18,+19,+22
 47,XX,-3,+8,+10,del(17)(p12),-21,+22
 47,XX,+8[5]
 47,XX,+8,del(17)(p12)[2]
 47,XX,+8,-18,+19
 47,XX,+10[3]
 47,XX,+10,del(11)(q23),del(17)(p12)
 47,XX,del(11)(q23),+13
 47,XX,del(11)(q23),del(17)(p12),+19
 47,XX,+18[2]
 47,XX,+19
 46,XX[12]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

44~47,X,-X[10],del(2)(p23)[2],+8[11],+10[5],del(11)(q23)[11],+13[3],del(17)(p12)[10],del(17)(q21-q23)[2],+18[3],+19[7],+22[2][cp40]/46,XX[12].

Das 56 células analisadas, 12 (21,43%) apresentaram cariótipo normal e 44 (78,57%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, 40 (90,91%) apresentaram aberrações clonais e quatro (9,09%) não. Foram observados onze clones diferentes: sete clones numéricos (monossomia do cromossomo X, trissomia dos cromossomos 8,10,13,18,19 e 22) e quatro clones estruturais (deleção no braço curto do cromossomo 2, deleção no braço longo do cromossomo 11 e deleções nos braços curto e longo do cromossomo 17). A figura 10 apresenta o cariótipo de uma célula e a figura 11 ilustra os cariótipos parciais com aberrações estruturais dos cromossomos 11 e 17, observadas no caso 7.

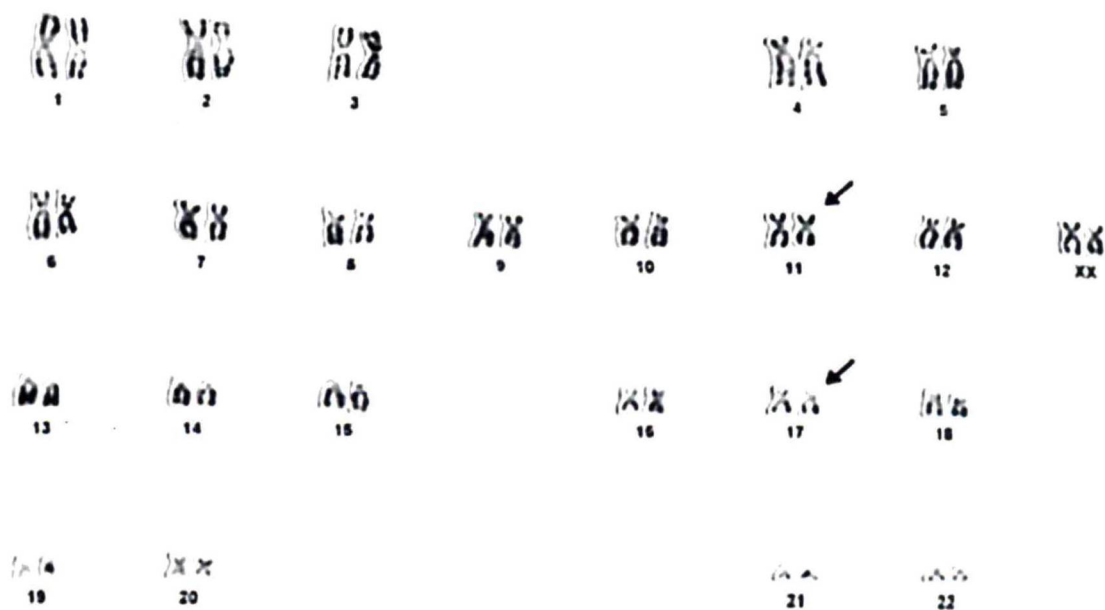


Figura 10- Metáfase 46,XX,del(11)(q23), del(17)(p12) observada no caso 7.

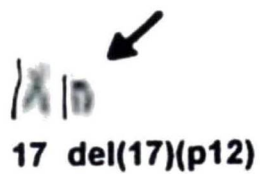
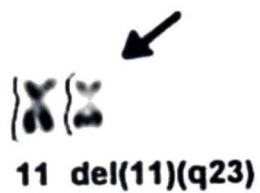


Figura 11- Cariótipos parciais mostrando a del(11)(q23) e a del(17)(p12) observadas no caso 7.

Caso 8- Carcinoma Ductal Infiltrante Grau II

Dezessete metáfases foram analisadas após bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

44,X,-X,-4,-6,-7,-8,-8,+16,+18,+21,+22

45,X,-X,+16,-20

45,X,-X,-10,+16

45,XX,-19

46,X,-X,+16

46,X,-X,+18

46,XX,+16,-19

47,XX,+8

47,XX,+16[2]

47,XX,+16,-19,+mar

46,XX[6]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

44~47,X,-X[5],+16[8],+18[2],-19[3][cp10]/46,XX[6].

Das 17 células analisadas, seis (35,29%) apresentaram o cariótipo normal e onze (64,71%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, dez (90,91%) apresentaram aberrações cromossômicas clonais e uma (9,09%) não. Foram observados quatro diferentes clones numéricos: duas monossomias (dos cromossomos X e 19) e duas trissomias (dos cromossomos 16 e 18). A figura 12 apresenta o cariótipo de uma célula com aberrações clonais numéricas dos cromossomos X e 16, observada no caso 8.



Figura 12- Metáfase 45,X,-X,+16,-20 observada no caso 8.

Caso 9- Carcinoma Ductal Infiltrante Grau I

Vinte e uma metáfases foram analisadas após bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

44,X,-X,-15,-16,+21

44,X,-X,-17

44,XX,-11,-12,-15,+18

45,X,-X,-8,-10,+21,+22

45,X,-X,-10,+18

45,XX,-1

45,XX,+8,-14,-21

45,XX,-20

46,X,-X,+21

46,XX,-4,+18

46,XX,-12,+21

46,XX,-14,+18

47,X,-X,+21,+22

47,XX,+8

47,XX,-10,+17,+21

47,XX,-10,+21,+22

47,XX,+22

46,XX[4]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

44~47,X,-X[6],-10[4],+18[4],+21[7],+22[4][cp13]/45~47,XX,+8[2]/46,XX[4].

Das 21 células analisadas, quatro (19,05%) apresentaram cariótipo normal e 17 (80,95%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, 15 (88,24%) apresentaram aberrações clonais e duas (11,76%) não. Foram observados dois clones independentes, um deles apresentando monossomia dos cromossomos X e 10 e, trissomia dos cromossomos 18, 21 e 22 e, o segundo apresentando trissomia do cromossomo 8. A figura 13 apresenta o cariótipo de uma célula com aberrações clonais numéricas dos cromossomos X,10,21 e 22, observada no caso 9.

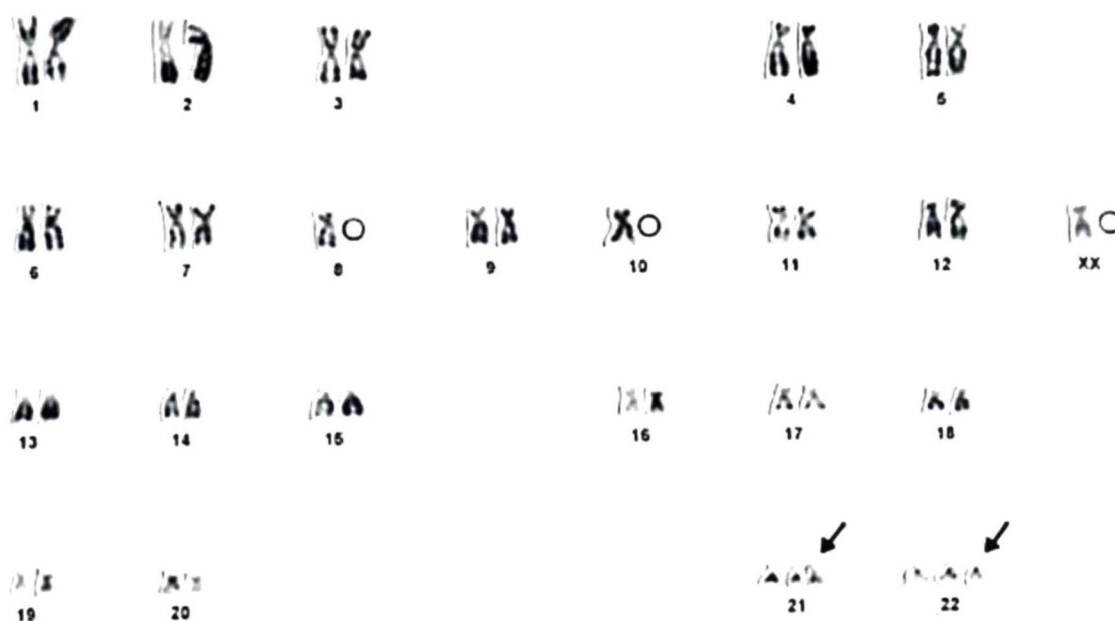


Figura 13- Metáfase 45,X,-X,-8,-10,+21,+22 observada no caso 9.

Caso 10- Carcinoma Ductal Infiltrante Grau III

Quatorze metáfases foram analisadas após bandeamento GTG, as quais, apresentaram as seguintes fórmulas cariotípicas:

45,XX,-4
 45,XX,-16
 45,XX,-17
 45,XX,-19
 45,XX,-20
 45,X,-X,**del(2)(p23)**, -6, **+21**
 45,XX,**del(17)(p12)**, -13
 46,XX,**del(2)(p23)**,**del(11)(q23)**
 46,XX, +8, **del(11)(q23)**, -18
 46,XX, +10, -16
 46,XX, -19, **+21**
 47,XX, **del(2)(p23)**, **+21**
 46,XX[2]

O cariótipo composto encontrado foi o seguinte:

45~47,XX,**del(2)(p23)[3]**,**del(11)(q23)[2]**,**+21[3][cp5]**/46,XX[2].

Das 14 células analisadas, duas (14,29%) apresentaram cariótipo normal e 12 (85,71%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, cinco (41,67%) apresentaram aberrações clonais e sete (50,33%) não. Foram observadas 14 aberrações cromossômicas diferentes: 11 aberrações numéricas (três trissomias e oito monossomias) e três aberrações estruturais (deleção nos cromossomos 2, 11 e 17). Destas, apenas três formaram clones: um numérico (trissomia do cromossomo 21) e dois estruturais (deleção no braço curto do cromossomo 2 e deleção no braço longo do cromossomo 11). A figura 14 apresenta o cariótipo de uma célula com aberração clonal numérica do cromossomo 21 e a figura 15 ilustra os cariótipos parciais com aberrações clonais estruturais dos cromossomos 2 e 11, observados no caso 10.

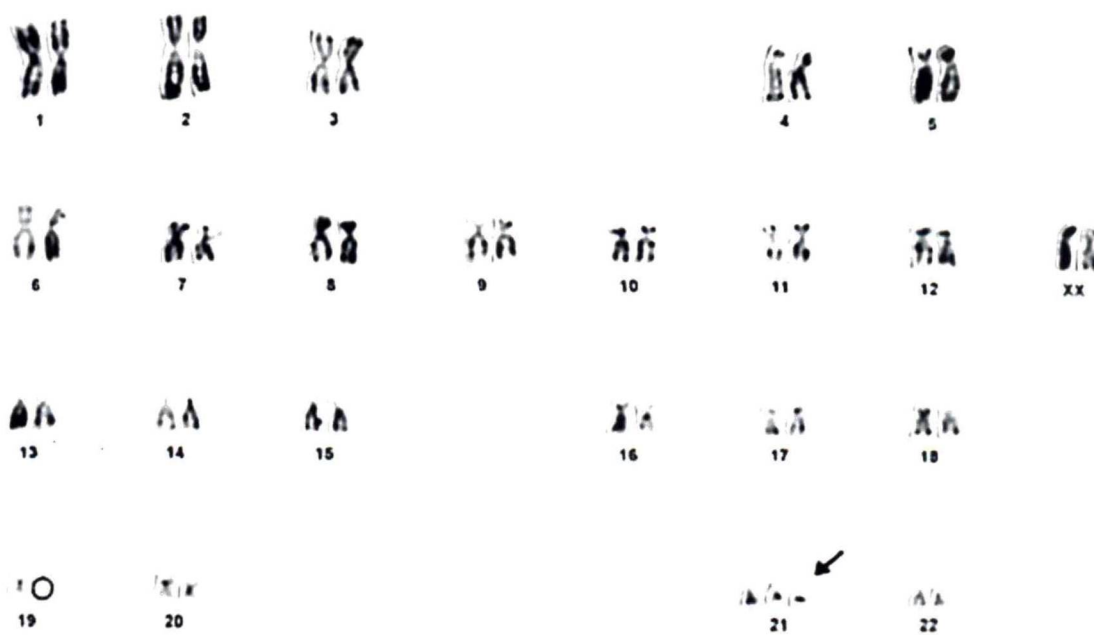


Figura 14- Metáfase 46,XX,-19,+21 observada no caso 10.

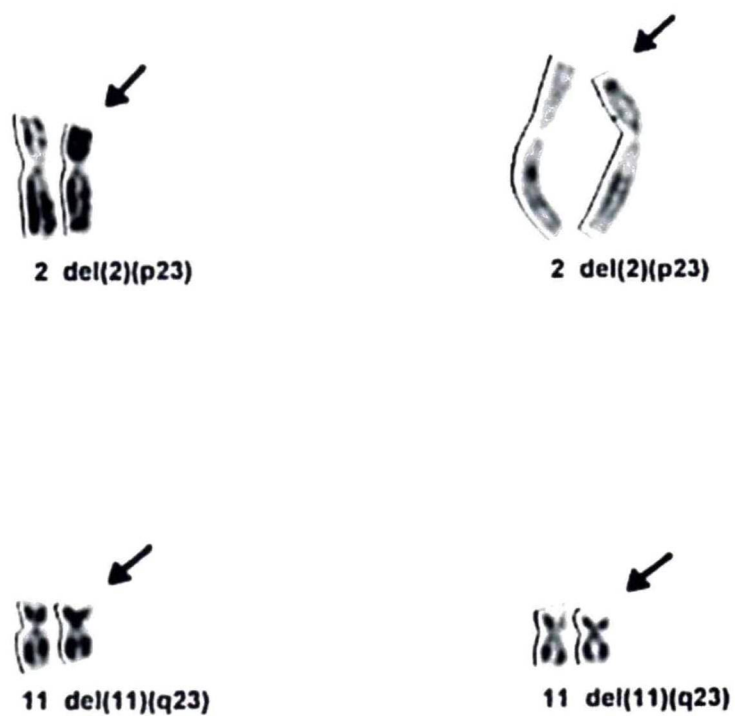


Figura 15- Cariótipos parciais mostrando a $\text{del}(2)(p23)$ e a $\text{del}(11)(q23)$ observadas no caso 10.

Síntese dos Resultados dos Tumores Malignos da Mama

A tabela 5 apresenta a idade das pacientes, o tipo histológico e o resumo dos dados citogenéticos dos cinco tumores malignos estudados neste trabalho.

Foram analisadas 126 células metafásicas ($x = 25,2 \pm 17,4$) com bandeamento GTG, das quais 26 (20,6%) apresentaram cariótipos normais e 100 (79,4%) apresentaram aberrações cromossômicas. Destas, 84 (84%) apresentaram aberrações clonais e 16 (16%) apresentaram aberrações não clonais.

As aberrações cromossômicas clonais numéricas e estruturais por cromossomo, bem como suas freqüências, observadas nos cinco tumores malignos estão apresentados na tabela 6 e figura 16. As aberrações clonais ocorreram preferencialmente nos cromossomos 2, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e X, indicando que as mesmas não ocorrem ao acaso em todos os cromossomos do genoma, o que se confirmou quando os dados da tabela 6 foram submetidos ao teste do χ^2 que apresentou um valor significativo ao nível de 0,1% ($\chi^2_{22} = 177,19$; $p < 0,001$).

Das aberrações cromossômicas clonais numéricas, conforme os dados apresentados nas tabelas 5 e 6 e distribuídos no gráfico da figura 16, as trissomias envolveram os cromossomos 8, 10, 13, 16, 18, 19, 20, 21 e 22, sendo que as mais recorrentes foram: +8 (casos 7 e 9), +18 (casos 7, 8 e 9), +21 (casos 6, 9 e 10) e +22 (casos 6, 7 e 9). As monossomias envolveram os cromossomos 10, 19 e X, sendo que a única recorrente foi a do cromossomo X, observada nos casos 7, 8 e 9. O caso 9 apresentou clones não relacionados citogeneticamente, conforme os dados apresentados na tabela 5.

As aberrações cromossômicas clonais estruturais envolveram os cromossomos 2, 11 e 17, sendo que as deleções em 2p e em 11q foram observadas nos casos 7 e 10 e, as deleções em 17p e 17q ocorreram no caso 7, conforme os dados apresentados nas tabelas 5 e 6 e distribuídos no gráfico da figura 16.

TABELA 5- IDADE DAS PACIENTES, TIPO HISTOLÓGICO E RESUMO DOS DADOS CITOGENÉTICOS DOS CINCO TUMORES MALIGNOS DA MAMA

CASO	IDADE	TIPO HISTOLÓGICO	GRAU DE DIFERENCIAÇÃO	ENVOLVIMENTO DE LINFONODOS	Nº DE CÉLULAS (GTG)	CARIÓTIPO
6	41	Ca. Ductal infiltrante	II	Sim	18	44~48,XX,+20[2],+21[12],+22[3][cp13]/46,XX[2].
7	49	Ca. Ductal infiltrante	III	Não	56	44~47,X,-X[10],del(2)(p23)[2],+8[11],+10[5],del(11)(q23)[11],+13[3],del(17)(p12)[10],del(17)(q21-23)[2],+18[3],+19[7],+22[2][cp40]/46,XX[12].
8	84	Ca. Ductal infiltrante	II	Não	17	44~47,X,-X[5],+16[8],+18[2],-19[3][cp10]/46,XX[6].
9	55	Ca. Ductal infiltrante	I	Não	21	44~47,X,-X[6],-10[4],+18[4],+21[7],+22[4][cp13]/45~47,XX,+8[2]/46,XX[4].
10	25	Ca. Ductal infiltrante	III	Sim	14	45~47,XX,del(2)(p23)[3],del(11)(q23)[2],+21[3][cp6]/46,XX[2].

Ca.= Carcinoma

TABELA 6- ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS CLONAI NUMÉRICAS E ESTRUTURAIS
OBSERVADAS NOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA

CROMOSSOMO	ABERRAÇÕES NUMÉRICAS		ABERRAÇÕES ESTRUTURAIS	TOTAL	FREQUÊNCIA (%)
	MONOSSOMIAS	TRISSOMIAS			
1	-	-	-	-	-
2	-	-	5	5	3,7
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	13	-	13	9,6
9	-	-	-	-	-
10	4	5	-	9	6,6
11	-	-	13	13	9,6
12	-	-	-	-	-
13	-	3	-	3	2,2
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	8	-	8	5,8
17	-	-	12	12	8,8
18	-	9	-	9	6,6
19	3	7	-	10	7,4
20	-	2	-	2	1,5
21	-	22	-	22	16,2
22	-	9	-	9	6,6
X	21	-	-	21	15,4
TOTAL	28	78	30	136	

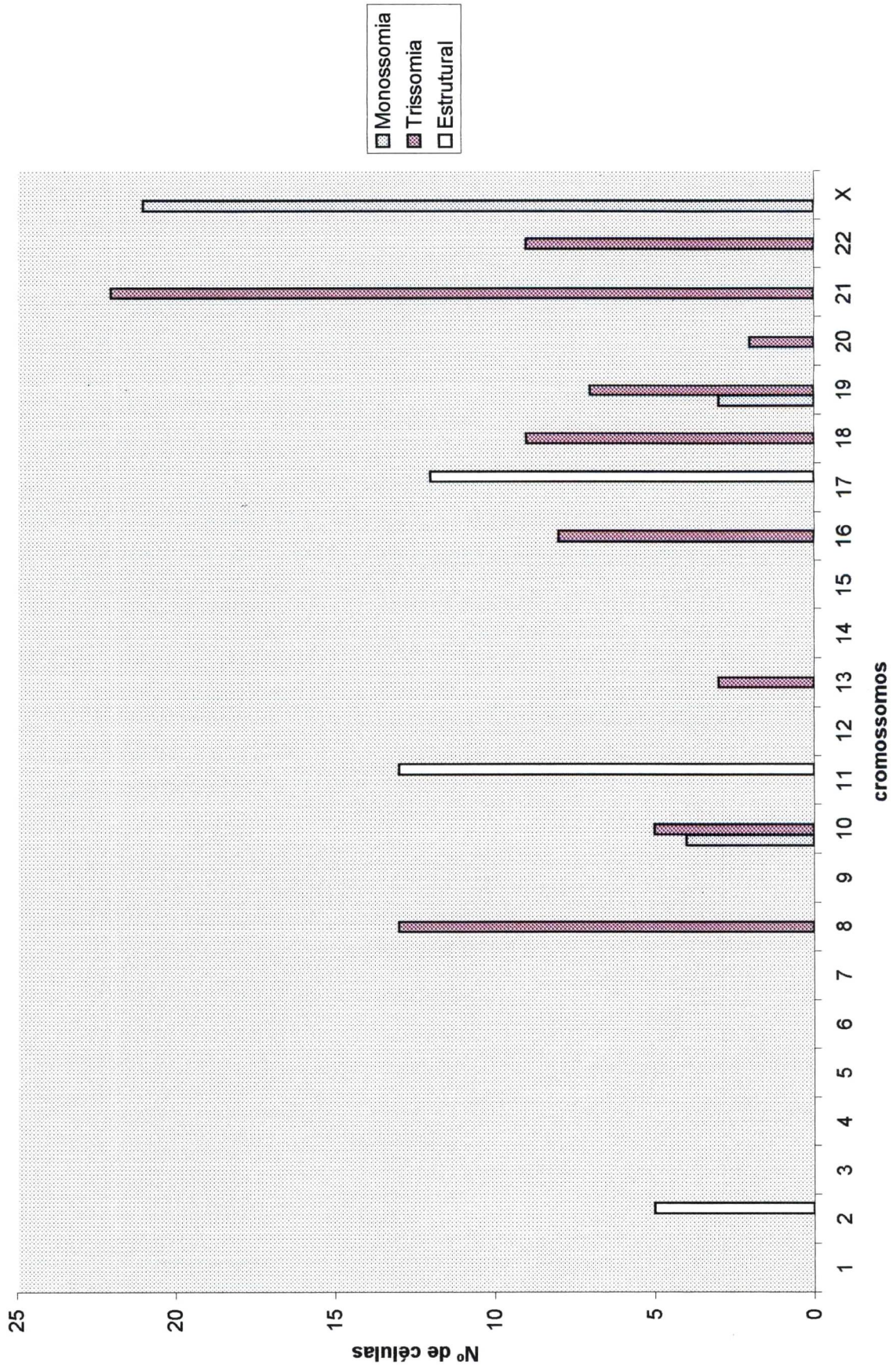


Figura 16- Distribuição, por cromossomo, das aberrações clonais observadas nos tumores malignos da mama.

V - DISCUSSÃO

1- Aberrações Cromossômicas Clonais Numéricas e Estruturais Observadas nas Lesões Benignas da Mama

Neste trabalho foram analisados citogeneticamente amostras de tecidos de uma mama supranumerária, de três fibroadenomas e de um tumor filóide da mama.

Nas cinco lesões mamárias benignas, analisou-se um total de 111 metáfases, sendo que 31 (27,9%) apresentaram cariótipos normais e 80 (72,1%) possuíam aberrações cromossômicas, das quais 67 (83,7%) eram clonais e 13 (16,3%) não clonais.

As aberrações cromossômicas clonais ocorreram com freqüências variadas, tendo sido observadas desde duas (0,5%; caso 1) até 298 (80%; caso 5), com uma média igual a $74,6 \pm 125,8$ aberrações por lesão.

Excluindo-se os quatro cromossomos marcadores, observa-se o envolvimento de todos os cromossomos do genoma nas aberrações cromossômicas clonais, totalizando 333 aberrações observadas mais freqüentemente nos cromossomos 21 (37=11,1%), 16 (28=8,4%), 19 (27=8,1%), 17 (25=7,5%), 20 (24=7,2%) e 18 (23=6,9%). Aplicando-se o teste do χ^2 aos dados apresentados na tabela 4, obteve-se um valor altamente significativo: $\chi^2_{22} = 123,44$; $p < 0,001$, indicando que a distribuição das aberrações cromossômicas clonais não se deram ao acaso em todos os cromossomos do genoma.

Nas lesões benignas da mama, as aberrações cromossômicas clonais numéricas (331) foram mais freqüentes do que as estruturais (2) e, entre as numéricas, as trissomias (280) foram mais comuns que as monossomias (51).

A única aberração cromossômica estrutural clonal observada foi a del(17)(p12) detectada em um fibroadenoma (caso 1) dos cinco casos estudados.

Aberrações clonais estruturais e numéricas envolvendo o cromossomo 17 são comumente descritas em fibroadenomas (CAVALLI, 1994; OZISIK et al., 1994; PETERSSON et al., 1997; CORNÉLIO, 1999; CORNÉLIO et al., 1999; BURBANO et al., 2000; CAVALLI et al., 2001). OZISIK et al. (1994) sugerem uma relação causal entre as aberrações neste cromossomo e as alterações malignas originadas de fibroadenomas. Contudo, esta sugestão é controversa e, portanto, mais estudos são

necessários para esclarecer as conseqüências patogênicas das aberrações cromossômicas que envolvem o cromossomo 17, onde estão localizados genes importantes (*BRCA1*, *ERBB2*) para a gênese desses tumores (PETERSSON et al., 1997).

As aberrações clonais numéricas envolvendo o cromossomo 21 foram as mais freqüentes neste trabalho (tabela 4), onde se observou principalmente trissomias. A presença adicional de um cromossomo 21 foi clonal em três (casos 2, 3 e 5) dos cinco casos de lesões benignas estudados, o que corresponde a 60% do total de casos analisados. A trissomia do 21 foi observada em sete células (30,43%) do caso 2; cinco células (22,73%) do caso 3 e, em 21 células (77,78%) do caso 5.

A trissomia do cromossomo 21 tem sido descrita na literatura, porém não como a aberração mais comum como observada neste trabalho. PETERSSON et al. (1997) observaram duas células com esta trissomia em apenas um de 33 casos de fibroadenomas analisados. TIBILETTI et al. (2000) também descreveram a trissomia 21 em nove casos de tumores benignos e, em dois casos de hiperplasia mamária atípica. POLITO et al. (1998) e TIBILETTI et al. (2000) observaram +21 em tumores filóides benignos da mama (em 2 casos e 1 caso respectivamente). CAVALLI et al. (2001) estudaram citogeneticamente dez fibroadenomas e detectaram esta trissomia em dois casos.

A monossomia do cromossomo 21 tem sido freqüentemente descrita em tumores benignos da mama por vários autores (CAVALIÉRI, 1993; CAVALLI, 1994; BIRDSALL et al., 1995; DIETRICH et al., 1997; TIBILETTI et al., 2000; BURBANO et al., 2000, 2001; CAVALLI et al., 2001). Neste estudo a monossomia deste cromossomo esteve presente em quatro (21,1%) das dezenove células analisadas no caso 4 (tabela 3).

Em 21q22.3, como mencionado na Introdução deste trabalho, localiza-se o gene *TFF.1* (*BCEI*) (HGM 11, 1991; GDB, 2003), relacionado à atividade mitogênica do estrogênio em células mamárias, envolvida na regulação gênica de proteínas que atuam no estímulo da proliferação celular mamária (COX e GODING, 1991). DAVIDOFF et al., (1991) descreveram que o gene *HSPA3*, localizado no cromossomo 21 (21pter-qter) (GDB, 2003) forma complexos com a proteína p53 e também poderia estar relacionado com o processo de proliferação celular.

Aberrações numéricas envolvendo o cromossomo 16 foram a segunda mais freqüente deste trabalho (tabela 4), observadas em três dos cinco casos de lesões benignas mamárias. A trissomia do cromossomo 16 foi observada em cinco células (21,7%) do caso 2, três células (13,6%) do caso 3 e dezessete células (63,0%) do caso 5 (tabela 3). A monossomia do cromossomo 16 foi observada com menor freqüência, em três células (13,0%), no caso 2 (tabela 4).

O Banco de Dados de Aberrações Cromossômicas em Câncer (MITELMAN Database do Website CGAP, 2003) cita o recente trabalho de TIBILETTI et al. (2000) descrevendo aberrações numéricas envolvendo o cromossomo 16 em 80 amostras de lesões expansivas mamárias, das quais 45 eram benignas, e a trissomia do 16 foi observada em quatorze casos enquanto a monossomia deste cromossomo em sete casos. Segundo os autores, trissomias e monossomias do 16 bem como de outros cromossomos estão presentes em lesões benignas e em carcinomas mamários evidenciando uma estreita relação entre lesões benignas e malignas da mama, concluindo que hiperplasias, principalmente as atípicas, podem ser precursoras diretas dos carcinomas mamários (BURBANO et al., 2000). CUMMINGS et al. (2000) observaram quebras em 16q21-24 e relacionaram-nas com o início do processo tumoral, por aparecerem mais freqüentemente em células com número cromossômico próximo ao diplóide.

Aberrações clonais numéricas envolvendo o cromossomo 19 foram freqüentes (8,1%; tabela 4), onde a trissomia deste cromossomo foi mais comumente observada em 20 (74,1%) das 27 células analisadas do tumor filóide apresentado no caso 5. CAVALLI (1994) encontrou a trissomia do cromossomo 19 em um fibroadenoma e em um papiloma mamário. FLETCHER et al. (1991) descreveu a trissomia do cromossomo 19 em um caso de fibroadenoma o que foi observado também por CAVALLI et al. (2001). Esta mesma trissomia também foi observada por TIBILETTI et al. (2000) em sete fibroadenomas, três hiperplasias epiteliais e em um caso de tumor filóide benigno da mama.

A monossomia do cromossomo 19 estava presente em três células (13,0%) do caso 2 e quatro células (21,1%) do caso 4. A monossomia do cromossomo 19 foi observada anteriormente em um fibroadenoma por FLETCHER et al. (1991), em dois fibroadenomas por CAVALLI (1994), em um caso de hiperplasia mamária por BURBANO et al. (1996a) e num tumor filóide da mama por DIETRICH et al. (1997).

Mais recentemente, a monossomia do cromossomo 19 foi descrita nos trabalhos de TIBILETTI et al. (2000), BURBANO et al. (2001) e por CAVALLI et al. (2001).

Aberrações clonais numéricas e estruturais envolvendo o cromossomo 17 foram comuns na amostra de lesões benignas da mama deste estudo. A trissomia ocorreu em duas células do caso 2 e em quatorze células do caso 5, enquanto a monossomia foi observada em sete células, somente no caso 4. A deleção envolvendo o braço curto do cromossomo 17 (17p12) foi a única aberração estrutural clonal presente no caso 1.

As aberrações clonais estruturais e numéricas envolvendo o cromossomo 17 foram detectadas em vários fibroadenomas descritos anteriormente (FLETCHER et al., 1991; CAVALLI, 1994; OZISIK et al., 1994; DIETRICH et al., 1995; PETERSSON et al., 1997; TIBILETTI et al., 2000; CAVALLI et al., 2001).

PETERSSON et al. (1997) analisando citogeneticamente fibroadenomas mamários, indicaram a monossomia do cromossomo 17 como sendo uma aberração cromossômica recorrente nestes tumores. MILLIKAN et al. (1995) através de métodos moleculares, descreveram um limitado número de casos exibindo imunoreatividade difusa para o produto protéico codificado pelos genes *TP53* e *ERBB2* localizados em 17p13.1 (HOLLSTEIN et al., 1991; OSBORNE et al., 1991) e em 17q21.1 (SLAMON et al., 1987; ALI et al., 1989) respectivamente. Os autores encontraram mutações de ponto no gene *TP53* em tumores mamários benignos, sugerindo que alterações funcionais no gene podem ocorrer previamente no tecido mamário antes que qualquer alteração histológica associada a um risco aumentado de câncer de mama esteja aparente. Alterações nestes genes são freqüentemente observadas em carcinomas mamários, estando associadas ao processo de evolução tumoral e um mau prognóstico.

Aberrações clonais no cromossomo 20 foram freqüentes (7,2%; tabela 4) no nosso estudo e foram observados em três (casos 2, 4 e 5) dos cinco casos de lesões mamárias benignas analisadas. Apenas aberrações cromossômicas numéricas, e destas somente as trissomias deste cromossomo, foram observadas.

A trissomia do cromossomo 20 tem sido descrita em fibroadenomas (FLETCHER et al., 1991; TIBILETTI et al., 2000; CAVALLI et al., 2001), em hiperplasias mamárias (CAVALIÉRI, 1993; TIBILETTI et al., 2000) e em tumores filóides (DAL CIN et al., 1988; POLITO et al., 1998 e TIBILETTI et al., 2000).

Monossomias do cromossomo 20 também foram descritas em neoplasias benignas da mama por: FLETCHER et al., 1991; BURBANO, 1993; CAVALIÉRI, 1993; CAVALLI, 1994; PETERSSON et al., 1997; CORNÉLIO et al., 1999; BURBANO et al., 2000, 2001; TIBILETTI et al., 2000; e CAVALLI et al., 2001. Entretanto, nos tumores benignos, aberrações envolvendo este cromossomo não aparecem como as mais freqüentes, mas como fazendo parte de cariótipos com outras aberrações clonais, necessitando de um maior número de informações para avaliações mais precisas.

Aberrações cromossômicas clonais envolvendo o cromossomo 18, embora menos freqüente (6,9%; tabela 4), foram detectadas em 23 células (20,72%) das 111 analisadas nas cinco lesões benignas da mama (casos 2 e 5), somente como trissomia deste cromossomo.

Segundo o Banco de Dados de Aberrações Cromossômicas em Câncer (MITELMAN Database do Website CGAP, 2003) a trissomia do cromossomo 18 foi relatada por vários autores em diferentes neoplasias benignas da mama: em fibroadenomas (FLETCHER et al., 1991; DIETRICH et al., 1995; CAVALLI et al., 2001), em hiperplasias mamárias (TIBILETTI et al., 2000), e em tumores filóides (DAL CIN et al., 1998; POLITO et al., 1998).

A alta freqüência de trissomias detectada neste estudo foi devida, principalmente, às observadas no caso 5, cujo quadro histológico era condizente com tumor filóide ulcerado de baixa agressividade histológica e, portanto, com diagnóstico histopatológico de tumor filóide benigno da mama. A complexidade cariotípica observada sugere que o mesmo seja caracterizado citogeneticamente como um exemplo de tumor filóide maligno ou pelo menos como um caso limítrofe. Tal afirmação é corroborada pelos estudos de DIETRICH et al. (1994 e 1997) e de TEIXEIRA et al. (2002) que relatam a dificuldade na avaliação histológica e na classificação como benigno, limítrofe-maligno e maligno dos tumores filóides mamários, sugerindo que a complexidade cariotípica pode ser um marcador de malignidade nestes tumores bifásicos, isto é, tanto células epiteliais quanto estromais apresentam clones anormais e, portanto, é provável que ambos façam parte do parênquima neoplásico.

O significado patogênético das aberrações cromossômicas em células de lesões benignas de mama pode estar relacionado com o estágio inicial de

progressão à malignidade, embora esta afirmação não seja conclusiva. Um maior número de análises citogenéticas, clássica e molecular, é necessário para avaliar o potencial de malignização dos tecidos benignos mamários.

2- Aberrações Cromossômicas Clonais Numéricas e Estruturais Observadas nos Tumores Malignos da Mama

Neste trabalho foram analisados citogeneticamente cinco carcinomas primários da mama.

Nos cinco tumores mamários malignos, analisou-se um total de 126 metáfases, sendo que 26 (20,6%) apresentaram cariótipos normais e 100 (79,4%) possuíam aberrações cromossômicas. Destas, 84 (84%) apresentaram aberrações clonais e 16 (16%) não clonais.

As aberrações cromossômicas clonais ocorreram com freqüências variadas, tendo sido observadas desde oito (5,9%; caso 10) até 66 (48,5%; caso 7), com uma média igual a $27,2 \pm 22,7$ aberrações por tumor.

As 136 aberrações clonais observadas (tabela 6) ocorreram mais freqüentemente nos cromossomos 21 (22=16,2%), X (21=15,4%), 8 e 11 (13=9,6%) e 17 (12=8,8%). Os cromossomos 13 e 20 apresentaram freqüências muito baixas de aberrações cromossômicas clonais (3=2,2%; 2=1,5%, respectivamente). Não foram observadas aberrações cromossômicas clonais nos cromossomos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 14 e 15.

Aplicando-se o teste do χ^2 aos dados apresentados na tabela 6, obteve-se um valor altamente significativo ($\chi^2_{22} = 177,19$; $p < 0,001$), indicando que a distribuição das aberrações cromossômicas clonais não se deram ao acaso em todos os cromossomos do genoma.

As 106 (77,9%) aberrações numéricas clonais observadas nos cinco carcinomas mamários estudados (tabela 6) ocorreram principalmente nos cromossomos 21 (22=20,7%), X (21=19,8%), 8 (13=12,3%) e 19 (10=9,4%). As 30 (22,1%) aberrações cromossômicas estruturais clonais observadas em dois (40%; casos 7 e 10) dos cinco casos analisados neste trabalho, envolveram preferencialmente os cromossomos 2 (16,7%), 11 (43,3%) e 17 (40%).

Foram observadas quatro aberrações estruturais diferentes em 25 (44,6%) das 56 células analisadas no caso 7 e duas aberrações estruturais diferentes em 5 (35,7%) das 14 células analisadas no caso 10. Das 30 aberrações estruturais, a del(11)(q23) foi observada com maior frequência em 13 células (43,3%), seguida pela del(17)(p12) observada em dez células (33,33%), del(2)(p23) observada em cinco células (16,7%) e del(17)(q21-23) observada em apenas duas células (6,7%).

O cromossomo 21 foi o mais freqüentemente envolvido em aberrações cromossômicas nos cinco carcinomas mamários analisados. As aberrações no 21 foram observadas em 60% dos tumores: casos 6, 9 e 10.

A trissomia foi à única aberração numérica clonal, envolvendo este cromossomo, observada em doze células (66,7%) do caso 6, sete células (33,3%) do caso 9 e três células (21,4%) do caso 10.

Em carcinomas mamários as trissomias envolvendo diversos cromossomos têm sido descritas por vários autores, como sendo uma única aberração clonal ou então, como fazendo parte de cariótipos complexos. As mais freqüentes são: +7, +20, +18, +12, +3, +X e +8 (TEIXEIRA et al., 2002). Embora, a trissomia do cromossomo 21 não apareça como uma das mais freqüentes em câncer de mama, o Banco de Dados de Aberrações Cromossômicas em Câncer (MITELMAN et al., 2003) registra 30 casos descritos na literatura.

Em 21q22.3 localiza-se o gene *TFF1* (GDB 2003) que se expressa, sob controle do estrogênio, em alguns cânceres de mama (MOISAN et al., 1988).

OHGAKI et al. (1998) analisaram perda de heterozigidade (LOH) em 21q21 em 142 tumores de mama, utilizando marcadores de microssatélites e observaram uma ou mais LOH em 44 (31%) dos tumores analisados, levantando a possibilidade de existir nesta região um ou mais genes supressores de tumor associados ao câncer de mama.

O efeito patogênico das aberrações cromossômicas numéricas na tumorigênese mamária ainda não é bem conhecido e atribuir que o ganho de um alelo de um oncogene ou a perda de um gene supressor tumoral é uma afirmação muito simplista (TEIXEIRA et al., 2002).

O cromossomo X foi o segundo mais envolvido em aberrações cromossômicas clonais numéricas. A monossomia do cromossomo X esteve presente em 21 das 136 (15,4%) aberrações clonais (tabela 6), nos casos 7, 8 e 9.

Trissomias e aberrações estruturais clonais não foram detectadas envolvendo este cromossomo.

Aberrações cromossômicas numéricas, principalmente as monossomias, envolvendo o cromossomo X são comumente descritas na literatura tanto em tumores benignos como malignos de mama. No Banco de Dados de Aberrações Cromossômicas em Câncer (MITELMAN et al., 2003) estão catalogados 105 casos descritos na literatura.

ROGATTO et al. (1994) questiona a monossomia do cromossomo X como não sendo uma alteração câncer-específica, pois a mesma é descrita em tecidos normais e em diferentes tumores benignos e malignos humanos.

CAVALLI (1994) também observou alta freqüência de perdas em algumas regiões do cromossomo X em tumores primários da mama e concluiu que devem existir genes supressores tumorais, localizados neste cromossomo, importantes na carcinogênese mamária, o que recentemente, foi enfatizado por PIAO e MALKOSYAN (2002) através da análise de perda de heterozigosidade (LOH) em Xq25.

As aberrações cromossômicas clonais detectadas no cromossomo 8 foram responsáveis por 9,6% das aberrações totais e 16,7% das trissomias observadas em dois (casos 7 e 9) dos cinco casos de tumores malignos analisados citogeneticamente neste trabalho (tabelas 5 e 6). Não foram detectados clones com monossomias e aberrações estruturais envolvendo este cromossomo.

A trissomia do 8 foi observada em 11 células (19,6%) do caso 7 e em duas células (9,5%) do caso 9, onde aparece como um clone independente.

Aberrações cromossômicas numéricas envolvendo o cromossomo 8 no câncer de mama são amplamente relatadas na literatura (RODGERS et al., 1984; HILL et al., 1987; GELEICK et al., 1990; HAINSWORTH et al., 1991; BULLERDIEK et al., 1993; MITELMAN, 1994; BIÈCHE et al., 1995; PANDIS et al., 1995; CAVALLI et al., 1997; CORNÉLIO, 1999; MARK et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2002).

BULLERDIEK et al. (1993) observaram que a trissomia do 8 representa uma alteração genética primária associada a um subgrupo particular de carcinoma ductal mamário, conferindo uma vantagem proliferativa às células tumorais, e não diretamente relacionada à malignidade; o que foi apoiado pelos dados de CAVALLI (1994) que detectou +8 em 56% (14/25), e pelos dados de CORNÉLIO (1999) que

detectou +8 em 7,5% (3/40) das aberrações cromossômicas clonais analisadas, em um caso descrito por cada uma das autoras de carcinoma ductal mamário.

O cromossomo 8 apresenta regiões homogeneamente coradas (hsr) que representam regiões cromossômicas de amplificação gênica, sendo mais comum em 8p11-22 (TEIXEIRA et al., 2002). MULERIS et al. (1994) estudaram carcinomas mamários através da técnica de hibridização genômica comparativa (CGH) e observaram hsr em 8q22 e 8q24, além de outras em outros cromossomos. O uso de microdissecção cromossômica e hibridização *in situ* para caracterizar a organização das seqüências amplificadas demonstrou que as hsrs poderiam ser formadas por translocações e seqüências amplificadas de DNA, provenientes de um a quatro diferentes sítios cromossômicos (GUAN et al., 1994; MÜLERIS et al., 1995). Em 8q24.12-24.13, localiza-se o proto-oncogene *MYC* (GDB, 2003), freqüentemente referido na etiologia do câncer mamário. COURJAL e THEILLET (1997) e NISHIZAKI et al. (1997) associam ampliações do *MYC* a um prognóstico desfavorável.

Clones não relacionados citogeneticamente, como o observado no caso 9 deste trabalho, sugerindo policlonalidade tumoral, têm sido descritos em carcinomas mamários (PANDIS et al., 1995a; TEIXEIRA et al., 1995, 1996) conferindo-lhes heterogeneidade cariotípica intratumoral. Esta heterogeneidade pode ser explicada das seguintes maneiras:

- a) Se aceita que todos os clones fazem parte do parênquima tumoral ou se estipula que somente um clone (ou um grupo de clones relacionados) seja representativo da neoplasia. Em relação a última situação, os clones anormais não-relacionados representariam tanto células epiteliais não-neoplásicas como células estromais cujos rearranjos cromossômicos possivelmente tenham sido induzidos por agentes mutagênicos liberados das células cancerosas vizinhas;
- b) Todos os clones são verdadeiramente neoplásicos, originários de uma única célula-mãe transformada por mutações submicroscópicas. Embora, seja possível, a hipótese de uma única mutação submicroscópica na maioria dos carcinomas de mama não explica por que a policlonalidade cariotípica é mais comum em tumores epiteliais do que os que ocorrem em neoplasmas hematológicos ou mesenquimais;

- c) Os clones não-relacionados citogeneticamente poderiam realmente ser não-relacionados evolutivamente, refletindo uma origem neoplásica policlonal.

Se os clones não-relacionados refletem uma tumorigênese mono ou policlonal ainda é controverso, porém é certo que eles refletem uma heterogeneidade genotípica intratumoral (TEIXEIRA et al., 2002).

O envolvimento do cromossomo 11 representou 9,6% das aberrações totais e 43,3% das aberrações estruturais clonais observadas em 40% dos casos analisados neste trabalho (tabela 6).

A del(11)(q23) foi detectada em 11 células (19,6%) no caso 7 e em duas células (14,3%) no caso 10.

Deleções envolvendo tanto o braço curto como o longo do cromossomo 11 são freqüentemente descritas em tumores mamários (GEBHART et al. 1986; HILL et al. 1987; FERTI-PASSANTONOPOULOU et al. 1991; HAINSWORTH et al. 1991; PANDIS et al. 1995; STEINARSDÓTTIR et al. 1995; CAVALLI et al. 1997; ADEYINKA et al. 1999; IOAKIM-LIOSSI et al. 1999; TAN et al. 2000). Como mencionado na Introdução desta dissertação, em 11q22.1-22.3, localiza-se o gene *PGR* (receptor de progesterona) e em 11q23.3 estão o gene *ETS1*, um sítio frágil raro (FRA11B) e um sítio frágil comum (FRA11G) (GDB, 2003). Alterações observadas em 11q têm sido associadas a um prognóstico desfavorável. TSUKAMOTO et al. (2001) detectaram uma alta freqüência de aneussomias deste cromossomo em cânceres mamários com metástases em linfonodos e de alto grau histológico. Também a hipermetilação da região promotora do gene *TSLC1*, localizado em 11q21-24, candidato a supressor tumoral (ALLINEN et al., 2002) e a perda de heterozigidade em 11q23-24 (NAGAHATA et al., 2002) são associados a um prognóstico desfavorável.

O cromossomo 17 esteve envolvido em aberrações estruturais clonais em um dos cinco carcinomas analisados. A del(17)(p12) foi observada em dez células (17,9%) e a del(17)(q21-23) em duas células (3,6%), ambas no caso 7.

Deleções e translocações em 17p, são as alterações estruturais descritas com maior freqüência em tumores mamários (HAINSWORTH e GARSON, 1990; PANDIS et al., 1995; KUUKASJARVI et al., 1997 a, b; MERTENS et al., 1997; CORNÉLIO, 1999). Perdas em 17p parecem representar eventos iniciais no acúmulo

de alterações genéticas que ocorrem durante a progressão do câncer mamário (SATO et al., 1990; ANDERSEN et al., 1992).

A del(17)(p12), observada em um dos casos (caso 7) apresentados neste trabalho, foi também descrita por outros autores (RODGERS et al., 1984; MITCHELL e SANTIBANEZ-KOREF, 1990; HAINSWORTH et al., 1991; LU et al., 1993; MITELMAN et al., 1997a; CORNÉLIO, 1999).

No cromossomo 17 localizam-se genes importantes relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão do câncer de mama como: o gene supressor tumoral *TP53* localizado em 17p13.1 (HOLLSTEIN et al., 1991; OSBORNE et al., 1991) responsável pela integridade do genoma; o oncogene *ERBB2* localizado em 17q21.1 (SLAMON et al., 1987; ALI et al., 1989) que está amplificado e superexpressado em 20 a 25% dos tumores mamários. Tumores de mama que possuem este gene amplificado têm uma perda predominante na expressão do receptor de estrogênio (BIRNBAUM et al., 1999). O gene *BRCA1* localizado em 17q21, relacionado ao câncer de mama familiar (HALL et al., 1990), parece atuar como um gene supressor tumoral, envolvido nos processos de proliferação de células epiteliais em resposta à estimulação hormonal, na apoptose, no controle da recombinação e da integridade genômica após ligar-se a proteínas envolvidas nestes processos (BIRNBAUM et al., 1999). O gene *NME1* localizado em 17q21-22 está relacionado ao câncer de mama metastático (TOULAS et al., 1996) e o gene *BCAS3* localizado em 17q23 está amplificado, superexpresso e faz fusão com o gene *BCAS4* localizado em 20q13.2 em cânceres mamários (BARLUND et al., 2002).

Finalmente, comparando as informações obtidas das aberrações numéricas e estruturais clonais nas lesões benignas e malignas da mama, constatou-se que nas benignas foram observadas 373 aberrações clonais com uma média igual a $74,6 \pm 125,8$ aberrações por lesão e, nas malignas foram detectadas 136 aberrações clonais com uma média igual a $27,2 \pm 22,7$ aberrações por tumor.

Nas lesões benignas, nas 111 metáfases analisadas foram observadas 331 aberrações numéricas (280 trissomias e 51 monossomias) e duas aberrações estruturais. Nos tumores malignos, nas 126 metáfases analisadas foram observadas

106 aberrações numéricas (78 trissomias e 28 monossomias) e 30 aberrações estruturais.

Aplicando-se a estes dados o teste do χ^2 verificou-se que as aberrações clonais (numéricas e estruturais) não se distribuem igualmente nas lesões benignas e nos tumores malignos ($\chi^2_1= 69,9$; $p<0,001$). Este valor foi devido principalmente aos resultados encontrados nos χ^2 parciais (65,2) nas aberrações estruturais.

Comparando isoladamente a distribuição das monossomias e das trissomias nas lesões benignas e malignas, verificou-se um valor significativo de $\chi^2_1= 6,6$; $p<0,05$, indicando que as monossomias e as trissomias não se distribuem ao acaso nos dois tipos de lesões mamárias.

Neste trabalho, as aberrações estruturais foram mais freqüentemente observadas nos tumores malignos, como foi também, descrito por CAVALLI (1994), enquanto que CORNÉLIO (1999) observou o contrário isto é, maior freqüência de aberrações estruturais em lesões benignas da mama. Nas dez lesões mamárias analisadas neste estudo, de acordo com as aberrações estruturais encontradas, identificou-se o envolvimento dos seguintes pontos de quebras: 2p23; 11q23; 17p12 e 17q21-23. Em vários destes pontos, oncogenes, genes supressores de tumores e genes envolvidos no sistema de reparo do DNA já foram descritos e mapeados, tais como: *ETS1* e *BRCATA* em 11q23, *ATM* em 11q22.3-23, *ERBB2* em 17q21.1, *BRCA1* em 17q21, *NME1* em 17q21-22 e *BCAS* em 17q23, reforçando a importância dos mesmos na tumorigênese mamária.

VI – CONCLUSÕES

Com o principal objetivo de contribuir para o conhecimento citogenético das lesões benignas e malignas da mama humana, foram analisados citogeneticamente cinco lesões benignas da mama e cinco carcinomas mamários.

Nas cinco lesões mamárias benignas, as aberrações cromossômicas clonais não ocorreram ao acaso em todos os cromossomos do genoma ($\chi^2_{22}= 123,44$; $p<0,001$), sendo que os cromossomos mais freqüentemente envolvidos foram: 21 (11,1%), 16 (8,4%), 19 (8,1%), 17 (7,5%), 20 (7,2%) e 18 (6,9%).

Das 333 aberrações clonais observadas (excluindo-se os cromossomos marcadores), as numéricas (331) foram mais freqüentes do que as estruturais (2), e entre as numéricas as trissomias (280) foram mais comuns que as monossomias (51).

Nos cinco carcinomas mamários, as aberrações cromossômicas clonais não se deram ao acaso em todos os cromossomos do genoma ($\chi^2_{22}= 177,19$; $p<0,001$) e das 136 aberrações clonais observadas, as numéricas (106) foram mais freqüentes do que as estruturais (30) e entre as numéricas as trissomias (78) foram mais comuns do que as monossomias (28). Os cromossomos mais freqüentemente envolvidos nas aberrações clonais foram: 21 (16,2%), X (15,4%), 8 e 11 (9,6%) e 17 (8,8%).

As aberrações clonais numéricas e estruturais não se distribuíram igualmente nos dois tipos de lesões ($\chi^2_1=69,9$; $p<0,001$) sendo a diferença devida principalmente às aberrações estruturais. O mesmo foi observado em relação à distribuição das monossomias e das trissomias ($\chi^2_1=6,6$; $p<0,05$).

Trissomias, envolvendo todos os cromossomos do genoma, foram as aberrações clonais numéricas mais freqüentemente observadas tanto nas lesões benignas da mama quanto nos carcinomas mamários. Contudo, o efeito patogênico das aberrações numéricas na tumorigênese mamária ainda não é conclusivo. Intensificação dos estudos da citogenética clássica e das novas técnicas moleculares se faz necessária para identificar e conhecer melhor as implicações das aberrações cromossômicas na carcinogênese mamária.

O caso 5, com diagnóstico histopatológico de tumor filóide benigno, foi o principal responsável pela alta frequência de trissomias observadas nas lesões benignas da mama. Devida a complexidade cariotípica observada é muito provável que este tumor seja mais propriamente classificado como tumor filóide maligno.

Adicionalmente, verificou-se que os pontos de quebras 2p23; 11q23; 17p12 e 17q21-23, identificados neste trabalho, coincidem com a localização de genes relacionados ao câncer de mama: *ETS1* e *BRCATA* em 11q23; *ATM* em 11q22.3-23, *ERBB2* em 17q21.1; *BRCA1* em 17q21; *NME1* em 17q21-22 e *BCAS3* em 17q23.

VII - REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, A. et al. *LOT1 (PLAGL1/ZAC1)*, the candidate tumour suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer. **J. Biol. Chem.** v.278, p.6041-6049. 2003.

ADEYINKA, A. et al. A subgroup of breast carcinomas is cytogenetically characterized by trisomy 12. **Cancer Genet Cytogenet**, v.97, p.112-121. 1997.

ADEYINKA, A. et al. Cytogenetic findings in invasive breast carcinomas with prognostically favorable histology: a less complex karyotypic pattern? **Int.J.Cancer**, v.79, p.361-364. 1998.

ADEYINKA, A. et al. Different patterns of chromosomal imbalances in metastasising and non-metastasising primary breast carcinomas. **Int.J.Cancer**, v.84, p.370-375. 1999.

ALCIDE-LORIDAN, C. et al. Mapping of the human interferon gamma response. Human Gene Mapping 10. **Cytogenet.Cell Genet**, v.51, p.149-165. 1989.

ALI, I.U. et al. Presence of two Members of c-erbA receptor gene family (c-erbA and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. **J.Natl.Cancer Inst**, v.81, p.1815-1820. 1989.

ALLINEN, M. et al. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.34, p.384-389. 2002.

AMIEL, A. et al. Application of comparative genomic hybridization in search for genetic aberrations in fibroadenomas of the breast. **Cancer Genet Cytogenet**, v.142, p.145-148. 2003

ANDERSEN, T.I. et al. Genetic alterations of the tumor suppressor gene regions 3p, 11p, 13q, 17p, and 17q in human breast carcinomas. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.4, p.113-121. 1992.

ATKIN, N.B. e BAKER, M.C. Pericentric inversion of chromosome I: frequency and possible association with cancer. **Cytogenet Cell Genet**, v.19, p.180-184. 1977.

ATKIN, N.B. e BAKER, M.C. Numerical chromosomal changes in 165 malignant tumors. Evidence for a nonrandom distribution of normal chromosomes. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.52, p.113-121. 1991.

ATKIN, N.B. et al. A comparison of the number of X chromatin bodies and of X chromosomes in 19 carcinomas of the cervix uteri. **Citobis**, v.60, p.111-114. 1989.

ATKIN, N.B. e PICKTALL, J. Chromosome 1 in ovarian cancer, heterochromatin variants and structural changes. **Hum. Genet**, v.38, p.25-33. 1997.

BALZ, V. et al. Analysis of *BRCA1*, *TP53* and *TSG101* germeline mutations in german breast and/or ovarian cancer families. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.138, p.120-127. 2002.

BARLUND, M. et al. Cloning of *BCAS3* (17q23) and *BCAS4* (20q13) genes that under amplification, overexpression, and fusion in breast cancer. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.35, p.311-317. 2002.

BARTOW, S. A.; FENOGLIO-PREISER, C. M. Mama. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. (Ed.). **Patologia**. Rio de Janeiro: Interlivros Edições Ltda., 1990. p.877-878.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto, SP: Revista Brasileira de Genética. 1988.

BELLO, M.J. e REY, J.A. Cytogenetic analysis of metastatic effusions from breast cancer. **Neoplasma**, v.36, p.71-81. 1989.

BERNARDINO, J. et al. Characterization of recurrent homogeneously staining regions in 72 breast carcinomas. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.23, p.100-108. 1998.

BIÈCHE, I. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 7q and aggressive primary breast cancer. **Lancet**, v.339, p.139-143. 1992.

BIÈCHE, I. e LIDEREAU, R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.14, p.227-251. 1995.

BIRDSALL, S.H. et al. t(6;12)(q23,q13) and t(10;16)(q22;p11) in a phyllodis tumor of breast. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.60, p.74-77. 1992.

BIRDSALL, S.H. et al. Additional copies of 1q in sequential samples from a phyllodes tumor of the breast. **Cancer Genet.Cytogenet.**, v.83, p.11-114. 1995.

BIRNBAUM, D. et al. Breast Cancer. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.** January 1999. Disponível em: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Tumors/breastID5018.html> Acesso em: 15 junho 2003.

BORG, A. et al. C-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. **Int.J.Cancer**, v.51, p.687-691. 1992.

BROSE, S. et al. *Her-2/neu* gene amplification in low to moderately expressing breast cancer possible role of chromosome 17/*Her-2/neu* polysomy. **Breast J.**, v.7, p.337-344. 2001.

BROSE, M. S. et al. Cancer risk estimates for *BRCA1* mutation carriers identified in a risk evaluation programm. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.94, p.1365-1372. 2002.

BULLERDIEK, J. et al. Trisomy 8 as a recurrent clonal abnormality in breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.** v.65, p.64-67. 1993.

BULLERDIEK, J. et al. Trisomy 18 as the first chromosome abnormality in a medullary breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 73, p.75-78. 1994.

BURBANO, R.M.R. **Alterações mamárias e suas manifestações citogenéticas.** São Paulo, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Orientadora: Cacilda Casartelli.

BURBANO, R.R. et al. Mammary epithelial hyperplasias: alterations related solely to proliferation? **Breast Cancer Res. Treat.**, v.41, p.95-101. 1996a.

BURBANO, R.R. et al. Cytogenetic analysis of breast carcinoma. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.137-143. 1996b.

BURBANO, R.R. et al. Cytogenetics of Epithelial Hyperplasias of the Human Breast. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 119, p.62-66. 2000.

BURBANO, R.R. et al. Cytogenetic description of breast fibroadenomas: alterations related solely to proliferation? **Braz J Med Biol Res**, v.34, p.1003-1006. 2001.

CALABRESE, G. et al. Chromosome Abnormalities in Breast Fibroadenomas. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.3, p.202-204. 1991.

CASPERSSON, T. et al. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exptl. Cell Res.**, v. 60, p.315-319. 1970a.

CASPERSSON, T. et al. Identificaton of human chromosome by DNA-binding fluorescent agents. **Chromosome**, v.60, p.215-227. 1970b.

CASPERSSON, T. et al. Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphse nuclei. **Exptl. Cell Res.**, v.61, p.472-474. 1970c.

CASPERSSON, T. et al. Quinacrine mustard-fluorescence of human chromosomes 4, 5 and X. **Exptl. Cell Res.**, v.61, p.474-476. 1970d.

CASPERSSON, T. et al. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. **Exptl. Cell Res.**, v.62, p.480-492. 1970e.

CAVALIÉRI, L.M.B. **Lesões Expansivas Mamárias: Avaliação citogenética.** Londrina, 1993. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual de Londrina. Orientadora: Silvia Regina Rogatto.

CAVALLI, L.R. **Estudo citogenético em tumores primários de mama.** Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Orientadores: Iglenir João Cavalli e Silvia Regina Rogatto.

CAVALLI, L.R. et al. Cytogenetic report of a male breast cancer. **Cancer Genet.Cytogenet**, v.81, p.66-71. 1995.

CAVALLI, L.R. et al. Cytogenetic evaluation of 20 primary breast carcinomas. **Hereditas**, v.126, p.261-268. 1997.

CAVALLI, L.R. et al. Clonal chromosome alterations In fibroadenomas of the breast. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.131, p.120-124. 2001.

CHEN, L-C. et al. Heterogeneity for allelic loss in human breast cancer. **J.Natl. Cancer Inst**, v.84, p.506-510. 1992.

CLIMENT, J, et al. Genomic loss of 18p predicts an adverse clinical outcome in patients with high-risk breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.8, p.3863-3869. 2002.

CORNÉLIO, D.A. **Estudo Citogenético em Lesões Benignas e Malignas da Mama Humana**. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas; Universidade Federal do Paraná. Orientador: Iglénir João Cavalli.

CORNÉLIO, D.A. et al. Clonal karyotypic abnormalities in gynecomastia. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.115, p.128-133. 1999.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. The Breast – The Female Breast. In:_. **Pathologic Basis Of Disease**. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. p.1091.

COURJAL, F. e THEILLET, C. Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. **Cancer Research**; v.57, p.4368-4377. 1997.

COUTURIER, J. et al. Assessment of chromosome 22 anomalies and neurinomas by combined karyotype and RFLP analyses. **Cancer Genet.Cytogenet.**, v45, p.55-62. 1990.

COX, P.M. e GODING, C.R. Transcription and cancer. **Br.J.Cancer**, v.63, p.651-662. 1991.

CRUCIGER, Q.V.J.; PATHAK, S. e CAILLEAU, R. Human breast carcinomas: marker chromosomes involving 1q in seven cases. **Cytogenet Cell Genet.**, v.17, p.231-235. 1976.

CUMMINGS, M. C. et al. Increasing chromosome 1 copy number parallels histological progression in breast carcinogenesis. **Br. J. Cancer**, v.82, p.1204-1210. 2000.

DAL CIN, P. et al. Observation of a Deletion of the Long Arm of Chromosome 6 in Benign Fibrocystic Disease of the Breast Constitutes a Challenging Problem. **Genes.Chrom.Cancer**, v.16, p.68-71. 1996.

DAL CIN, P. et al. Hiperdiploidy in Benign Breast Lesions. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.101, p.162-163. 1998

DASGUPTA, J.D. et al. The role of class I histocompatibility antigens in the regulation of T-cell activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.1094-1098. 1987.

DAVIDOFF, A.M. et al. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v.88, p.5006-5010. 1991.

DELARUE, J.C. et al. Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with estrogen and progesterone receptors. **Breast Cancer Res Treat**, v.11, p.173-178. 1988.

DELLAS, A. et al. DNA sequence losses on chromosomes 11p and 11q are associated with clinical outcome in lymph node-negative ductal breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.8, p.1210-1216. 2002.

DeVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. 5 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott-Raven Publishers, 1997.

DIETRICH,C.U. et al. Karyotypic Changes in Phyllodes Tumors of the Breast. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.78, p.200-206. 1994

DIETRICH,C.U. et al. Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal breast tissue. **Int.J.Cancer**, v.60, p.49-53. 1995.

DIETRICH,C.U. et al. Cytogenetic findings in phyllodes tumors of the breast karyotypic complexity differentiates between malignant and benign tumors. **Human Pathology**, v.28, p.1379-1382. 1997.

DUTRILLAUX, B.; MULERI, M.; SEUREAU, M.G. Imbalance of sex chromosomes with gain of early-replication X in human solid tumors. **Int J. Cancer**, v.38, p.475-479. 1986.

DUTRILLAUX, B.; GERBAULT-SEREAU, M.; ZAFRANI, B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiploid cases with few chromosome changes. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.49, p.203-217. 1990.

EIRIKSDOTTIR, G. et al. High incidence of loss of heterozygosity at chromosome 17p13 in breast tumours from *BRCA2* mutation carriers. **Oncogene**, v.8, p:21-26. 1998.

FABARIUS, A. et al. Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degree of aneuploidy. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.143, p.59-72. 2003.

FERTI-PASSANTONOPOULOU, A. e PANANI, A.D. Common cytogenetic findings in primary breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.27, p.289-298. 1987.

FERTI-PASSANTONOPOULOU, A. et al. Preferential involvement of 11q23-24 and 11p15 in breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.51, p.183-188. 1991.

FLETCHER, J.A. et al. Lineage restricted clonality in biphasic solid tumors. **Am. J. of Pathology**, v.138, p.1199-1207. 1991.

FRANCO, N. et al. Absence of Genetic Abnormalities in Fibroadenomas of the Breast Determined at *p53* Gene Mutations and Microsatellite Alterations. **Cancer Res.**, v.61, p.7955-7958. 2001.

FRIEDMAN, M. et al. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. **Nucleic Acids Res.**, v.21, p.4259-4267. 1993.

GARCIA, I. et al. Genetic alterations of c-myc, c-erb-2 and c-H-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. **Cancer Res.**, v.49, p.6675-6679. 1989.

GEBHART, E. et al. Cytogenetic studies of human breast carcinomas. **Breast Cancer Res. Treat**, v.8, p.125-138. 1986.

GDB. **The Genome Database**. 2003. Disponível em: <http://www.gdb.org.html> Acesso em: 30 maio 2003.

GELEICK, D. et al. Cytogenetics of breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.46, p.217-229. 1990.

GENUARDI, M. et al. Distal deletion of chromosome 1p in ductal carcinoma of the breast. **Am.J.Hum.Genet.**, v.45, p.73-88. 1989.

GOMPEL, C.; VAN KERKEM, C. The Breast. In: Steven G. Silverberg (Ed.). **Principles of Surgical Pathology**. 1990. p.245-288.

GOSDEN, J.R.; MIDDLETON, P.G. e ROUT, D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. **Cytogenet. Cell.Genet.**, v.43, p.218-220. 1986.

GUAN, X.Y. et al. Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. **Nat Genet**, v.8, p.155-161. 1994.

HAINSWORTH, P.J. e GARSON, O.M. Breast Cancer Cytogenetics and Beyond. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v.60, p.327-336. 1990.

HAINSWORTH, P.J. et al. Cytogenetic features of twenty-six primary breast cancers. **Cancer Genet.Cytogenet.**, v.52, p.205-218. 1991.

HALL, J.M. et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v.250, p.1684-1689. 1990.

HEIM, S. e MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics**. 2 ed. New York, Wiley-Liss, 1995. Cap.1, p.1-6.

HILL, S.M. et al. Cytogenetic analysis in human breast carcinoma II. Seven cases in the triploid/tetraploid range investigated using direct preparations. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.24, p.45-62. 1987.

HIRATA, K. et al. Frequency of chromosome 7 gain in human breast cancers cells: correlation with the number of metastatic lymph nodes and prognosis. **Tokoku J. Exp. Med.**, v.184, p.85-97. 1998.

HOLLSTEIN, M. et al. P53 mutations in human cancers. **Science**, v.253, p.49-53. 1991.

HUANG, W. C. et al. *KIAA1096*, a gene on chromosome 19, is amplified and overexpressed in bladder cancer. **Cell Biol.**, v.21, p.707-715. 2002.

HGM 11- Human Gene Mapping 11. Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping. London Conference. **Cytogenet. Cell Genet.**, V.58, p.1-984, 1991.

ICHIKAWA, D. et al. Analysis of numerical aberrations in specific chromosomes by fluorescent in situ hybridization as a diagnostic tool in breast cancer. **Cancer**, v.77, p.2064-2069. 1996.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/cancer/epidemiologia/estimativa2003/estimativas.html>> Acesso em: 30 maio 2003.

IOAKIM-LIOSSI et al. Changes of chromosomes 1, 3, 6, and 11 in metastatic effusions arising from breast and ovarian cancer. **Cancer Genet.Cytogenet**, v.110, p.34-40. 1999.

ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman, F.(ed); S. Karger, Basel, 1995.

JANSSEN, J. W. G. et al. Sublocalization of **c-myb** to 6q21-q23 by in situ hybridization and **c-myb** expression in a human teratocarcinoma with 6q rearrangements. **Cytogenet Cell Genet.**, v.41, p.129-135. 1986.

JOHANSSON, B. et al. Trisomy 7 in nonneoplastic cells. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.6, p.199-205. 1993.

KARNIK, P. et al. Two distinct tumor suppressor loci within chromosome 11p15 implicated in breast cancer progression and metastasis. **Human Molecular Genetics**, v.7, p.895-903. 1998.

KHAN, S.A. e EVANS, A. An examination of the chromosomal abnormalities of benign tumors may provide a lead to the identification of "metastasis genes". **Cancer Genet.Cytogenet**, v.54, p.139-141. 1991.

KIECHLE-SCHWARZ, M. et al. Nonrandom cytogenetic changes in leiomyomas of the female genitourinary tract. **Cancer Genet Cytogenet**, v.53, p.125-136. 1991.

KRISTIANSEN, M. et al. High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients. **J. Med. Genet.**, v.39, p.30-33. 2002.

KUUKASJÄRVI, T. et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. **Cancer Research**, v.57, p.1597-1604. 1997a.

KUUKASJÄRVI, T. et al. Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. **Am.J.Pathology**, v.150, p.1465-1471. 1997b.

KWIATKOWSKA, E. et al. Somatic mutations in the **BRCA2** gene and high frequency of allelic loss of **BRCA2** in sporadic male breast cancer. **Int. J. Cancer**, v.98, p.943-945. 2002.

LASFARGUES, E.Y. New approaches to cultivations of breast carcinomas. In: Fogh, J. (ed) Human tumor cell in vitro. New York. **Plenum Press**, p.51-57, 1975.

LICHY, J. H. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 11p15 during histological progression in microdissected ductal carcinoma of the breast. **Am. J. Pathol.**, v.153, p.271-278. 1998.

LUNDIN, C.P. et al. Cytogenetic Changes in Benign Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Breast. **Cancer Genet Cytogenet**, v.107, p.118-120. 1998.

LU, Y. et al. Direct chromosome analysis of 50 primary breast carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v.69, p.91-99. 1993.

LUOH, S. W. Amplification and expression of genes from the 17q11 approximately q12 amplicon in breast cancer cells. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.136, p.43-47. 2002.

MACKAY, J. et al. Partial deletion of chromosome 11p in breast cancer with size of primary tumour and oestrogen receptor Level. **Br.J.Cancer**, v.58, p.710-714. 1988a.

MACKAY, J. et al. Allelic loss on short arm of chromosome 17 in breast cancers. **Lancet**, v.2, p.1384-1385. 1988b.

MARK, H.F. et al. Abnormal chromosome 8 copy number is stage I to stage IV breast cancer by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.108, p.1-5. 1999.

MARK, J. et al. On the specificity of the G abnormality in human meningiomas studied by the fluorescence technique. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, v.80, p.812-820. 1972.

MARK, J. e DAHLENFORS, R. Cytogenetical observations in 100 human benign pleomorphic adenomas: specificity of the chromosome aberrations and their relationship to site of localized oncogenes. **Anticancer Res.**, v.6, p.299-308. 1986.

MARS, W.M. e SAUNDERS, G.F. Chromosomal abnormalities in human breast cancer. **Cancer Metastases Rev.**, v.9, p. 35-43. 1990.

MERTENS, F. et al. Chromosome imbalance maps of malignant solid tumors: A cytogenetic survey of 3185 neoplasms. **Cancer Research**, v.57, p.2765-2780. 1997.

MITCHELL, E.L.D. e SANTIBANEZ-KOREF, M. 1p13 is the most frequently involved band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer. **Genes. Chromosomes & Cancer**, v.2, p.278-289. 1990.

MITELMAN, F. **Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer**. 5 ed. New York: Wiley-Liss. 1994.

MITELMAN, F. et al. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. **Nature Genetics**, v.15, p.417-473. 1997a.

MITELMAN, F. et al. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. **Cancer. Genet. Cytogenet**, v.95, p.1-8. 1997b.

MITELMAN, F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. **Mutation Research**, v. 462, p.247-253. 2000.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. (Eds.). **Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer**. 2003. Disponível em <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. Acesso em: 13 junho 2003.

MULERIS, M. et al. Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique. **Genes. Chromosomes & Cancer**, v.10, p.160-170. 1994.

MULERIS, M. et al. Identification of amplified DNA sequences in breast cancer and their organization within homogeneously staining regions. **Gens.Chromosomes & Cancer**, v.14, p.155-163. 1995.

NAGAHATA, T. et al. Correlation of allelic loss and clinopatological factors in 504 primary breast cancer. **Breast Cancer**, v.9, p.208-215. 2002.

NAKOPOULOU, L. et al. Evolution of numeric alterations of chromosomes 1 and 17 by in situ hybridization in invasive breast carcinoma with clinicopathologic parameters. **Appl. Immunohistochem Mol. Morphol.**, v.10, p.20-28. 2002a.

NAKOPOULOU, L. et al. Aneuploidy of chromosome 20 in invasive breast cancer correlates with poor outcome. **Cancer. Genet. Cytogenet.**, v.134, p.127-132. 2002b.

NAROLD, S.A. et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-23. **Lancet**, v.338, p.82-83. 1991.

NIELSEN, K.V.; ANDERSEN, J.A. e BLICHERT-TOLF, M. Chromosome changes of "in situ" carcinomas in the female breast. **Eur.J.Surg.Oncol.**, v.13, p.225-229. 1987.

NISHIZAKI, T. et al. Genetic alterations in primary breast cancer and their metastases: Direct comparison using modified comparative genomic hybridization. **Gens.Chromosomes & Cancer**, v.19, p.267-272. 1997.

NOWELL, P.C. e HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v.132, p.1497, 1960.

NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell population. **Science**, v.194, p.23-28. 1976.

NOWELL, P.C. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res.**, v.46, p.2203-2207. 1986.

OHGAKI, K. et al. Mapping of a new target region of allelic loss to a 6-cM interval 21q21 in primary breast cancers. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.23, p.244-247. 1998.

OSBORNE, R.J. et al. Mutations in the p53 gene in primary human breast. **Cancer Res.**, v.51, p.6194-6198. 1991.

OTHA, M. et al. The human **FHIT** gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal cell carcinoma associated translocation breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. **Cell**, v.84, p.587-597. 1996

OZISIK, Y.Y. et al. Chromosome abnormalities in breast fibroadenomas. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.77, p.125-128. 1994.

PANDIS, N. et al. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 as a primary chromosome in carcinomas of the breast. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.6, p.151-155. 1993.

PANDIS, N. et al. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas. Identification of eight karyotypic subgroups. **Genes. Chromosomes & Cancer**, v.12, p.173-185. 1995.

PANDIS, N.; TEIXEIRA, M.R.; ADEYINKA, A et al. Cytogenetic comparison of primary tumors and lymphnode metastases in breast cancer patients. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.22, p.122-129. 1998.

PARKIN, D.M. et al. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v.37, p.4-66. 2001.

PATHAK, S. Cytogenetic analysis in human breast tumors. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.1, p.281-289. 1980.

PENG, H. et al. ARHI is the center of allelic deletion on chromosome 1p31 in ovarian and breast cancer. **Int. J. Cancer**, v.86, p.690-694. 2000.

PETERSSON, C. et al. Karyotypic Abnormalities In Fibroadenomas Of The Breast. **Int. J. Cancer**, v.70, p.282-286. 1997.

PIAO, Z. e MALKHOSYAN, S.R. Frequent loss Xq25 on the inactive X chromosome in primary breast carcinomas is associated with tumor grade and axillary lymph node metastasis. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.32, p.262-269. 2002.

POLITO, P. et al. An important subgroup of phyllodes tumors of the breast is characterized by rearrangements of chromosomes 1q and 10q. **Oncol Rep**, v.5, p.1099-1102. 1998.

RABIN, M. et al. Human **ras 1** and **mas 1** oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements. **OncogeneRes.**, v.1, p.169-178. 1987.

RODGERS, C.S. et al. Cytogenetic analysis breast carcinoma. Nine cases in the diploid range investigated using direct preparations. **Cancer_Genet. Cytogenet.**, v.13, p.95-119. 1984.

ROGATTO, S.R. et al. Loss of the sex chromosome in human neoplasias of the nervous system. **Rev.Bras.Genética**, v.17, p.215-222. 1994.

ROHEN, C. et al. Significance of clonal chromosome aberrations in breast fibroadenomas. **Cancer, Genet. Cytogenet.**, v.87, p.152-155. 1996.

RONCUZZI, L. et al. Loss of heterozygosity at pseudoautosomal regions in human breast cancer and association with negative hormonal phenotype. **Cancer, Genet. Cytogenet.**, v.135, p.173-176. 2002.

ROSENBERG, C. et al. Genetic alterations of chromosome 17 in human breast carcinoma studied by fluorescence in situ hybridization and molecular DNA techniques. **Cancer_Genet.Cytogenet.**, v.75, p.1-5. 1994.

SAINSBURY, J.R.C. et al. Epidermal growth factor receptors on human breast cancer. **Br.J.Surg.**, v.72, p.186-188. 1985.

SAINSBURY, J.R.C. et al. Epidermal growth factor receptor status of histological sub-types of breast cancer. **Br.J.Cancer**, v.58, p.458-460. 1988.

SAINT-RUF, C. et al. Recurrent homogeneously staining regions in 8p1 in breast cancer and lack of amplification of POLB, LHRH, and PLAT genes. **Cancer_Genet. Cytogenet.** v.52, p.27-35. 1991.

SAITO, H. et al. Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. **Cancer Res.**, v.5, p.3382-3385. 1993.

SANDBERG, A.A. **The chromosomes in human cancer and leukemia.** 1.ed. New York: Elsevier, 1980.

SANDBERG, A.A. **The chromosomes in human cancer and leukemia**. 2.ed. New York: Elsevier, 1990.

SANTOS, S. C. de L. **Estudo da perda de heterozigosidade nas regiões 17q21, 17q24 e 3p14 em cânceres de mama esporádicos**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Orientadora: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro.

SASI, R. et al. Chromosome aberrations and oncogene alterations in two new breast tumor cell lines. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.51, p.239-259. 1991.

SATO, T. et al. Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. **Cancer Res.**, v.50, p.7184-7189. 1990.

SAUER, T. et al. Numerical abnormalities of chromosome 7 in interphase cell nuclei of breast carcinomas have no impact on immunohistochemically determined EGFR status. **APMIS**, v.107, p.211-216. 1999.

SCHERES, J.M.J.C. Identification of two robertsonian translocation with a giemsa banding technique. **Hum.Genet.**, v.15, p.253-256. 1972.

SCHMID-BRAZ, AT. **Estudo Citogenético de Tumores Ovarianos e Carcinomas Mamários**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Orientador: Iglénir João Cavalli.

SCHOENMAKERS, E.F.P.M. et al. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-G, in benign mesenchymal tumors. **Nature Genet.**, v.10, p.436-444. 1995.

SLAMON, D.J. et al. Human breast cancer: correlations of relapse and survival with amplifications of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v.235, p.177-182. 1987.

STAATS, B. et al. A fibroadenoma with a t(4;12)(q27;q15) affecting the HMG1-C gene, a member of the high mobility group protein gene family. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.38, p.209-303. 1996.

STEINARSDÓTTIR, M. et al. Cytogenetic studies of breast carcinomas: Different karyotypic profiles detected by direct harvesting and short-term culture. **Genés, Chromosomes & Cancer**, v.13, p.239-248. 1995.

SREEKANTIAH, C. e SANDBERG, A. A. Clustering of Aberrations to Specific Chromosome Regions in Benign Neoplasms. **Int. J. Cancer**, v.48, p.194-198. 1991.

SU, G. et al. Genomic structure of the human tetratricopeptide repeated-containing gene **TTCH**, from chromosome region 1p31 and mutation analysis in breast cancers. **Int. J. Mol. Med.**, v.5, p.197-200. 2000.

TAN, J. M. et al. The novel human **MOST-1** (G8 orf 17) gene exhibits tissue specific expression, maps to chromosome 8q24.2, and is overexpressed/amplified in high grade cancers of the breast and prostate. **Mol. Pathol.**, v.56, p.109-115. 2003

TEIXEIRA, M.R. et al. Clonal Heterogeneity in Breast Cancer: Karyotypic Comparisons of Multiple Intra and Extra – Tumorous Simples from 3 Patients. **Int. J. Cancer**, v.63, p.63-68. 1995.

TEIXEIRA, M.R. et al. Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. **Cancer Res.**, v.56, p.855-859. 1996.

TEIXEIRA, M.R. et al. Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. **Genes Chromosomes Cancer**, v.33, n.1, p.1-16. 2002.

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

TEYSSIER, J.R. e FERRE, D. Frequent clonal chromosome changes in human non-malignant tumors. **Int. J. Cancer**, v. 44, p.8282-832. 1989.

THEILLET, C. et al. Loss of a c-H-ras-1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. **Cancer Res.**, v.46, p.4776-4781. 1986.

THOMPSON, A.M. et al. P53 allele losses mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinical-pathological parameters. **Int.J.Cancer**, v.50, p.528-532. 1992.

THOMPSON, F. et al. Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinoma I. Twenty-eight cases with primary disease. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.7, p.185-193. 1993.

TIBILETTI, M.G. et al. A Large 6q Deletion is a Common Cytogenetic Alteration in Fibroadenomas, Pre-Malignant Lesions, and Carcinomas of the Breast. **Clinical Cancer Res**, v.6, p.1422-1431. 2000.

TLSTY, T. et al. Suppression of gene amplification in human cell hybrids. **Science**, v.255, p.1425-1427. 1992.

TOBIAS, E. S. et al. The *TES* gene at 7q31.1 is methylated in tumours and encodes a novel growth-suppressing LIM domain protein. **Oncogene**, v.20, p.2844-2853. 2001.

TOULAS, C. et al. Potential prognostic value in human breast cancer of cytosolic Nme1 protein detection using an original hen specific antibody. **Br J Cancer**, v.73, p.630-635. 1996.

TRENT, JM. Cytogenetic and molecular biologic alterations in human breast cancer: a review. **Breast Cancer Res Treat**, v.5, p.221-229. 1985.

TRENT, J. et al. Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas II. Thirty-four cases with metastatic disease. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.7, p.194-203. 1993.

TSAROUHA, H. et al. Karyotypic evolution in breast carcinomas with *i(1)(q10)* and *der(1;16)(q10;p10)* as the primary chromosome abnormality. **Cancer Genet. Cytogenet**, v.113, p.156-161. 1999.

TSUDA, H. et al. Correlations between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative Oncogene co-amplification units, *hst-1/int2* and *c-erbB-2/ear1*. **Cancer Res.**, v.49, p.3104-3108. 1989.

TSUDA, H. et al. Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. **Am. J. Pathol.**, v.161, p.859-866. 2002.

TSUKAMOTO, F. et al. Clinicopathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization. **Cancer**, v.93, p.165-170. 2001.

TSUNEIZUMI, M. et al. Association of allelic loss at 8p22 with poor prognosis among breast cancer cases treated with high-dose adjuvant chemotherapy. **Cancer Lett.**, v.180, p.75-82. 2002.

VAL, J. F. et al. Cell proliferation, nuclear ploidy, and EGFr and MER2/neu Tyrosine Kinase oncoproteins in infiltrating ductal breast carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet**, v.138, p.69-72. 2002.

VARLEY, J.M. et al. Alterations to either *c-erbB- 2* (neu) or *c-myc* protooncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. **Oncogene**, v.1, p.423-430. 1987.

VAZIMAKI, S. et al. Distinct target regions for chromosome 1p deletions in parathyroid adenomas and carcinomas. **Int. J. Oncol.**, v.21, p.727-735. 2002.

WAKE, N. et al. Chromosomes and causations of human cancer and leukemia. XLIV. A method for chromosome analysis of solid tumors. **Cancer Genet Cytogenet.**, v.3, p.1-10. 1981.

WANSCHURA, S. et al. Regional fine mapping of the multiple aberration region involved in uterine leiomyoma, lipoma and pleomorphic adenoma of the salivary gland to 12q15. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.14, p.68-70. 1995.

WOOSTER, R. et al. Localizations of a breast susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. **Science**, v.265, p.2088-2090. 1994.

WUICIK, L. **Estudo Citogenético em Carcinomas da Mama Humana**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Orientador: Iglénir João Cavalli.

YAREMKO, M.L. et al. Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is an early event in breast cancer. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.13, p.186-191. 1995.

YUNIS, J.J. High resolution of human chromosomes. **Science**, v.191, p.1268-1270. 1976

ZAFRANI, B. et al. Cytogenetic study of breast cancer: clinicopathologic significance of homogeneously staining regions in 84 patients. **Hum. Pathol.**, v.23, p.542-547. 1992.

ZANG, K.D. e SINGER,H. Chromosomal constitution of meningiomas. **Nature** (London), v.216, p.84-85. 1967.

ZANKL, H. e ZANG,K.D. Cytological and cytogenetic studies on brain tumors. IV. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as No.22 by fluorescence technique. **Human Genetik**, v.14, p.167-169. 1972.

ZECH, L. Investigation at metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. **Exptl. Cell Res.**, v.58, p.463. 1969.

ZHANG, R. et al. Rare clonal karyotypic variants in primary cultures of human breast carcinoma cells. **Cancer_Res.**, v.49, p.444-449. 1989.

ZHOU, J. et al. A novel transcription factor, ELF5, belongs to the ELF subfamily of ETS genes and maps to human chromosome 1p13-15, a region subject to LOH and rearrangement in human carcinoma cell lines. **Oncogene**, v.17, p.2719-2732. 1998.