

DÉBORAH AFONSO CORNÉLIO

Estudo Citogenético em Lesões Benignas e Malignas da Mama
Humana

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, área Genética.

CURITIBA
1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

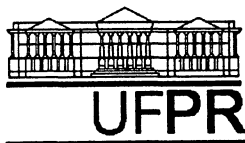
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Estudo Citogenético em Lesões Benignas e Malignas da Mama
Humana

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

Área de concentração: Genética
Aluna: Déborah Afonso Cornélio
Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA
1999



Curso de Pós-Graduação em Genética

Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

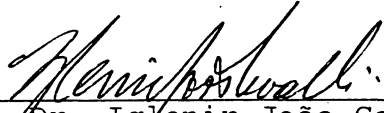
P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **DÉBORAH AFONSO CORNÉLIO**, 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 à candidata o conceito **"A" (Excelente)**.

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

Curitiba, 25 de maio de 1999.

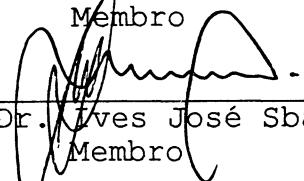
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Igenir João Cavalli
Orientador e Presidente

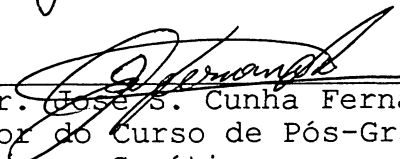


Profª. Dra. Hiroko Nitta
Membro



Prof. Dr. Lves José Sbalqueiro
Membro

Visto:



Prof. Dr. José S. Cunha Fernandes
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Genética



Arq.CPGG/Parecer/par99

Aos pacientes:

Porque é muito mais espessa
a vida que se desdobra
em mais vida,
como uma fruta
é mais espessa
que sua flor;
como a árvore
é mais espessa
que sua semente;
como a flor
é mais espessa
que sua árvore.

Espesso,
porque é mais espessa
a vida que se luta
cada dia,
o dia que se adquire
cada dia
(como uma ave
que vai cada segundo
conquistando seu vôo).

João Cabral de Melo Neto (de Cão Sem Plumas, 1950).

Aos meus avós, Bruno e
Conrada, Antônio e Eulália
(*in memoriam*). Aos meus
pais, Antônio (*in
memoriam*), Luiz e
Martinha. Ao meu
companheiro, Mauro, e aos
meus filhos, Matheus e
Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Iglénir João Cavalli por ter me orientado e contribuído para a realização deste trabalho, e pela confiança que demonstrou ao me aceitar para trabalhar no Laboratório de Citogenética Humana.

À Luciane Regina Cavalli, pela orientação no início da parte prática deste trabalho, ao ensinar toda a técnica de obtenção de cromossomos em tumores de mama, por ter demonstrado interesse pelo trabalho em vários momentos e por ter realizado uma eficiente correção do manuscrito.

À minha amiga e “companheira de trabalho”, Ana Teresa Schmid-Braz, pelo valioso auxílio durante a parte prática, pelo constante incentivo e por estarmos sempre lutando juntas para que tudo desse certo, tanto pessoal quanto profissionalmente.

À Enilze M. S. F. Ribeiro, por ter realizado, com muita dedicação e paciência, a correção de todos os cariótipos obtidos neste trabalho e principalmente pela sua importante presença desde o início da minha formação científica.

Ao Dr. Rubens Silveira de Lima, pela sua seriedade e preocupação com a produção e desenvolvimento científico.

À equipe de médicos e auxiliares do Serviço de Oncologia do Hospital Nossa Senhora das Graças e da Oncoclínica, principalmente à Claudete de Fátima Lara Pinto, por ter sido prestativa e atenciosa em todos os momentos em que foi solicitada.

À amiga Regina de Paula Xavier Gomes por ter corrigido o manuscrito sobre a histopatologia da mama.

À Lismeri Wuicik e Adriane Martins pela imprescindível ajuda durante a parte prática deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Genética que ministraram com bastante eficiência e dedicação os créditos que cursei durante o Mestrado e pela amizade e consideração demonstradas em alguns momentos difíceis pelos quais passei.

Aos amigos Danilo Doneda, pela sua amizade sincera, e Virgínia Cóser que me ajudaram a obter a maioria dos periódicos utilizados no levantamento bibliográfico.

À minha mãe, Martinha Afonso Padoin, pelo exemplo de força e de raça e por ter auxiliado na correção do português empregado no manuscrito.

Ao meu marido, Mauro Pichorim, por ter fotografado os cariótipos apresentados, por ser um exemplo de dedicação e competência em tudo o que realiza e por ser um ótimo pai e companheiro.

À Tamara, Carmem Lúcia e “Duca”, colegas do Laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas, por estarem sempre prontas a ajudar.

À toda a minha família, à minha irmã, Soraya, e em especial à Tania, Carmem e Luiz, por serem pessoas tão especiais que me ajudaram de várias maneiras para a realização deste trabalho.

Aos amigos biólogos Alessandra e Paulinho Pagliosa, Munique e Denilson, Patrícia, Paulinho Labiak, Adriana e Paulinho Marques, Rose, Bione, por estarem sempre ao meu lado, respeitando a vida e me ajudando a seguir em frente.

Às crianças Gabriel e Matheus, meus filhos, por terem sido compreensivos quando precisei estar ausente, Mariah, Aurea, Elora e Nicole, pela presença delas em minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. HISTÓRICO.....	1
2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE CÂNCER DE MAMA.....	3
3. HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA.....	3
4. HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES BENIGNOS DA MAMA.....	5
5. HISTOPATOLOGIA DA DOENÇA FIBROCÍSTICA.....	7
6. CITOGENÉTICA DAS LESÕES BENIGNAS DA MAMA.....	8
7. ESTUDOS MOLECULARES NAS LESÕES BENIGNAS DA MAMA.....	18
8. CITOGENÉTICA DE TUMORES MALIGNOS DA MAMA.....	23
8.1 – Aspectos gerais.....	23
8.2 – Citogenética dos tumores malignos da mama.....	25
8.3 – Citogenética dos tumores metastáticos da mama.....	33
8.4 – Policlonalidade citogenética em tumores da mama.....	35
9. ESTUDOS MOLECULARES EM TUMORES MALIGNOS DA MAMA	37
9.1 – Aspectos gerais.....	37
9.2 – Alterações genéticas nos tumores malignos da mama.....	39
10. CITOGENÉTICA E GENÉTICA MOLECULAR DAS LESÕES NA MAMA MASCULINA.....	42
11. CARCINOMAS DE MAMA FAMILIAIS E HEREDITÁRIOS.....	47
II. OBJETIVOS.....	52
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	53
2. COLETA DO MATERIAL.....	54
3. INÍCIO E MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR.....	55
3.1 - Dissociação do material.....	55
3.2 - Método de cultura.....	55
3.3 - Repique da cultura.....	56
4. COLHEITA DA CULTURA.....	57
5. ANÁLISE CROMOSSÔMICA.....	58
6. BANDAMENTO GTG.....	58
7. FOTOMICROGRAFIA.....	59
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
9. MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	59
IV. RESULTADOS.....	61
1. LESÕES BENIGNAS DA MAMA.....	61
Caso 1 – Ginecomastia.....	61
Caso 2 - Doença Fibrocística Mamária Florida.....	65
Caso 3 - Doença Fibrocística Mamária Florida.....	68
Caso 4 – Fibroadenoma.....	72
Caso 5 - Fibroadenoma.....	77
Caso 6 - Fibroadenoma.....	80
Caso 7 - Fibroadenoma.....	83
Síntese dos resultados das lesões benignas da mama.....	87
2. TUMORES MALIGNOS DA MAMA.....	93

Caso 8 – Carcinoma Ductal Invasor.....	93
Caso 9 – Carcinoma Ductal Invasor.....	97
Caso 10 – Carcinoma Ductal Invasor.....	101
Caso 11 – Carcinoma Ductal Invasor.....	105
Caso 12 – Carcinoma Ductal Invasor.....	108
Caso 13 – Carcinoma Ductal Invasor.....	112
Caso 14 – Carcinoma Ductal Invasor.....	116
Caso 15 – Carcinoma Mamário Metastático.....	120
Síntese dos resultados dos tumores malignos da mama.....	124
V. DISCUSSÃO.....	130
1. Graus de ploidia nas lesões benignas e malignas da mama.....	130
2. Aberrações cromossômicas numéricas e estruturais observadas nas lesões benignas da mama.....	140
3. Aberrações cromossômicas numéricas e estruturais observadas nos tumores malignos da mama.....	152
VI. CONCLUSÕES.....	173
VII. REFERÊNCIAS.....	177

RESUMO

Com o principal objetivo de ampliar o conhecimento citogenético sobre as lesões benignas e malignas da mama humana, analisamos citogeneticamente sete lesões benignas da mama e oito carcinomas mamários. Os tecidos tumorais foram processados utilizando-se a técnica de desagregação enzimática pela colagenase, seguida de cultura celular a curto-médio prazo. Nas sete lesões benignas, foram contados os cromossomos de 416 metáfases em coloração convencional, obtendo-se um número cromossômico modal igual a 46 em todos os casos. Nos oito tumores malignos, foram contados os cromossomos de 598 metáfases em coloração convencional, um número cromossômico modal igual a 46 foi obtido em todos os casos. Foram analisadas 200 metáfases com bandamento GTG das sete alterações benignas, sendo que três metáfases (47,XXY do caso 4) não foram consideradas, 87 (43,5%) apresentaram um cariótipo normal e 110 (55%) tinham alterações cromossômicas, destas, 91 (82,73% das alteradas e 45,5% do total) apresentaram alterações cariotípicas clonais. As aberrações cromossômicas clonais ocorreram mais freqüentemente nos cromossomos 22, X, 4 e 17. Analisaram-se 242 metáfases com bandamento GTG das oito alterações malignas, 85 (35,12%) apresentaram um cariótipo normal e 157 (64,88%) tinham alterações cromossômicas. Destas, 135 (85,99% das alteradas e 55,79% do total) apresentaram alterações cariotípicas clonais. As aberrações cromossômicas clonais foram observadas mais freqüentemente nos cromossomos 17, X e 18, 15, 19 e 21. Comparando as alterações cromossômicas dos tumores benignos e malignos, verificou-se que nos primeiros observou-se, em média, $22,57 \pm 14,27$ alterações clonais por caso e nos malignos, $37,75 \pm 24,60$. A diferença entre as médias avaliada pelo teste t indicou um valor não significativo ($t=1,43$; $0,20 > P > 0,10$). Observou-se também que as aberrações numéricas e as estruturais não se distribuem igualmente nos dois tipos de tumores ($X^2_1 = 7,33$; $P < 0,01$) sendo a diferença devido principalmente às aberrações estruturais. As monossomias e trissomias distribuíram-se igualmente nos dois tipos de tumores ($X^2_1 = 1,37$; $P > 0,10$). Nos dois tipos de lesões mamárias estudadas verificou-se que as alterações cromossômicas não ocorreram ao acaso em alguns cromossomos e a união dos resultados obtidos por nós com aqueles já descritos na literatura demonstrou que certas aberrações não são casuais em câncer de mama, podendo-se começar a distinguir quais são as alterações primárias e secundárias na tumorigênese mamária.

I. INTRODUÇÃO

1. HISTÓRICO

Os primeiros estudos sugerindo associações de irregularidades nucleares e mitóticas a neoplasias humanas e a importância das mesmas para o diagnóstico do câncer datam da última década do século passado (von Hanseemann, 1890; cf. Mitelman *et al.*, 1997a). Em 1914, Theodor Boveri formulou a Teoria Mutacional do Câncer onde postulou que aberrações cromossômicas são as responsáveis pelo comportamento maligno das células cancerosas (Hainsworth & Garson, 1990; Mitelman *et al.*, 1997a).

Na década de 50, vários pesquisadores, analisando cromossomos de tumores, observaram alterações numéricas e estruturais adquiridas, fortalecendo a hipótese de que aberrações cromossômicas são uma parte importante e integrante do desenvolvimento e progressão do tumor. Elaboraram, também, o conceito de "stemline", definido pela primeira vez por Winge (1930; cf. Heim & Mitelman, 1995), descrevendo o comportamento das populações de células malignas em termos Darwinianos: a variabilidade genética surgindo através de mutação transformando a célula normal em neoplásica, dando a ela uma vantagem de crescimento em relação às células normais adjacentes, prosseguindo a proliferação neoplásica em termos de seleção sequencial de subpopulações mutantes derivadas de um progenitor comum (Nowell, 1976; Mitelman *et al.*, 1997a).

Estas suposições foram alvo de muitos debates até que em 1960, Nowell & Hungerford descreveram o cromossomo Philadelphia em pacientes com leucemia mieloide crônica, a primeira anormalidade cariotípica consistente associada a uma neoplasia humana, admitindo-se que esta alteração era a causa direta do estado neoplásico (Heim & Mitelman, 1995) e dando um forte suporte à hipótese de Boveri. Esta descoberta fez aumentar o interesse na citogenética de câncer no início dos anos 60, porém um quadro muito confuso de aberrações cariotípicas foi encontrado nas outras neoplasias estudadas, fazendo com que a visão prevalecente nessa década fosse a de que as alterações cromossômicas eram epifenômenos, originando-se durante a progressão tumoral e de nenhum significado patogenético (Mitelman *et al.*, 1997a).

Também, durante a década de 60, análises cariotípicas foram realizadas em muitas amostras de câncer de mama, a grande maioria derivada de efusões malignas em pacientes submetidos a radioterapia e quimioterapia (Hainsworth & Garson, 1990).

Entretanto, antes do advento das técnicas de bandamento (Casperson *et al.*, 1968) e sua aplicação nos cromossomos humanos (Zech, 1969; Casperson *et al.*, 1970), não era possível a diferenciação exata dos cromossomos e nem o estudo detalhado das alterações cromossômicas. A introdução destas técnicas e o aperfeiçoamento dos métodos de cultura de células (Limon *et al.*, 1986; Pandis *et al.*, 1992a) possibilitaram um desenvolvimento qualitativo e quantitativo dos estudos citogenéticos em neoplasias humanas.

Com o advento de técnicas citogenéticas refinadas, numerosas alterações cromossômicas adquiridas têm sido descritas em tumores hematológicos e de tecidos sólidos (Sandberg, 1990; Heim & Mitelman, 1995). Os primeiros são mais fáceis de analisar pois as células são dispersas e crescem em suspensão. Ao contrário, a citogenética de tumores sólidos é mais complexa, necessitando de cultura *in vitro*, devido à pior qualidade e quantidade das metáfases obtidas por preparação direta.

De 1983 a 1994 foram publicadas cinco edições do Catálogo de Aberrações Cromossômicas em Câncer demonstrando um rápido aumento na quantidade de informações citogenéticas em uma ampla variedade de doenças neoplásicas, de tal maneira que o **Cancer Chromosome Data Bank**, que é continuamente atualizado, contém a descrição de mais de 27000 neoplasmas cariotipicamente anormais (Mitelman *et al.*, 1997a). Entretanto, a maioria destes dados é de doenças hematológicas, e embora o número de estudos citogenéticos em tumores sólidos tenha dobrado nos últimos cinco anos, eles constituem somente 29% dos cânceres humanos estudados citogeneticamente (Mitelman *et al.*, 1997b). Em relação à citogenética em câncer de mama, o aumento no número de casos descritos é considerável, pois se no início da década de 90 somente 100 carcinomas mamários com anormalidades cariotípicas haviam sido descritos, em poucos anos este número aumentou para mais de 500 (Heim *et al.*, 1997).

Apesar disso, o número de informações é restrito e este fato, aliado a problemas técnicos, dificulta a introdução da citogenética na prática de diagnóstico clínico de tumores sólidos. Entretanto, a situação está mudando rapidamente e análises cromossômicas serão uma importante ferramenta para auxiliar a estabelecer um diagnóstico correto e para fornecer informações importantes referentes ao prognóstico nas neoplasias de tecidos sólidos, assim como ocorre atualmente com os estudos citogenéticos de doenças hematológicas, que desempenham uma função essencial no gerenciamento dos pacientes (Mitelman *et al.*, 1997b).

2- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a segunda causa de morte por neoplasia nos Estados Unidos, sendo a principal causa de morte entre mulheres de 40 a 60 anos de idade. Atualmente, constata-se que está havendo uma maior detecção de casos de carcinoma mamário na maioria das populações (Garne *et al.*, 1997). Porém, este fato pode estar relacionado ao uso de técnicas de diagnóstico mais adequadas como a de mamografia, e não a um aumento real na incidência da doença (Garne *et al.*, 1997). Outras razões possíveis são registros mais eficientes e/ou alterações na prevalência de fatores de risco como os reprodutivos e o uso de anticoncepcionais orais. Observa-se também que um declínio na mortalidade causada por carcinoma de mama tem recentemente sido registrado em vários países, e as causas do mesmo têm sido atribuídas tanto à crescente possibilidade de detecção precoce da doença como ao aperfeiçoamento dos procedimentos terapêuticos (Moss, 1997).

Embora a causa do câncer de mama seja desconhecida, vários fatores de risco parecem aumentar a susceptibilidade da mulher para a doença. Alguns destes fatores incluem a história menstrual e reprodutiva, história familiar, presença de doença benigna da mama, exposição à radiação ionizante e longo tratamento com estrógenos (Cropp, 1995). Apesar do reconhecimento destes fatores de risco, aproximadamente 70% das mulheres que desenvolveram carcinoma de mama não têm qualquer fator de risco identificável (Harris *et al.*, 1993).

O câncer de mama é uma doença heterogênea tanto clínica quanto biologicamente, portanto é possível que a genética do câncer de mama seja também especialmente complexa, sendo os muitos fatores que predisõem à doença indicativos de várias vias alternativas para o desenvolvimento e progressão desta malignidade (Cropp, 1995).

3 - HISTOPATOLOGIA DOS TUMORES MALIGNOS DA MAMA

O câncer de mama é uma doença muito heterogênea histologicamente, sendo que, muitas vezes, diferentes áreas dentro de um tumor podem apresentar diferentes combinações de padrões histopatológicos. A análise histopatológica do câncer de mama estabelece o diagnóstico da lesão, auxilia na determinação do prognóstico do paciente e

leva a um melhor entendimento da natureza da neoplasia. Há várias classificações patológicas de carcinomas mamários, sendo que as mais comumente usadas são aquelas apresentadas pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP, 1967; cf. Harris *et al.*, 1993) e pela Organização Mundial da Saúde (1982; cf. Harris *et al.*, 1993).

Harris *et al.* (1993) classificaram os carcinomas mamários da seguinte forma:

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

* **carcinoma ductal infiltrante ou invasor:** uma grande variedade de tipos histológicos de carcinomas invasivos (infiltrantes) da mama tem sido descrita. O carcinoma ductal infiltrante designado NOS (sem outra especificação), em que nenhuma característica histológica especial é reconhecida, está entre 70% dos cânceres de mama. Estes 70% comumente formam metástases nos linfonodos axilares e seu prognóstico é o pior de todos os tipos ductais.

* **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 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:** é relativamente incomum, 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.

Microscopicamente, carcinomas lobulares são compostos tipicamente por pequenas células num arranjo linear (fila indiana) com tendência a crescer ao redor dos ductos e lóbulos. Carcinomas lobulares são caracterizados por uma proporção maior de tumores multicêntricos na mesma mama ou na mama oposta do que a encontrada em carcinoma ductal NOS. Carcinoma lobular infiltrante tem uma probabilidade de envolvimento axilar e de prognóstico similar ao do 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 de parênquimas do pulmão, fígado ou cérebro, os carcinomas lobulares mostram uma predileção para meninges e superfícies serosas.

***doença de Paget:** ocorre em 1% de todos os pacientes com câncer de mama. Clinicamente, o 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 dos pacientes. Este tumor pode ser do tipo intraductal ou invasivo, sendo o prognóstico relacionado ao tipo histológico do tumor associado.

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

4 - HISTOPATOLOGIA DOS NEOPLASMAS BENIGNOS DA MAMA

Segundo Gompel & Van Kerkem (1990):

*** fibroadenoma:** é um neoplasma fibroepitelial, sendo a neoplasia benigna 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 pode 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. A possibilidade de transformação maligna tem dado origem a muita controvérsia, sendo que em 1996, Houlihan (cf. Petersson *et al.*, 1997) 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 de carcinoma associado mais freqüentemente descrito. 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 do papiloma intraductal, portanto, falando em termos gerais, a evolução desta lesão é benigna na maioria dos casos, porém, deve-se realizar a excisão completa deste tumor benigno para evitar o risco de recorrência local.

* **cistosarcoma filóides:** atualmente conhecido 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, que aparece mais freqüentemente 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 pequeno espaço de 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 atipias 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, parecendo não ocorrer no benigno. Excisão local ampla é o tratamento adequado para lesões benignas, e a mastectomia é necessária para tumores muito volumosos ou histologicamente malignos.

5 - 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, está apenas parcialmente compreendida. As estruturas histológicas do tecido mamário são submetidas a influências e fatores diferentes que podem modificá-las 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 uma condição 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 de lesões básicas incluindo as seguintes: proliferação epitelial, que inclui epiteliomose e papilomatose intraductal, cistos lactíferos, fibrose estromal, adenose esclerosante ou adenomatose mioepitelia, 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. Os argumentos a favor incluem: 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 é muito fraca.

6. CITOGENÉTICA DAS LESÕES BENIGNAS DA MAMA

Por muito tempo se aceitou que os tumores benignos apresentavam uma constituição cromossômica normal, pela não detecção de núcleos e figuras mitóticas atípicas e pelos achados nos ocasionais estudos citogenéticos realizados antes do desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico (Sandberg, 1980).

Atualmente está bem estabelecido que em alguns tumores benignos são freqüentes determinados tipos de aberrações cromossômicas como por exemplo: a translocação $t(12;14)(q14-15;q23-24)$ em leiomiomas uterinos (Heim *et al.*, 1988); o envolvimento de 12q13-14 em lipomas (Mandahl *et al.*, 1987); monossomia ou deleção do cromossomo 22 em meningiomas (Sreekantaiah & Sandberg, 1991); e alterações estruturais nos cromossomos 3, 8 e 12 em adenomas pleomórficos da glândula salivar (Sreekantaiah & Sandberg, 1991). Portanto, a presença de aberrações cromossômicas não é necessariamente indicativa de malignidade. Algumas delas são encontradas em tumores benignos e malignos da mesma linhagem, o que indica uma evolução citogenética em proliferações benignas e levanta novas questões sobre a relação entre processos benignos e malignos (Sandberg, 1988). Comparações entre a freqüência e o padrão de alterações cromossômicas em tumores benignos e malignos são muito úteis e podem auxiliar a distinguir aberrações que estão associadas ao fenótipo metastático daquelas associadas somente aos aspectos proliferativos do processo neoplásico (Khan & Evans, 1991).

Apesar dos fibroadenomas serem os tumores benignos mamários citogeneticamente mais estudados, estes estudos são relativamente incomuns, considerando a alta frequência destes tumores em mulheres jovens.

Zhang *et al.* (1989) analisaram citogeneticamente 40 carcinomas de mama primários e quatro metástases mamárias não tratados, nove fibroadenomas e 10 tecidos mamários normais (obtidos de biópsias ou mastectomias). Nos fibroadenomas, foram analisadas em média 15,4 metáfases por caso, sendo que o número modal foi 46 em todos os casos, com aneuploidias e tetraploidias casuais e sem nenhuma anormalidade cromossômica clonal detectada.

Calabrese *et al.* (1991), estudando citogeneticamente 25 fibroadenomas mamários de 17 mulheres, encontraram em sete deles alterações cromossômicas clonais, com o envolvimento preferencial dos cromossomos 1, 8, 9, 12, 15, 20 e 21, sendo que as alterações mais comuns foram aquelas envolvendo o cromossomo 12, observadas em três pacientes. Em dois destes tumores, de diferentes pacientes, os pontos de quebra localizaram-se em 12p12, próximo àquele observado numa linhagem celular derivada de uma lesão fibrocística benigna da mama por Nielsen & Briand (1989). Também encontraram uma $t(11;12)(q21;q15)$ em três fibroadenomas provenientes de uma mesma paciente, indicando que todos tiveram origem numa mesma célula primordial transformada.

Fletcher *et al.* (1991) realizaram uma análise citogenética de dois hamartomas condróide pulmonar e de nove fibroadenomas. Quatro fibroadenomas apresentaram aberrações cromossômicas clonais, sendo que as trissomias dos cromossomos 5, 11 e 20 foram as alterações recorrentes. Como o fibroadenoma é um tumor bifásico em que às vezes ocorre transformação maligna, é de considerável interesse determinar qual é o componente neoplásico. Para isso, os autores desenvolveram um método combinado de imunohistoquímica e citogenética. Informações foram obtidas em apenas dois fibroadenomas com alterações clonais, observando-se que ambos continham igual proliferação de fibroblastos e de células epiteliais e que a proliferação neoplásica estava confinada ao componente estromal, pois as aberrações clonais estavam restritas às células mesenquimais, enquanto que as células epiteliais dos mesmos tumores eram citogeneticamente normais. Em um caso com cariótipo complexo envolvendo as trissomias dos cromossomos 5, 11 e 20 foi observado crescimento *in vitro* somente de células mesênquimais, e o quarto tumor com aberração não apresentou metáfases

suficientes para se fazer a análise combinada. Segundo Belda *et al.* (1993), o trabalho de Fletcher *et al.* (1991) foi o primeiro a dar evidência concreta de que alguns fibroadenomas representam uma proliferação neoplásica clonal de células estromais.

Stephenson *et al.* (1992) analisaram sete fibroadenomas, dos quais dois apresentaram alterações cariotípicas clonais e um não clonal. Um paciente apresentou a $t(3;5)(p22;q13)$ em todas as células analisadas. Em outro caso foi observada a trissomia do 11 em quatro células e do 10 em uma célula. E no terceiro caso com aberração não clonal, a trissomia do 8 foi encontrada em uma célula. Os autores ampliaram a investigação citogenética com estudos de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em células interfásicas usando sondas centroméricas dos cromossomos 8, 10 e 11. Desta maneira, a natureza clonal das trissomias para estes três cromossomos pôde ser documentada, pois a trissomia do 8 esteve presente em 2% dos núcleos interfásicos do terceiro caso; e no segundo caso dois clones não relacionados foram identificados: um com a trissomia do 11 em 15% das células, e outro com a trissomia do 10 em 24% das células, Stephenson *et al.* (1992) sugeriram que a primeira alteração (+11) poderia ser de origem mesenquimal, enquanto que a segunda (+10) poderia ter se originado no componente epitelial.

Belda *et al.* (1993) descreveram um rearranjo cromossômico clonal, $t(4;14)(q24-25;q24.3)$, num tumor fibroso da mama, que é uma lesão rara mostrando muitas características em comum com fibroadenomas, inclusive o caráter bifásico. Os pesquisadores também fizeram um estudo imunohistoquímico/citogenético combinado que demonstrou que as células com a translocação derivaram de populações estromais. Considerando os dados das pesquisas de Fletcher *et al.* (1991), acima referidos, e de Belda *et al.* (1993), Petersson *et al.* (1997) sugeriram que as condições *in vitro* levando à seleção de um ou outro tipo celular poderiam resultar em padrões cariotípicos diferentes.

Cavalli (1994) analisou oito tumores benignos de mama, sendo sete fibroadenomas e um papiloma intraductal. Nas 133 células analisadas com bandamento GTG foram observadas 412 alterações cromossômicas das quais 222 (53,88%) formaram clones ($\bar{x} = 27,75 \pm 23,79$) observados em todos os casos. Das aberrações clonais, 186 (84%) foram numéricas e 36 (14%) estruturais. As monossomias (117) foram mais freqüentes do que as trissomias (69). Alterações estruturais clonais foram observadas em cinco (62,5%) dos oito tumores estudados, sendo que a $del(6)(q23)$ e a

inv(20)(p13q11) foram as mais freqüentes. As aberrações clonais, numéricas e estruturais, ocorreram em ordem de maior freqüência nos cromossomos 12, X, 20, 22, 21, 6, 9 e 17.

Leuschner *et al.* (1994) investigaram citogeneticamente um fibroadenoma recorrente, que apresentou em 31 das 58 metáfases analisadas o seguinte cariótipo : 48, XX, del(6)(q21), r(11)(?)+ der(11)x2, der(14)t(6;14)(q21;q32). As células em cultura apresentaram uma morfologia exclusivamente de fibroblastos, reforçando sugestões anteriores de que nos fibroadenomas, as células neoplásicas são de origem mesenquimal. Os autores usaram técnicas de FISH, com sonda específica para o cromossomo 11 que possibilitou a demonstração de que os dois marcadores e o cromossomo em anel detectados por citogenética convencional continham DNA do cromossomo 11.

Análise citogenética de 25 fibroadenomas de 18 pacientes foi realizada por Ozisik *et al.* (1994). Em três casos foram observadas aberrações cromossômicas clonais: 46, XX, ins(12;?)(q15;?) no caso 1; 45, XX, t(1; 8; 16)(q25; q23;q22-23), add(7)(p14), der(15)(q?), -17 no caso 2 e 46, XX, del(2)(q14;q31-q32) no caso 3.

Investigação citogenética de 15 casos de doença proliferativa da mama (DPM) e de 15 fibroadenomas foi realizada em 1995 por Dietrich *et al.* Em relação aos fibroadenomas, 10 apresentaram cariótipos normais e cinco foram cariotipicamente anormais, sendo que quatro destes apresentaram clones múltiplos não relacionados citogeneticamente. Nenhuma alteração recorrente foi detectada nos cinco tumores cariotipicamente anormais; entretanto algumas das anormalidades, entre elas: der(1;16)(q10;p10), del(1)(q12) e del(7)(q11) ocorrem não casualmente em carcinomas mamários, sendo que estas alterações foram observadas somente em culturas enriquecidas por células epiteliais, mas não naquelas com um padrão predominante de crescimento de fibroblastos. Isto também aconteceu para o der(1; 15)(q10;q10), outro rearranjo resultando no ganho de 1q. Portanto, os autores concluem que algumas das alterações cromossômicas que têm sido freqüentemente encontradas em carcinomas da mama são também detectadas no componente epitelial dos fibroadenomas.

Rohen *et al.* (1996) analisaram citogeneticamente 30 fibroadenomas, sendo que um deles havia sido descrito num trabalho anterior conforme foi acima referido (Leuschner *et al.*, 1994). Destes, três apresentaram aberrações cromossômicas clonais: aquele previamente descrito e mais dois com os seguintes cariótipos 46, XX,

der(6)t(1;6)(q25;p21.3) e 47, XX, +5. Rohen *et al.* (1996) enfatizaram a importância do envolvimento dos cromossomos 5, 11 e de 6p21 em alterações nos fibroadenomas, supondo que rearranjos no gene HGM podem estar envolvidos na gênese de um subtipo de fibroadenomas, pois nestes tumores foram detectadas alterações em 6p21, onde foi mapeado o gene HMGI-Y (Friedman *et al.*, 1993), e em 12q13-15, onde se encontra o gene HMGI-C (Wanschura *et al.*, 1995).

Um fibroadenoma da mama com uma única anormalidade citogenética: t(4;12)(q27;q15) foi descrito por Staats *et al.* (1996). As freqüentes descrições do envolvimento de 12q14-15 levou os autores a acreditarem que o gene HMGI-C poderia estar mutado num subtipo de fibroadenomas. Para resolver esta questão eles realizaram estudos citogenéticos moleculares neste fibroadenoma e mostraram que o ponto de quebra 12q15 estava de fato localizado dentro do gene HMGI-C. A partir destes dados Staats *et al.* (1996) discutem se as alterações em 12q13-15 observadas em fibroadenomas poderiam representar transformação precoce para tumores filóides.

Petersson *et al.* (1997) estudaram citogeneticamente 50 fibroadenomas, encontrando alterações cromossômicas clonais em nove deles, sendo que em um caso havia múltiplos clones não relacionados e relacionados citogeneticamente, enquanto que os outros apresentaram um único clone anormal. Quatro tumores possuíam uma translocação balanceada como única anomalia: t(5;13)(q22-31;q22-34), t(1;4)(p34;p14), t(5;17)(p10;q10) e t(7;19)(q22;q13), um quinto tumor apresentou um rearranjo complexo no cromossomo 3, levando à perda de material em 3p. Em outro caso foi detectada a monossomia do 6 como única alteração, e outros dois fibroadenomas apresentaram alterações numéricas e estruturais envolvendo os cromossomos X, 1, 4, 7, 9, 10, 12, 20 e 21. As únicas alterações recorrentes foram +20 e os rearranjos no braço curto do 1: t(1;4)(p34;p14) em um caso e t(X;1)(q26;p33) em outro. Petersson *et al.* (1997) salientaram o envolvimento do cromossomo 1, de 3p, de 4p14 em alterações estruturais e das alterações numéricas +4, -6, +7, +12 e +20 observadas em fibroadenomas (Calabrese *et al.*, 1991; Fletcher *et al.*, 1991; Ozisik *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1995; Rohen *et al.*, 1996) e em outras lesões benignas da mama e que também foram descritas em carcinomas mamários (Mitelman *et al.*, 1994; cf. Petersson *et al.*, 1997).

Dal Cin *et al.* (1998) encontraram o cariótipo 52, XX, +7, +8, +11, +12, +18, +20 em 15 das 20 metáfases analisadas de um fibroadenoma juvenil de uma paciente

com 15 anos de idade. Estes autores salientaram que a presença isolada de alterações numéricas é um achado comum em vários tipos de tumores infantis, porém a relevância biológica das trissomias ainda precisa ser esclarecida.

Tumores filóides da mama são tumores bifásicos raros nos quais o componente mesenquimal pode ser altamente maligno, portanto é a única alteração benigna da mama que certamente pode passar por transformação maligna (Dietrich *et al.*, 1997). A análise citogenética dos cistosarcomas filóides além de fornecer informação patogénica importante, pode ter um grande valor clínico se as causas pelas quais alguns destes tumores sofrem transformação malignas forem detectadas (Dietrich *et al.*, 1997). Alterações cromossômicas clonais foram descritas em 14 tumores primários e em duas linhagens celulares (Birdsall *et al.*, 1992, 1995a; Dietrich *et al.*, 1994a, 1997; Dal Cin *et al.*, 1995; Warso *et al.*, 1995).

Um cistosarcoma filóides foi analisado citogeneticamente pela primeira vez por Birdsall *et al.* (1992) que observaram alterações cromossômicas nas 30 células analisadas, obtendo-se o seguinte cariótipo: 46, XX, t(6;12)(q23;q13), t(10;16)(q22;p11), t(13;22)(p11;q11), der(14)t(14;?)(p11;?). Segundo Birdsall *et al.* (1992) as alterações mais representativas foram as translocações: t(6;12)(q23;q13) e t(10;16)(q22;p11), pois as bandas 12q13 e 16p11 também estão envolvidas em alterações em liposarcoma mixóide.

Dietrich *et al.* (1994a) estudaram citogeneticamente cinco tumores filóides, sendo um benigno, dois limítrofes malignos (da mesma mama) e dois malignos. O cariótipo observado no tumor benigno foi: 46, XX, del(12)(p11p12)/ 46, XX, t(8;18)(p11;p11)/ 46,XX. O primeiro limítrofe maligno apresentou a t(3; 20)(p21;q13) como única anormalidade, enquanto que o tumor recorrente apresentou o seguinte cariótipo: 46, XX, t(3; 20)(p21;q13)/ 46, XX, t(9;10)(p22;q22)/46, XX, t(1; 8)(p34;q24)/ 46, XX, del(11)(q22-23)/ 46,XX. Num tumor maligno que apresentou áreas benignas e áreas de limítrofe observou-se a t(1;6)(p34;p22) como anormalidade clonal. Finalmente, o cariótipo do segundo tumor maligno foi o seguinte: 42, XX, der(1)t(1;4)(q21;q21), der(3)t(3;17)(q29;q21), -4, i(8)(q10), -10, -13, i(13)(q10), der(14) t(1;14)(q21;p11), der(14)t(4;14)(p12;p11), -17/ 80-90, idemx2, +del(1)(q12), +i(1)(p10), +dic(5;5)(p14;p14), +i(6)(p10), +del(7)(p11), +dup(7)(q11q36), +i(15)(q10), inc/ 46,XX. Os resultados indicaram algumas similaridades citogenéticas entre tumores filóides benignos/ limítrofes malignos e fibroadenomas, refletindo mecanismos

patogenéticos similares nestes dois tipos tumorais.

Birdsall *et al.* (1995a) realizaram análises citogenéticas e de FISH em duas amostras consecutivas de tumor filóides da mama na mesma paciente. Na primeira amostra o cariótipo foi: 46, XX, +dic(1;10)(q10;q24), - 21 [29], e na segunda foi: 46, XX [1]/ 46, XX, +i(1)(q10), -21[23]/ 47, XX, +1, +i(1)(q10), dic(1;10)(q10;q24), -21 [1]. Os autores discutiram a importância dos rearranjos em 1q, e acrescentaram que a perda do cromossomo 21 e a presença do dic(1;10)(q10;q24) em ambas as amostras é consistente com uma origem e evolução clonais nestes tumores.

Dietrich *et al.* (1997) detectaram alterações cromossômicas clonais simples em cinco tumores filóides benignos, sendo que em dois deles foram observados clones citogeneticamente não relacionados e alterações que levaram ao ganho de material em 1q, e em outros dois foram detectadas deleções intersticiais de 3p como aberrações únicas. Num tumor filóides altamente maligno foi encontrado um cariótipo complexo e com número cromossômico próximo à triploidia. Os autores sugeriram que a complexidade cariotípica pode ser um marcador de malignidade em tumores filóides, e também que estes tumores são verdadeiramente bifásicos, pois tanto os componentes epiteliais quanto estromais apresentam clones anormais e, portanto, é possível que ambos façam parte do parênquima neoplásico.

Doença fibrocística da mama é uma desordem não neoplásica comum que compreende diagnósticos histológicos diferentes que têm características clínicas similares. Estas doenças benignas da mama distinguem-se em lesões não proliferativas (cistos, fibroadenoses, e hiperplasia epitelial suave), lesões proliferativas sem atipia (adenose esclerosante e hiperplasia moderada ou florida) e hiperplasias atípicas (ductal ou lobular), de acordo com o risco subsequente de câncer de mama (Petersson Lundin *et al.*, 1998a).

Duas lesões epiteliais benignas da mama mostrando alterações clonais envolvendo 12q13-15 foram descritas por Rohan *et al.* (1993). O primeiro tumor mostrou hiperplasia epitelial florida e adenose, e o segundo tratava-se de um tumor papilar com áreas de hiperplasia epitelial florida. Os autores questionaram se a ativação de um gene em 12q13-15 tem um papel importante não somente na gênese de alguns tumores benignos, mas também na hiperplasia epitelial de células ductais da mama.

Estudos citogenéticos em uma papilomatose ductal e em 15 tumores malignos

foram realizados por Bullerdiel *et al.* (1993). O cariótipo observado na alteração benigna foi o seguinte: 47, XX, +7[7]/ 46, XX[6], a trissomia do 7 tem sido observada como única anormalidade numa grande variedade de tumores sólidos (Sandberg, 1990) bem como em tecidos normais próximos ao tecido tumoral.

Petersson *et al.* (1994) encontraram alterações cromossômicas clonais em seis de 30 lesões mamárias com doença fibrocística. Estes seis casos apresentaram características histopatológicas que representam um risco aumentado de câncer de mama: quatro casos com adenose esclerosante, o quinto com áreas de proliferação epitelial e o sexto com hiperplasia lobular atípica. Os cariótipos foram os seguintes: no caso 1, 45, XX, -12, add(16)(q13)/46, XX; caso 2, 45, XX, -6, der(16)t(6;16)(q13;q22)/46, XX; caso 3, 47, XX, +18/46, XX; caso 4, 46, XX, der(11)t(1;11)(q11;q25)/46, XX; caso 5, 47, XX, +5, del(7)(q22q32)/47, X, add(X)(q11), +der(?)t(?;X)(?;q11-21)/46, XX; e no caso 6, 46, XX, t(5;17)(p13;q12)/46, XX.

Dietrich *et al.* (1995) analisaram citogeneticamente 15 casos de DPM, encontrando alterações cromossômicas clonais em sete das 10 hiperplasias epiteliais (HE) analisadas e em quatro dos cinco papilomas. O cromossomo mais frequentemente envolvido nas alterações estruturais foi o 12 (com pontos de quebra em 12p13 numa HE, 12q24 em outra HE e 12q12 e 12q23 num papiloma). A del(3p), observada frequentemente em câncer de mama, foi a alteração mais comum, encontrada em um caso de HE atípica e em dois papilomas, em que havia uma mistura de HE atípica difusa. Além disso, a del(1)(q12), também característica de câncer de mama, foi detectada numa HE. Dietrich *et al.* (1995) concluíram que, sob o ponto de vista citogenético, pode-se dizer que hiperplasia epitelial atípica e papiloma da mama deveriam ser considerados lesões pré cancerosas considerando que eles apresentam alterações cromossômicas idênticas às aquelas identificadas como anormalidades primárias em câncer de mama.

Dal Cin *et al.* (1996) descreveram uma deleção em 6q entre as bandas 6q21 e 6q25 como a única anormalidade cromossômica num caso de doença fibrocística benigna da mama sem hiperplasia epitelial. Isto é de substancial importância, pois deleções em 6q estão entre as anormalidades cromossômicas mais frequentemente observadas em tumores de mama primários e metastáticos, em contraste com sua rara ocorrência em lesões benignas. Admite-se que molecularmente em 6q podem ocorrer numerosos pontos de quebra e vários tipos de deleções não detectáveis

citogeneticamente (Dal Cin *et al.*, 1996). Pode-se também considerar a possibilidade de que a mesma aberração em 6q pode ser observada em algumas lesões benignas e em carcinomas da mama.

Burbano *et al.* (1996a) descreveram citogeneticamente culturas primárias de cinco hiperplasias epiteliais mamárias. Quatro casos apresentaram um número modal diplóide, e um tetraplóide. Dois dos cinco casos apresentaram anormalidades citogenéticas clonais: del(5)(q33) em um caso; +del(1)(p32), del(1)(q41), e monossomias dos cromossomos 6, 9, 19 e X no outro caso, além da associação telomérica tas(1;11)(q44;p15) que foi encontrada em apenas uma célula. Estas associações têm sido descritas em diferentes tipos de tumores malignos e podem ser uma característica de células cancerosas (Pathak *et al.*, 1988). Burbano *et al.* (1996a) acreditam que as alterações cromossômicas encontradas nas duas hiperplasias epiteliais possam ter um papel importante na tumorigênese benigna da mama.

Staats *et al.* (1998) analisando dois casos de doença fibrocística, observaram a tetrassomia do cromossomo 18 em duas células de ambos os casos analisados. Adicionalmente, no segundo caso, foi observada a trissomia do 18 em cinco metáfases. O segundo caso foi avaliado também pelo uso de FISH com sondas centroméricas para o cromossomo 18 que comprovou a presença da trissomia e tetrassomia deste cromossomo. A ocorrência de +18 em hiperplasias benignas e em câncer de mama sugere que esta aberração tem uma função importante nos estágios iniciais da transformação das células epiteliais da mama.

Petersson Lundin *et al.* (1998a) analisaram 69 casos de alterações fibrocísticas da mama e 10 amostras de tecido mamário normal e encontraram alterações clonais em seis lesões fibrocísticas. Em duas destas amostras foram encontrados diagnósticos histopatológicos correspondentes a alterações não proliferativas, com o cariótipo 46,XX,t(1;10)(p22;p14) [4]/ 46, XX [54] em um caso e 46,XX,t(3;4)(p14;q21)[10]/46,XX[17] no outro. Três casos cariotipicamente anormais foram diagnosticados como lesões proliferativas sem atipia, com os seguintes cariótipos: 37~45,XX,-1,-3,-18[cp5]/46,XX[55]; 46,XX,t(1;7)(p22;q32)[2]/46,XX[105]; e 47,XX,+7[10]/46,XX,t(1;3)(p31;q24)[5]/ 46,XX[52]. Finalmente, o cariótipo 46,X,r(X;?),-6,+der(?)t(?;X)(?;p11)[15]/46,XX[34] foi observado numa lesão proliferativa com focos de hiperplasia atípica.

Birdsall *et al.* (1995b) estudando um caso de fascite nodular da mama, que é uma proliferação aumentada benigna de fibroblastos, descreveram o seguinte cariótipo: 46, XX, -2,-2,-13, der(15)t(2;15)(q31;q26), +der(?)t(?;2), +mar1, +mar2[cp3]/ 90-93, XXX, -X, -2, -2, -2, -2, del(6)(q16q24)x2, -13, -13, der(15)t(2;15)(q31;q26)x2, -18, +der(?)t(?;2)x2, +mar1x2, +mar2x2, +mar3x2, +mar4x2[cp8][11]. Os autores sugeriram o possível envolvimento de genes localizados em 6q na proliferação de fibroblastos.

Cavalli (1994) estudou um papiloma intraductal, observando a del(12)(p12p12) como única aberração estrutural e aberrações numéricas dos cromossomos 6, 9, 19, 21 e 22 (trissomias), 12 e 21 (monossomias).

Petersson Lundin *et al.* (1998b) analisaram dois casos de papiloma intraductal, sendo que um deles possuía alterações cromossômicas clonais, sendo encontrado o seguinte cariótipo 47,XX,+16[25]/ 47,idem,der(19)t(1;19)(q11;p13)[4].

Dois adenolipomas benignos da mama (tumores benignos raros com uma histologia mista envolvendo componentes ductais estromais e gordurosos) foram analisados citogeneticamente por Dietrich *et al.* (1994b), apresentando os seguintes cariótipos: 47,XX, +del(1)(p22) e 46, XX, t(12;16)(q15;q24), tais rearranjos são também frequentemente descritos em outros lipomas esporádicos. No primeiro caso foi utilizado o método de cultura normalmente empregado para carcinomas de mama (Pandis *et al.*, 1992a), entretanto o segundo caso foi processado de uma maneira que permitiu separar a população celular mesenquimal da epitelial, possibilitando uma comparação dos cariótipos quantitativamente dominantes nestes dois componentes tumorais principais, demonstrando que a t(12;16) esteve presente em maior proporção no frasco com células mesenquimais. Os autores concluíram que adenolipomas da mama têm cariótipos indistinguíveis dos lipomas esporádicos e que as células que apresentam as aberrações são de origem mesenquimal, indicando que os elementos epiteliais não fazem parte do parênquima neoplásico. O seguinte cariótipo: 46, XX, add(4)(?), add(6)(q?), der(7)t(7;12)(q11.1 ou q11.2; q11 ou q12), der(12) de um adenolipoma da mama foi descrito por Rohen *et al.* (1995a). Além da análise citogenética, os autores utilizaram FISH, comprovando que o ponto de quebra da translocação envolvendo o 12 estava dentro de uma região de aberrações múltiplas (MAR).

7. ESTUDOS MOLECULARES NAS LESÕES BENIGNAS DA MAMA

Segundo Steeg *et al.* (1996) o desenvolvimento de estratégias de prevenção para mulheres com um alto risco de desenvolver câncer de mama necessita de um mapa molecular do processo da tumorigênese, considerando-se que a progressão de um estado pré maligno para maligno é acompanhada por alterações citogenéticas e moleculares. A comparação dos estudos existentes de carcinomas invasivos, que apresentam diferenças no número de cópias, seqüência ou níveis de expressão de genes específicos, com os de estudos obtidos em lesões precoces da mama evidencia um número limitado de estudos nestas lesões. Em consequência, o conhecimento sobre os eventos envolvidos na transição de células epiteliais normais para os estados pré-malignos e tumorigênicos é escasso.

Micale *et al.* (1994) afirmaram que a identificação em doença proliferativa da mama (DPM) de alterações similares àquelas encontradas em carcinomas poderia fortalecer a percepção de DPM como uma condição pré-maligna. Estes autores analisaram aberrações cromossômicas em lesões proliferativas microscópicas da mama, tentando relacioná-las às aberrações previamente descritas em câncer de mama. Para tanto utilizaram FISH empregando sondas α -satélite dos cromossomos 1, 16, 17, 18 e X em tecidos normais da mama, adenose, hiperplasia moderada a florida, carcinoma ductal ou lobular *in situ*, e câncer invasivo. Perdas dos cromossomos 16, 17 e 18 foram observadas nas lesões hiperplásicas e em carcinomas, sugerindo, segundo os autores, que algumas hiperplasias podem ser parte de uma seqüência de progressão à malignidade na carcinogênese mamária. Os tecidos normais correspondentes apresentaram complemento cromossômico normal, indicando que as aberrações cromossômicas citadas acima estão associadas à condição neoplásica.

Visscher *et al.* (1995) utilizaram FISH para determinar as alterações numéricas dos cromossomos 1, 7, 8, 16, 17 e X em nove carcinomas lobulares *in situ*, 10 carcinomas ductais *in situ* e uma variedade de lesões proliferativas (três hiperplasias ductais, uma adenose, um scar radial e duas hiperplasias atípicas). Nenhuma das lesões proliferativas exibiu ganhos cromossômicos detectáveis, e somente a adenose mostrou evidência de perda de sinal, consistente com monossomia do cromossomo 7.

Leuschner *et al.* (1996) fizeram estudos utilizando FISH com sonda centromérica do cromossomo 1 em 77 tumores malignos e 17 lesões benignas (10 fibroadenomas,

cinco papilomas, uma hiperplasia ductal leve e uma hiperplasia ductal florida). Todos os tumores benignos apresentaram dois sinais por núcleo.

Afify *et al.* (1996) também utilizaram FISH e sonda α -satélite específica para o cromossomo 8 na análise de 11 carcinomas ductais infiltrantes, cinco carcinomas ductais *in situ*, cinco carcinomas lobulares, três carcinomas papilares e seis lesões benignas da mama. Neste estudo não foram encontradas polissomias do cromossomo 8 nas lesões benignas.

Sneige *et al.* (1996) realizaram estudos com FISH em 25 lesões da mama detectadas por mamografia: cinco lesões não proliferativas, nove hiperplasias atípicas e 11 carcinomas; foram utilizadas sondas para os cromossomos 7-12, 17, 18 e X. Aberrações cromossômicas foram detectadas em duas lesões não proliferativas e em todas as hiperplasias atípicas. Nas lesões não proliferativas foram observadas trissomias dos cromossomos 7, 8, e 12 e monossomia do 17; nas hiperplasias atípicas foram observadas trissomias de todos os cromossomos investigados e monossomias dos cromossomos 8 e 10. Neste estudo foi observado que houve um aumento das aberrações de acordo com a progressão da doença.

A ocorrência de aberrações cromossômicas numéricas foi investigada por Ichikawa *et al.* (1996) utilizando-se FISH com sondas para os cromossomos 1, 11 e 17 em amostras de 106 tumores de mama primários (78 carcinomas primários, dois tumores filóides, e 26 tumores benignos) obtidos por biópsias de aspiração. Nenhum dos tumores benignos e filóides apresentou evidências de alterações para qualquer um dos três cromossomos avaliados.

Tsuda *et al.* (1997) examinaram em 12 papilomas e em 14 carcinomas papilares, através de FISH, as alterações numéricas e estruturais dos cromossomos 1 e 16, incluindo os cromossomos derivativos formados pela fusão der(1;16). Alterações envolvendo estes cromossomos não foram observadas em nenhum papiloma analisado.

Ried *et al.* (1995) utilizaram a técnica de hibridização genômica comparativa (CGH) para verificar perdas e ganhos de DNA em 13 fibroadenomas, 10 carcinomas diplóides e 10 carcinomas aneuplóides. Adicionalmente investigaram a amplificação dos protooncogenes C-MYC, CYCD1, INT-2, e C-ERBB-2 e a expressão de C-ERBB-2 e de TP53 mutante nesta mesma amostra. Nenhum dos fibroadenomas analisados revelou variação no número de cópias do DNA detectável por CGH, além de não ter sido evidente qualquer amplificação de protooncogenes (por análise de Southern blot) ou

expressão aumentada de TP53.

Lu *et al.* (1997) determinaram as alterações no número de cópias cromossômicas em 19 tumores filóides (15 benignos, três malignos e um limítrofe) de 18 pacientes utilizando CGH. As alterações freqüentemente observadas foram ganho de 1q (7/18), perda de 3p (6/18), ganho de 7q (4/18) e perdas de 6q (4/18) e 3q (3/18). Ganho de 1q esteve significativamente associado a um maior crescimento do componente estromal definido histologicamente. Além disso, todos os casos com ganho de 1q e sem ganho de 1p, apresentaram uma história clínica de recorrência. Somente um caso onde não foi detectado ganho de 1q, que demonstrou a perda do cromossomo X como única alteração, apresentou recorrência. O número aumentado de cópias em 1q nos tumores filóides estudados esteve associado à recorrência e pode, portanto, ser considerado como um indicador de agressividade necessitando de um tratamento terapêutico mais radical.

Odagiri *et al.* (1994) investigaram o significado clínico de deleções teloméricas e amplificação de C-ERBB-2 ambos por Southern blot em pacientes com lesões na mama, incluindo 41 carcinomas e tecidos normais adjacentes, oito fibroadenomas e seis ginecomastias. As médias dos comprimentos teloméricos foram menores em carcinomas e fibroadenomas, entretanto nenhuma diferença significativa foi observada nos comprimentos teloméricos entre carcinomas, fibroadenomas e ginecomastia. Amplificação de C-ERBB-2 não foi observada em pacientes com fibroadenomas ou ginecomastia.

Com o objetivo de determinar se as alterações genéticas descritas em carcinomas mamários também poderiam estar envolvidas no desenvolvimento de doenças benignas da mama, Lizard-Nacol *et al.* (1995) analisaram em 50 destas lesões (37 fibroadenomas, oito tumores filóides benignos e cinco doenças fibrocística da mama) evidências de perda de heterozigosidade (LOH) em 1p32, 3p24, 7q31, 11pter-p15-5, 17p13, 17q23-qter e 18q21.3-qter; de amplificações dos genes C-MYC, INT-2 e C-ERBB-2; e de mutações em TP53 e HRAS. Nenhuma alteração genética foi encontrada nas amostras estudadas, nem naquelas com células adjacentes a regiões atípicas ou de carcinoma, sugerindo que a ocorrência das alterações moleculares testadas no trabalho é um evento tardio na carcinogênese mamária.

Millikan *et al.* (1995) analisaram 60 biópsias benignas da mama, incluindo fibroadenomas, alteração fibrocística, adenose esclerosante e graus variando de baixa a moderada hiperplasia, para os seguintes marcadores: expressão aumentada de HER-

2/neu e TP53 por imunohistoquímica, amplificação de HER-2/neu e PRAD-1 e mutação em TP53. Não foi detectada amplificação de PRAD-1 ou de HER-2/neu em nenhuma das amostras analisadas; cinco amostras exibiram baixa imunoreatividade para o produto de HER-2/neu, 14 lesões mostraram imunoreatividade focal ou difusa para a proteína TP53; e mutações de ponto no gene TP53 foram encontradas em cinco amostras.

Os resultados das análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) e das hibridizações por Southern blot do DNA de 19 tumores de mama malignos e dois fibroadenomas obtidos por Buchhagen *et al.* (1994) sugerem o envolvimento do braço curto do cromossomo 3, 3p14.3-p21.3, no desenvolvimento e/ou progressão do câncer de mama esporádico.

Panagopoulos *et al.* (1996) utilizaram análise de RT-PCR e PCR no DNA genômico para estudar a expressão dos genes FHIT e PTPRG, localizados em 3p14.2, em quatro amostras de mastectomias profiláticas, sendo três hiperplasias epiteliais com aberração cromossômica em 3p14, e uma fibroadenose com câncer de mama e cariótipo normal. Os genes em questão estavam deletados nas três hiperplasias atípicas da mama, sugerindo que estes rearranjos são eventos precoces na tumorigênese mamária. A análise genômica forneceu evidência de que pelo menos os exons 3 e 5 do FHIT e o exon 12 do PTPRG sofreram deleções homozigotas na maioria das células. Estes dados estão de acordo com as características histopatológicas e citogenéticas das três amostras: nenhuma contém parênquima normal e todas têm aberrações cromossômicas envolvendo 3p14. Em uma das amostras o rearranjo em 3p foi interpretado como inv(3)(p14q26), entretanto a análise molecular revelou uma deleção também nesta amostra, mostrando que rearranjos balanceados podem estar associados aos rearranjos submicroscópicos não balanceados. Além disso, os resultados enfatizam que a importância de um clone aberrante detectado citogeneticamente não pode ser julgado com base em sua frequência relativa após uma cultura a curto prazo, pois em todas as amostras com aberrações clonais, os clones com rearranjos em 3p foram a minoria, o que contraria os resultados moleculares, indicando que estes clones sofrem uma seleção *in vitro*. A perda casual de células depois da cultura *in vitro* pode ser devido a vários fatores como, por exemplo, aderência preferencial e vantagem proliferativa de células estromais normais. PTPRG foi proposto como um candidato a gene supressor tumoral e tem sido extensivamente investigado em carcinomas de células renais (Kastury *et al.*,

1996). FHIT é outro candidato a gene supressor que foi clonado e caracterizado (Ohta *et al.*, 1996), anormalidades neste gene foram descritas em carcinomas do trato digestivo, mama e pele (Ohta *et al.*, 1996; Sozzi *et al.*, 1996a,b; Negrini *et al.*, 1996), o que está de acordo com dados citogenéticos e moleculares prévios que mostraram alterações freqüentes na banda 3p14, nestes tipos tumorais.

Ahmadian *et al.* (1997) encontraram LOH na região 3p14.2, onde estão mapeados o gene FHIT e o sítio frágil FRA3B, em 2/8 hiperplasias intraductal próximas a lesões de carcinoma ductal *in situ* (DCIS). Foi observado que sempre o mesmo alelo estava perdido nas lesões hiperplásicas e em DCIS correspondentes, indicando que LOH em 3p14.2 pode ser um evento precoce no modelo de múltiplos passos de eventos genéticos progressivos levando à carcinogênese.

Chuaqui *et al.* (1997) analisaram LOH em 11q13 (PYGM, INT-2) em 12 casos de hiperplasia ductal atípica e em 24 de carcinomas *in situ*. Um caso de hiperplasia ductal atípica mostrou perda alélica em 11q13. Lakhani *et al.* (1995) descreveram LOH em cinco dos nove casos informativos de hiperplasia ductal atípica em 16q e em dois de oito casos informativos em 17p, com um marcador próximo ao TP53. Estes autores concluíram que deleções alélicas podem ocorrer em fases histológicas precoces do desenvolvimento do câncer de mama, e hiperplasia ductal atípica pode representar uma entidade neoplásica.

Kasami *et al.* (1997) estudaram as biópsias cirúrgicas de 25 lesões hiperplásicas benignas da mama, examinando LOH e instabilidade de microsatélite (MSI) em locos que têm mostrado alterações em câncer de mama. Estes autores encontraram cinco regiões com MSI e LOH para INT-2 (11q13) e D11S934 (11q23.3-24) num caso de hiperplasia florida com atipia (a paciente não desenvolveu câncer de mama até a data do estudo, 25 anos após a biópsia) e três regiões de MSI num caso de hiperplasia florida sem atipia (paciente sem câncer de mama até a data do estudo, 21 anos após a biópsia). Esta é a primeira descrição de múltiplas regiões com MSI em lesões pré malignas não associadas ao câncer. Apesar do fato dos estudos atuais ainda serem limitados, é provável que nem todas as alterações genéticas observadas em doenças proliferativas da mama sejam indicativas de pré malignidade clinicamente significativa para a mama remanescente.

8. CITOGENÉTICA DE TUMORES MALIGNOS DA MAMA

8.1 - Aspectos gerais

Os neoplasmas mais extensivamente analisados citogeneticamente são as leucemias e linfomas, constituindo em torno de 70-75% dos 27000 casos com alterações cromossômicas descritos na literatura. Entre as doenças hematológicas, vários rearranjos estruturais e numéricos recorrentes têm sido descritos, sendo que a não casualidade destas aberrações além de ser de interesse teórico, dando forte evidência à teoria da mutação somática, tem sido utilizada como guia para os estudos genético-moleculares que visam o descobrimento de mecanismos celulares básicos envolvidos no desenvolvimento do tumor (Mertens *et al.*, 1997).

De grande importância também é o fato de que o grande número de casos estudados permite a correlação dos padrões cariotípicos com características clínicas e morfológicas, tornando a análise citogenética extremamente importante no monitoramento de pacientes com leucemias e linfomas (Mertens *et al.*, 1997).

As informações citogenéticas em tumores sólidos são bem mais limitadas do que aquelas encontradas em doenças hematológicas, principalmente no que se refere aos tumores de origem epitelial, justamente aqueles que têm o maior impacto na morbidade e mortalidade humana. Esta falta de dados é parcialmente devida às dificuldades técnicas encontradas na cultura de células epiteliais (presença de áreas necrosadas, baixa atividade mitótica, crescimento de células normais, contaminação por microorganismos, dificuldades na desagregação do material) e à complexidade cariotípica, que torna difícil e algumas vezes impossível a identificação de todos os rearranjos cromossômicos presentes em um tumor (Mertens *et al.*, 1997). A complexidade cariotípica pode ser reflexo da detecção do câncer sólido num estágio tumoral mais avançado, de diferentes fatores etiológicos, ou da existência de múltiplas vias patogénicas nos tumores que se originam no epitélio.

Entretanto, mesmo quando a preparação é de boa qualidade e cada aberração cromossômica pode ser caracterizada, a diferenciação entre as alterações essenciais patogénicamente primárias (relacionadas com o início do processo tumoral) e as secundárias (alterações adicionais às primárias e que se relacionam à progressão tumoral) é mais difícil em tumores sólidos epiteliais do que em doenças hematológicas. As alterações genéticas primárias representam passos fundamentais durante o

estabelecimento do neoplasma e freqüentemente são específicas para cada tipo tumoral. Alterações secundárias originam-se através de evolução clonal e são responsáveis pelas alterações fenotípicas posteriores apresentadas por muitos tumores (Nowell, 1976). Conseqüentemente, um maior número de tumores citogeneticamente bem caracterizados é necessário para a identificação das aberrações essenciais envolvidas na iniciação e progressão tumoral (Mitelman *et al.*, 1997a).

Portanto, diferente da situação observada nas doenças hematológicas, onde a identificação de genes associados à neoplasia tem se baseado no conhecimento citogenético prévio, a seleção de locos alvos para estudos moleculares de tumores sólidos tem sido realizada sem um conhecimento detalhado sobre as alterações genéticas observadas ao nível cromossômico (Mertens *et al.*, 1997).

Atualmente observa-se que alguns tumores sólidos apresentam dados citogenéticos suficientes para permitir avaliações preliminares da heterogeneidade dentro e entre diferentes tipos tumorais, e também começam a ser caracterizados por um padrão de aberrações não casuais. Em contraste com o padrão de alterações estruturais simples e balanceadas, que pode levar à desregulação de funções de oncogenes ou à formação de genes híbridos, característico de leucemias e linfomas, percebe-se que o desenvolvimento da maioria dos tumores sólidos epiteliais é mais dependente de uma combinação de deleções e amplificações de múltiplos segmentos cromossômicos devido ao padrão cariotípico inespecífico e complexo. Como os segmentos cromossômicos envolvidos nestas alterações estruturais provavelmente contêm locos de genes supressores tumorais e de oncogenes, os dados obtidos através da análise citogenética podem apresentar grande relevância para os estudos moleculares de tumores sólidos (Mertens *et al.*, 1997).

Mertens *et al.* (1997) reuniram os dados cariotípicos de onze neoplasmas com aberrações cromossômicas clonais incluídas no **Cancer Chromosome Data Bank**, e analisaram as perdas e ganhos de material genético. Através deste estudo ficou evidente que cada um dos 11 tipos tumorais apresenta um padrão característico de ganhos e perdas cromossômicas, e que também há uma sobreposição considerável entre os perfis de desequilíbrio das diferentes entidades diagnósticas, sendo uma característica unificante que as perdas superam os ganhos em todos os tipos tumorais. Apesar das dificuldades técnicas e de interpretação na análise citogenética, percebe-se que há uma freqüência maior de perdas do que ganhos cromossômicos junto com a distribuição não

casual dos desequilíbrios. Isto sugere que a deleção de segmentos cromossômicos é, pelo menos quantitativamente, mais importante do que o ganho no desenvolvimento de tumores sólidos, sugerindo que, independente de origem histológica e de diferenciação, muitas malignidades sólidas desenvolvem-se a partir da mesma via genética.

A presença predominante das deleções em carcinomas sugere que a perda de genes supressores tumorais é o principal mecanismo para a iniciação e progressão destes tumores.

8.2 – Citogenética dos tumores malignos da mama

A análise citogenética de tumores malignos da mama foi de difícil interpretação por muitos anos. Os estudos citogenéticos das décadas de 50 e 60, realizados antes do advento das técnicas de bandamento cromossômico, apresentam um valor apenas histórico e a maioria das análises realizadas nas décadas de 70 e 80 utilizou células tumorais de efusões pleurais, algumas vezes obtendo-se as metáfases depois do estabelecimento de linhagens celulares *in vitro* (Trent, 1985).

No início da década de 90 somente 100 carcinomas mamários com anormalidades cariotípicas haviam sido descritos. No entanto, em poucos anos este número aumentou para mais de 500 (Heim *et al.*, 1997), devido principalmente aos desenvolvimentos técnicos (Limon *et al.*, 1986; Pandis *et al.*, 1992a) que possibilitaram analisar em detalhe também os tumores primários.

Apesar do número de informações ainda insuficiente, um padrão cariotípico não casual está sendo observado, permanecendo, no entanto, uma ampla heterogeneidade citogenética. Quando se analisa quaisquer dois tumores escolhidos casualmente, é muito mais provável que eles sejam citogeneticamente diferentes do que similares (Teixeira *et al.*, 1997), e até mesmo as alterações cromossômicas mais comumente observadas em câncer de mama (der(1;16)(q10;p10), i(1)(q10), del(1)(q11-12), del(1)(q42), del(3)(p12-13p14-21) e del(6)(q21-22)) apareceram com uma frequência inferior a 10% nos casos da grande série analisada por Pandis *et al.* (1995a). Os resultados até certo ponto dependem da técnica utilizada (Hainsworth & Garson, 1990; Pandis *et al.*, 1994a), especialmente se as células são colhidas diretamente ou depois de cultura a curto prazo. A primeira técnica não fornece informação em muitos casos mas se observa uma proporção alta de cariótipos complexos entre aqueles tumores que têm aberrações cromossômicas; provavelmente estes sejam os tumores mais malignos com alta

atividade mitótica *in vivo* (Rodgers *et al.*, 1984; Hill *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Ferti-Passantonopoulou *et al.*, 1991; Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993). Pela última técnica obtém-se preparações cromossômicas de melhor qualidade e a proporção de casos com anormalidades simples e únicas é maior (Thompson *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1993a, 1995a). As análises utilizando cultura *in vitro* fornecem informações citogenéticas numa porcentagem mais alta de casos (em relação às preparações diretas), sendo que as modificações nos protocolos de cultura a curto prazo possibilitaram um melhor crescimento das células epiteliais dos tumores mamários (Pandis *et al.*, 1992a) e cariótipos anormais passaram a ser obtidos em torno de 80% dos tumores examinados (Pandis *et al.*, 1993a, 1995a). Steinarsdóttir *et al.* (1995) obtiveram metáfases por preparação direta e após cultura a curto prazo de um mesmo grupo de tumores mamários e compararam os resultados cariotípicos obtidos por estes diferentes métodos, chegando à conclusão de que apesar do tipo de anormalidades cromossômicas clonais diferir dependendo do método utilizado, os resultados se sobrepõem parcialmente.

Apesar do que foi discutido acima, os estudos têm demonstrado que anormalidades adquiridas são comuns em carcinomas primários da mama e que o padrão cariotípico não é casual. As alterações cromossômicas mais comuns são ganhos de 1q, 7, 8, 18 e 20 e perdas de X, 1p, 1q, 3p, 6q, 8p, 11p, 11q, 13q, 16q, 17p, 19p, 19q e 22. Os pontos de quebra preferencialmente envolvidos em aberrações cromossômicas estruturais são 1p36, 1p22, 1q11-12, 1q21, 3p21, 3p12-14, 3q29, 4q21, 5p15, 6q21, 7p22, 7q11, 8p21, 11p15, 11q13, 13q12, 15cen, 16p13, 16cen, 16q22, e 19q13 (Dutrillaux *et al.*, 1990, 1991; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Ferti-Passantonopoulou *et al.*, 1991; Hainsworth *et al.*, 1991; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a,b, 1995a,b, 1996, 1997, 1998; Bullerdiel *et al.*, 1993, 1994; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a,b, 1997; Heim & Mitelman, 1995; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Adeyinka *et al.*, 1997, 1998; Cavalli *et al.*, 1997; Heim *et al.*, 1997).

Embora nenhuma aberração cromossômica esteja especificamente associada ao câncer de mama, várias alterações características ocorrem repetidamente com frequências que excedem aquelas nas quais elas são detectadas em outros tipos tumorais (Heim & Mitelman, 1995). Um total de onze anormalidades citogenéticas têm sido repetidamente detectadas tanto como alterações isoladas quanto como parte de

cariótipos mais complexos: trissomia dos cromossomos 7, 8, 12, 18 e 20 e os rearranjos estruturais der(1;16)(q10;p10), i(1)(q10), del(1)(q11-12), del(1)(q42), del(3)(p12-13p14-21) e del(6)(q21-22) (Bullerdiak *et al.*, 1993, 1994; Pandis *et al.*, 1995a; Rohen *et al.*, 1995b; Teixeira *et al.*, 1996; Adeyinka *et al.*, 1997). Estas alterações devem ser consideradas como candidatas a anormalidades cromossômicas primárias em carcinomas da mama, sendo bastante importantes patogeneticamente (Pandis *et al.*, 1995a).

Entre as aberrações acima citadas, as mais comuns em câncer de mama envolvem o cromossomo 1 (Dutrillaux *et al.*, 1990, 1991; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, 1994b, 1995a, b, 1998; Thompson *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1993; Hultén *et al.*, 1993; Heim & Mitelman, 1995; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1996a, 1997; Adeyinka *et al.*, 1998), o que já era evidente antes da década de 90 (Kovacs, 1981; Rodgers *et al.*, 1984; Trent, 1985; Gebhart *et al.*, 1986; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Hill *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1989). Gerbault-Seureau *et al.* (1987) verificaram que a maioria das aberrações no cromossomo 1 resultava no ganho do braço longo ou perda parcial ou completa do braço curto, afirmando que o ganho de 1q deve ocorrer precocemente na progressão tumoral. No início da década de 90, Dutrillaux *et al.* (1990) descreveram os rearranjos dos cromossomos 1 e/ou 16 como sendo as aberrações mais frequentes entre aquelas observadas nos 30 casos de câncer de mama analisados, e que levavam ao ganho de 1q e perda de 16q; sugerindo que +1q e -16q são alterações precoces na carcinogênese mamária. Em seguida, Pandis *et al.* (1992b) descreveram o der(1;16)(q10;p10) em dois tumores primários da mama e o i(1)(q10) em outros dois. O der(1;16)(q10;p10) resulta em um cariótipo que contém duas cópias normais do cromossomo 1, uma cópia normal do 16 e o cromossomo derivativo consistindo de 16p e 1q. Como Pandis *et al.* (1992b) encontraram rearranjos que resultam em +1q em todos os quatro tumores analisados, eles concluem que ganho de 1q é o efeito funcionalmente importante dos dois rearranjos. Porém, um possível efeito patogenético da perda de 16q não pode ser descartado, considerando que a perda em especial de 16q22-24, por outros mecanismos que não a translocação 1;16, tem também sido descrita em câncer de mama (Dutrillaux *et al.*, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1995a). Pela análise com bandamento cromossômico não era possível definir exatamente os pontos de quebra envolvidos no der(1;16), e a importância dos genes neles localizados era

questionada (Hultén *et al.*, 1993). Kokalj-Vokac *et al.* (1993) mostraram por FISH que os pontos de quebra no der(1;16) e i(1q) são variáveis e concluíram que a consequência importante dos rearranjos é realmente o desequilíbrio resultante e não o ponto de quebra em si. Embora menos freqüente, ganho de 1q ocorre também através de translocações não balanceadas entre o cromossomo 1 e outros pares que não o par 16 (Pandis *et al.*, 1995a).

A perda de material em 1q também tem sido descrita em alguns tipos de tumores mamários (Ferti- Passantonopoulou & Panani, 1987; Bello & Rey, 1989; Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1995a, b, 1998; Teixeira *et al.*, 1996a; Cavalli *et al.*, 1997). A del(1)(q11-12) resulta na perda de praticamente todo o braço longo do cromossomo 1, antagonizando os resultados do der(1;16) e do i(1q), onde ocorre o ganho deste braço cromossômico, representando resultados diferentes de eventos basicamente similares na região pericentromérica de 1q. É difícil visualizar um modelo de carcinogênese que explique observações de ganhos e perdas de 1q num mesmo tumor, porém Pandis *et al.* (1995a) acreditam que tais alterações antagônicas ocorrem em diferentes subpopulações de células tumorais da mama, sendo uma forte evidência da heterogeneidade intratumor. Outra deleção no braço longo do 1 freqüentemente observada em câncer de mama é a del(1)(q42), cujo efeito patogeneticamente importante é desconhecido, porém a perda de um gene supressor tumoral nesta região poderia ser o efeito relevante (Teixeira *et al.*, 1996a).

Deleções no braço curto do cromossomo 1 são interpretadas como alterações secundárias adquiridas durante a evolução clonal (Pandis *et al.*, 1995a), sendo que em 1990, Mitchell & Santibanez-Koref indicaram que 1p13 foi a banda mais envolvida em aberrações cromossômicas em suas amostras de câncer de mama analisadas. Hainsworth *et al.* (1992) afirmaram que as aberrações em 1p correlacionam com um pior prognóstico.

Pandis *et al.* (1993b) descreveram cinco carcinomas mamários que apresentavam uma deleção intersticial em 3p, del(3)(p12-13p14-21), como única alteração. Além destes cinco casos, outros carcinomas foram descritos com alterações em 3p, todos tendo a perda de 3p14 em comum (Zhang *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1993b, 1995a,b; Teixeira *et al.*, 1996a, b, 1997; Adeyinka *et al.*, 1996, 1998). As del(3p) intersticiais freqüentemente ocorrem como alterações únicas nas células, enquanto que deleções terminais maiores e translocações balanceadas que levam à perda de 3p são

observadas em cariótipos complexos. Portanto, Pandis *et al.* (1997) sugeriram que as primeiras são alterações primárias e que as últimas são alterações secundárias, tardias, relacionadas à progressão tumoral. O gene FHIT, que é candidato a gene supressor, foi recentemente mapeado no sítio frágil FRA3B em 3p14.2 e foi encontrado alterado em carcinomas da mama (Negrini *et al.*, 1996).

Deleções terminais e intersticiais envolvendo 6q, a maioria dos casos preferencialmente na região 6q21-23, também têm sido descritas como alterações únicas e fazendo parte de cariótipos complexos (Hill *et al.*, 1987; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1993a, 1995a; Thompson *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1997; Cavalli *et al.*, 1997). Thompson *et al.* (1993) afirmaram que estudos biológicos e moleculares das alterações no cromossomo 6, tanto em câncer de mama como em outros tumores, fornecem um forte suporte à hipótese de que este cromossomo contém um gene supressor tumoral importante na progressão maligna de várias neoplasias. Porém, considerando a presença de deleções em 6q em alguns casos de doença proliferativa da mama (dados citados no item 6), Cavalli *et al.* (1997) afirmaram que esta anormalidade pode afetar genes envolvidos nos estágios iniciais da tumorigênese mamária, ou que a região 6q21-25 pode conter mais do que um gene que possa contribuir nos diferentes passos na tumorigenicidade humana, considerando a alta frequência e a heterogeneidade de pontos de quebra desta deleção nos diferentes tumores.

A trissomia do cromossomo 7 foi detectada em carcinomas da mama por muitos pesquisadores (Rodgers *et al.*, 1984; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1992a, 1993a, 1994b, 1995a,b, 1998; Lu *et al.*, 1993; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1995, 1997; Bernardino *et al.*, 1997; Cavalli *et al.*, 1997; Adeyinka *et al.*, 1998) como alterações únicas ou fazendo parte de cariótipos complexos. A trissomia do cromossomo 7 tem sido encontrada em uma variedade de tipos tumorais e também em lesões não neoplásicas, e sugere-se que esta alteração, em particular, não seja específica de neoplasia (Johansson *et al.*, 1993; cf. Pandis *et al.*, 1995a). Rohen *et al.* (1995b) alertaram que a ocorrência de +7 como única anomalia é ainda controversa pois a sua presença pode ser devido a populações específicas de linfócitos infiltrantes no tumor.

A trissomia do cromossomo 8 foi proposta como uma alteração clonal recorrente em câncer de mama por Bullerdiek *et al.*, em 1993, e também foi observada em outras

análises citogenéticas (Rodgers *et al.*, 1984; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, 1995a, 1998; Rohen *et al.*, 1995b; Burbano *et al.*, 1996b; Bernardino *et al.*, 1997; Cavalli *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1997; Adeyinka *et al.*, 1998). Esta alteração tem sido descrita em vários tipos tumorais, ocorrendo em tumores benignos e malignos. Bullerdiel *et al.* (1993) acreditam que +8 pode fornecer uma vantagem proliferativa às células e não estar diretamente relacionada com a progressão maligna; porém, posteriormente o mesmo grupo (Rohen *et al.*, 1995b) afirmou que +8 pode representar tanto uma alteração primária como secundária em tumores sólidos. Análises sistemáticas são necessárias para excluir a possibilidade de que +8 possa ser comparada com a ocorrência de +7 em tumores sólidos (Bullerdiel *et al.*, 1993).

A trissomia do 12 foi identificada como um subgrupo citogenético de câncer de mama por Adeyinka *et al.*, em 1997, que indicam uma função para esta alteração nos estágios iniciais do desenvolvimento do carcinoma. Um total de quatro carcinomas da mama com +12 como única alteração no tumor ou em um dos clones aberrantes foi descrito recentemente (Adeyinka *et al.*, 1997; Pandis *et al.*, 1998). A trissomia deste cromossomo também foi observada como fazendo parte de cariótipos complexos (Pandis *et al.*, 1992b, 1993, 1995a, 1998; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Adeyinka *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1997). Os dados citogenéticos disponíveis não esclarecem se o significado patogenético de +12 pode ser reduzido a uma dosagem aumentada de somente um ou poucos genes e nem mesmo qual a região no cromossomo 12 em que ele(s) poderia(m) estar localizado(s) (Adeyinka *et al.*, 1997).

A trissomia do cromossomo 18 também é freqüentemente encontrada em câncer de mama (Zhang *et al.*, 1989; Geleick *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, 1995a, 1998; Bullerdiel *et al.*, 1993, 1994; Rohen *et al.*, 1995b; Adeyinka *et al.*, 1997, 1998; Cavalli *et al.*, 1997), sendo proposta como uma alteração importante nestes tumores por Bullerdiel *et al.* (1994).

A trissomia do cromossomo 20 foi observada em vários casos de câncer de mama (Rodgers *et al.*, 1984; Pandis *et al.*, 1993a, 1995a, 1998; Thompson *et al.*, 1993; Burbano *et al.*, 1996b; Cavalli *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1997), quase sempre fazendo parte de cariótipos que continham outras aberrações.

A relevância patogenética das trissomias consistentemente detectadas em câncer de mama ainda não foi esclarecida (Pandis *et al.*, 1995a). Estes autores acreditam que a evidência indireta de que as células trissômicas fazem parte do parênquima do tumor é

fornecida através da detecção destas alterações em cariótipos com número cromossômico próximo à triploidia e que não apresentam alterações estruturais (Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, 1995a), sendo possível que estas células apresentem importância no processo carcinogênico.

A análise realizada por Pandis *et al.* (1995a) em 103 carcinomas da mama com alterações clonais mostrou que além das trissomias acima citadas, as perdas dos cromossomos X, 8, 9, 13, 14, 17 e 22 parecem não serem casuais e nem secundárias, pois raramente foram encontradas como anomalias únicas. Todas estas monossomias também foram encontradas em câncer de mama por outros investigadores (Rodgers *et al.*, 1984; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Hill *et al.*, 1987; Geleick *et al.*, 1990; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Dutrillaux *et al.*, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Adeyinka *et al.*, 1996). Entretanto, Burbano *et al.* (1996b) referindo-se a Seizinger *et al.* (1991) ponderaram que células tumorais em crescimento rápido podem perder cromossomos ao acaso, e afirmaram que muitas monossomias e nulissomias descritas em tumores da mama podem não ter efeitos significantes na etiologia ou progressão da doença.

As regiões homogeneamente coradas (hsr) e os cromossomos double minutes (dmin) são sinais citogenéticos de amplificação gênica. Enquanto que dmin são raramente encontrados em carcinomas da mama (Rodgers *et al.*, 1984; Hill *et al.*, 1987), hsr têm sido descritas em até 60% dos casos com alterações cromossômicas clonais (Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Dutrillaux *et al.*, 1990; Saint-Ruf *et al.*, 1991; Zafrani *et al.*, 1992; Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1993a, 1995a; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Bernardino *et al.*, 1998). As hsr foram detectadas em todos os cromossomos em câncer de mama, com exceção do cromossomo 18, sendo que Gerbault-Seureau *et al.* (1987) foram os primeiros a indicar a região 8p como sendo a mais comum de hsr em câncer de mama, seguido pelos dois braços do cromossomo 19. Bernardino *et al.* (1998) encontraram hsr em 58% dos casos de câncer de mama analisados, tendo sido observada uma distribuição não casual da localização das mesmas e com recorrência em alguns cromossomos: cromossomo 8 (28 vezes), 11 (15 vezes), 17 (14 vezes), 19 (oito vezes) e 1 (sete vezes). Os autores também demonstraram que somente uma minoria das hsr(8)(p1) tem seqüências de DNA de 8p, enquanto que a maioria das hsr localizadas em 11q13 e no cromossomo 17 tem seqüências de DNA dos cromossomos 11 e 17, respectivamente. Estas observações

sugeriram que mecanismos diferentes podem ser responsáveis pela formação de hsr em câncer de mama.

Vários estudos histopatológicos têm demonstrado que não é rara a ocorrência de mais de um tumor mamário em uma mulher, localizados na mesma (tumores ipsilaterais) ou em ambas as mamas (tumores bilaterais). Como a maioria dos tumores malignos da mama são carcinomas ductais de nenhum tipo especial, histologicamente estes tumores são, muitas vezes, de difícil discriminação, permanecendo indefinido se são multicêntricos (tumores primários múltiplos de origem distinta) ou multifocais (tumores resultantes da disseminação intramamária de um processo carcinomatoso único). A determinação da constituição cariotípica dos carcinomas de mama distintos macroscopicamente no mesmo paciente pode fornecer informação válida sobre a multifocalidade ou multicentricidade tumoral (Teixeira *et al.*, 1994,1997; Pandis *et al.*, 1995b), pois as análises com bandamento cromossômico podem determinar a origem clonal das populações celulares tumorais (Heim, 1992). Pandis *et al.* (1995b) chegaram à conclusão de que o perfil cariotípico do câncer de mama bilateral é similar àquele encontrado no unilateral; a maioria dos exemplos indicou que cada tumor origina-se independentemente, pois contém aberrações cromossômicas completamente diferentes, porém em alguns casos os dados cariotípicos indicaram que poderia ter ocorrido metástase de uma mama para outra. Os estudos de Teixeira *et al.* (1994, 1997) sobre lesões ipsilaterais macroscopicamente distintas, mostraram que os diferentes tumores, freqüentemente, contêm clones anormais citogeneticamente, evolucionariamente relacionados. Estes autores chegaram à conclusão de que a disseminação a partir de um tumor primário (multifocalidade) é o mecanismo de origem dominante destas lesões; apesar de que carcinogênese *de novo* (multicentricidade) foi evidenciada em alguns casos. Apesar da limitação de dados, parece que os focos de câncer de mama multifocal tendem a estar próximos, e os focos do multicêntrico localizam-se casualmente dentro da mama.

O câncer de mama é uma das neoplasias humanas mais heterogêneas fenotipicamente, e Teixeira *et al.* (1995) salientaram que a análise citogenética é de grande utilidade para acessar esta heterogeneidade dentro de um tumor específico, pois permite determinar a constituição cariotípica de células individuais, ao invés de se basear no padrão médio observado numa população celular (Heim, 1992). Teixeira *et al.* (1995, 1996a) realizaram culturas separadas de amostras de todos os quatro quadrantes

de 10 cânceres de mama diferentes e também de tecidos da mama normais próximos ao tumor. Os autores demonstraram que houve uma extensa heterogeneidade citogenética dentro do tumor e que as populações celulares distintas cariotipicamente localizavam-se em domínios separados dentro do tumor. Esta distribuição clonal assimétrica indicou que a citogenética padrão subestima a heterogeneidade genômica real, considerando que a única amostra analisada, muitas vezes pequena, pode excluir as populações celulares quantitativamente menores ou localizadas num local do tumor que não foi enviado para o estudo citogenético. Estas subpopulações celulares cariotipicamente diferentes podem também apresentar características diferentes relacionadas ao processo maligno.

8.3 – Citogenética dos tumores metastáticos da mama

Em câncer de mama, a detecção de células neoplásicas nos linfonodos axilares é um sinal de mau prognóstico e significa generalização da doença (Pandis *et al.*, 1998).

Apesar de ser importante investigar qual a extensão da heterogeneidade do câncer de mama envolvida no processo metastático e quais são as diferenças e similaridades cariotípicas entre as lesões tumorais primárias e secundárias, apenas quatro trabalhos compararam a citogenética do tumor primário e sua metástase no linfonodo axilar (Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Pandis *et al.*, 1994b, 1998; Bernardino *et al.*, 1997) e somente o cariótipo das metástases foi descrito por outros pesquisadores (Zhang *et al.*, 1989; Trent *et al.*, 1993; Adeyinka *et al.*, 1996).

Gerbault-Seureau *et al.* (1987) encontraram cariótipos diferentes no tumor primário e no linfonodo (os cariótipos serão descritos no item 9 desta introdução), e segundo os autores isto poderia indicar que o tumor apresentava um cariótipo normal no início do processo tumorigênico e que a aquisição de anomalias cromossômicas ocorreu depois da invasão no linfonodo.

Zhang *et al.* (1989) analisaram cinco tumores metastáticos da mama removidos de pele, tórax e linfonodos não axilares. Apenas um deles possuía alterações cromossômicas clonais: t(1,5)(q21;q31), +16, +18.

Trent *et al.* (1993) analisaram 34 casos de carcinomas metastáticos da mama, todos apresentaram anormalidades cariotípicas clonais. Observaram-se cariótipos simples, com poucas aberrações numéricas e/ou estruturais em 11 casos. As monossomias foram mais freqüentes do que as trissomias, sendo que as mais comuns foram -2, -15, -18 e +20. As alterações estruturais envolveram mais freqüentemente os

cromossomos 1, 7 e 11, sendo que os autores salientaram a importância do envolvimento dos cromossomos 7 e 11 que não foi tão evidente em tumores primários descritos anteriormente pelo mesmo grupo (Thompson *et al.*, 1993). Foram observadas hsr em 12p12-13 (dois casos), 17q25 (um caso) e 18q21(um), indicando o envolvimento tardio das hsr na progressão do câncer de mama.

A descoberta do der(1;16) como a única alteração estrutural num carcinoma de mama primário e em sua metástase de linfonodo por Pandis *et al.* (1994b) indicou uma função patogênica relevante na carcinogênese mamária para esta alteração cariotípica, e que o processo de progressão da doença de câncer de mama primário a metastático não envolveu qualquer aumento correspondente na complexidade cariotípica.

Adeyinka *et al.* (1996) realizaram a análise citogenética de duas metástases mamárias no osso. O único caso de metástase no osso em paciente com câncer de mama descrito anteriormente possuía o seguinte cariótipo complexo: 79-94<4n>, XXX, -X, add(3)(q?28), i(6)(p10)x2, -9, -9, -10, -12, -13, -22, +9-10mar (Tarkkanen *et al.*, 1993). No trabalho de Adeyinka *et al.* (1996) o caso 1 apresentou um único clone hipotriplóide complexo em 56 células e 45 células normais. O caso 2 apresentou três clones anormais não relacionados: 46, XX, t(4;11)(p14;p13)[4]/ 45, XX, -19 [4]/ 46, XX, del(3)(p13p23)[3]/ 46, XX[105]. Os clones não relacionados do caso 2 sugeriram uma possibilidade interessante de que a metástase tenha se originado por uma invasão simultânea de células cancerosas múltiplas do tumor primário. Os quadros clínico-patológicos nos dois casos estão paralelos ao seu perfil cariotípico. A metástase do caso 2, com alterações cariotípicas simples, ocorreu depois de um longo período de latência e foi única e bem diferenciada. A metástase do caso 1 desenvolveu-se mais rapidamente, apresentou um cariótipo complexo, era pouco diferenciada e era somente uma das muitas manifestações do processo de disseminação geral da doença na paciente.

Bernardino *et al.* (1997) descreveram o primeiro estudo citogenético de um câncer de mama e sua metástase no linfonodo axilar numa mulher com Síndrome de Down, portadora do der(21;21) constitucional. A translocação t(X;21) e a perda do outro X foi comum a todos os cariótipos do tumor primário e do metastático. As células do primário eram hiperdiplóides e apresentaram uma evolução clonal com ganhos cromossômicos progressivos. As células do linfonodo foram cariotipicamente heterogêneas, com uma pequena população celular hiperdiplóide idêntica à do tumor primário, e outra população maior com vários rearranjos e perdas levando à

hipodiploidia. Isto sugere que o linfonodo foi colonizado duas vezes: num estágio inicial da progressão tumoral e posteriormente num estágio mais tardio.

Através da análise citogenética de tumores primários, metástases em linfonodos axilares e uma metástase subcutânea de 12 pacientes com câncer de mama, Teixeira *et al.* (1996a) e Pandis *et al.* (1998) chegaram a várias conclusões sobre o perfil cariotípico das metástases e sobre a progressão tumoral. A primeira delas foi a de que um subtipo dos carcinomas da mama metastáticos tem alterações simples, entretanto, no geral, os casos metastáticos tendem a ser cariotipicamente mais complexos do que câncer de mama primário. Todas as alterações cromossômicas que definem subgrupos citogenéticos em câncer de mama (ver item 8.2) foram também detectadas nestes estudos, nos tumores primários e nas suas metástases. Isto indicou que estas aberrações estavam presentes antes da formação da metástase e que elas podem ter uma função no processo metastático. Aberrações cariotípicas que ocorreram mais freqüentemente em câncer de mama metastático em relação ao câncer de mama não selecionado são: presença de hsr, -17, e perda de material do 22. Pelo menos uma anormalidade citogenética foi comum ao tumor primário e à sua metástase, indicando que estes eram clonalmente relacionados. Embora tenha sido encontrada evidência de policlonalidade nas metástases, os dados sugeriram que a população celular neoplásica é geneticamente mais homogênea nas metástases do que no tumor primário. As metástases foram mais complexas cariotipicamente no sentido de que cada clone apresentava um maior número de aberrações cromossômicas, porém menos complexas no sentido de que o número de clones apresentado era menor.

8.4 - Policlonalidade citogenética em tumores da mama

Uma das mais surpreendentes descobertas na citogenética de câncer de mama nos recentes anos foi a detecção freqüente de clones não relacionados cariotipicamente (Dutrillaux *et al.*, 1990; Geleick *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1993a, 1995a, b, 1998; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1997; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 1997). Este tipo de policlonalidade raramente é encontrado em neoplasmas mesenquimais e hematológicos (Heim & Mitelman, 1995) mas tem sido descrito repetidamente em carcinomas de outro sítios: cólon (Bardi *et al.*, 1993, 1995), pâncreas (Gorunova *et al.*, 1995) e cabeça e pescoço (Jin *et al.*, 1993, 1995). A fração epitelial de muitos tumores benignos da mama também mostra um padrão similar

(Dietrich *et al.*, 1995, 1997). Como a policlonalidade citogenética da mama é uma característica tanto de lesões pré malignas quanto de carcinomas infiltrantes e metastáticos, não se pode obter uma conclusão definitiva sobre se o fenômeno é mais característico da tumorigênese tardia ou precoce (Heim *et al.*, 1997). Segundo a interpretação mais comum da teoria da mutação somática da carcinogênese, o processo começa com uma única célula mutada e transformada neoplasticamente (Nowell, 1976). Entretanto, segundo Pandis *et al.* (1993a), a descoberta de múltiplos clones não relacionados citogeneticamente reforça a idéia de que alguns cânceres podem se originar por sucessivas divisões de não só uma, mas de várias células transformadas independentemente, isto é, poderiam ter uma origem policlonal. Teixeira *et al.* (1994, 1995, 1996a) afirmaram que a presença de clones não relacionados pode ser explicada das seguintes maneiras:

1) Somente um dos clones ou um grupo de clones relacionados é representativo da neoplasia, sendo os clones anormais não relacionados representantes de células epiteliais não neoplásicas ou de células estromais cujos rearranjos possivelmente tenham sido induzidos por mutágenos liberados pelas células vizinhas cancerosas. A hipótese de mosaicismo celular somático existente no tecido mamário antes do aparecimento de qualquer processo neoplásico poderia ser descartada, desde que anormalidades cariotípicas clonais pudessem ser detectadas em áreas macroscopicamente não tumorais nas extremidades dos carcinomas, mas provavelmente não, ou somente raramente, em tecido da mama histologicamente normal (Teixeira *et al.*, 1995, 1996a).

2) Todos os clones são neoplásicos e poderiam ter se originado de uma única célula mãe que possuía mutações submicroscópicas. Esta hipótese parece altamente improvável considerando o disparate das alterações observadas. Segundo Teixeira *et al.* (1996a), a hipótese de uma mutação submicroscópica unificante não explica por que a policlonalidade cariotípica é muito mais comum em tumores epiteliais do que em neoplasmas hematológicos ou mesenquimais.

3) Os clones patogeneticamente importantes, mas não relacionados citogeneticamente, poderiam também não ser relacionados evolutivamente, refletindo uma origem policlonal do neoplasma.

Se os clones não relacionados refletem uma tumorigênese monoclonal ou não, ainda não foi elucidado, porém é certo que eles são manifestações inquestionáveis da heterogeneidade genotípica intratumoral. Portanto, as contribuições relativas dos vários

clones para o comportamento geral do tumor precisam ser averiguadas, bem como os mecanismos pelos quais eles interagem, tanto física como funcionalmente.

9. ESTUDOS MOLECULARES EM TUMORES MALIGNOS DA MAMA

9.1 - Aspectos gerais

As alterações cariotípicas podem indicar sítios no genoma onde importantes genes envolvidos na carcinogênese estão localizados e podem auxiliar a elucidar como a função de tais genes é alterada.

Os diferentes tipos de aberrações cromossômicas em células cancerosas podem ter diferentes efeitos patogénéticos no nível molecular. Há dois tipos principais de genes envolvidos com o processo carcinogênico: os oncogenes e os genes supressores tumorais (Bishop, 1987, 1991; Weinberg, 1989; Goddard & Solomon, 1993; cf. Teixeira, 1997).

As primeiras indicações de que genes celulares normais (os proto-oncogenes) eram os genes alvos de mutações que levavam a ganho de função estimulando a divisão celular foram obtidas de estudos de retrovírus transformantes. Os proto-oncogenes controlam uma variedade de processos associados ao crescimento, proliferação e diferenciação celular. Eles manifestam seus efeitos em muitos pontos na cascata de informações, desde mensageiros (fatores de crescimento) fora da célula até os fatores de transcrição nucleares que determinam o estágio do ciclo celular e o grau de diferenciação (Solomon *et al.*, 1991). Eles codificam um grupo diverso de proteínas que podem atuar como sinais transdutores, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento e reguladores da transcrição de DNA (Friend *et al.*, 1988; Druker *et al.*, 1989).

Os proto-oncogenes podem ser desregulados de modo que de genes normais passam a oncogenes (que promovem proliferação celular desordenada, pois o produto do proto-oncogene passa a ser expresso anormalmente) por uma variedade de eventos: mutações de ponto, pequenas inserções e deleções, justaposição a outras seqüências cromossômicas e amplificações (visíveis citogeneticamente como *hsr* ou "double minutes"). Algumas destas alterações podem atuar num caminho qualitativo, dando origem a uma proteína final diferente, ou elas podem atuar quantitativamente por promover concentrações inapropriadas do oncogene ou de seu produto (Solomon *et al.*,

1991).

A existência de genes supressores tumorais foi inicialmente sugerida por experimentos que demonstraram a supressão do fenótipo neoplásico em células somáticas híbridas (Harris, 1969; cf. Teixeira, 1997). Estes genes previnem a proliferação celular descontrolada produzindo sinais inibitórios do crescimento ou reduzindo a eficiência dos sinais que estimulam a divisão celular. Os genes supressores de tumor contribuem para a oncogenicidade através de sua perda, seu comportamento é recessivo e as duas cópias precisam ser inativadas para a ocorrência da formação tumoral. Portanto, as mutações nestes genes, que resultam em perda de função, ou deleção de ambos os alelos induzem ao crescimento neoplásico descontrolado. Estas mutações são detectáveis ao nível de DNA como perda de heterozigosidade (LOH) constitucional no DNA tumoral. Perda do gene inteiro, da região cromossômica ou mesmo de todo cromossomo, também afetam os genes supressores, sendo que tais deleções e perdas cromossômicas podem ser detectadas citogeneticamente (Solomon *et al.*, 1991).

Knudson (1971, 1985) propôs um modelo explicando como a perda de genes supressores tumorais contribui para a carcinogênese: nos cânceres familiares, o primeiro passo na inativação gênica é uma mutação silenciosa num alelo transmitido através da linhagem germinativa em indivíduos predispostos, e o segundo é uma mutação somática do outro alelo, inativando completamente a função do gene. Enquanto que a susceptibilidade ao câncer é herdada de uma maneira dominante ao nível de organismo, a carcinogênese é recessiva no nível de células individuais, considerando-se a inativação dos genes supressores tumorais (Teixeira, 1997). Em cânceres esporádicos, ambas as mutações ocorrem nas células somáticas.

Outro tipo de genes, cujo envolvimento no processo neoplásico foi indicado mais recentemente, são os genes de reparo do DNA (Liu *et al.*, 1996; Lothe, 1997). A sua inativação impede que erros de replicação sejam corrigidos, o que possivelmente poderia resultar na ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais (Teixeira, 1997).

As seguintes aberrações cariotípicas: deleções, translocações não balanceadas e monossomias, indicam perda de material genético, portanto o possível efeito patogenético destas aberrações é a perda de genes supressores tumorais ou de genes envolvidos no sistema de reparo de DNA. Ao contrário, quando se observa

citogeneticamente ganhos cromossômicos (polissomias) ou multiplicação de regiões cromossômicas específicas, originando ganho de material genético, o efeito principal parece ser a ativação desregulada de proto-oncogenes (Teixeira, 1997).

Os proto-oncogenes também podem ser ativados quantitativamente ou qualitativamente por alterações cromossômicas balanceadas, frequentemente por translocações. A ativação quantitativa pode ocorrer quando as aberrações interferem nas seqüências de DNA reguladoras, como ocorre com as translocações t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24) e t(8;22)(q24;q11) características de Linfoma de Burkitt (Heim & Mitelman, 1995). A ativação qualitativa resulta da formação de genes híbridos originados pelas translocações, como acontece na t(9;22)(q34;q11) em pacientes com leucemia mielóide crônica (Heim & Mitelman, 1995). É importante lembrar que aberrações cromossômicas balanceadas também podem inativar genes supressores tumorais ou de reparo de DNA localizados nos pontos de quebra envolvidos, quando elas interrompem diretamente as suas seqüências codificadoras (Teixeira, 1997).

As aberrações cromossômicas estruturais primárias, em doenças hematológicas e em vários sarcomas são, na sua grande maioria, balanceadas, enquanto que deleções e outras alterações não balanceadas são a característica comum dos tumores sólidos epiteliais (Sandberg, 1990; Heim & Mitelman, 1995). Isto indica fortemente que a perda de genes supressores tumorais é o mecanismo mais comum para a iniciação e progressão dos tumores epiteliais.

9.2 – Alterações genéticas nos tumores malignos da mama

Atualmente está bem estabelecido que várias alterações genéticas são necessárias para que um tecido torne-se hiperplásico, maligno e então metastático. O envolvimento coordenado de ambas as classes dos genes envolvidos na carcinogênese (oncogenes e genes supressores tumorais) é necessário para o desenvolvimento tumoral. Um exemplo clássico é o modelo genético para tumorigênese coloretal proposta por Vogelstein, que mostra a necessidade de alterações genéticas em vários cromossomos (Fearon & Vogelstein, 1990; cf. Bièche & Lidereau, 1995). Em relação ao câncer de mama, poucos genes importantes foram identificados ou localizados no nível molecular.

Os estudos que utilizam técnicas de genética molecular em câncer de mama são muito mais numerosos do que aqueles baseados na citogenética convencional. As alterações genéticas estão sendo investigadas pelas seguintes pesquisas: CGH e FISH

que são técnicas de hibridização *in situ*, análises de LOH, mutações e amplificações gênicas utilizando técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A importância das aberrações genéticas na progressão do câncer de mama é fortalecida pelo fato de que uma alta frequência dos tumores primários de mama estudados por CGH contém alterações no número de cópias de seqüências de DNA. Uma frequência de casos alterados bem mais alta do que aquela descrita pelos estudos utilizando citogenética convencional (Tirkkonen *et al.*, 1998). Ganhos de 1q, 8q, 13q, 16p, 17q22-24 e 20q13 e perdas de Xq, 6q, 8p, 9p, 11q, 13q, 16q e 17p foram freqüentemente detectados pela análise de CGH em câncer de mama (Tirkkonen *et al.*, 1998).

As análises utilizando FISH detectaram perdas freqüentes de 17p, amplificação de ERBB2, e alterações numéricas dos cromossomos 1, 3, 10, 11, 17 e 18 em câncer de mama (Tsuda *et al.*, 1997).

As alterações genéticas mais freqüentemente observadas em câncer de mama são amplificações de DNA, mutações e LOH que podem envolver oncogenes e genes supressores tumorais. Outros mecanismos de ativação de proto-oncogenes, como mutações de ponto, inserções e rearranjos gênicos, são raramente observados em carcinomas mamários (Bièche & Lidereau, 1995).

O oncogene mais extensivamente estudado neste tipo tumoral é o ERBB2 (também conhecido como HER2 ou NEU), localizado em 17q11-12 e codifica o receptor do fator de crescimento epidermal. Ele é ativado através de amplificação gênica e a expressão do seu produto se encontra aumentada em 20-30% dos carcinomas da mama, sendo que este fato pode ocorrer precocemente na tumorigênese mamária (Devilee & Cornelisse, 1994; Bièche & Lidereau, 1995; Heim & Mitelman, 1995).

O oncogene MYC localizado em 8q24 também foi encontrado amplificado em torno de 30% dos casos de câncer de mama estudados. Ele codifica uma proteína nuclear de 59-62kDa envolvida no controle do crescimento, diferenciação e apoptose celular que parece atuar como um fator de transcrição. A amplificação de MYC também parece ocorrer no início da progressão tumoral e parece não persistir nas metástases. Há casos descritos de expressão aumentada do produto do gene MYC sem a amplificação do gene, portanto pode ser que nas células mamárias ele seja ativado por outros mecanismos além de amplificação gênica (Bièche & Lidereau, 1995).

A banda 11q13 está amplificada em 15-20% dos tumores mamários, não tendo sido, ainda, elucidado qual o loco exato de relevância e o principal oncogene envolvido (Heim & Mitelman, 1995). Os primeiros resultados estão indicando que existem, no mínimo, quatro regiões de amplificações independentes e diferentes rearranjos genéticos (Bièche & Lidereau, 1995). Os dois primeiros genes mapeados em 11q13, que estão freqüentemente amplificados em câncer de mama são FGF3 e FGF4 (também conhecidos como INT2 e HST, respectivamente), codificam fatores de crescimento de fibroblastos. Outros três genes candidatos foram posteriormente mapeados em 11q13: GSTP1, EMS1 e CCND1. A amplificação destes genes está associada à expressão aumentada de seus produtos. O gene GSTP1 codifica uma proteína citoplasmática cuja amplificação poderia aumentar a resistência das células tumorais a drogas citotóxicas. O gene CCND1 codifica uma proteína da família das ciclinas, a ciclina D1, que regula a transição das fases G1-S do ciclo celular (Bièche & Lidereau, 1995).

Outros proto-oncogenes que também foram encontrados amplificados em menores freqüências em tumores mamários são: FGFR1, FGFR2 (ambos codificam receptores de membrana para fatores de crescimento de fibroblastos), FES, MDM2 e IGF1R (Bièche & Lidereau, 1995).

As mais altas freqüências de LOH em carcinomas mamários foram observadas nas seguintes bandas cromossômicas: 11p15, 13q14, e 17p13, que poderiam inativar os genes supressores WT2, RB1 e TP53 respectivamente.

O TP53 é o gene supressor que apresenta a mais alta freqüência (20-25%) de mutações de ponto somáticas em câncer de mama. Ele codifica uma fosfoproteína nuclear que participa na regulação do ciclo celular, contribuindo para a manutenção da integridade do DNA. Se a molécula de DNA está danificada, os níveis da proteína p53 aumentam e o ciclo celular se prolonga em G1 para que haja reparo da molécula. Vários estudos indicam também que, em certos casos, TP53 induz a apoptose (morte celular programada).

O gene RB1 localizado em 13q14, codifica uma fosfoproteína nuclear com atividade de ligação ao DNA, exercendo sua função na regulação da transcrição celular. Deleções homozigotas deste gene foram encontradas em linhagens celulares e tumores primários de mama (Devilee & Cornelisse, 1994).

Outras perdas não casuais dos seguintes braços cromossômicos: 1p, 1q, 3p, 6q, 7q, 8p, 8q, 11q, 15q, 16q, 17q, 18q e 22q têm sido detectadas em tumores primários de

mama através de análises de LOH (Devilee & Cornelisse, 1994; Bièche & Lidereau, 1995; Heim & Mitelman, 1995).

É importante salientar que, no mínimo, seis regiões encontram-se deletadas no cromossomo 17, sugerindo o envolvimento de vários genes supressores localizados neste cromossomo além do TP53, BRCA1 e NM23, sendo que a descrição de monossomia do 17 em quase metade dos tumores analisados sugere que um dos dois alelos de cada um dos diferentes genes supressores pode ser inativado ao mesmo tempo.

10. CITOGENÉTICA E GENÉTICA MOLECULAR DAS LESÕES NA MAMA MASCULINA

O câncer de mama masculino é bastante raro em todas as partes do mundo, sendo que a taxa de incidência mais alta ocorre em Recife, no Brasil, com 3,4 casos por 100.000 homens por ano (Muir *et al.*, 1987, cf. Sasco *et al.*, 1993). Apenas 1% de todos os cânceres mamários ocorre em homens e entre 0,35 a 1,5% de todas as neoplasias masculinas é de câncer de mama (Sasco *et al.*, 1993).

Alguns fatores de risco hipotéticos têm sido propostos para o desenvolvimento da doença: idade avançada, exposição à radiação ionizante, doença benigna da mama, ginecomastia e história de patologia nos testículos ou fígado. Os fatores hereditários têm um papel importante pois há um risco maior para homens com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, e pacientes com a síndrome de Klinefelter têm um risco 20 vezes maior (Nagadowska & Fentiman, 1993; Thomas, 1993).

A idade média de manifestação do câncer de mama masculino é de 60 anos, sendo que a proporção de pacientes com doença avançada (diagnóstico nos estágios III ou IV) e com metástases em linfonodos é mais alta em homens do que em mulheres. Os principais sinais clínicos são: nódulo palpável, alterações no mamilo (ulceração, retração) e ulceração da mama (Nagadowska & Fentiman, 1993).

Todos os tipos histológicos de câncer de mama observados em mulheres já foram descritos em homens. O carcinoma ductal infiltrante é o tipo histológico mais freqüente, presente em 87% dos casos; papiloma infiltrante em 5%, tumor medular em 4%, tumores mucoso e tubulares em 1% e tumores não infiltrantes em 3% (Fentiman, 1990, cf. Nagadowska & Fentiman, 1993).

Os primeiros estudos citogenéticos em pacientes do sexo masculino com carcinoma mamário tentavam correlacionar a incidência do câncer com a síndrome de Klinefelter. Avaliava-se a presença ou não da cromatina do X em amostras da biópsia ou em células da mucosa bucal, e o sangue periférico dos indivíduos era analisado para a observação do complemento sexual. Tais estudos demonstraram uma incidência maior e altamente significativa do câncer de mama em portadores da síndrome de Klinefelter (Harnden *et al.*, 1971). Outros estudos foram realizados na década de 80, porém somente o sangue periférico de pacientes que não apresentavam a síndrome de Klinefelter e com câncer de mama e/ou ginecomastia foi analisado, na maioria das vezes obtendo-se um cariótipo normal (Haibach & Rosenhotz, 1983; Olsson *et al.*, 1984; Palka *et al.* 1987, 1990; Kojima *et al.*, 1991). Os seguintes cariótipos constitucionais: 46, XX e 45, X/ 46, X, del(Y)(q12) foram descritos respectivamente num homem com câncer de mama por Giammarini *et al.* (1980) e em outro com ginecomastia por Interlandi *et al.* (1981).

A primeira descrição citogenética de uma amostra de carcinoma masculino foi realizada por Rodgers *et al.* (1985), foi descrito um número cromossômico modal igual a 44 e a análise de 13 metáfases com bandamento G revelou o seguinte cariótipo: 34~48,XY,del(1)(p32), dup(1)(q21q44), add(2)(q21), add(3)(p13), -4, t(6;12)(q11;q11), -8, add(8)(q24), der(11)add(11)(p12)add(11)(q14), add(12)(q13), -13, add(13)(q1?3), del(15)(q12), -17, del(18)(q21), +5mar[cp11].

Estudos de replicação de DNA utilizando incorporação de BUdR foram realizados em uma amostra de carcinoma mamário masculino (Dutrillaux *et al.*, 1986). Os cromossomos foram analisados com bandamento R, observando-se o cariótipo 47, XY, +X sem nenhuma alteração estrutural. Dutrillaux *et al.* (1986) demonstraram que o cromossomo X extra encontrado nas células tumorais estava se replicando precocemente, havendo, portanto, um excesso de cromossomos X ativos. Constitutivamente o paciente apresentou o cariótipo 46, XY.

Os cariótipos de 12 tumores da mama, incluindo dois masculinos, foram descritos por Gerbault-Seureau *et al.* (1987). O primeiro tumor masculino mostrou um cariótipo normal em quatro células e o cariótipo 47, XY, +X em 3. A análise de 100 linfócitos de sangue periférico do paciente demonstrou um cariótipo constitucional normal, indicando que o ganho de um cromossomo X ocorreu apenas nas células tumorais. O outro carcinoma masculino mostrou o seguinte cariótipo: 46, XY,

der(1)t(1;1)(p36;q12), der(6), del(11)(p14p15), del(13)(q13q33)[6]/ 47, XY, idem, +der(6), +7, -8[4]; um linfonodo deste paciente também foi analisado, sendo que uma única anomalia foi observada em oito células: 46, XY, del(14)(q24-q31).

A análise citogenética através da preparação direta de um carcinoma de mama masculino, onde duas populações celulares estavam presentes, uma hipodiplóide (25-34 cromossomos) e outra hipertriplóide (56-84 cromossomos), foi realizada por Mitchell (1990). O seguinte cariótipo foi obtido: 25~84,XY,add(X)(p22),t(1;4)(p22;p14), t(1;12)(p13p34;p11),t(1;18)(p13p35;p11),+3,t(3;9)(q12;q12),t(3;11)(p12;q13),t(3;12)(p12;p11),dic(5;11)(p14;q23),del(6)(q23),-7,del(16)(q13),del(17)(p11),add(?20)(q13), inc[cp13]. As alterações mais consistentes foram a presença do dic(5;11)(p14;q23) e da monossomia do 7 presentes em todas as células analisadas. Em todas as células triplóides houve um ganho de uma a três cópias do cromossomo 3, estando este sempre presente em duas cópias nas hipodiplóides. A análise de 25 linfócitos de sangue periférico deste paciente revelou um cariótipo normal.

A primeira descrição cariotípica de um câncer de mama masculino utilizando FISH foi feita por Balazs *et al.* (1991) utilizando sondas pericentroméricas para os cromossomos 1, 7, 9, 11, 15, 17, 18, X e Y. Os cromossomos 1, 7 e 17 estavam presentes predominantemente em quatro cópias por célula, os cromossomos 11, 15 e 18 em 3, e os cromossomos X e Y em 2. As distribuições do número de cópias foram heterogêneas mostrando subpopulações menores, evidenciando uma heterogeneidade genética intratumoral. Um cariótipo normal foi determinado por FISH nos fibroblastos da pele do paciente.

Pandis *et al.* (1993a) estudaram citogeneticamente 20 tumores de mama, sendo um carcinoma de mama masculino, que apresentou um número modal próximo do diplóide com alterações simples e com clones citogeneticamente não relacionados: 46, XY, t(5;15)(q35;q22)[12]/ 47, XY, +5[8]/ 46, XY[24].

A análise do sangue periférico, coletado antes do início do tratamento, de um homem com câncer de mama foi realizada por Udayakumar & Bhargava (1994), sendo observadas seis metáfases anormais, porém nenhuma das alterações observadas formaram clones.

Cavalli *et al.* (1995) estudaram citogeneticamente um carcinoma ductal infiltrante da mama de um homem com 69 anos de idade. Foi realizada a análise citogenética do tumor e do sangue periférico que foi colhido um mês após oito ciclos de

tratamento quimioterápico. A análise de 25 células tumorais com bandamento GTG, revelou o seguinte cariótipo: 44~48, XY, +8, +9, -12, -17, add(17)(q25)[cp22]/46, XY[3]. Os resultados citogenéticos deste trabalho sugeriram a alteração add(17)(q25) como uma alteração primária e as trissomias dos cromossomos 8 e 9 como alterações secundárias no processo neoplásico. A análise citogenética do sangue periférico revelou as seguintes alterações clonais: monossomias do 11, 12, 19 e 21, trissomia do 19 e a presença de cromossomos dicêntricos. Cavalli *et al.* (1995) sugeriram que as anormalidades encontradas no sangue periférico foram resultantes do tratamento quimioterápico administrado ao paciente.

Wolman *et al.* (1995) analisaram a ploidia de DNA em 22 tumores masculinos (17 carcinomas ductais, quatro tumores papilares e um papiloma) e 11 ginecomastias por citometria de fluxo e utilizaram FISH com sondas pericentroméricas para os cromossomos X e Y em 14 dos carcinomas ductais e nas lesões papilares malignas. Sete tumores multimodais foram claramente aneuplóides pela citometria de fluxo, os outros 14 tumores malignos, o papiloma e as 11 amostras de ginecomastia estavam dentro do grau diplóide. Pela análise com FISH, Wolman *et al.* (1995) encontraram um excesso de cópias do cromossomo X em dois dos 14 cânceres de mama masculinos analisados, os resultados também favoreceram a exclusão de síndrome de Klinefelter, embora um mosaicismo não possa ser excluído.

Teixeira *et al.* (1998) realizaram a análise citogenética de cinco amostras de câncer de mama masculino, sendo que de um paciente foram analisados o tumor da mama e também a metástase de linfonodo. Todos os casos apresentaram alterações cromossômicas clonais. O primeiro caso possuía quatro clones não relacionados, com alterações estruturais nos cromossomos 1, 2, 3, 7, 8, 9 e 12, nenhuma alteração numérica foi observada. A metástase deste caso apresentou 10 clones não relacionados, alterações estruturais nos cromossomos 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 16, e as seguintes alterações numéricas: -Y, +7, +18. O segundo caso apresentou um único clone anormal caracterizado por -Y, -17 e del(18)(q21). No terceiro caso estavam presentes dois clones relacionados com trissomia do X e ausência do Y. No quarto caso, que consistia de uma metástase de linfonodo, um único clone com +5 e +16 foi detectado.

Apesar dos estudos citogenéticos em câncer de mama masculino serem limitados, pode-se perceber pela análise dos dados descritos acima que várias aberrações cromossômicas não casuais já podem ser identificadas. Perda parcial ou completa de um

cromossomo 17 foi encontrada em quatro casos (Rodgers *et al.*, 1985; Mitchell, 1990; Cavalli *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1998); perda do cromossomo Y em três casos (Teixeira *et al.*, 1998); trissomia do cromossomo 5 em dois casos (Pandis *et al.*, 1993a; Teixeira *et al.*, 1998); e ganho de um cromossomo X foi detectado em três casos pela análise citogenética convencional (Dutrillaux *et al.*, 1986; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 1998) e em três casos analisados pela técnica de FISH (Balazs *et al.*, 1991; Wolman *et al.*, 1995).

A ginecomastia é um aumento no componente glandular da mama masculina, freqüentemente bilateral, assintomática e reversível. É uma doença benigna comum, estando presente em $\pm 30\%$ dos homens adultos (Hands & Greenall, 1991), sendo uma das principais características da síndrome de Klinefelter. Embora homens com câncer de mama freqüentemente apresentem ginecomastia, ainda não está esclarecido se ela realmente é um fator que predispõe a uma doença mamária maligna (Teixeira *et al.*, 1998).

Teixeira *et al.* (1998) descreveram citogeneticamente três casos de ginecomastia. Nenhuma alteração cromossômica foi detectada nos dois casos de ginecomastia que não possuíam outra doença da mama concomitante. A terceira ginecomastia foi retirada de um local onde um carcinoma havia sido previamente removido, foram analisadas 18 metáfases desta amostra. Em duas metáfases foi observada a $t(2;11)(p24;p13)$ como a única alteração cromossômica. O tumor maligno precedente à terceira ginecomastia não foi analisado citogeneticamente, permanecendo desconhecido se houve alguma relação clonal entre as duas lesões. Esta foi a primeira descrição de um cariótipo anormal em ginecomastia.

Há poucos trabalhos analisando as alterações genéticas ao nível molecular em carcinomas mamários masculinos. Os primeiros estudos referiam-se aos casos de cânceres de mama familiar em homens com a síndrome de Reifenshtein, que é caracterizada por mutações na linhagem germinativa do gene receptor de andrógeno em Xq11.2-12 (Wooster *et al.*, 1992; Lobaccaro *et al.*, 1993). Atualmente as análises de mutações na linhagem germinativa no gene BRCA2 (em 13q12-13) são mais freqüentes, pois tais mutações predispõe seus portadores ao câncer de mama, principalmente aqueles cujas famílias possuem homens com a doença (Wooster *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1997). Recentemente foi descrita pela primeira vez, por Prechtel *et al.* (1998), uma alta freqüência de LOH em 13q12-13 em câncer de mama esporádico em homens e

sua associação a fatores que indicam um pior prognóstico. Estes resultados sugeriram uma função importante do BRCA2 no desenvolvimento e progressão do câncer de mama masculino esporádico.

Análises de LOH em carcinomas mamários masculinos detectaram LOH em 11q13 em 13 casos (Sanz-Ortega *et al.*, 1995), em 17q21.3-22 em um caso (Sanz-Ortega *et al.*, 1995) e em 8p22 em 19 casos (Chuaqui *et al.*, 1995). As altas frequências de LOH em 11q13 e em 8p22 sugeriram a presença de genes supressores tumorais localizados nestas bandas cromossômicas, envolvidos na carcinogênese mamária masculina.

Mutações nos genes TP53 (Anelli *et al.*, 1995) e KRAS (Schroer *et al.*, 1993) foram descritas em amostras de câncer de mama masculino. A incidência das mutações em TP53 detectadas em pacientes masculinos numa série descrita por Anelli *et al.* (1995) foi concordante com aquela observada em mulheres, favorecendo a idéia de que o câncer de mama masculino é similar ao feminino. Contrariamente, Schroer *et al.* (1993) encontraram uma frequência mais alta de mutações em KRAS em carcinomas mamários masculinos do que em femininos, sugerindo um modo diferente de carcinogênese mamária, segundo os autores.

A partir dos dados descritos acima, torna-se clara a necessidade de um maior número de estudos para definir precisamente quais são as alterações citogenéticas e moleculares que caracterizam as patologias da mama masculina.

11. CARCINOMAS DA MAMA FAMILIAIS E HEREDITÁRIOS

O câncer de mama hereditário é responsável por aproximadamente 5-10% de todos os casos de câncer de mama (Claus *et al.*, 1996; cf. Greenman *et al.*, 1998). Estes casos hereditários são caracterizados por ocorrer em pessoas mais jovens, com maior frequência de doença bilateral e associados a tumores de outras localizações, principalmente a carcinomas de ovário. Em torno de ¼ destes casos familiares mostra um padrão de segregação que indica que a doença é transmitida de um modo autossômico dominante com alta penetrância (Ford & Easton, 1995).

As famílias com câncer de mama hereditário são normalmente divididas em dois tipos: aquelas com a síndrome de carcinoma de mama e ovário e aquelas com o carcinoma de mama sítio específico. A segunda categoria refere-se à ausência de casos de câncer de ovário, o que não significa que a mama seja o único sítio de câncer

presente na família (Narod, 1997). Esta distinção é útil na análise clínica, pois a presença de carcinoma ovariano numa família que também apresenta carcinoma mamário, aumenta a probabilidade de um gene para o câncer estar presente e indica que os membros da família podem ter um risco aumentado de desenvolver câncer de mama e/ou de ovário. Entretanto, uma distinção clara entre os dois tipos de família não é evidente por estudos genético-moleculares porque os dois principais genes de susceptibilidade, BRCA1 e BRCA2, predispõem à síndrome de câncer de mama e de ovário (Narod, 1997).

A compreensão da etiologia genética do câncer de mama hereditário (CMH) teve um avanço significativo com o trabalho de Hall *et al.* (1990; cf. Marcus *et al.*, 1997) que associou o CMH a um sítio específico a 17q21, sendo que logo depois Narod *et al.* (1991; cf. Marcus *et al.*, 1997) mostraram a ligação desta mesma região com câncer de mama e ovário hereditário (CMOH). O gene BRCA1 identificado por clonagem posicional por Miki *et al.*, em 1994, apresenta 100 kilobases e 22 exons que produzem um transcrito de 7,8 kilodalton que codifica uma proteína de 1863 aminoácidos (Marcus *et al.*, 1997). A função específica da proteína codificada é ainda desconhecida, mas ela tem um importante papel na supressão da proliferação celular. Uma função na regulação da expressão gênica tem sido sugerida devido à presença de um domínio **zinc-finger** característico de muitas proteínas de ligação a ácidos nucleicos. Mais de 250 mutações já foram descritas (Couch *et al.*, 1996), sendo que a maioria delas resulta na ausência ou na codificação incompleta da proteína BRCA1. As mutações em BRCA1 foram encontradas em 75-80% das famílias com CMOH e em 50% das famílias com câncer de mama sítio específico (Marcus *et al.*, 1997). O gene é altamente penetrante, sendo que entre os portadores de mutações em BRCA1, o risco para câncer de mama em mulheres de 70 anos de idade está entre 80-90% e para câncer de ovário, 50% (Easton *et al.*, 1995; cf. Narod *et al.*, 1997).

Um segundo gene de susceptibilidade ao câncer de mama, o BRCA2, foi mapeado em 13q12-13 e clonado um ano depois do BRCA1 (Wooster *et al.*, 1994, 1995). O gene BRCA2 apresenta 70 kilobases com 27 exons que codificam uma proteína de 3418 aminoácidos (Tavtigian *et al.*, 1996; cf. Marcus *et al.*, 1997). Mutações neste gene encontradas na linhagem germinativa conferem aos portadores um risco mais baixo de câncer de ovário e um risco mais alto de câncer de mama masculino (Serova *et al.*, 1997) do que aqueles conferidos pelas mutações no BRCA1. O BRCA2 parece estar

envolvido em 40-45% das famílias com câncer de mama sítio específico hereditário, incluindo a maioria das famílias com casos de câncer de mama em homens (Stratton *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1997). A penetrância das mutações em BRCA2 é mais variável que a do BRCA1, sendo que Narod *et al.* (1997) salientaram que os estudos de BRCA2 são baseados em famílias altamente selecionadas com penetrância muito alta, o que pode ser uma situação atípica.

Estudos de análises de ligação e de mutação sugerem que há outros genes, além do BRCA1 e BRCA2, que predisõem ao CMH. O câncer de mama é uma característica de várias síndromes hereditárias: a síndrome de Li Fraumeni, doença de Cowden, a síndrome de Klinefelter, Reifenshtein e Ataxia telangiectasia (Andersen, 1996).

A síndrome de Li-Fraumeni é caracterizada pela associação entre idade precoce de manifestação do câncer de mama (com alta taxa de bilateralidade) e ocorrência de tumores infantis na família, como sarcomas, osteosarcomas, tumores cerebrais, leucemias e carcinomas adrenocorticais (Narod, 1997). Há suspeita da ocorrência desta síndrome em mulheres jovens com câncer de mama e com parentes que apresentem tumores infantis. Esta doença segue o modo de herança dominante (Williams & Strong, 1985), sendo que mutações constitucionais no gene TP53 são freqüentes em famílias com Li Fraumeni (Malkin *et al.* 1990; cf. Narod, 1997), mas são raras em casos não selecionados de câncer de mama.

A doença de Cowden é caracterizada por um maior risco de ocorrência de tumores benignos e malignos da mama (na maioria são casos bilaterais e de manifestação precoce), tireóide e cólon. Esta doença é rara e é responsável por uma pequena porcentagem das famílias com CMH. O gene responsável por esta síndrome foi mapeado em 10q22-23 (Nelen *et al.*, 1996; cf. Narod, 1997).

A Ataxia-telangiectasia (AT) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por ataxia cerebelar, telangiectasia oculocutânea, hipersensibilidade à radiação ionizante e susceptibilidade aumentada ao câncer (Ford & Easton, 1995). Estima-se que 5-10% dos casos de câncer de mama podem ocorrer em heterozigotas portadoras de mutações no gene responsável pela AT localizado em 11q23.1 (Easton *et al.*, 1993; cf. Narod, 1997). Esta estimativa é baseada na observação de que o câncer de mama precoce é encontrado mais freqüentemente do que o esperado em mulheres que têm filhos com a doença, pois certamente elas são portadoras do gene mutado. No entanto, os poucos estudos existentes não corroboram a hipótese.

Dois grupos têm descrito, independentemente, associações entre câncer de mama em dois homens com a síndrome de Reifenshtein e mutações na linhagem germinativa do gene receptor de andrógeno; principalmente mutações responsáveis pelas substituições dos amino ácidos 607 e 608 no segundo **zinc finger** do domínio de ligação ao DNA do receptor de andrógeno (Wooster *et al.*, 1992; Lobaccaro *et al.*, 1993).

Os dois principais genes que predisõem ao CMH, o BRCA1 e o BRCA2, já foram identificados, mas espera-se encontrar outros genes pois pelo menos 1/3 de todos os casos familiares ainda não foi considerado (Sobol *et al.*, 1994). É também improvável que os casos não relacionados com mutações em BRCA1 ou BRCA2 sejam causados por mutações constitucionais nos genes responsáveis pelas síndromes de Cowden, Li Fraumeni ou AT. Estudos de LOH e análise de ligação têm fornecido evidências de que existe um 3º gene de susceptibilidade ao câncer de mama localizado em 8p (Kerangueven *et al.*, 1995; Seitz *et al.*, 1998).

Como os genes BRCA1 e BRCA2 juntos são responsáveis, provavelmente, por somente 2/3 dos casos e como é provável que existam outros genes patogenticamente relevantes em locos ainda não conhecidos, Teixeira *et al.* (1996b) enfatizaram a importância dos estudos citogenéticos como uma primeira abordagem metodológica para a identificação de regiões e bandas cromossômicas de interesse para a análise molecular e realizaram, pela primeira vez, a análise citogenética de amostras de tecido de três mastectomias bilaterais profiláticas e de um carcinoma *in situ* provenientes de quatro mulheres pertencentes a uma família com CMH. A análise citogenética detectou anormalidades cromossômicas clonais em cinco das seis mamas removidas por mastectomia profilática, todas com hiperplasia epitelial sem atipia, e também no carcinoma *in situ*. Perda do segmento 3p12-14 esteve presente no tecido mamário de 2/4 das mulheres (no carcinoma *in situ* e numa hiperplasia epitelial sem atipia). Portanto, segundo Teixeira *et al.* (1996b), parece razoável concluir que perda de material genético em 3p precede as alterações mais específicas de malignidade. A deleção em 3p provavelmente leva à perda de um gene supressor que tem função regulatória na proliferação celular e não na transformação maligna. O fato de que nenhuma aberração recorrente foi encontrada entre as lesões com o mesmo diagnóstico histológico ilustra que há uma grande magnitude de vias pelas quais as células podem perder o controle proliferativo e adquirir um fenótipo mais agressivo. Os dados apresentados por Teixeira *et al.* (1996b) mostraram que as alterações cromossômicas encontradas são similares

àquelas encontradas em doenças proliferativas e tumores de mama esporádicos, contrariando a hipótese de que o câncer de mama esporádico e familiar evoluem por mecanismos biologicamente diferentes.

Petersson *et al.* (1996) analisaram citogeneticamente 14 amostras de oito mamas removidas profilaticamente de cinco mulheres pertencentes a diferentes famílias com casos de câncer de mama. Foram encontradas anormalidades em cinco mamas de quatro mulheres. Em três amostras com hiperplasias atípicas de duas pacientes, a região 3p estava envolvida em alterações clonais. O ponto de quebra em 1q41 foi comum aos clones anormais de duas pacientes. Uma amostra apresentou três clones aberrantes não relacionados. A única paciente com mutação em BRCA1 e que há um ano manifestou carcinoma na outra mama apresentou um cariótipo normal. As alterações encontradas em 3p neste trabalho, no estudo de Teixeira *et al.* (1996b) e num estudo de câncer de mama familiar que utilizou marcadores de microsátélites, e detectou desequilíbrio alélico em 68% dos tumores na região 3p14.1-14.2 (Bergthorsson *et al.*, 1995; cf. Petersson *et al.*, 1996), sugerem a importância das deleções citogenéticas em 3p nos casos hereditários. No entanto, um maior número de estudos é necessário para uma avaliação mais segura destas informações.

II. OBJETIVOS:

1-Contribuir para o conhecimento citogenético das lesões benignas e malignas da mama humana, comparando os resultados obtidos neste trabalho com aqueles descritos na literatura científica.

2-Verificar a casualidade da ocorrência das aberrações cromossômicas observadas nos diferentes cromossomos.

3-Descrever as aberrações cromossômicas, recorrentes ou não, nas lesões mamárias analisadas e tentar determinar o envolvimento destas no desenvolvimento e progressão do câncer de mama.

4-Tentar distinguir as aberrações que estão associadas com o fenótipo metastático daquelas associadas com os aspectos proliferativos do processo neoplásico, observando a frequência e padrão das alterações cromossômicas nas lesões benignas e malignas da mama.

5-Relacionar os pontos de quebra encontrados com os dados descritos na literatura sobre a localização de oncogenes e de genes supressores de tumor.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Estudaram-se citogeneticamente 15 lesões mamárias, provenientes de 15 pacientes diferentes. 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 - Dados pessoais, clínicos e histopatológicos das lesões benignas estudadas

Caso	Idade/ Sexo	Tipo histológico	Bilateralidade	Multicentricidade
1	47/M	ginecomastia	não	não
2	37/F	doença fibrocística mamária florida	não	sim
3	68/F	doença fibrocística mamária florida	não	sim
4	43/F	fibroadenoma	não	sim
5	25/F	fibroadenoma	não	não
6	38/F	fibroadenoma	não	não
7	52/F	fibroadenoma	não	não

F = Feminino; M = Masculino.

Tabela 2 - Dados pessoais, clínicos e histopatológicos dos carcinomas mamários estudados

Caso	Idade/ Sexo	Tipo histológico	Grau de diferenciação	Envolvimento de linfonodos	Multicentricidade
8	33/F	comedo carcinoma	-	não	não
9	43/F	ca. ductal invasor	II	não	não
10	61/F	ca. ductal invasor	I	não	não
11	79/F	ca. ductal invasor	II	sim	não
12	49/F	ca. ductal invasor	III	sim	não
13	48/F	ca. ductal invasor	III	sim	sim
14	74/F	ca. ductal invasor	III	sim	sim
15	48/F	ca. mamário metastático	-	-	-

F = Feminino; ca. = carcinoma.

2. COLETA DO MATERIAL

As amostras de tecidos tumorais foram coletadas no Hospital Nossa Senhora das Graças (Curitiba, PR) e analisadas histopatologicamente como rotina do hospital pelo patologista Dr. Luís Fernando Bleggi Torres.

As amostras foram coletadas assepticamente a fresco, durante a cirurgia e transferidas para frascos estéreis, etiquetados com as seguintes informações: nome e idade do paciente, data da cirurgia e nome do cirurgião responsável.

O material foi encaminhado com a maior brevidade possível para o Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, onde foi manipulado numa câmara asséptica contendo um fluxo laminar e lâmpadas UV, ligados com antecedência de 30 minutos.

Cada peça que chegou ao laboratório foi cuidadosamente registrada num livro de controle de entrada de material.

3. INÍCIO E MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR

3.1 - Dissociação do material

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

O tecido limpo foi transferido para outra placa de Petri onde foi seccionado, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril, em pequenos fragmentos que foram transferidos com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril para um tubo de centrífuga estéril de 15ml. Em seguida foi adicionado 10ml de meio de cultura, sendo o material ressuspensionado e sedimentado por centrifugação (500 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e se o material ainda apresentasse resíduos de gordura ou sangue, repetia-se o procedimento anterior quantas vezes fossem necessárias, sendo, então, o material ressuspensionado em 5 a 10 ml de solução de collagenase (Wake *et al.*, 1981), e colocado em estufa a 37°C por um período aproximado de 1 hora, agitando-o em intervalos de 15 minutos.

3.2 - Método de cultura

Após o período necessário para uma completa desagregação celular pôde-se perceber que a suspensão celular na collagenase ficava bastante viscosa, a partir de então iniciou-se uma cultura primária das células tumorais (Gibas *et al.*, 1984; Limon *et al.*, 1986). A suspensão foi liberada da solução de collagenase por centrifugação (500 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 10ml de meio HAM F-10, ressuspensionando delicadamente e centrifugando-se novamente (500 rpm) por 15 minutos. Descartado o sobrenadante, adicionaram-se 6-8ml (dependendo da quantidade final de material) de meio HAM F-10 suplementado com 20% de soro

bovino fetal à suspensão celular, que em seguida foi transferida para dois frascos de cultura de tecidos e incubada a 37°C por 1 hora, tempo necessário para que os fibroblastos pudessem aderir à superfície dos frascos, ficando as células tumorais em suspensão, de acordo com a técnica da aderência celular (Dasgupta *et al.*, 1987), que considera que os macrófagos e células mesoteliais aderem mais rapidamente ao frasco do que as células tumorais. Esta suspensão foi cuidadosamente retirada e redistribuída em outros frascos (três a cinco, dependendo da quantidade de células disponíveis), iniciando-se então a cultura em estufa a 37°C.

O material não foi manipulado por um período de dois a quatro dias, tempo necessário para que houvesse uma perfeita adesão celular à superfície do frasco. Transcorrido este período, as culturas foram alimentadas de duas a três vezes por semana (dependendo do crescimento celular), descartando-se metade do meio antigo e adicionando-se 2,5ml de meio suplementado com 20% de soro bovino fetal, a 37°C. Durante a alimentação foi necessário muito cuidado para não contaminar as culturas, e os frascos foram manuseados delicadamente para que as células não perdessem a aderência à superfície do frasco de cultura.

O aspecto da cultura e a atividade mitótica das células foram observados diariamente através de um microscópio invertido, o que permitia a avaliação do procedimento a ser realizado.

3.3 - Repique da cultura

Quando as células apresentavam uma alta atividade mitótica e formavam muitas áreas de confluência, foi necessário realizar o repique da cultura. Primeiramente todo o meio existente no frasco foi descartado, acrescentando-se 3ml de meio de cultura para lavar o material e retirar os resíduos de soro. Em seguida, adicionaram-se 3ml de solução de tripsina (1:250 Sigma T0646) a 4°C, permanecendo os frascos na posição horizontal por 30 segundos, transcorrido este tempo, retirou-se o excesso de tripsina e os frascos foram inclinados obliquamente por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente. Ao microscópio invertido observou-se se houve desprendimento celular, e quando necessário a tripsina agia por mais 5 minutos. A ação da tripsina foi inibida com 3ml de meio acrescido de 50% de soro bovino fetal. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur a parede do frasco foi lavada, ajudando a liberação das células. Em seguida, o material foi transferido para um frasco novo (filho) e ao frasco que sofreu o repique (mãe).

acrescentaram-se 2,5ml de meio de cultura com 20% de soro bovino fetal. Este procedimento foi sempre anotado no caderno controle. Após 8 a 24 horas, o frasco filho apresentava um número ótimo de células e sem áreas de confluência, sendo o momento ideal para a colheita da cultura.

4. COLHEITA DA CULTURA

O tempo em que o material permaneceu em cultura variou de acordo com a atividade mitótica.

Nos casos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 e 14 utilizou-se o método de sincronização celular descrito por Yunis (1976) com modificações. Quando a cultura apresentava uma quantidade suficiente de células sem confluência, com 2,5ml de meio suplementado com soro, adicionou-se 0,2ml de solução de metotrexato. Após 17 horas, adicionou-se 0,2ml de solução de timidina que agiu durante 6 horas, e em seguida foi colocado 0,2ml de solução de colchicina 0,016mg/ml. Transcorridas 13 horas, as células foram retiradas dos frascos com o auxílio da solução de tripsina, através do mesmo procedimento utilizado para o repique, transferidas para tubos de centrifuga e o material foi centrifugado a 800 rpm durante 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, acrescentou-se 1ml de solução hipotônica de KCl a 37°C homogeneizando-se delicadamente com haste de metal, adicionaram-se mais 5ml desta solução, homogeneizando-se novamente e deixando agir por 10 minutos em estufa a 37°C. Decorrido este tempo, centrifugou-se durante 8 minutos a 800rpm, descartou-se o sobrenadante e fez-se a fixação das células com 5ml de metanol:ácido acético (3:1), ressuspendendo-se cuidadosamente o material que permaneceu por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 1000 rpm por 8 minutos, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se este procedimento por mais duas vezes.

Nos casos 8, 9, 12 e 15 não foi utilizado o método de sincronização celular acima referido. Adicionou-se 0,2ml de solução de colchicina 0,012mg/ml, que agiu durante 22 horas, após este período o procedimento adotado foi o mesmo descrito anteriormente.

5. ANÁLISE CROMOSSÔMICA

Para a obtenção do número cromossômico modal utilizou-se o método de coloração convencional em solução de Giemsa (Merck) por 7 minutos. Foram contadas em média 67,6 células por caso. Quando havia poucas metáfases, várias lâminas foram feitas para conseguirmos um maior número de células, muitas vezes tendo-se que esgotar o material.

Os cromossomos metafásicos foram analisados detalhadamente através do bandamento GTG, sendo analisadas, em média 29,47 células por caso. As células foram primeiramente analisadas no microscópio (cada uma das metáfases desenhada e classificada) sendo, em seguida, fotografadas e cariotipadas. As anormalidades estruturais foram consideradas clonais quando uma mesma aberração foi detectada em duas ou mais metáfases, 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 onde havia tanto células monossômicas como nulissômicas para o mesmo cromossomo, considerou-se também as últimas para a clonalidade da monossomia em questão, portanto na tabela de alterações cromossômicas não consta a nulissomia e sim a monossomia clonal do determinado cromossomo. O mesmo critério foi aplicado para as tetrassomias. Na apresentação dos resultados, as alterações cromossômicas clonais estão destacadas em negrito.

6. BANDAMENTO GTG

O material foi submetido ao bandamento GTG (segundo a técnica de Scheres, 1972, com modificações) em lâminas preparadas com um dia (ficando em temperatura ambiente) ou com 2 horas (ficando em estufa a 40°C) de antecedência. As lâminas foram mergulhadas numa solução salina duplamente citratada (2SSC) por 5 minutos, lavadas com água destilada e colocadas numa solução de tripsina (tipo II Sigma T8128) por um tempo variável de 8 a 30 segundos (dependendo da sensibilidade do cromossomo ao bandamento). Em seguida, foram lavadas em solução salina 0,9% contendo 1ml de soro bovino fetal para interromper a ação da enzima e coradas em

solução de Giemsa durante 8 minutos, lavadas com água destilada e deixadas secar ao ar. Depois de secas, cada lâmina foi levada ao microscópio para a análise cromossômica. Todas as metáfases que apresentaram um bom padrão de bandamento foram analisadas ao microscópio e desenhadas.

7. FOTOMICROGRAFIA

Após a análise ao microscópio, todas as metáfases foram fotomicrografadas em microscópio comum equipado com câmara fotográfica automática. Utilizou-se o filme AGFA COPEX PAN A.H.U. 35 mm, 12 ASA, objetiva 100. O filme foi revelado utilizando-se o revelador D-72 (8 minutos a 20°C) e o fixador Kodak (15 minutos a 20°C). As cópias foram feitas no papel Kodabrome Print RCF3 Kodak, com revelador Dektol Kodak (1 minuto a 20°C) e o fixador Kodak (15 minutos a 20°C). Todo este procedimento foi realizado no laboratório fotográfico do Departamento de Genética da UFPR. Depois de lavadas em água corrente e secas, as fotomicrografias foram recortadas e os cariótipos montados de acordo com os desenhos obtidos durante a análise ao microscópio. Quando houve dúvidas entre as análises obtidas ao microscópio e nas fotos, voltamos ao microscópio para esclarecê-las.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos (X^2 , teste t, coeficiente de regressão) foram realizados conforme as fórmulas apresentadas por Beiguelman (1977).

9. MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

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

Solução de colagenase: 0,01g de colagenase tipo IV da Sigma dissolvido em cada 5ml de meio, concentração 0,2%. Após a dissolução da colagenase, esta solução foi esterilizada por filtração e colocada na estufa para atingir a temperatura de 37°C. Sempre preparada no momento do uso, sendo que dependendo do tamanho da massa tumoral, utilizou-se um maior ou menor volume da solução.

Solução de tripsina para cultura: 137mM de NaCl, 5,4mM de KCl, 0,42mM de Na_2HPO_4 , 0,44mM de KH_2PO_4 , 5,0mM de dextrose, 3mM de NaHCO_3 , 2mg% de vermelho de fenol, 0,53mM de EDTA, 50mg% de tripsina 1:250 Sigma, diluídos em água Milli-Q autoclavada, pH final igual a 7,4, esterilizada por filtração, aliquoteada em frascos de 45ml e conservada em geladeira.

Solução de metotrexato: 0,73ml da solução mãe (25mg de MTX/ml) diluídos em 39,27ml de meio de cultura, numa concentração final de 10^{-5}M . Então, a solução foi dividida em frascos de 5ml vedados com papel alumínio e guardada num freezer a -20°C.

Solução de timidina: 5mg de timidina Sigma T 9250 dissolvidos em 20ml de meio de cultura, numa concentração final de 10^{-3}M . Dividiu-se em frascos de 5ml cobertos com papel alumínio e guardou-se no freezer a -20°C.

Solução de colchicina: em 1ml da solução mãe (1mg/25ml de água destilada) foram adicionados 1,5ml de água destilada, esta concentração foi usada quando foi empregada a sincronização celular. Quando foi realizada a colheita direta, utilizou-se 1,5ml da solução mãe para cada 3,5ml de água destilada. Estas soluções foram guardadas na geladeira.

Solução hipotônica: 0,56g de KCl diluídos em 100ml de água destilada estéril, concentração 0,075M, utilizado a 37°C.

Solução de Giemsa: diluiu-se 1ml de Giemsa (Merck) em 10ml de tampão fosfato Sorensen 0,06M, pH6,8, mais 29ml de água destilada. Foi preparada no momento do uso e utilizada à 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 guardada na geladeira, sendo usados 40ml de cada vez à temperatura ambiente.

Solução de tripsina para bandamento GTG: 0,04g de tripsina (tipo II Sigma) diluídos em 40ml de solução salina 0,9% (9g em 1000ml de água), sempre preparada no momento do uso e utilizada à temperatura ambiente.

IV. RESULTADOS

1. LESÕES BENIGNAS DA MAMA

Caso 1 - Ginecomastia

As células deste caso permaneceram em cultura por 11 (frasco I) e 15 dias (frasco II), tendo sido colhidas após sincronização celular. Obteve-se um número cromossômico modal igual a 46 através da contagem de 60 metáfases com coloração convencional. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição do número cromossômico do caso 1

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura		Total	Frequência (%)
	I	II		
58-80	1	3	4	6,67
47	-	1	1	1,67
46	8	27	35	58,33
45	2	4	6	10,00
44	4	4	8	13,33
43	-	2	2	3,33
41	-	1	1	1,67
40	-	2	2	3,33
38	-	1	1	1,67
Total	15	45	60	

Para podermos excluir a ocorrência de síndrome de Klinefelter neste paciente com ginecomastia, analisamos também as células do sangue periférico, obtidas segundo o método proposto por Moorhead *et al.* (1960). Esta análise demonstrou um cariótipo constitucional normal: 46, XY. A análise cromossômica da amostra de ginecomastia após bandamento GTG foi realizada em 35 células, 33 provenientes do frasco II e duas metáfases normais do frasco I. As fórmulas cariotípicas estão apresentadas a seguir:

38, X, -Y, -2, -4, -8, -9, -17, -18, -20

40, XY, -2, -4, -7, -13, -14, -21

41, XY, -9, -12, -17, -19, -19

43, XY, -6, -11, -17

44, XY, -13, -16, **del(12)(p12)**

44, XY, -16, -19, -19, +mar1

44, XY, -19, -20

45, X, -Y

45, XY, -6, -20, +mar1

45, XY, -7

45, XY, -9

45, XY, -14

46, XY, -17, -17, +21, +mar2

46, XY, del(11)(q23)

46, XY, **del(12)(p12)[4]**

46, XY[17]

O cariótipo do caso 1 é o seguinte:

38~46, XY, -9[3], -17[4], -19[3], -20[3], +mar1[2] [cp8]/ 44~46, XY, del(12)(p12)[5]/ 46,XY[17].

Das 35 metáfases analisadas, 17 (48,57%) eram normais e 18 (51,43%) apresentaram alterações cromossômicas, sendo que, destas, 13 (72,22%) possuíam alterações clonais e cinco (27,78%) apresentaram alterações não clonais. Foram observadas 24 alterações cromossômicas diferentes (duas nulissomias, 17 monossomias, uma trissomia e quatro alterações estruturais), sendo que seis (25%) destas fizeram clone: quatro monossomias e duas alterações estruturais. Foram detectadas 47 alterações distribuídas nas 18 células, sendo que 20 formaram clones.

A tabela 4 mostra as alterações cromossômicas com suas respectivas frequências e as figuras 1 e 2 apresentam cariótipos representativos do caso 1.

Tabela 4 - Alterações cariotípicas do caso 1

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*
NUMÉRICAS		
Clonais		
- 9, -19, -20	3	8,57
-17	4	11,43
Não clonais		
-8, -11, -12, -18, -21, +21	1	2,86
-Y, -2, -4, -6, -7, -13, -14, -16	2	5,71
ESTRUTURAIS		
Clonais		
mar 1	2	5,71
del(12)(p12)	5	14,29
Não clonais		
mar 2	1	2,86
del(11)(q23)	1	2,86

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

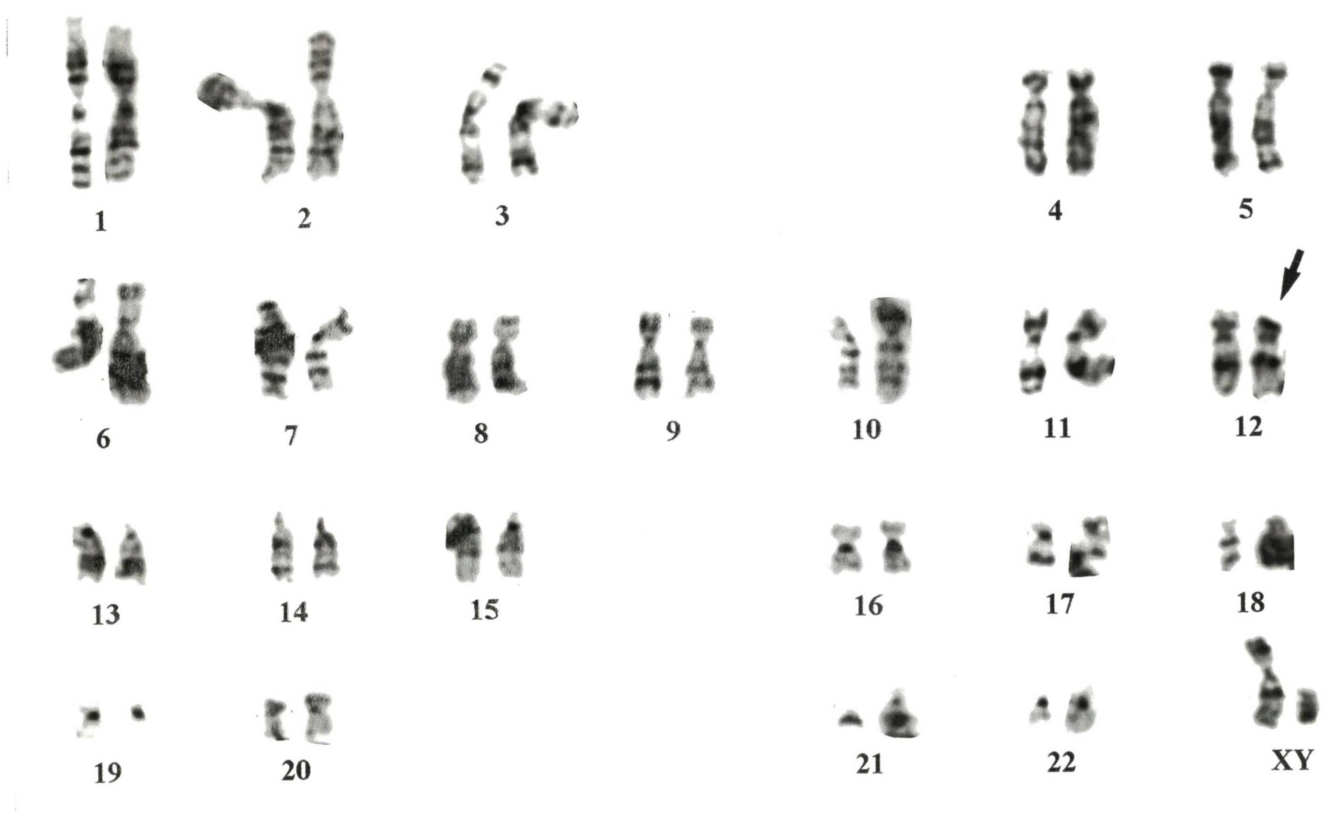


Figura 1 – Cariótipo representativo do caso 1: 46, XY, **del(12)(p12)**.

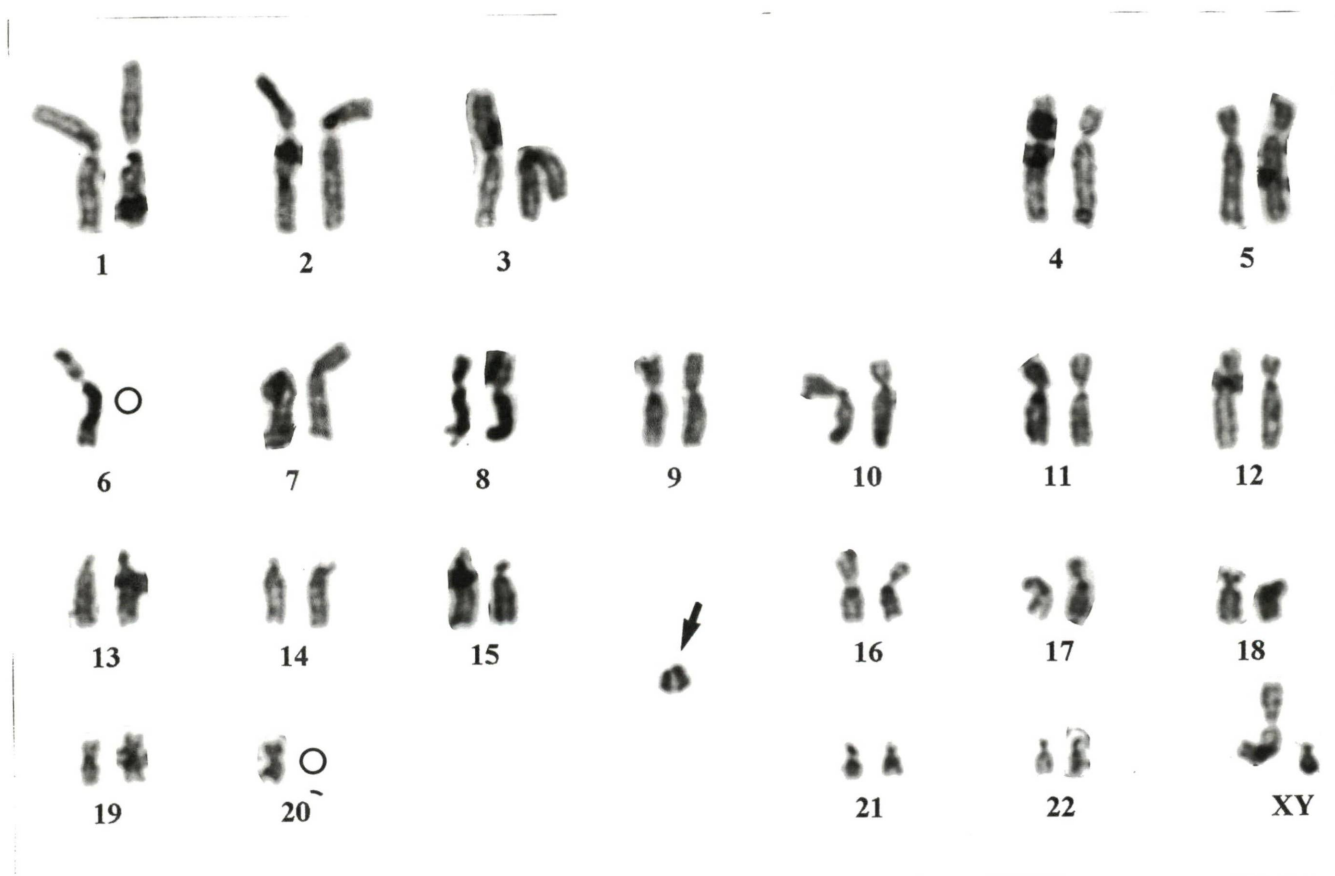


Figura 2 – Cariótipo representativo do caso 1: 45, XY, -6, -20, **+mar1**.

Caso 2 - Doença Fibrocística Mamária Florida

As células deste caso permaneceram em cultura por 18 dias tendo sido colhidas de apenas um frasco após a sincronização celular. Obteve-se um número modal igual a 46 cromossomos através da contagem de 32 metáfases com coloração convencional. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição do número cromossômico do caso 2

Número de cromossomos	Número de células	Frequência (%)
90	1	3,13
55	1	3,13
46	11	34,37
45	5	15,62
44	5	15,62
43	3	9,37
42	2	6,25
41	1	3,13
38	2	6,25
33	1	3,13
Total	32	

A análise cromossômica com bandamento GTG foi realizada em 12 células. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

33, X, -X, -4, -4, -6, -7, -8, -9, -12, -12, -13, -19, -19, -22

38, X, -X, -4, -8, -12, -16, -16, -18, -20

41, X, -X, -3, +5, -6, -10, -18, -22

42, XX, -4, -9, -13, -22

43, XX, -4, +5, -6, -7, -13

43, XX, +5, -8, -14, -16, -20

43, XX, -16, -17, -22

44, XX, -4, -22

44, XX, -8, -17

46, XX, -4, +5

46, XX, +5, -13

46, XX

O cariótipo do caso 2 é o seguinte:

33~46, XX, -X[3], -4[6], +5[5], -6[3], -8[4], -13[4], -16[3], -22[5][cp11].

Das 12 células analisadas, apenas uma (8,33%) mostrou cariótipo normal e as 11 (91,67%) restantes apresentaram alterações cromossômicas numéricas clonais. Foram observadas 21 alterações diferentes (quatro nulissomias, 16 monossomias e uma trissomia), sendo que oito (38,09%) delas eram clonais: uma trissomia e sete monossomias. Nenhuma alteração estrutural foi observada neste caso. Há ao todo 53 alterações distribuídas em 11 células, sendo que 33 formaram clones.

A tabela 6 mostra as alterações cromossômicas com suas respectivas frequências e as figuras 3 e 4 apresentam cariótipos representativos do caso 2.

Tabela 6 - Alterações cariotípicas do caso 2

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*
NUMÉRICAS		
Clonais		
-X, -6, -16	3	25,0
-8, -13	4	33,33
+5, -22	5	41,67
-4	6	50,0
Não clonais		
-3, -10, -12, <u>-12-12</u> , -14, <u>-19-19</u> ,	1	8,33
-7, -9, -17, -18, -20	2	16,67

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

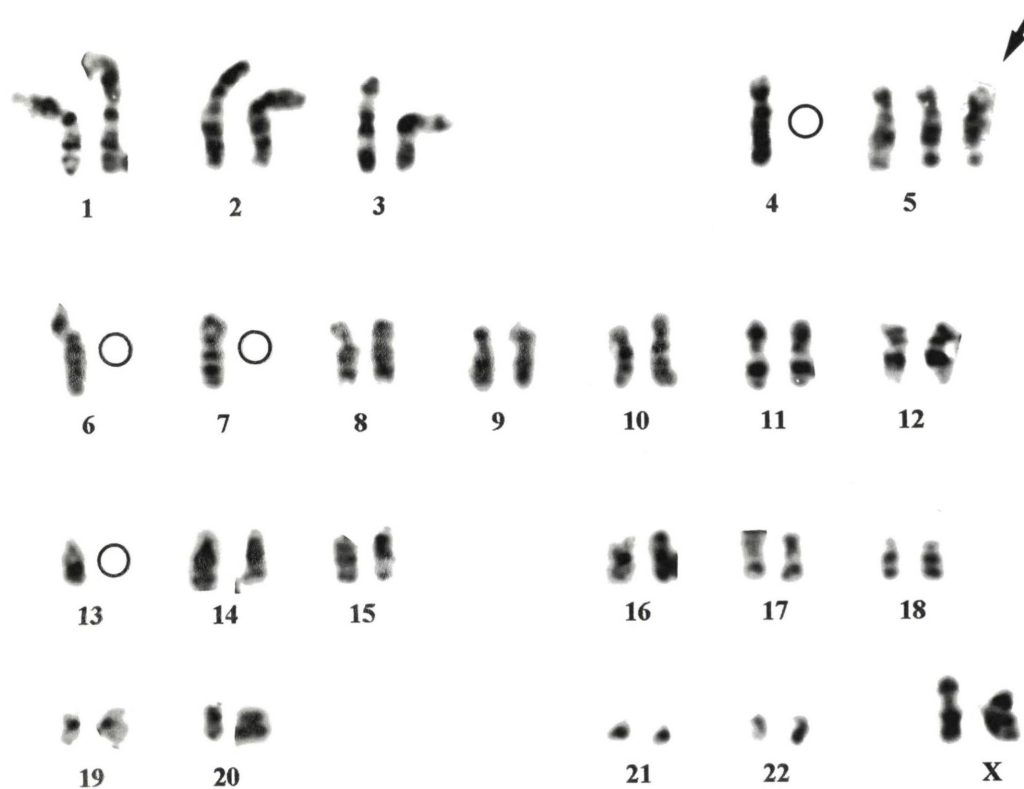


Figura 3: Cariótipo representativo do caso 2: 43, XX, -4, +5, -6, -7, -13.

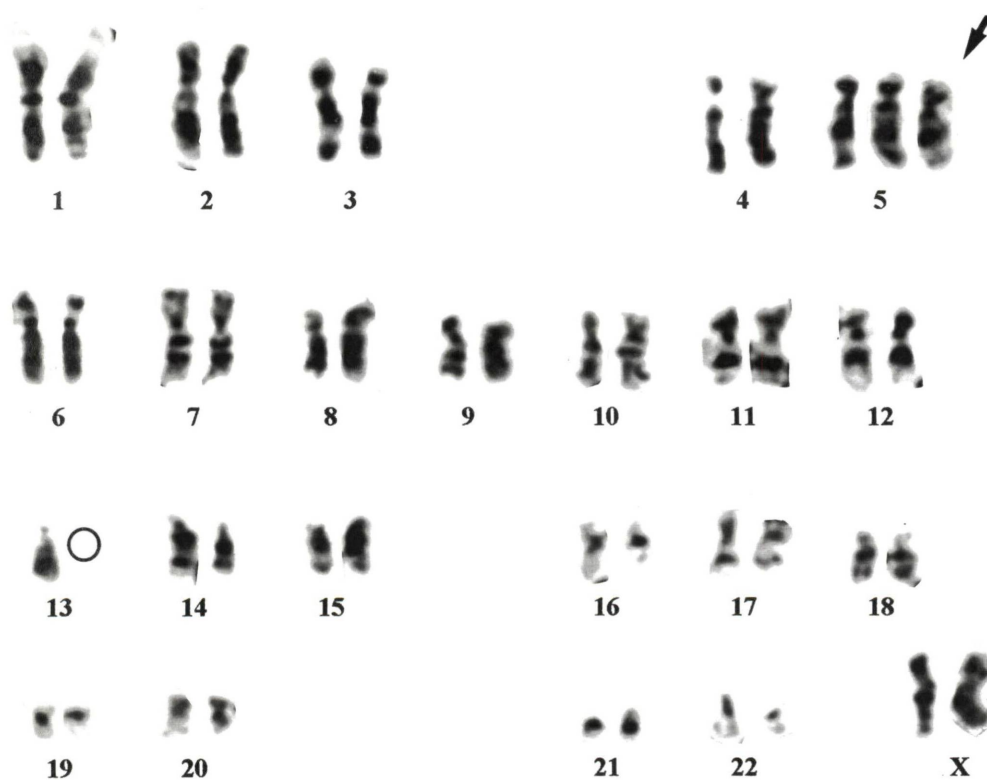


Figura 4: Cariótipo representativo do caso 2: 46, XX, +5, -13.

Caso 3 - Doença Fibrocística Mamária Florida

As células deste caso permaneceram em cultura por 60 (frascos I e II), 45 (frasco III) e 70 dias (frasco IV), tendo sido colhidas após sincronização celular. Obteve-se um número cromossômico modal igual a 46 através da contagem de 80 metáfases com coloração convencional. Os resultados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição do número cromossômico do caso 3

Número de cromossomos	Número de células/ frasco de cultura				Total	Frequência (%)
	I	II	III	IV		
47	1	2	-	1	4	5,0
46	7	17	9	14	47	58,75
45	2	4	3	4	13	16,25
44	1	-	2	3	6	7,5
43	-	1	1	3	5	6,25
42	-	1	-	3	4	5,0
40	-	1	-	-	1	1,25
Total	11	26	15	28	80	

Foi realizada a análise de 33 células com bandamento GTG. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

40, XX, -3, -7, -12, -15, -19, -20

42, X, -X, -3, -11, -22

43, X, -X, -15, -16, -17, +mar1

45, X, del(X)(q23), +3, -9, -10

45, XX, -9

45, XX, -12

45, XX, -17

45, XX, -18

45, XX, -19

45, XX, -22

46, X, del(X)(q23)[3]

46, X, del(X)(q23), del(11)(q23)

46, XX, -13, +mar1

46, XX, -14, +15, -17, +18

46, XX, -15, +mar1

46, XX, -15, +18

46, XX, -17, +18

46, XX [13]

47, XX, +mar1

O cariótipo do caso 3 é o seguinte:

40~47, XX, -15[4], -17[4], +18[3], +mar1[4] [cp 9]/ 45~46, X, del(X)(q23) [5]/ 46, XX [13].

Das 33 células analisadas, 13 (39,39%) eram normais e 20 (60,61%) apresentaram alterações cromossômicas, sendo que destas 14 (70%) possuíam alterações clonais e seis (30%) apresentaram alterações não clonais. Foram observadas 22 alterações diferentes (três estruturais, três trissomias e 16 monossomias), sendo que cinco (22,73%) destas formaram clones: duas estruturais, duas monossomias e uma trissomia. No total observou-se 43 anormalidades cariotípicas distribuídas nas 20 células, sendo que 20 formaram clones.

A tabela 8 mostra as alterações cromossômicas com suas respectivas frequências e as figuras 5 e 6 apresentam cariótipos representativos do caso 3.

Tabela 8 - Alterações cariotípicas do caso 3

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
+18	3	9,09	II
-15, -17	4	12,12	II
Não clonais			
-7, -13, -14, +15, -16, -20	1	3,03	II
+3, -10, -11	1	3,03	IV
-18	1	3,03	III
-X, -3, -9, -19, -22	2	6,06	II, IV
-12	2	6,06	II, III
ESTRUTURAIS			
Clonais			
mar1	4	12,12	II
del(X)(q23)	5	15,15	I, II, III, IV
Não clonais			
del(11)(q23)	1	3,03	II

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

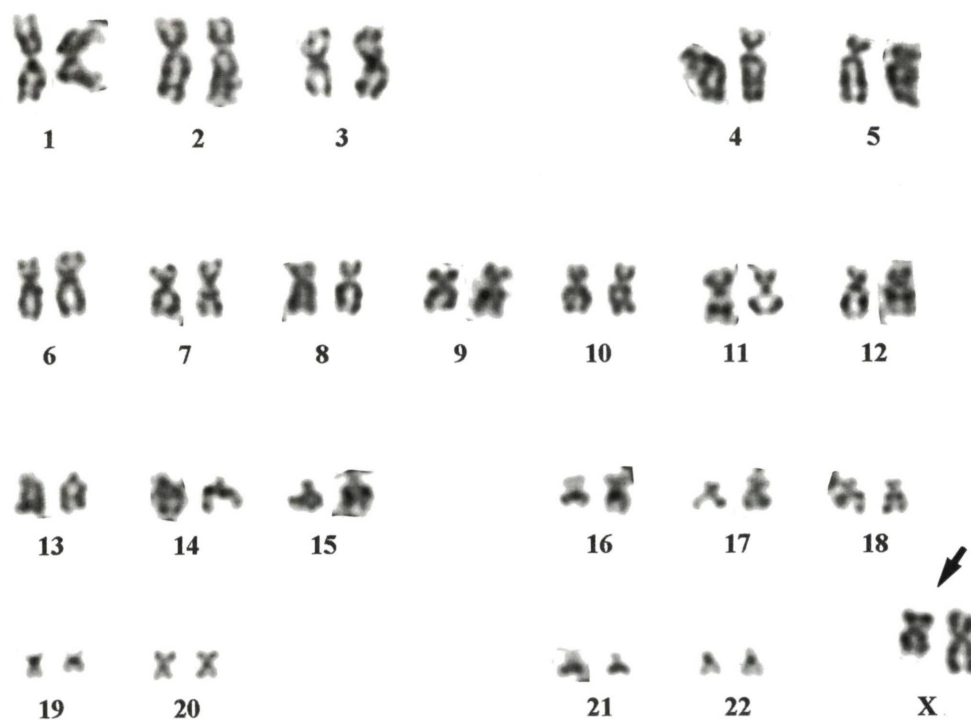


Figura 5 – Cariótipo representativo do caso 3: 46, X, **del(X)(q23)**, **del(11)(q23)**.



Figura 6 – Cariótipo representativo do caso 3: 46, XX, -14, +15, -17, +18.

Caso 4 - Fibroadenoma

As células deste caso permaneceram 30 (frascos II e IV) e 45 dias (frasco III) em cultura, tendo sido colhidas após sincronização celular. Obteve-se um número modal igual a 46 cromossomos através da contagem de 64 metáfases com coloração convencional. Os resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição do número cromossômico do caso 4

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura			Total	Frequência (%)
	II	III	IV		
81-103	1	1	3	5	7,81
47	3	-	1	4	6,25
46	11	6	4	21	32,81
45	4	2	4	10	15,63
44	1	2	2	5	7,81
43	3	3	1	7	10,94
42	-	1	1	2	3,13
41	-	1	-	1	1,56
40	-	-	2	2	3,13
38	1	1	1	3	4,69
37	1	-	1	2	3,13
35	1	-	-	1	1,56
33	-	-	1	1	1,56
Total	26	17	21	64	

A análise cromossômica após o bandamento GTG foi realizada em 31 células. Este caso apresentou uma situação incomum, pois o fibroadenoma proveniente de uma paciente do sexo feminino, possuía em algumas células o cromossomo Y, confirmado pelo emprego do bandamento CBG (figura 7), conforme o método descrito por Sumner (1972). Não foi possível localizar novamente a paciente e, portanto, não houve possibilidade de avaliar o cariótipo constitucional.

38, XY, -1, -3, -4, -6, -9, -12, -19, -22

40, X, -4, -7, -10, -11, -12

41, XY, -2, -3, -4, -6, -17

42, XY, -7, -18, -19, -20

43, XY, -2, -18, -19

43, XX, -4, -8, -18

43, XX, -10, -12, -17

43, XX, -11, -21, -21

44, XX, -2, -22

44, XY, -4, -6, -10, +18

45, XXY, -4, -4

45, XXY, -7, -17

45, XY, -11, -12, +mar1

45, XX, -13

45, XXY, -17, -19

45, XX, -19

45, XXY, -19, -22

46, XXY, -16, +18, -22

46, XXY, -19

46, XXY, -22 [3]

46, XX [4]

46, XY [2]

47, XXY [3]

O cariótipo do caso 4 é o seguinte:

38~46, X, XX, XY, XXY, -2[3], -4[6], -6[3], -7[3], -10[3], -11[3], -12[4], -17[4], -18[3], +18[2], -19[7], -22[7] [cp 22]/ 46, XX[4] / 46, XY[2]/ 47, XXY[3].

Não considerando as três células com cariótipo 47, XXY, foram observadas seis (21,43%) células normais, 46, XX[4] e 46, XY[2], e 22 (78,57%) células com alterações cariotípicas. As constituições cromossômicas sexuais XXY (nove células) e X0 (uma célula) não foram computadas como alterações cariotípicas, no entanto, todas as 31 células foram consideradas para a análise da ploidia. Das 22 células anormais, 21 (95,45%) apresentavam aberrações clonais e uma (4,55%) apresentava uma aberração

não clonal. Foram observadas 23 alterações diferentes (duas nulissomias, 19 monossomias, uma trissomia e uma estrutural) sendo que 12 (52%) destas fizeram clone: 11 monossomias e uma trissomia. Detectaram-se 60 alterações distribuídas nas 22 células cariotipicamente anormais, sendo que 48 delas formaram clones.

A tabela 10 mostra as alterações cariotípicas encontradas e as figuras 8 e 9 apresentam cariótipos representativos do caso 4.

Tabela 10 - Alterações cariotípicas do caso 4

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
+18	2	6,45	II, III
-2	3	9,68	II, III
-6, -18	3	9,68	III
-7	3	9,68	III, IV
-10, -11	3	9,68	II, III, IV
-12	4	12,9	II, III, IV
-17	4	12,9	II, III
-4	6	19,35	III, IV
-19	7	22,58	III, IV
-22	7	22,58	II, III, IV
Não clonais			
-1, -8, -9, -20	1	3,23	III
-13, -16, <u>-21, -21</u>	1	3,23	II
-3	2	6,45	II, III
ESTRUTURAIS			
Não clonais			
mar1	1	3,23	

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.



Figura 7 – Cromossomos com bandamento CBG demonstrando a presença do Y.

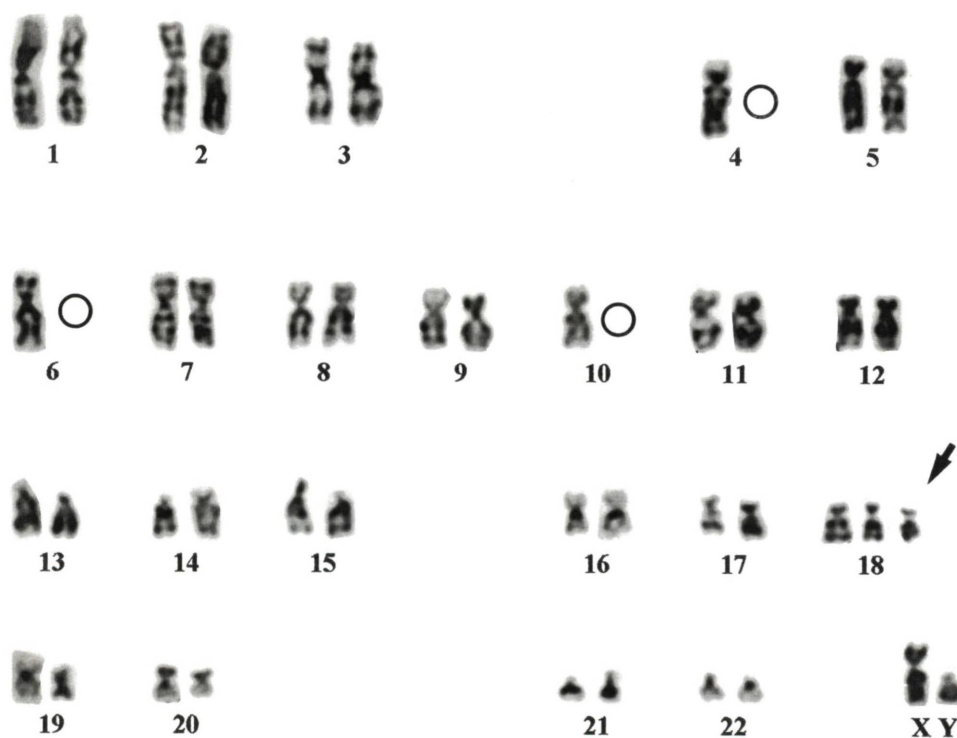


Figura 8 – Cariótipo representativo do caso 4: 44, XY, -4, -6, -10, +18.

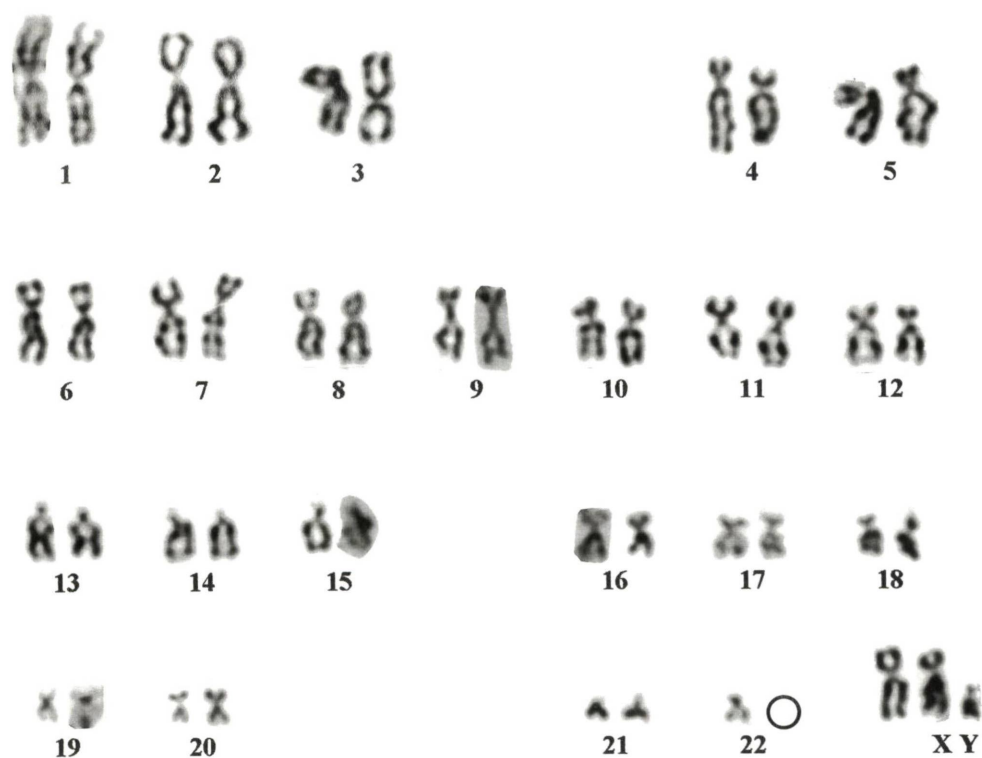


Figura 9 – Cariótipo representativo do caso 4: 46, XXY, -22.

Caso 5 - Fibroadenoma

As células deste caso permaneceram em cultura por nove dias tendo sido colhidas de apenas um frasco após sincronização celular. Obteve-se um número cromossômico modal igual a 46 através da contagem de 60 metáfases com coloração convencional. Os resultados estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição do número cromossômico do caso 5

Número de cromossomos	Número de células	Frequência (%)
47	4	6,67
46	37	61,67
45	6	10
44	5	8,33
43	1	1,67
42	1	1,67
41	1	1,67
40	1	1,67
39	1	1,67
38	1	1,67
35	2	3,33
Total	60	

A análise cromossômica com bandamento GTG foi realizada em 34 células. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

43, XX, -9, -10, -16

45, XX, -10[3]

45, XX, -14

46, X, -X, +9

46, XX, +8, +9, -10, -11

46, XX, +9, -10

46, XX, +9, -14

46, XX, del(9)(q33)[4]

46, XX, -14, +15

46, XX, -14, +20

46, XX[18]

91, XXXX, -2, +7, -10

O cariótipo do caso 5 é o seguinte:

43~91, XX, +9[4], -10[7], -14[4] [cp12]/ 46, XX, del(9)(q33)[4]/ 46, XX[18].

Foram observadas 18 (52,94%) células normais e 16 (47,06%) células com alterações cariotípicas, todas com aberrações clonais. Foram observadas 13 alterações diferentes (sete monossomias, cinco trissomias e uma estrutural) sendo que quatro (30,77%) destas fizeram clone: duas monossomias, uma trissomia e uma estrutural. Detectaram-se 28 alterações distribuídas em 16 células, sendo que 19 delas formaram clones.

A tabela 12 apresenta as alterações cariotípicas do caso 5 com suas respectivas frequências e as figuras 10 e 11 mostram os cariótipos representativos deste caso.

Tabela 12 - Alterações cariotípicas do caso 5

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*
NUMÉRICAS		
Clonais		
+9, -14	4	11,76
-10	7	20,59
Não clonais		
-X, -2, +7, +8, -9, -11, +15, -16, +20	1	2,94
ESTRUTURAIS		
Clonais		
del(9)(q33)	4	11,76

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.



Figura 10 - Cariótipo representativo do caso 5: 46, XX, +8, +9, -10, -11.

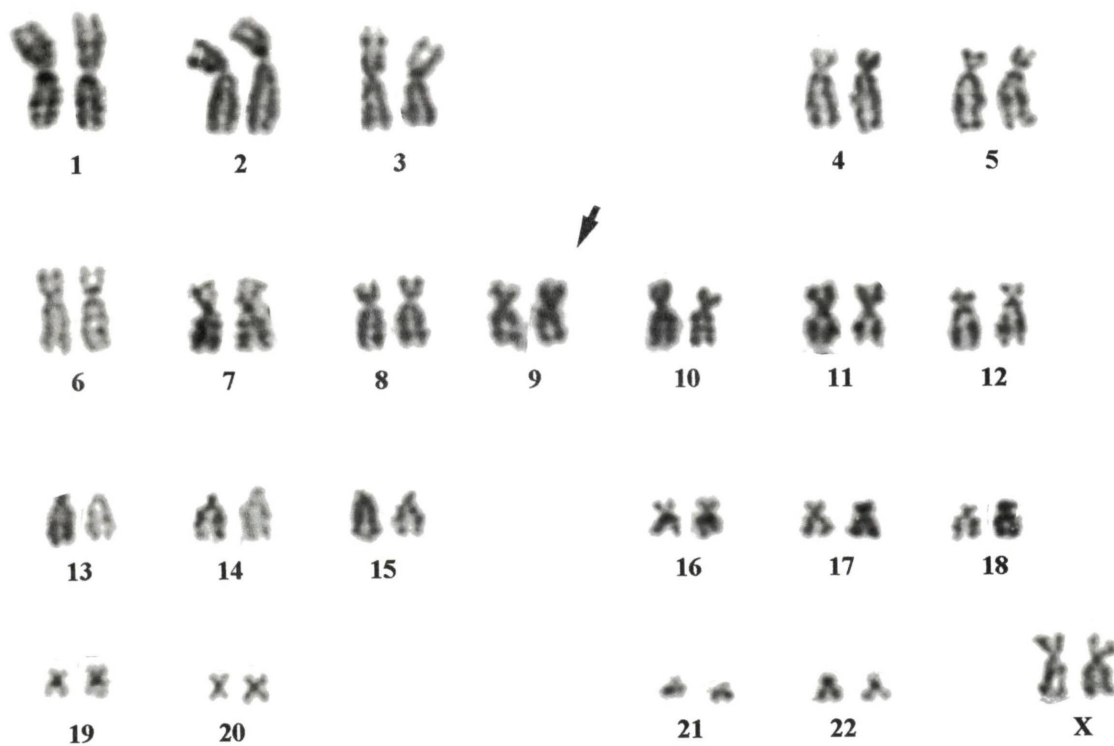


Figura 11 – Cariótipo representativo do caso 5: 46, XX, **del(9)(q33)**.

Caso 6 - Fibroadenoma

As células deste caso permaneceram em cultura por 52 (frascos II e IV) e 65 dias (frasco III), tendo sido colhidas após sincronização celular. Obteve-se um número modal igual a 46 cromossomos pela contagem de 60 metáfases com coloração convencional. Os resultados são apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Distribuição do número cromossômico do caso 6

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura			Total	Frequência (%)
	II	III	IV		
48	1	2	-	3	5,0
47	-	2	-	2	3,33
46	10	37	-	47	78,33
45	-	2	-	2	3,33
44	-	2	-	2	3,33
43	1	-	-	1	1,67
39	-	1	-	1	1,67
36	-	1	1	2	3,33
Total	12	47	1	60	

A análise cromossômica após bandamento GTG foi realizada em 15 metáfases, as fórmulas cariotípicas estão apresentadas a seguir:

46, XX, -12, +17

46, XX, del(13)(q22) [3]

46, XX[11]

O cariótipo do caso 6 é o seguinte:

46, XX, del(13)(q22)[3]/ 46, XX[11].

Das 15 células analisadas, 11 (73,33%) eram normais e quatro (26,67%) apresentaram alterações cromossômicas, sendo que destas três (75%) possuíam alterações clonais e uma (25%) apresentou alterações não clonais. Foram observadas três alterações diferentes (uma monossomia, uma trissomia e uma estrutural), sendo que uma

(33,33%) destas formou clone: a alteração estrutural. Foram detectadas cinco anormalidades cariotípicas distribuídas em quatro células, sendo que três formaram clone.

A tabela 14 mostra as alterações cariotípicas encontradas no caso 6 e suas respectivas frequências e as figuras 12 e 13 apresentam os cariótipos representativos deste caso.

Tabela 14 - Alterações cariotípicas do caso 6

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Não clonais			
-12, +17	1	6,67	IV
ESTRUTURAIS			
Clonais			
del(13)(q22)	3	20,0	III

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.



Figura 12 - Cariótipo representativo do caso 6: 46, XX, **del(13)(q22)**.

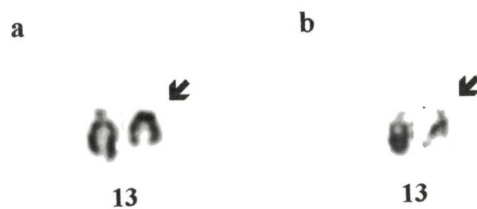


Figura 13 – Cariótipos parciais de duas outras células (a, b) com a **del(13)(q22)**.

Caso 7 - Fibroadenoma

As células deste caso foram sincronizadas e colhidas após 36 (frascos I e II) dias em cultura. Obteve-se o número cromossômico modal igual a 46 pela contagem de 60 metáfases com coloração convencional. A tabela 15 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 15 - Distribuição do número cromossômico do caso 7

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura		Total	Frequência (%)
	I	II		
46	26	12	38	63,33
45	4	2	6	10,0
44	4	-	4	6,67
43	4	-	4	6,67
42	2	-	2	3,33
41	3	-	3	5,0
40	1	-	1	1,67
39	1	1	2	3,33
Total	45	15	60	

Foram analisadas 40 metáfases com bandamento GTG. As fórmulas cariotípicas estão apresentadas a seguir:

42, XX, -4, -7, -10, -22

42, XX, -16, -17, -20, -22

43, XX, -15, -21, -21

44, XX, -6, -14

44, XX, -7, -22

44, XX, -10, -18

44, XX, -15, -20

45, X, -X, del(15)(q22)

45, X, del(X)(q26), -6

45, XX, -2

45, XX, -9, +14, -18

45, XX, -13

45, XX, -18

45, XX, -20

46, X, del(X)(q26) [3]

46, XX, -11, +14

46, XX, del(12)(p12)

46, XX [21]

O cariótipo do caso 7 é o seguinte:

42~46, XX, +14[2], -18[3], -20[3], -22[3] [cp9]/ 46, X, del(X)(q26) [4]/ 46, XX [21].

Das 40 células analisadas, 21 (52,50%) eram normais e 19 (47,50%) apresentaram alterações cromossômicas, sendo que destas, 13 (68,42%) apresentaram alterações clonais e seis (31,58%) não clonais. Foram identificadas 21 alterações diferentes (uma nulissomia, 16 monossomias, uma trissomia e três estruturais), das quais cinco (23,81%) formaram clones: três monossomias, uma trissomia e uma estrutural. Foram detectadas 35 anormalidades distribuídas entre as 19 metáfases, sendo que 15 delas formaram clones.

A tabela 16 apresenta as aberrações cromossômicas detectadas com suas respectivas frequências e as figuras 14 e 15 mostram cariótipos representativos deste caso.

Tabela 16 - Alterações cariotípicas do caso 7

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
+14	2	5,0	I
-18	3	7,5	I, II
-20, -22	3	7,5	I
Não clonais			
-X, -2, -4, -9, -11, -13, -14, -16, -17, <u>-21-21</u>	1	2,5	I
-6, -7, -10, -15	2	5,0	I
ESTRUTURAIS			
Clonais			
del(X)(q26)	4	10,0	I
Não clonais			
del(12)(p12), del(15)(q22)	1	2,5	I

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

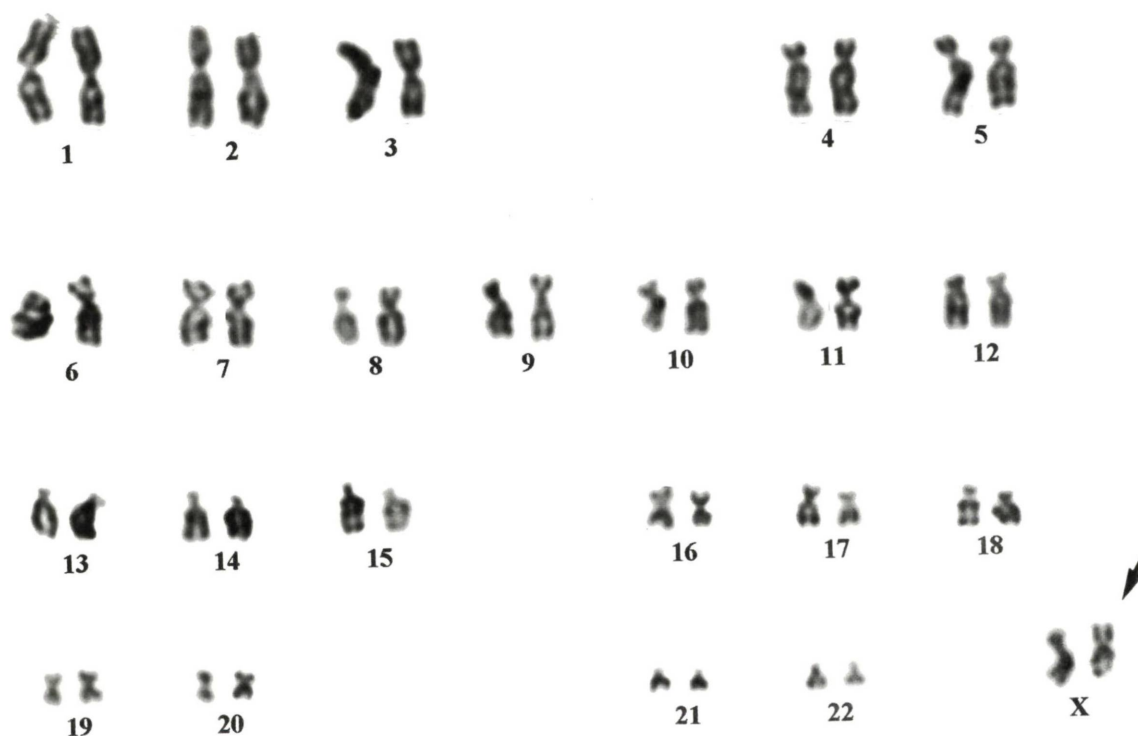


Figura 14 – Cariótipo representativo do caso 7: 46, X, del(X)(q26)

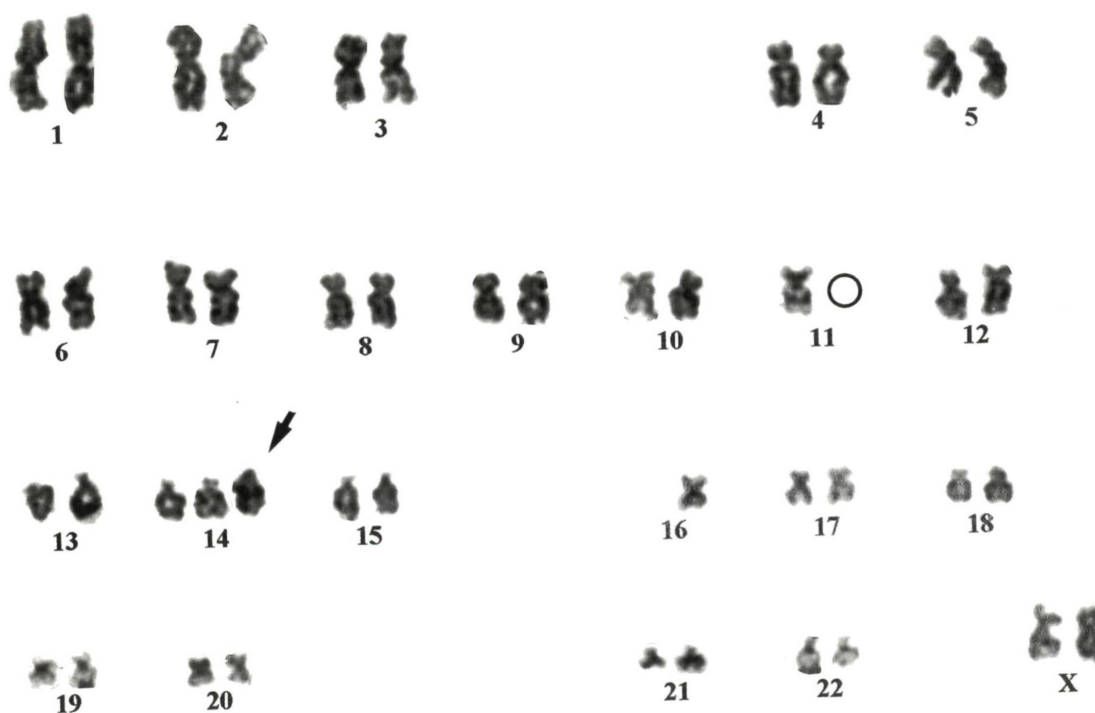


Figura 15 – Cariótipo representativo do caso 7: 46, XX, -11, +14

Síntese dos Resultados das Lesões Benignas da Mama

O número cromossômico modal encontrado nas populações celulares de todos os sete casos de lesões benignas da mama analisados citogeneticamente através de coloração convencional foi 46, sendo que a frequência variou de 32,81% (caso 4) a 78,33% (caso 6).

A análise após bandamento GTG, realizada em todas as alterações benignas deste trabalho, demonstrou a presença de anormalidades cariotípicas clonais em todos os casos. A frequência de células normais variou de 8,33% (caso 2) a 73,33% (caso 6). A tabela 17 apresenta um resumo dos dados citogenéticos das lesões benignas.

A maioria dos casos apresentou várias aberrações cromossômicas clonais; somente o caso 6 apresentou um único clone anormal. Os casos 1, 3, 5 e 7 apresentaram clones não relacionados citogeneticamente.

As aberrações cromossômicas estruturais observadas nos sete casos estão apresentadas na tabela 18. Não foi detectada nenhuma aberração estrutural clonal recorrente, sendo que o único cromossomo que se apresentou alterado estruturalmente em mais do que um caso foi o cromossomo X, ambas as aberrações com deleção em Xq.

As aberrações cromossômicas numéricas observadas nas sete lesões benignas estão apresentadas na tabela 19. As monossomias recorrentes foram: -4 em dois casos (2 e 4), -6 em dois casos (2 e 4), -10 em dois casos (4 e 5), -17 em três casos (1, 4, e 7), -18 em dois casos (4 e 7), -19 em dois casos (1 e 4), -20 em dois casos (1 e 7), -22 em três casos (2, 4 e 7). As trissomias envolveram os cromossomos 5, 9, 14 e 18, sendo que a única recorrente foi a do 18 observada em dois casos (3 e 4).

A tabela 20 e a figura 16 apresentam a distribuição das aberrações cromossômicas estruturais e numéricas clonais observadas nas lesões benignas da mama. Nelas não foram incluídos os cromossomos marcadores.

Tabela 17 - Idade dos pacientes, tipo histológico e resumo dos dados citogenéticos de sete lesões benignas da mama

Caso	Idade	Tipo histológico	Dias <i>in vitro</i> (média)	Número modal	Células (GTG)	Cariótipo
1	47	ginecomastia	13	46	35	38~46, XY, -9[3], -17[4], -19[3], -20[3] +mar1[2] [cp8]/ 44~46,XY, del(12)(p12)[5]/ 46, XY[17].
2	37	Doença fibrocística mamária florida	18	46	12	33~46, XX, -X[3], -4[6], +5[5], -6[3], -8[4], -13[4], -16[3], -22[5][cp11].
3	68	Doença fibrocística mamária florida	58	46	33	40~47, XX, -15[4], -17[4], +18[3], +mar1[4] [cp9]/ 45~46, X, del(X)(q23) [5]/ 46, XX [13].
4	43	fibroadenoma	37	46	31	38~46, X, XX, XY, XXY, -2[3], -4[6], -6[3], -7[3], -10[3], -11[3], -12[4], -17[4], -18[3], +18[2], -19[7], -22[7] [cp22]/ 46, XX[4]/46, XY[2]/ 47, XXY[3].
5	25	fibroadenoma	9	46	34	43~91, XX, +9[4], -10[7], -14[4] [cp12]/ 46, XX, del(9)(q33)[4]/ 46, XX[18].
6	38	fibroadenoma	58	46	15	46, XX, del(13)(q22)[3]/ 46, XX[11].
7	52	fibroadenoma	36	46	40	42~46, XX, +14[2], -18[3], -20[3], -22[3] [cp9]/ 46, X, del(X)(q26) [4]/46, XX [21].

Tabela 18 - Aberrações cromossômicas estruturais clonais observadas em sete lesões benignas da mama

Cromossomo	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Total	Frequência(%)
X	-	-	del(X)(q23)[5]	-	-	-	del(X)(q26)[4]	9	33,33
9	-	-	-	-	del(9)(q33)[4]	-	-	4	14,81
12	del(12)(p12)[5]	-	-	-	-	-	-	5	18,51
13	-	-	-	-	-	del(13)(q22)[3]	-	3	11,11
Mar	mar[2]	-	mar[4]	-	-	-	-	6	22,22
Total	7	-	9	-	4	3	4	27	-

Tabela 19 – Aberrações cromossômicas numéricas clonais observadas em sete lesões benignas da mama

C	Caso 1		Caso 2		Caso 3		Caso 4		Caso 5		Caso 6		Caso 7		TP		TG	F(%)
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	2,29
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	12	-	12	9,16
5	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	3,82
6	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	6	-	6	4,58
7	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	2,29
8	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4	3,05
9	3	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	3	4	7	5,34
10	-	-	-	-	-	-	3	-	7	-	-	-	-	-	10	-	10	7,63
11	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	2,29
12	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4	3,05
13	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4	3,05
14	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	2	4	2	6	4,58
15	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4	3,05
16	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	2,29
17	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	-	-	-	-	12	-	12	9,16
18	-	-	-	-	-	3	3	2	-	-	-	-	3	-	6	5	11	8,40
19	3	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	10	-	10	7,63
20	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	6	-	6	4,58
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	5	-	-	-	7	-	-	-	-	-	3	-	15	-	15	11,45
X	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	2,29
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TP	13	0	28	5	8	3	46	2	11	4	-	-	9	2	115	16	-	-
TG	13		33		11		48		15		-		11		131		131	-

C = Cromossomo; M = Monossomia; T = Trissomia; TP = Total Parcial; TG= Total Geral; F = Frequência.

Tabela 20 - Aberrações cromossômicas numéricas e estruturais clonais observadas nas lesões benignas da mama

Cromossomo	Numéricas		Estruturais	Total	Frequência (%)
	M	T			
1	-	-	-	-	-
2	3	-	-	3	1,97
3	-	-	-	-	-
4	12	-	-	12	7,90
5	-	5	-	5	3,29
6	6	-	-	6	3,95
7	3	-	-	3	1,97
8	4	-	-	4	2,63
9	3	4	4	11	7,24
10	10	-	-	10	6,58
11	3	-	-	3	1,97
12	4	-	5	9	5,92
13	4	-	3	7	4,61
14	4	2	-	6	3,95
15	4	-	-	4	2,63
16	3	-	-	3	1,97
17	12	-	-	12	7,90
18	6	5	-	11	7,24
19	10	-	-	10	6,58
20	6	-	-	6	3,95
21	-	-	-	-	-
22	15	-	-	15	9,87
X	3	-	9	12	7,90
Y	-	-	-	-	-
Total	115	16	21	152	

M = Monossomia; T = Trissomia.

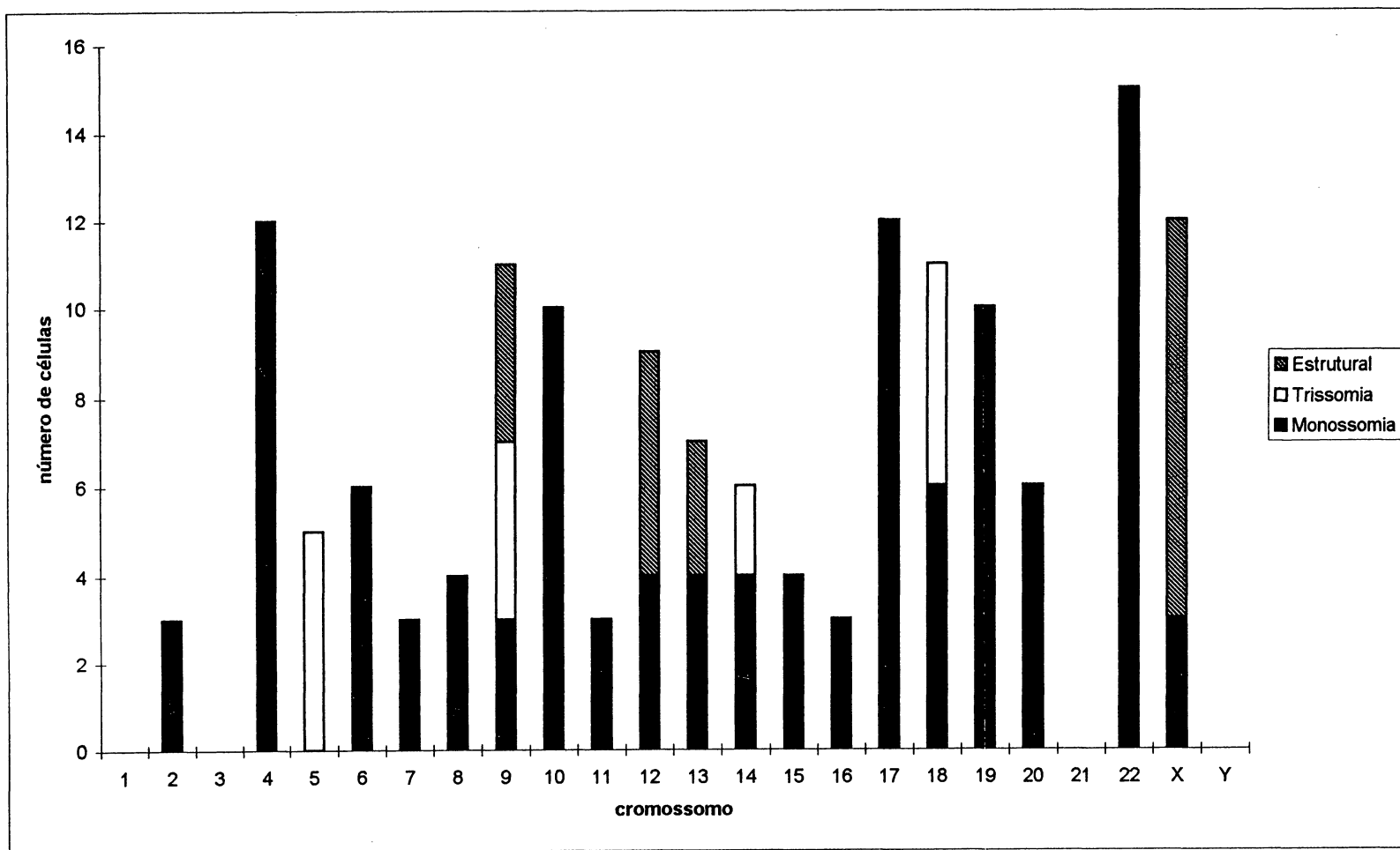


Figura 16 – Distribuição, por cromossomo, das alterações cromossômicas clonais observadas nas lesões benignas da mama.

2-TUMORES MALIGNOS DA MAMA

Caso 8 - Carcinoma Ductal Invasor

As células deste tumor permaneceram em cultura por 50 dias (frascos I e III) e foram colhidas sem sincronização. Obteve-se um número cromossômico modal igual a 46 através da contagem de 51 metáfases com coloração convencional. Os resultados são apresentados na tabela 21.

Tabela 21 - Distribuição do número cromossômico do caso 8

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura		Total	Frequência (%)
	I	III		
54	1	-	1	1,96
52	-	1	1	1,96
47	1	-	1	1,96
46	10	17	27	52,94
45	2	4	6	11,76
44	1	2	3	5,88
43	-	1	1	1,96
42	1	-	1	1,96
41	-	5	5	9,80
40	-	2	2	3,92
39	-	2	2	3,92
37	-	1	1	1,96
Total	16	35	51	

Foram analisadas 15 metáfases com bandamento GTG. As fórmulas cariotípicas estão apresentadas a seguir:

40, X, -X, -1, -2, -3, -10, -15

42, XX, -11, -13, -17, -19

43, XX, -4, -7, -16

44, XX, -9, -22

45, XX, -6, +9, -22

45, XX, -7

46, X, -X, +9, -19, +21

46, XX, -7, +9, -19, +20

46, XX, +9, -10[2]

46, XX, +9, -19

46, XX, +9, -11

46, XX[3]

O cariótipo do caso 8 é o seguinte:

40~46, XX, -7[3], +9[7], -10[3], -19[4][cp 11]/ 46, XX[3].

Das 15 metáfases analisadas, três (20%) eram normais e 12 (80%) apresentaram alterações cromossômicas, sendo que destas, 11 (91,67%) apresentavam alterações clonais e uma (8,33%) possuía alterações não clonais. Foram identificadas 19 alterações diferentes (três trissomias e 16 monossomias), das quais quatro (21,05%) clonais: três monossomias e uma trissomia. Observou-se 35 alterações distribuídas nas 12 células anormais, sendo que 17 formaram clones.

A tabela 22 mostra as alterações cromossômicas com suas respectivas frequências e as figuras 17 e 18 apresentam cariótipos representativos do caso 8.

Tabela 22 - Alterações cariotípicas do caso 8

Alterações caritípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
-7	3	20,0	III
-10	3	20,0	I, III
-19	4	26,67	I, III
+9	7	46,67	III
Não clonais			
-1, -2, -3, -4, -6, -15, -16, +20, +21	1	6,67	III
-9, -13, -17	1	6,67	I
-X	2	13,33	III
-11, -22	2	13,33	I, III

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

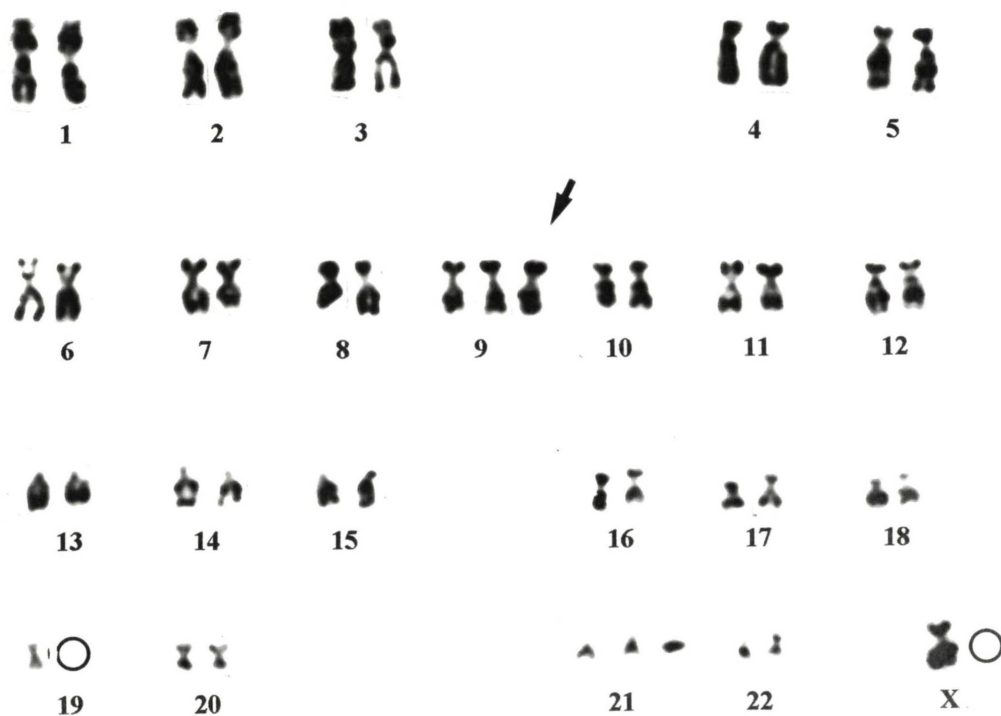


Figura 17 - Cariótipo representativo do caso 8: 46, X, -X, +9, -19, +21.

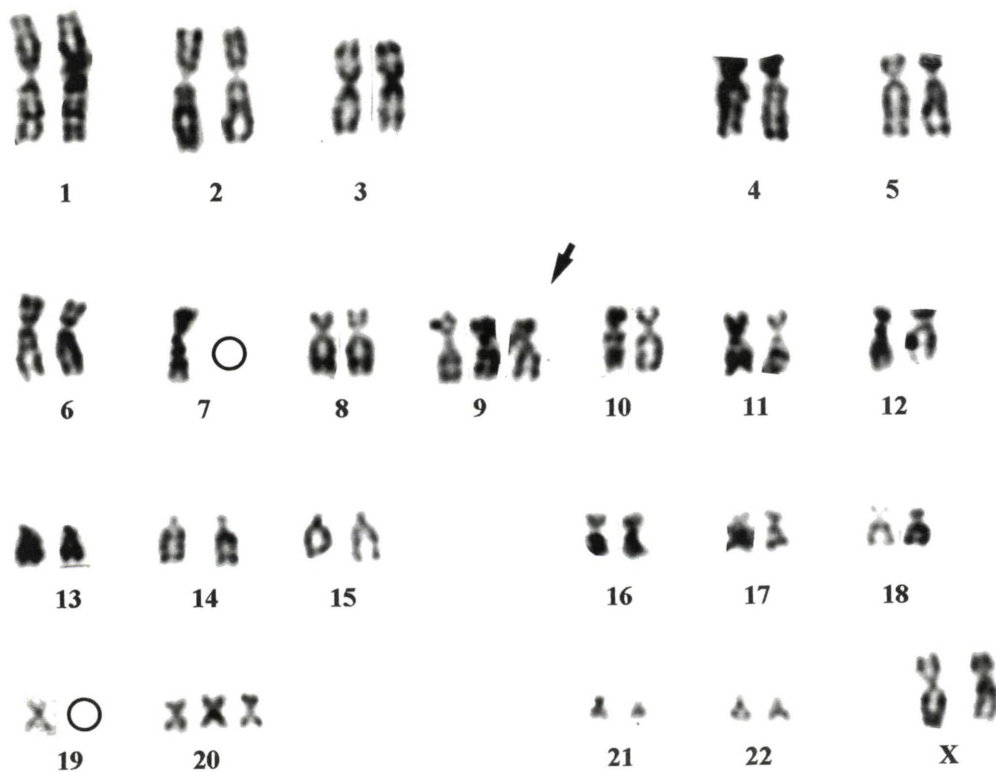


Figura 18 - Cariótipo representativo do caso 8: 46, XX, -7, +9, -19, +20.

Caso 9 - Carcinoma Ductal Invasor

As células deste tumor que foram utilizadas para a análise citogenética foram obtidas, sem sincronização celular, de apenas um frasco que permaneceu em cultura por 45 dias. O número modal encontrado após a contagem de 52 metáfases com coloração convencional foi igual a 46 cromossomos. A tabela 23 apresenta a distribuição do número cromossômico observada no caso 9.

Tabela 23 - Distribuição do número cromossômico do caso 9

Número de cromossomos	Número de células	Frequência (%)
poliplóide	2	3,85
47	1	1,92
46	33	63,46
45	11	21,15
40	2	3,85
37	1	1,92
34	2	3,85
Total	52	

Analisaram-se 19 metáfases com bandamento GTG, as fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

34, XX, -7, -8, -10, -12, -15, -15, -16, -17, -20, -20, -21, -22

40, -X, -X, der(12;15)(q10;q10), -16, -17, -20

41, X, -X, -2, -5, -12, -13

41, XX, -3, -9, -13, -15, -22

42, XX, -6, -13, -18, -19

43, XX, -13, -15, +17, -20, -22

44, X, -X, -20

44, XX, -15, -20

45, XX, -12, -15, +17

45, X, -X

45, XX, -15[2]

46, XX, der(12;15)(q10;q10), +16

46, XX, -15, +17[2]

46, XX, -2, -10, -12, +mar1, +mar2, +mar3

46, XX[3]

O cariótipo do caso 9 é o seguinte:

34~46, XX, -X[4], -12[4], der(12;15)(q10;q10)[2], -13[4], -15[9], +17[4], -20[5], -22[3][cp 16]/ 46, XX[3].

Foram identificadas três (15,79%) células normais entre as 19 analisadas, e as outras 16 (84,21%) apresentaram aberrações clonais. Das 28 alterações diferentes detectadas (três nulissomias, 19 monossomias, duas trissomias e quatro alterações estruturais), oito (28,57%) eram clonais: seis monossomias, uma trissomia e uma estrutural. Foram observadas ao todo 59 aberrações distribuídas entre as 16 células, das quais 35 formaram clones.

A tabela 24 ilustra as modificações cariotípicas observadas nestas células tumorais e as figuras 19 e 20 apresentam os cariótipos representativos do caso 9.

Tabela 24 - Alterações cariotípicas do caso 9

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*
NUMÉRICAS		
Clonais		
-22	3	15,79
+17	4	21,05
-X, -12, -13	4	21,05
-20	5	26,32
-15	9	47,37
Não clonais		
-3, -5, -6, -7, -8, -9, +16, -18, -19, -21	1	5,26
-2, -10, -16, -17	2	10,53
ESTRUTURAIS		
Clonais		
der(12;15)(q10;q10)	2	10,53
Não clonais		
mar1, mar2, mar3	1	5,26

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

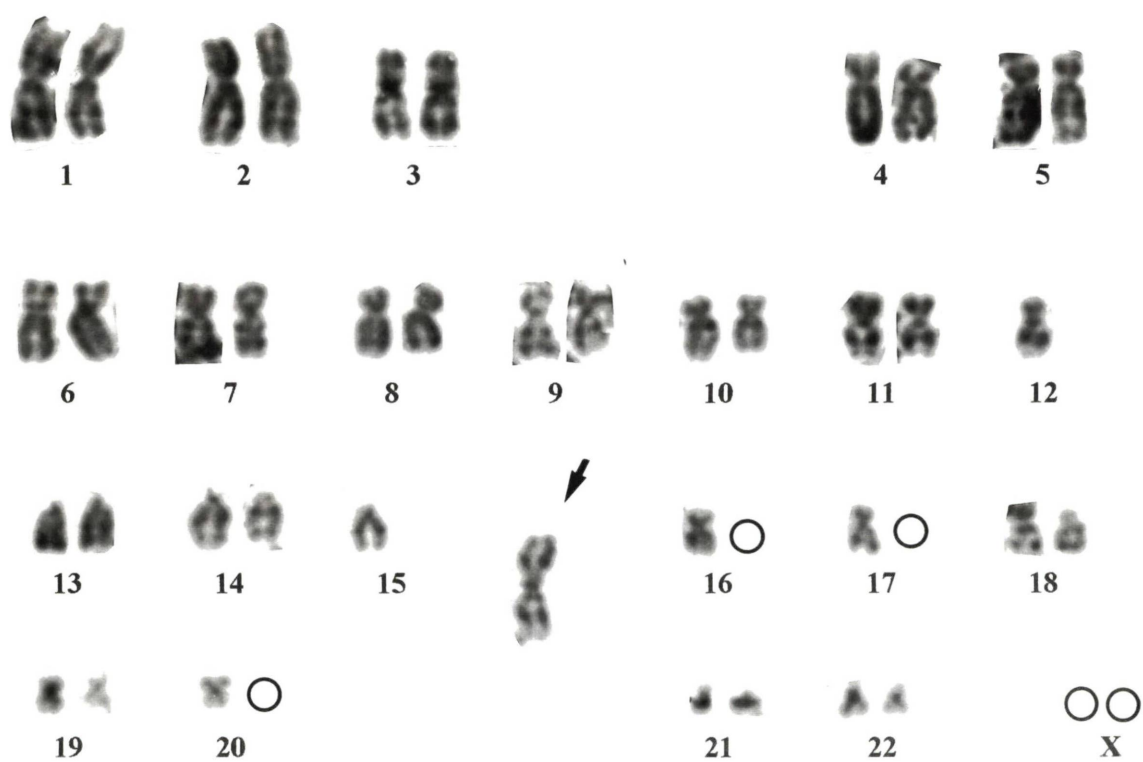


Figura 19 - Cariótipo representativo do caso 9: 40, -X, -X, der(12;15)(q10;q10), -16, -17,-20.

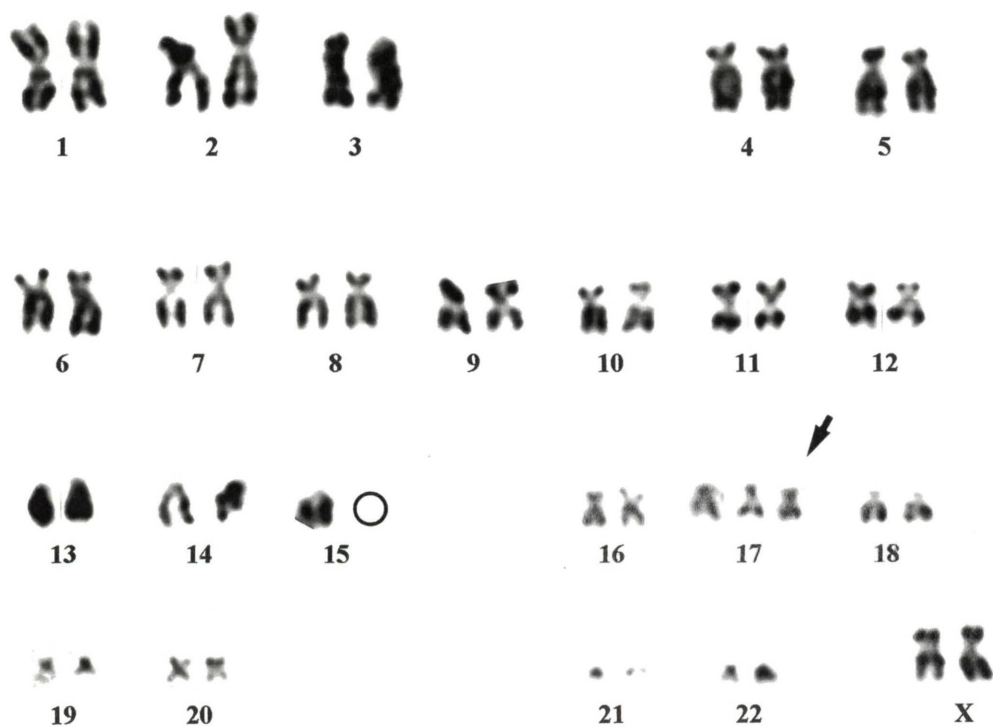


Figura 20 – Cariótipo representativo do caso 9: 46, XX, -15, +17.

Caso 10 - Carcinoma Ductal Invasor

As células deste caso foram sincronizadas e colhidas após 24 (frascos I, II e III) e 45 (frasco IV) dias de cultura. Obteve-se um número cromossômico modal igual a 46 pela contagem de 57 metáfases com coloração convencional. A tabela 25 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 25 - Distribuição do número cromossômico do caso 10

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura				Total	Frequência (%)
	I	II	III	IV		
81-103	6	6	4	4	20	35,09
58-80	1	1	-	-	2	3,51
47	-	1	1	1	3	5,26
46	1	-	13	7	21	36,84
45	-	1	2	4	7	12,28
44	1	1	2	-	4	7,02
Total	9	10	22	16	57	

Foram analisadas 52 metáfases com bandamento GTG. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

42, XX, -11, -17, -21, -21

43, XX, -12, -17, -20

44, XX, -17, -18

45, X, -X, +10, -22

45, XX, -5, +10, -19

45, XX, -6

45, XX, -6, -8, +10

45, XX, +10, -11, -14, -14, +mar3

45, XX, -19[2]

45, XX, -21[2]

46, X, -X, -5, +6, +mar1

46, X, -X, +del(6)(q23)
 46, X, -X, +10[2]
 46, X, -X, +13
 46, XX, +6, -8[2]
 46, XX, +del(6)(q23), -8, -22, +mar3
 46, XX, del(6)(q23), -13, +mar2
 46, XX, del(12)(p12)[3]
 46, XX, -13, +22
 46, XX, -17, +mar1
 46, XX, -18, +mar4
 46, XX, -19, +mar3
 46, XX, -21, +mar2
 46, XX[21]
 47, XX, +10, -21, +mar2
 48, XX, +9, +10, +19

O cariótipo do caso 10 é o seguinte:

42~48, XX, -X[6], +6[3], del(6)(q23)[3], -8[4], +10[8], -17[4], -19[4], -21[5], +mar1[2], +mar2[3], +mar3[3] [cp 25]/ 46, XX, del(12)(p12)[3]/ 46, XX[21].

Analisaram-se 52 células, sendo 21 (40,38%) normais e 31 (59,62%) aberrantes citogeneticamente. Destas, 28 (90,32%) apresentavam alterações clonais e três (9,68%) não clonais. Foram identificadas 27 alterações diferentes (duas nulissomias, 13 monossomias, seis trissomias e seis estruturais), 12 (44,44%) formaram clone: cinco monossomias, duas trissomias e cinco estruturais. Foram detectadas 70 anormalidades distribuídas entre as 31 metáfases, sendo que 48 delas formaram clones.

A tabela 26 apresenta as aberrações cromossômicas detectadas neste caso e a figuras 21 e 22 apresentam os cariótipos representativos do caso 10.

Tabela 26 - Alterações cariotípicas do caso 10

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
+6	3	5,77	I
-8	4	7,69	I, II
-17	4	7,69	I, II, III
-19	4	7,69	II, III, IV
-21	5	9,61	I, III, IV
-X	6	11,54	I, II
+10	8	15,38	I, II, III
Não clonais			
+9, +13, <u>-14-14</u> , +19, +22	1	1,92	II
-12, -20	1	1,92	I
-5, -11	2	3,84	II, III
-6, -13, -18	2	3,84	II
-22	2	3,84	I
ESTRUTURAIS			
Clonais			
mar1	2	3,84	II
del(6)(q23)	3	5,77	II
mar2, mar3	3	5,77	I, II
del(12)(p12)	3	5,77	I, IV
Não clonais			
mar4	1	1,92	II

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

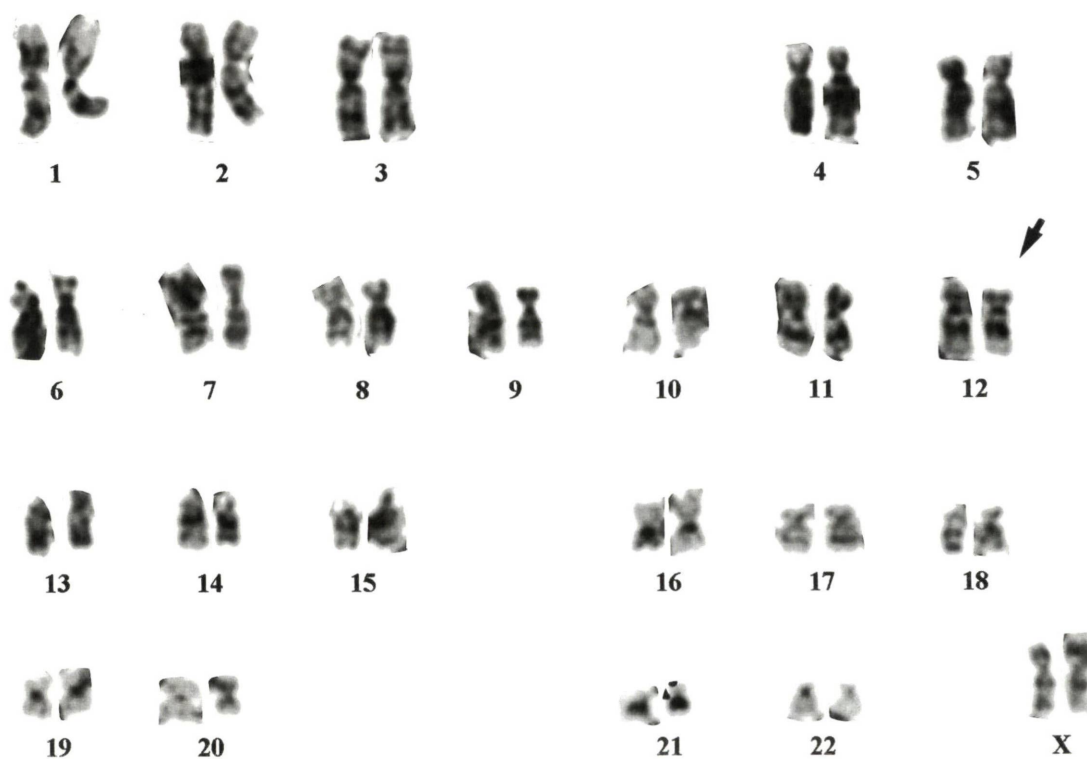


Figura 21 – Cariótipo representativo do caso 10: 46, XX, **del(12)(p12)**

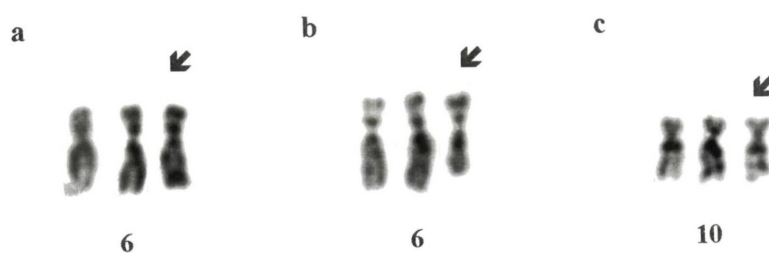


Figura 22 – Cariótipos parciais das células a, b, c demonstrando a trissomia do 6, +del(6)(q23) e trissomia do 10, respectivamente.

Caso 11- Carcinoma Ductal Invasor

As células deste caso permaneceram em cultura por 28 (frasco III), 47 (frasco I) e 52 (frasco V) dias, tendo sido colhidas após sincronização celular. Obteve-se um número modal igual a 46 cromossomos através da contagem de 62 metáfases com coloração convencional. Os resultados estão apresentados na tabela 27.

Tabela 27 - Distribuição do número cromossômico do caso 11

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura			Total	Frequência (%)
	I	III	V		
81-103	1	1	3	5	8,06
58-80	-	-	2	2	3,22
47	3	1	1	5	8,06
46	8	9	9	26	41,93
45	-	-	5	5	8,06
44	-	3	6	9	14,52
43	-	3	-	3	4,84
42	-	3	1	4	6,45
41	-	1	2	3	4,84
Total	12	21	29	62	

A análise citogenética com bandamento GTG foi realizada em 11 células. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

42, XX, -7, -12, -12, -15

43, XX, -13, -15, -19

44, XX, -2, -18

44, XX, -5, -11

44, XX, -6, -6, -8, -8, +17, +21

45, XX, -19

46, XX, -2, +20

46, XX, +20, -22

46, XX[3]

O cariótipo do caso 11 é o seguinte:

46, XX, +20[2]/ 46, XX[3].

Das 11 células analisadas, três (27,27%) eram normais e oito (72,73%) apresentaram alterações cromossômicas, sendo que destas duas (25%) apresentavam alterações clonais e seis (75%) alterações não clonais. Foram observadas 15 alterações diferentes (três nulissomias, três trissomias e nove monossomias), sendo que uma (6,67%) destas formou clone: uma trissomia. Nenhuma alteração estrutural foi observada no caso 5. Foram detectadas 22 anormalidades cariotípicas distribuídas nas oito células anormais, sendo que duas formaram clone.

A tabela 28 mostra as alterações cariotípicas e suas respectivas frequências e a figuras 23 e 24 apresentam os cariótipos representativos do caso 11.

Tabela 28 - Alterações cariotípicas do caso 11

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
+20	2	18,18	III, V
Não clonais			
<u>-6, -6, -8, -8</u>	1	9,09	III
<u>-12, -12</u>	1	9,09	V
-5, -7, -11, -18	1	9,09	V
-13, +17, +21, -22	1	9,09	III
-15, -19	2	18,18	III, V
-2	2	18,18	V

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

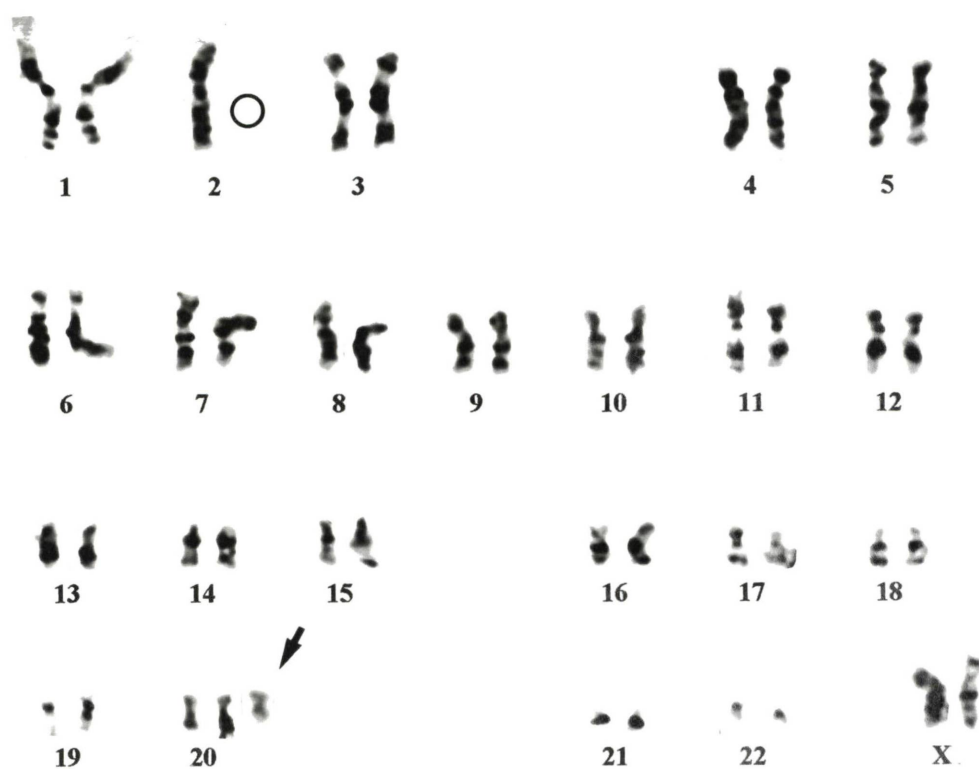


Figura 23 – Cariótipo representativo do caso 11: 46, XX, -2, +20.

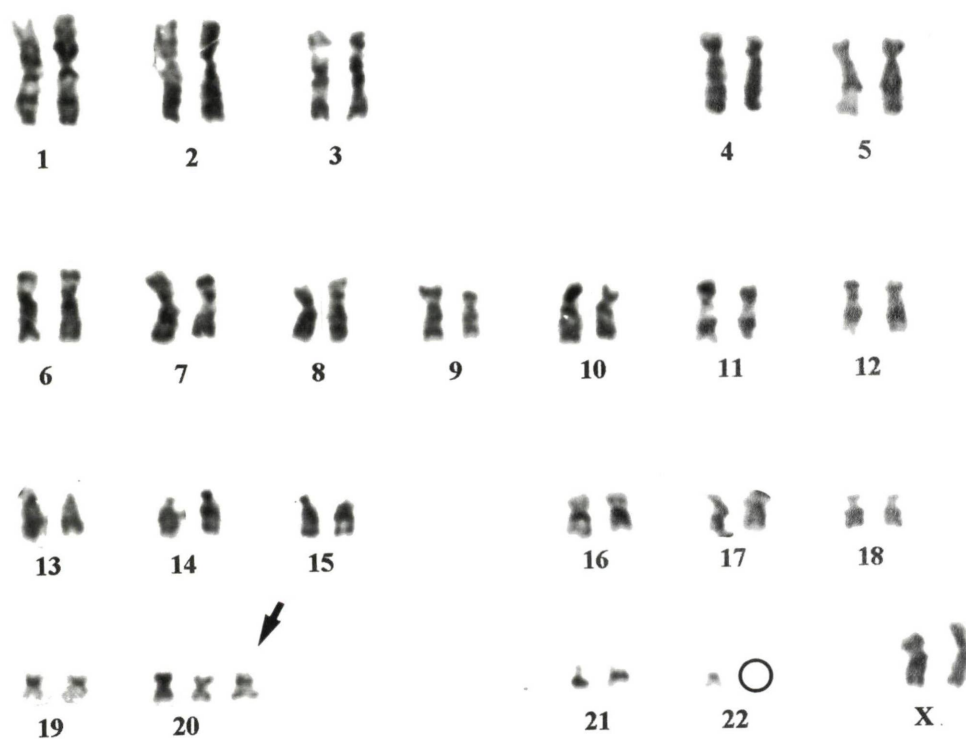


Figura 24 – Cariótipo representativo do caso 11: 46, XX, +20, -22.

Caso 12 - Carcinoma Ductal Invasor

As células deste tumor foram obtidas sem sincronização após 70 (frasco I), 80 (frasco III) e 90 (frasco II) dias em cultura. Obteve-se um número cromossômico modal igual a 46 através da contagem de 73 metáfases com coloração convencional. Os resultados estão apresentados na tabela 29.

Tabela 29 - Distribuição do número cromossômico do caso 12

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura			Total	Frequência (%)
	I	II	III		
81-103	-	3	5	8	10,96
58-80	-	4	1	5	6,85
47	2	-	-	2	2,74
46	14	2	5	21	28,77
45	2	3	1	6	8,22
44	-	2	1	3	4,11
43	1	1	2	4	5,48
42	2	-	1	3	4,11
41	-	1	3	4	5,48
40	-	-	3	3	4,11
39	-	1	1	2	2,74
38	-	-	1	1	1,37
37	1	-	3	4	5,48
36	-	1	-	1	1,37
35	-	1	-	1	1,37
34	-	1	-	1	1,37
33	-	-	2	2	2,74
32	-	-	1	1	1,37
30	-	1	-	1	1,37
Total	22	21	30	73	

A análise citogenética com bandamento GTG foi realizada em 15 células. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

34, X, -X, -3, -6, -8, -9, -9, -10, -11, -13, -15, -17, -19

35, -X, -X, -3, -6, -8, -12, -13, -16, -19, -21, -22

36, XX, -4, -4, -6, -10, -11, -15, -16, -16, -17, -22

39, XX, +1, +2, -6, -7, -11, -11, -13, -13, -14, -15, -15

39, XX, -4, -4, -7, -12, -13, -16, -17

41, XX, -3, -7, -10, -11, -16, -19, +21

42, XX, -4, -15, -21, -22

43, XX, -11, del(17)(p12), -19, -20

44, XX, del(17)(p12), -19, -21

45, XX, -7, del(17)(p12)

45, XX, -22

46, XX, -18, +21

46, XX[3]

O cariótipo do caso 12 é o seguinte:

34~46, XX, -3[3], -4[3], -6[4], -7[4], -10[3], -11[5], -13[4], -15[4], -16[4], -17[3], del(17)(p12)[3], -19[5], -21[3], +21[2], -22[4][cp 12]/ 46, XX[3].

Das 15 células cariotipadas, três (20%) apresentaram cariótipo normal e 12 (80%) possuíam aberrações cromossômicas clonais. Foram observadas 30 alterações diferentes (sete nulissomias, 19 monossomias, três trissomias e uma alteração estrutural), destas, 15 (50%) foram clonais: 13 monossomias, uma trissomia e uma alteração estrutural. Observou-se 74 alterações distribuídas entre as 12 células, sendo que 54 formaram clones.

A tabela 30 apresenta as alterações cariotípicas encontradas no caso 12 e suas respectivas frequências e a figuras 25 e 26 apresentam os cariótipos representativos deste caso.

Tabela 30 - Alterações cariotípicas do caso 12

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
+21	2	13,33	II
-3, -10, -17	3	20,0	II
-4	3	20,0	I, II
-21	3	20,0	I, II, III
-6, -7, -13	4	26,67	II, III
-15	4	26,67	I, II, III
-16	4	26,67	II
-22	4	26,67	I, II
-11, -19	5	33,33	II, III
Não clonais			
-X, <u>-X</u> , <u>-X</u> , <u>-9</u> , <u>-9</u> , -18	1	6,67	II
+1, +2, -14, -20	1	6,67	III
-8, -12	2	13,33	II
ESTRUTURAIS			
Clonais			
del(17)(p12)	3	20	II, III

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

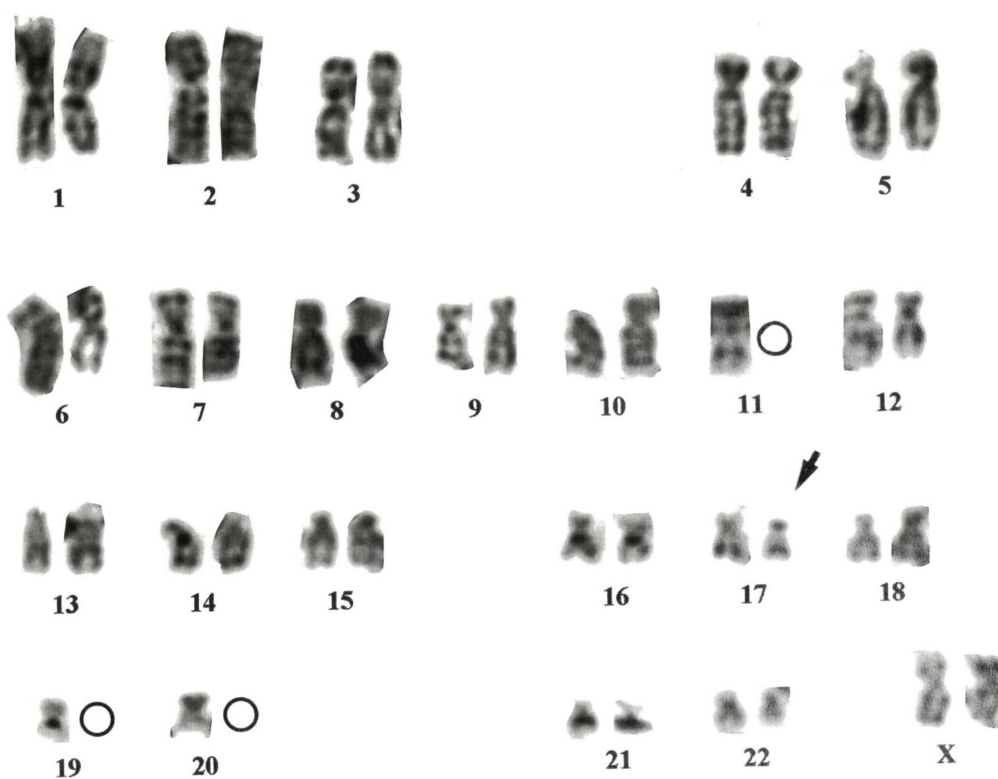


Figura 25 – Cariótipo representativo do caso 12: 43, XX, -11, del(17)(p12), -19, -20.

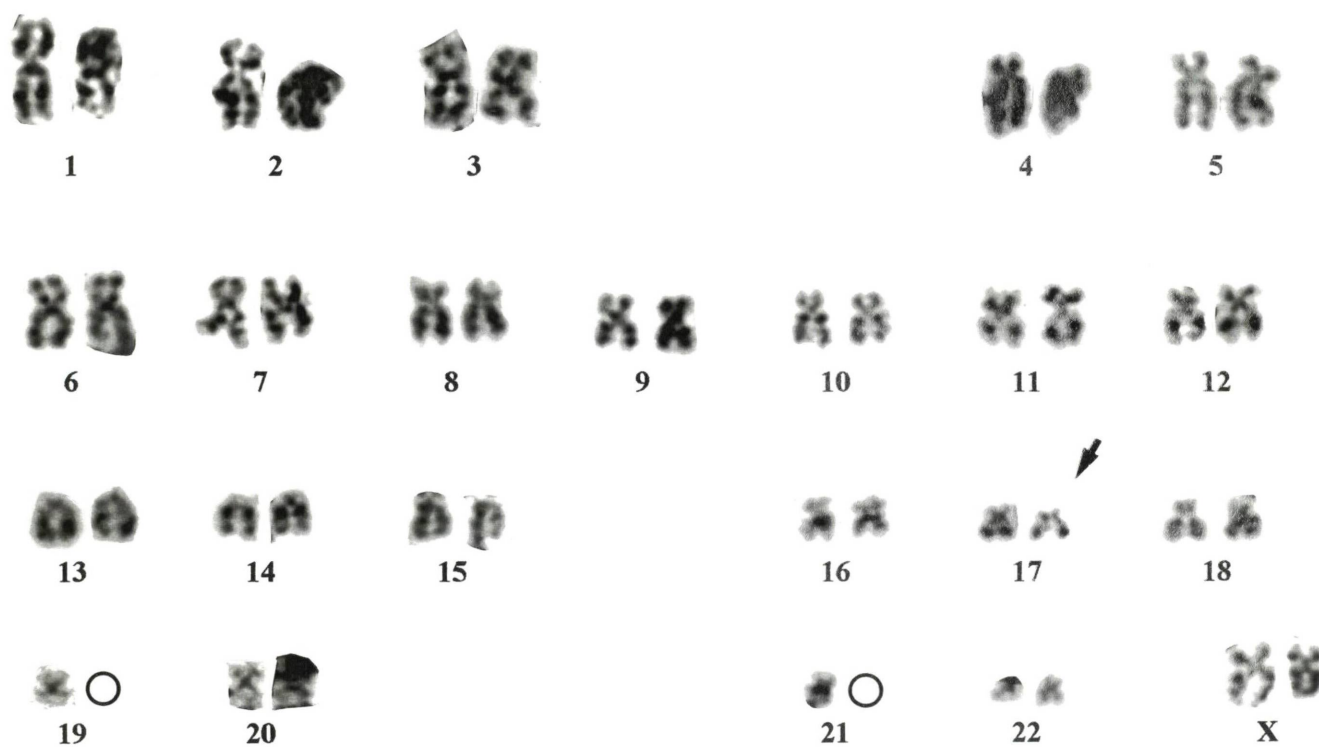


Figura 26 – Cariótipo representativo do caso 12: 44, XX, del(17)(p12), -19, -21.

Caso 13 - Carcinoma Ductal Invasor

As células deste caso foram colhidas após sincronização celular, permanecendo em cultura por 47 dias (frascos IV) e 76 dias (frasco I). Obteve-se um número modal igual a 46 cromossomos pela contagem de 106 metáfases com coloração convencional. A tabela 31 apresenta os dados da distribuição do número cromossômico do caso 13.

Tabela 31 - Distribuição do número cromossômico do caso 13

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura		Total	Frequência (%)
	I	IV		
81-103	6	10	16	15,10
53	2	-	2	1,89
48	-	1	1	0,94
47	2	2	4	3,77
46	18	30	48	45,28
45	2	5	7	6,60
44	2	1	3	2,83
43	6	3	9	8,50
42	2	2	4	3,77
41	-	1	1	0,94
40	8	-	8	7,55
39	1	1	2	1,89
38	1	-	1	0,94
Total	50	56	106	

Foram utilizadas 40 metáfases com bandamento GTG para a análise citogenética. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

38, XX, -7, -11, -13, -14, -17, -18, -21, -22

40, XX, -4, -14, -15, -17, -18, -20

41, XX, -2, -2, -8, -10, +18, -20, -22

41, XX, -4, -9, -13, -14, -19

42, XX, -2, -2, -15, -19
 42, XX, del(1)(q32), -6, -10, -11, -22
 43, XX, -12, -19, -20
 43, XX, -14, -15, -21
 45, XX, +8, -9, -11
 45, XX, -17
 45, XX, -21[2]
 45, XX, -22
 46, XX, -6, +18
 46, X, -X, +8
 46, XX, -15, +18
 46, XX, -17, +18[3]
 46, XX[18]
 47, XX, +8
 47, XX, +mar1
 48, XX, +13, +14

O cariótipo do caso 13 é o seguinte:

38~47, XX, +8[3], -11[3], -14[4], -15[4], -17[6], +18[6], -19[3], -20[3], -21[4], -22[4][cp 20]/ 46, XX[18].

Das 40 células, 18 (45%) apresentaram cariótipo normal e 22 (55%) um cariótipo alterado, destas, 20 (90,91%) com alterações clonais e duas (9,09%) com alterações não clonais. Foram identificadas 25 aberrações diferentes (uma nulissomia, 18 monossomias, quatro trissomias e duas estruturais), 10 (40%) formaram clones: duas trissomias e oito monossomias. Ao todo observou-se 64 alterações distribuídas entre as 22 células, 40 formaram clones.

A tabela 32 apresenta as alterações cariotípicas e as figuras 27 e 28 apresentam os cariótipos representativos do caso 13.

Tabela 32 - Alterações cariotípicas do caso 13

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
+8, -11	3	7,5	IV
-19, -20	3	7,5	I, IV
-14, -22	4	10,0	I, IV
-15, -21	4	10,0	IV
-17	6	15,0	IV
+18	6	15,0	I, IV
Não clonais			
-X, -7, -12, +13, +14	1	2,5	IV
-8	1	2,5	I
<u>-2,-2</u> , -4, -6, -9, -10, -13	2	5,0	I, IV
-18	2	5,0	IV
ESTRUTURAIS			
Não clonais			
del(1)(q32)	1	2,5	IV
mar1	1	2,5	IV

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

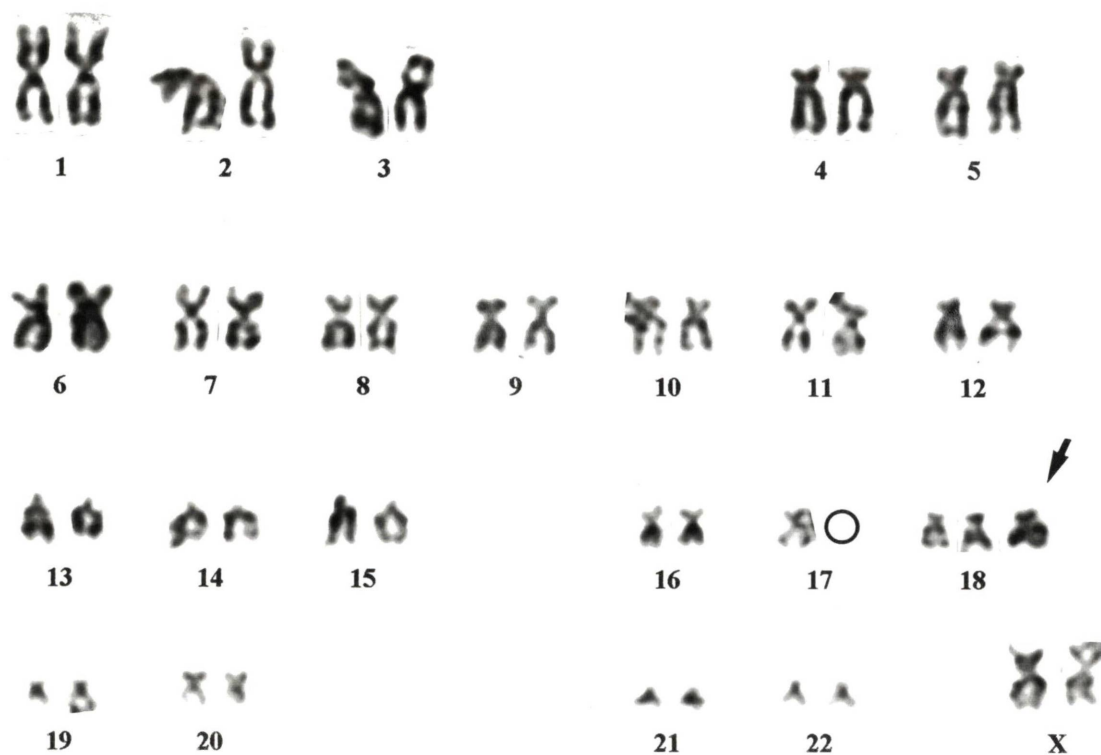


Figura 27 – Cariótipo representativo do caso 13: 46, XX, -17, +18.



Figura 28 – Cariótipo representativo do caso 13: 47, XX, +8.

Caso 14 - Carcinoma Ductal Invasor

As células deste caso foram sincronizadas e colhidas após 16 (frasco I) e 71 (frasco II) dias em cultura. Obteve-se o número cromossômico modal igual a 46 pela contagem de 109 metáfases com coloração convencional. Neste caso há uma alta porcentagem de células com um número cromossômico maior que 46. A tabela 33 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 33 - Distribuição do número cromossômico do caso 14

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura		Total	Frequência (%)
	I	II		
81-103	2	18	20	18,35
58-80	-	10	10	9,17
47	4	8	12	11,01
46	16	13	29	26,61
45	5	7	12	11,01
44	6	5	11	10,09
43	-	5	5	4,59
42	-	1	1	0,92
41	-	3	3	2,75
40	1	1	2	1,84
39	1	-	1	0,92
38	1	2	3	2,75
Total	36	73	109	

Um total de 50 células foram analisadas com bandamento GTG. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

37, XX, +X, -1, -3, -4, -6, -6, -7, -10, -11, -16, -21

37, -X, -X, -3, -5, -12, -17, -18, -19, -21

40, XX, -2, -9, -11, -17, -17, -22

40, XX, -6, -8, -10, -16, -17, -18

41, XX, -3, -3, -11, -21, -22
 41, XX, -5, -14, -16, -17, -19
 42, XX, -8, -13, -17, -17
 43, X, -X, -18, -21
 43, XX, -4, -6, -7
 43, XX, -4, -8, -10
 43, XX, -8, -15, -18
 43, XX, -13, -13, -18
 44, X, -X, -3, -17, +18
 44, XX, -4, -20
 44, XX, -6, -17
 44, XX, -14, -22
 44, XX, -15, -20
 44, XX, -15, -21
 44, XX, -16, -18[2]
 45, X, -X[2]
 45, XX, +X, -17, -21
 45, XX, -15, -17, +18
 45, XX, -17
 45, XX, -20[2]
 46, XX, +X, -7
 46, XX, +X, -8
 46, XX, -8, +18
 46, XX[15]
 47, XX, +X[3]
 47, XX, del(11)(q23), +21
 47, XX, +18

O cariótipo do caso 14 é o seguinte:

37~47, XX, +X[7], -X[5], -3[4], -4[4], -6[4], -7[3], -8[6], -10[3], -11[3], -15[4], -16[5], -17[10], -18[7], +18[4], -20[4], -21[6], -22[3] [cp 34]/ 46, XX[15].

Das 50 células analisadas, 15 (30%) apresentaram um cariótipo normal e 35 (70%) possuíam alterações, das quais 34 (97,14%) com aberrações clonais e 1 (2,86%)

com aberrações que não formaram clone. Foram observadas 32 alterações diferentes (cinco nulissomias, 23 monossomias, três trissomias e uma estrutural), 17 (53,12%) fizeram clones: 15 monossomias e duas trissomias. Observou-se 102 aberrações distribuídas entre as 35 células, sendo que 82 formaram clones.

A tabela 34 apresenta as alterações cariotípicas observadas neste caso e as figuras 29 e 30 apresentam os cariótipos representativos.

Tabela 34 - Alterações cariotípicas do caso 14

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
-7, -11, -22	3	6	I, II
-10	3	6	II
-3, -4, -15, +18, -20	4	8	I, II
-6	4	8	II
-X	5	10	I, II
-16	5	10	II
-8, -21	6	12	I, II
+X, -18	7	14	I, II
-17	10	20	I, II
Não clonais			
-1, -13, +21, <u>-13, -13</u>	1	2	II
-2, -9, -12	1	2	I
-5, -14, -19	2	4	I, II
ESTRUTURAIS			
Não clonais			
del(11)(q23)	1	2	II

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

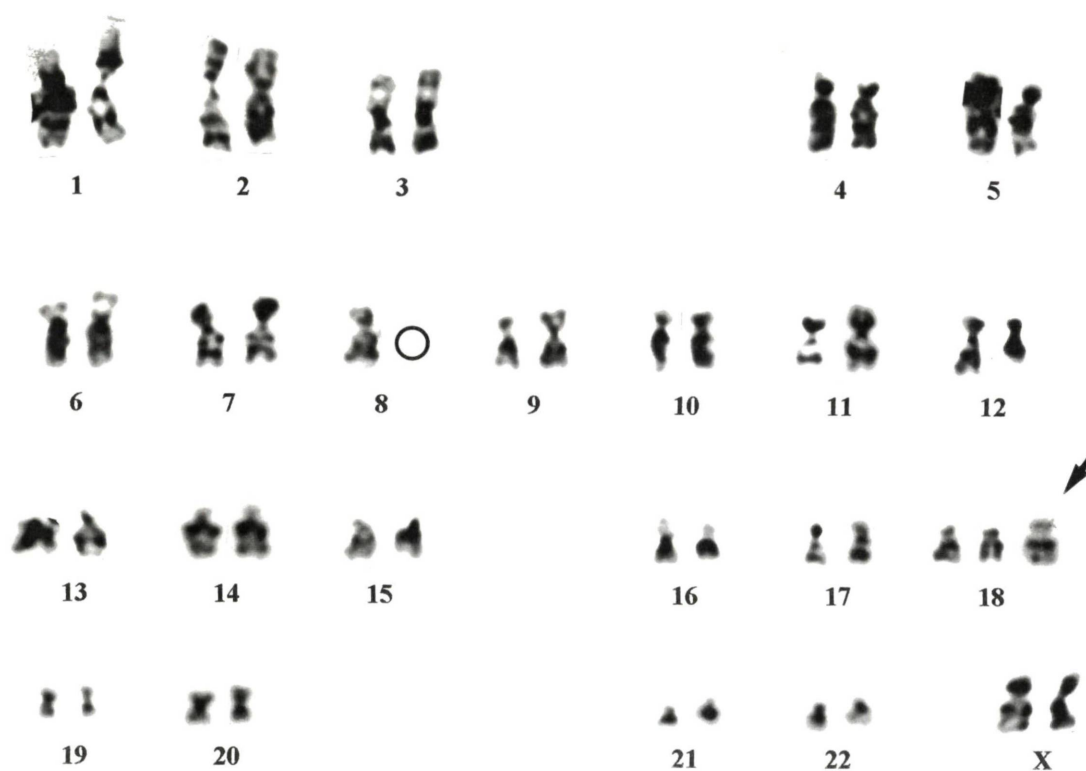


Figura 29 – Cariótipo representativo do caso 14: 46, XX, -8, +18.

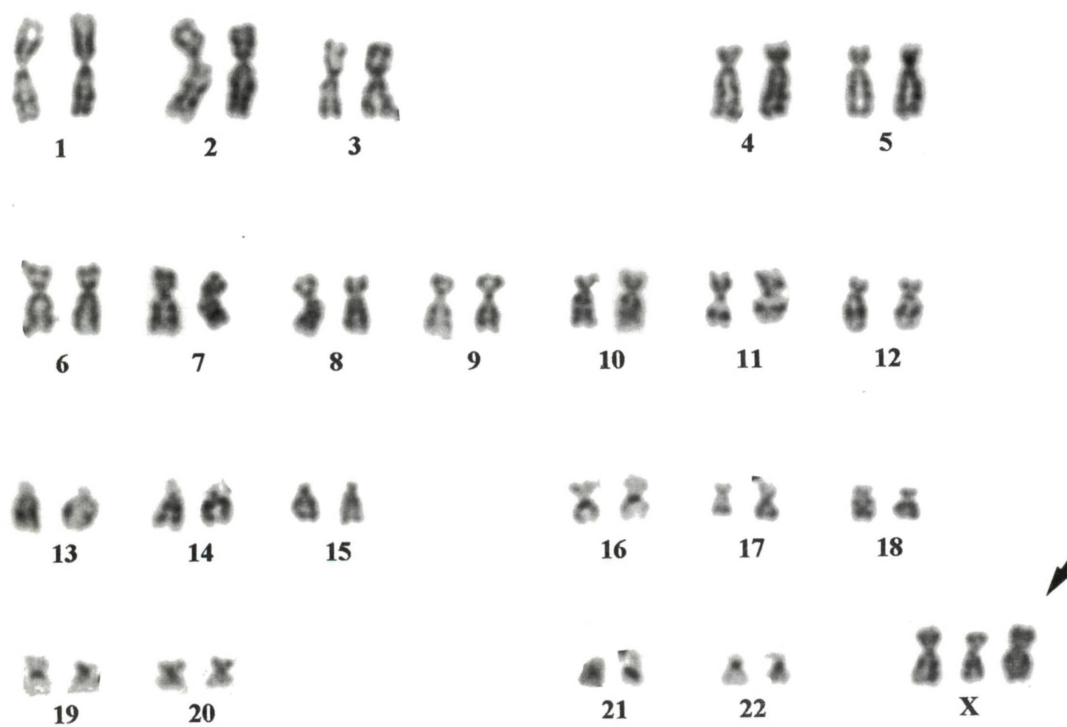


Figura 30 – Cariótipo representativo do caso 14: 47, XX, +X.

Caso 15 - Carcinoma Mamário Metastático

As células deste tumor foram colhidas sem sincronização após 30 (frasco I), 72 (frasco III) e 80 (frasco II) dias em cultura. O número modal igual a 46 cromossomos foi obtido através da contagem de 88 metáfases com coloração convencional. A tabela 35 apresenta a distribuição do número cromossômico observada neste caso.

Tabela 35 - Distribuição do número cromossômico do caso 15

Número de cromossomos	Número de células/frasco de cultura			Total	Frequência (%)
	I	II	III		
81-103	1	8	12	21	23,86
58-80	-	7	3	10	11,36
51	1	-	-	1	1,14
46	3	9	10	22	25,0
45	-	3	4	7	7,95
44	1	3	1	5	5,68
43	-	-	1	1	1,14
42	-	4	2	6	6,82
41	-	1	-	1	1,14
40	-	2	4	6	6,82
39	-	2	2	4	4,55
38	-	1	3	4	4,55
Total	6	40	42	88	

Quarenta metáfases com bandamento GTG foram analisadas. As fórmulas cariotípicas são apresentadas a seguir:

40, XX, -3, -4, -17, -18, -19, -20

42, X, -X, -5, -10, -19

42, XX, -2, del(8)(q23), -15, -16, del(18)(p11), -19

42, XX, -8, -19, -21, -22

43, XX, -7, -9, -11

43, XX, -16, -17, -18

43, XX, -16, -17, -22

44, X, -X, -15

44, XX, -17, -18

45, XX, -4

45, XX, -8

45, XX, -11

45, XX, -12

45, XX, -13

45, XX, -21

45, XX, -22

46, XX, -1, -2, +mar1, +mar2

46, XX, del(8)(q23)[3]

46, XX, del(8)(q23), del(18)(p11)

46, XX[19]

O cariótipo do caso 15 é o seguinte:

40~46, XX, del(8)(q23)[5], -16[3], -17[4], -18[3], del(18)(p11)[2], -19[4], -22[3] [cp 12]/ 46, XX[19].

Das 40 metáfases cariotipadas, 19 (47,5%) eram normais e 21 (52,5%) apresentaram alterações, destas, 12 (57,14%) com alterações clonais e nove (42,86%) com alterações que não formaram clones. Vinte e cinco aberrações diferentes foram detectadas (21 monossomias e quatro estruturais), sete (28%) formaram clone: cinco monossomias e duas estruturais. Foram observadas 49 anormalidades cariotípicas distribuídas entre as 21 metáfases, sendo que 24 delas formaram clones.

A tabela 36 mostra as alterações cariotípicas identificadas e as figuras 31 e 32 apresentam os cariótipos representativos do caso 15.

Tabela 36 - Alterações cariotípicas do caso 15

Alterações cariotípicas	Número de células	Frequência (%)*	Frasco
NUMÉRICAS			
Clonais			
-16, -22	3	7,5	II, III
-18	3	7,5	I, III
-17, -19	4	10,0	I, II, III
Não clonais			
-1, -5, -7, -9, -10, -12	1	2,5	III
-3, -20	1	2,5	I
-13	1	2,5	II
-X, -2, -11, -15	2	5,0	III
-4	2	5,0	I, III
-8, -21	2	5,0	II, III
ESTRUTURAIS			
Clonais			
del(18)(p11)	2	5,0	III
del(8)(q23)	5	12,5	I, II, III
Não clonais			
mar1, mar2	1	2,5	III

*Número de células com aberração sobre o número total de células analisadas multiplicado por 100.

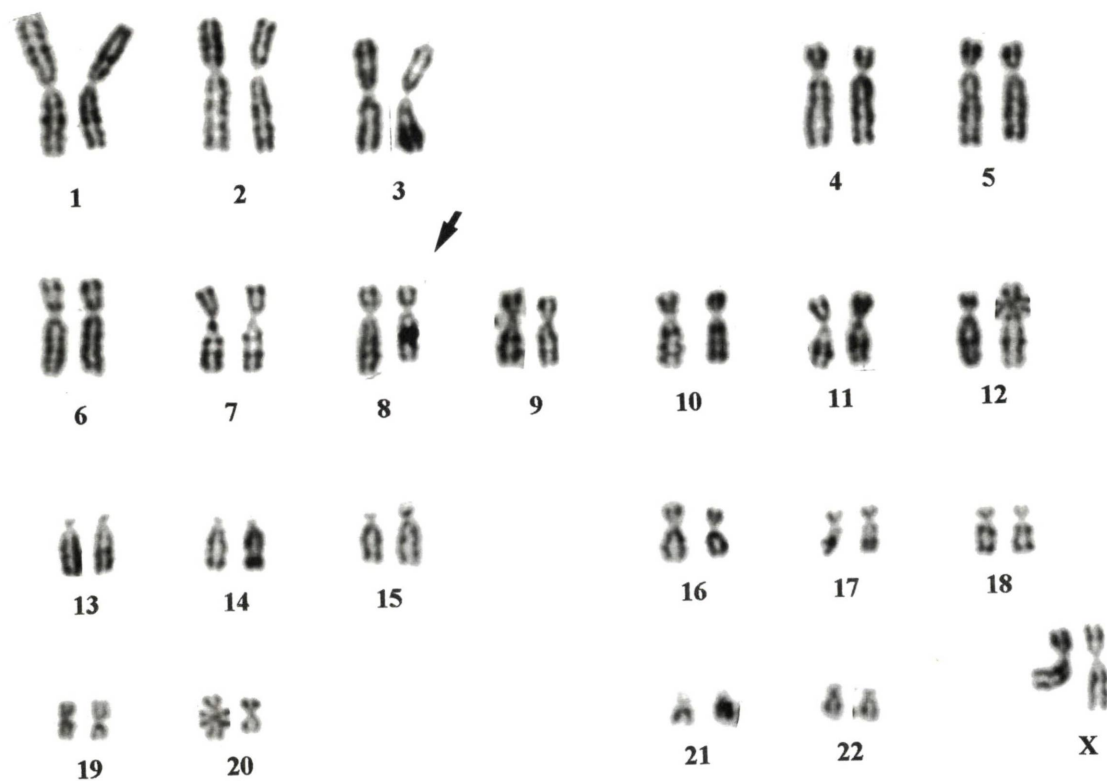


Figura 31 – Cariótipo representativo do caso 15: 46, XX, **del(8)(q23)**.

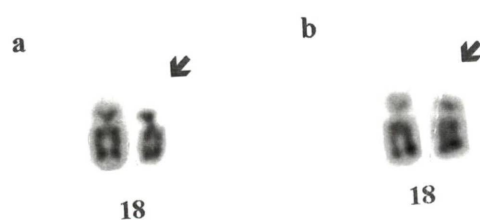


Figura 32 – Cariótipos parciais das células a, b do caso 15 demonstrando a **del(18)(p11)**.

Síntese dos Resultados dos Tumores Malignos da Mama

O número cromossômico modal encontrado nas populações celulares de todos os oito tumores malignos da mama analisados citogeneticamente foi 46.

A análise após bandamento GTG foi realizada em todos os tumores malignos deste trabalho, anormalidades cariotípicas clonais e células com número cromossômico diplóide com presença de aberrações cromossômicas, ou seja células pseudodiplóides, foram observadas em todos os casos. A frequência de células normais variou de 15,79% (caso 9) a 47,5% (caso 15). A tabela 37 apresenta um resumo dos dados clínicos e citogenéticos dos tumores malignos.

A maioria dos casos apresentou várias alterações clonais, somente o caso 11 apresentou um único clone anormal. O caso 10 apresentou clones não relacionados citogeneticamente

As alterações cromossômicas estruturais observadas nos oito tumores malignos estão apresentadas na tabela 38. Não foi detectada nenhuma anomalia estrutural recorrente, sendo que o único cromossomo que se apresentou alterado estruturalmente em mais do que um caso foi o 12, ambas as alterações levando à perda de material em 12p .

As alterações cromossômicas numéricas observadas nos oito tumores malignos estão apresentadas na tabela 39. Alterações cariotípicas numéricas recorrentes foram: -7 em três casos, -10 em três casos, -11 em três casos, -15 em quatro casos, -16 em três casos, -17 em cinco casos, -19 em cinco casos, -20 em três casos, -21 em quatro casos, -22 em cinco casos, - X em três casos. As trissomias envolveram os cromossomos 6, 8, 9, 10, 17, 18, 20, 21 e X, sendo que a única recorrente foi +18 observada em dois casos.

A tabela 40 e a figura 33 apresentam a distribuição das aberrações cromossômicas estruturais e numéricas por cromossomo observadas nos tumores malignos da mama.

Tabela 37- Resumo dos dados clínicos e citogenéticos de oito tumores malignos da mama

Caso	Idade	Estado menopausa	Tamanho tumoral	Grau	Metástase	Sobrevida	Número modal	Células (GTG)	Cariótipo das células com aberração
8	33	Pré	60 mm	-	sem	SRD	46	15	40~46, XX, -7[3], +9[7], -10[3], -19[4][cp11].
9	43	Pré	50 mm	II	sem	?	46	19	34~46, XX, -X[4], -12[4], der(12;15)(q10;q10)[2], -13[4], -15[9], +17[4], -20[5], -22[3] [cp16].
10	61	Pós	40 mm	I	sem	SRD	46	52	42~48, XX, -X[6], +6[3], del(6)(q23)[3], -8[4], +10[8], -17[4], -19[4], -21[5], +mar1[2], +mar2[3], +mar3[3][cp25]/ 46, XX, del(12)(p12)[3].
11	79	Pós	90 mm	II	linfonodo	?	46	11	46,XX,+20[2].
12	49	Pós	80 mm	III	linfonodo	SRD	46	15	34~46, XX, -3[3], -4[3], -6[4], -7[4], -10[3], -11[5], -13[4], -15[4], -16[4], -17[3], del(17)(p12)[3], -19[5], -21[3], +21[2], -22[4] [cp12].
13	48	Pré	60 mm	III	linfonodo	SRD	46	40	38~47, XX, +8[3], -11[3], -14[4], -15[4], -17[6], +18[6], -19[3], -20[3], -21[4], -22[4] [cp20].
14	74	Pós	60 mm	III	linfonodo	óbito	46	50	37~47, XX, +X[7], -X[5], -3[4], -4[4], -6[4], -7[3], -8[6], -10[3], -11[3], -15[4], -16[5], -17[10], -18[7], +18[4], -20[4], -21[6], -22[3][cp34].
15	48	Pré	-	-	ovários	óbito	46	40	40~46, XX, del(8)(q23)[5], -16[3], -17[4], -18[3], del(18)(p11) [2], -19[4], -22[3][cp12].

SRD = Sem Recorrência da Doença.

Tabela 38 – Alterações cromossômicas estruturais clonais observadas em oito tumores malignos da mama

C	Caso 8	Caso 9	Caso 10	Caso 11	Caso 12	Caso 13	Caso 14	Caso 15	T	F(%)
6	-	-	del(6)(q23)[3]	-	-	-	-	-	3	11,54
8	-	-	-	-	-	-	-	del(8)(q23)[5]	5	19,23
12	-	der(12;15)(q10;q10)[2]	del(12)(p12)[3]	-	-	-	-	-	5	19,23
17	-	-	-	-	del(17)(p12)[3]	-	-	-	3	11,54
18	-	-	-	-	-	-	-	del(18)(p11)[2]	2	7,70
mar	-	-	mar1[2]/mar2[3]/ mar3[3]	-	-	-	-	-	8	30,78
T	-	2	14	-	3	-	-	7	26	

C = Cromossomo; T = Total; F = Frequência.

Tabela 39 - Alterações cromossômicas numéricas clonais observadas em oito tumores malignos da mama

C	Caso 8		Caso 9		Caso 10		Caso 11		Caso 12		Caso 13		Caso 14		Caso 15		TP		TG	F(%)
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	4	-	-	-	7	-	7	2,54
4	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	4	-	-	-	7	-	7	2,54
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	3	-	-	4	-	-	-	4	-	-	-	8	3	11	3,99
7	3	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	3	-	-	-	10	-	10	3,62
8	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	3	6	-	-	-	10	3	13	4,71
9	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7	2,54
10	3	-	-	-	-	8	-	-	3	-	-	-	3	-	-	-	9	8	17	6,16
11	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	3	-	3	-	-	-	11	-	11	3,99
12	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4	1,45
13	-	-	4	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	8	-	8	2,90
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	4	-	4	1,45
15	-	-	9	-	-	-	-	-	4	-	4	-	4	-	-	-	21	-	21	7,61
16	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	5	-	3	-	12	-	12	4,35
17	-	-	-	4	4	-	-	-	3	-	6	-	10	-	4	-	27	4	31	11,23
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	7	4	3	-	10	10	20	7,25
19	4	-	-	-	4	-	-	-	5	-	3	-	-	-	4	-	20	-	20	7,25
20	-	-	5	-	-	-	-	2	-	-	3	-	4	-	-	-	12	2	14	5,07
21	-	-	-	-	5	-	-	-	3	2	4	-	6	-	-	-	18	2	20	7,25
22	-	-	3	-	-	-	-	-	4	-	4	-	3	-	3	-	17	-	17	6,16
X	-	-	4	-	6	-	-	-	-	-	-	-	5	7	-	-	15	7	22	7,97
TP	10	7	29	4	23	11	-	2	49	2	31	9	71	11	17	-	230	46	-	-
TG	17		33		34		2		51		40		82		17		276		276	

C = Cromossomo; M = Monossomia; T = Trissomia; TP = Total Parcial; TG= Total Geral; F = Frequência.

Tabela 40 – Aberrações cromossômicas numéricas e estruturais clonais observadas nos tumores malignos da mama

Cromossomo	Numéricas		Estruturais	Total	Frequência (%)
	M	T			
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	7	-	-	7	2,38
4	7	-	-	7	2,38
5	-	-	-	-	-
6	8	3	3	14	4,76
7	10	-	-	10	3,40
8	10	3	5	18	6,12
9	-	7	-	7	2,38
10	9	8	-	17	5,78
11	11	-	-	11	3,74
12	4	-	5	9	3,06
13	8	-	-	8	2,72
14	4	-	-	4	1,36
15	21	-	-	21	7,14
16	12	-	-	12	4,08
17	27	4	3	34	11,56
18	10	10	2	22	7,48
19	20	-	-	20	6,80
20	12	2	-	14	4,76
21	18	2	-	20	6,80
22	17	-	-	17	5,78
X	15	7	-	22	7,48
Total Parcial	230	46	18	294	
Total	276		18	294	

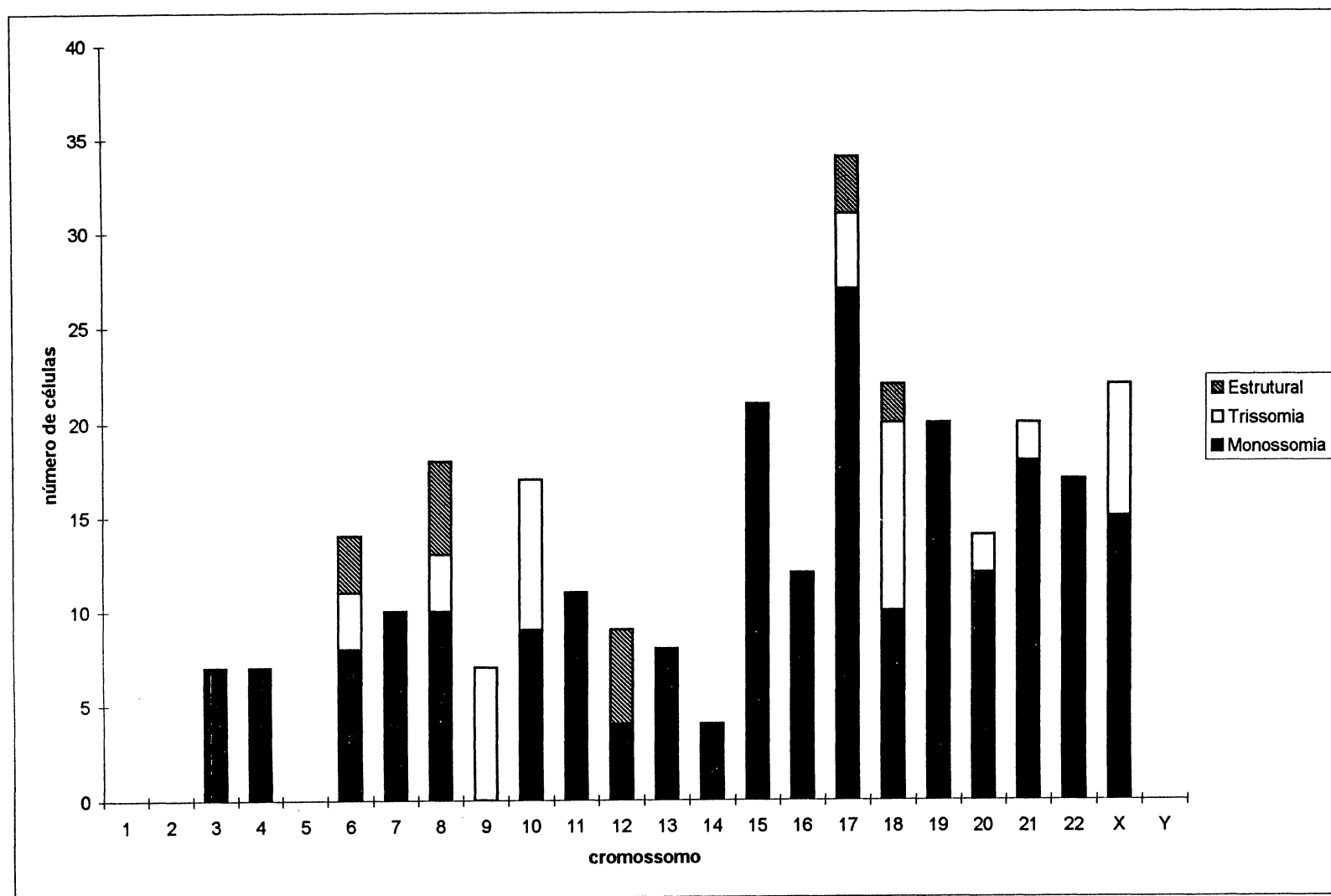


Figura 33 - Distribuição por cromossomo das alterações cromossômicas clonais observadas nos tumores malignos da mama.

V. DISCUSSÃO

1 – Graus de ploidia nas lesões benignas e malignas da mama.

Nos sete tumores benignos analisados, foram contados os cromossomos de 416 metáfases em coloração convencional. O número de células analisadas variou de 32 (caso 2) a 80 (caso 3) com uma média de $59,43 \pm 14,13$ células contadas por tumor. Das 416 células analisadas, 236 (56,73%) apresentaram 46 cromossomos, com frequências entre 32,81% (caso 4) a 78,33% (caso 6), 168 (40,38%) células apresentaram número cromossômico próximo ao diplóide (35-57 cromossomos), com frequências variando de 21,67% (caso 6) a 59,38% (caso 2). Entre as células com número cromossômico próximo ao diplóide, as hipodiplóides (149) foram mais frequentes (88,69%) do que as hiperdiplóides (19 = 11,31%). As células com número cromossômico próximo ao haplóide (≤ 34), 2 = 0,48%, próximo ao triploide (58-80 cromossomos), 4 = 0,96% e próximo ao tetraploide (81-103 cromossomos), 6 = 1,44%, totalizaram 2,88% (12 células) das 416 estudadas.

Nos sete tumores benignos, 200 células foram analisadas pelo emprego do bandamento GTG. O número de células analisadas variou de 12 (caso 2) a 40 (caso 7) com uma média de $28,57 \pm 10,69$ células estudadas por tumor. Das 200 células, 87 (43,50%) eram normais com frequências entre 8,33% (caso 2) e 73,33% (caso 6), 40 (20%) pseudodiplóides com frequências entre 12,50% (caso 7) e 29,41% (caso 5); 71 (35,5%) apresentaram número cromossômico próximo ao diplóide, com frequências entre 0,0% (caso 6) e 66,67% (caso 2), das quais 66 (92,96%) eram hipodiplóides e cinco (7,04%) hiperdiplóides. Uma célula (0,5%) apresentou 33 cromossomos e uma célula (0,5%) apresentou 91 cromossomos.

Comparando os dados obtidos nas células estudadas sem e com o bandamento GTG, verifica-se que nas primeiras, 56,73% eram diplóides, enquanto que com o bandamento a frequência baixou para 43,5%, considerando-se as diplóides normais. Como era esperado, esta diferença deve-se, principalmente, à inclusão na contagem de células sem bandamento de células pseudodiplóides não identificáveis nesta análise. Informações semelhantes foram obtidas por Cavalli (1994). As frequências de células com número cromossômico próximo ao diplóide e diferentes do diplóide não contribuíram de forma importante para as diferenças observadas nos dois tipos de análises.

Considerando-se as médias das frequências obtidas nas análises com e sem bandamento, os nossos dados apresentaram-se na mesma direção daqueles obtidos por Cavalli (1994) que utilizou a mesma metodologia. Obteve-se, respectivamente, para as células com 46 cromossomos 50,1% e 43%, próximas ao diplóide 37,94% e 43% (hipodiplóides 91,8% e 81%; hiperdiplóides 9,17% e 19%), com graus de ploidia diferentes dos acima citados (próximo ao haplóide, ao triploide e ao tetraploide) 2% e 4,5%. As frequências de células pseudodiplóides, observadas com bandamento, foram iguais a 20% neste trabalho e 19,5% no trabalho de Cavalli (1994).

Em cinco das sete lesões benignas analisadas, o número cromossômico modal foi igual a 46 cromossomos e em dois (casos 2 e 4) foi igual ao próximo ao diplóide (35-57 cromossomos), tanto na análise sem como com bandamento. As hipodiplóides foram mais frequentes do que as hiperdiplóides. Estes dados estão de acordo com os descritos na literatura.

Os dados citogenéticos sobre fibroadenomas descritos em 12 trabalhos (Zhang *et al.*, 1989; Calabrese *et al.*, 1991; Fletcher *et al.*, 1991; Stephenson *et al.*, 1992; Belda *et al.*, 1993; Leuschner *et al.*, 1994; Ozisik *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1995; Rohen *et al.*, 1996; Staats *et al.*, 1996; Petersson *et al.*, 1997; Dal Cin *et al.*, 1998) foram analisados em conjunto neste trabalho. Um total de 173 casos foram estudados citogeneticamente, 136 não apresentaram alterações cromossômicas clonais e 37 apresentaram. Destes 37, oito apresentaram um maior número de células pseudodiplóides, seis hiperdiplóides, um hipodiplóide, e 22 apresentaram uma frequência maior de células normais (46,XX) com os clones anormais sendo pseudodiplóides (15 casos), hiperdiplóides (seis casos) e hipodiplóides (um caso).

Observou-se que através da análise citogenética é comum os fibroadenomas apresentarem um grau diplóide normal ou pseudodiplóide, como aconteceu com os casos apresentados nesta dissertação. Além disso, uma porcentagem muito baixa de células poliplóides é detectada nos tumores benignos da mama, o que está de acordo com o baixo número de células com grau de ploidia alto observado no presente trabalho. A frequência de fibroadenomas hipodiplóides foi muito baixa (dois dos 37 casos = 5,41%) em relação àquela encontrada na nossa análise (um dos quatro casos = 25%).

A mesma análise conjunta obtida em relação aos fibroadenomas foi realizada em oito artigos sobre doença fibrocística da mama (Rohen *et al.*, 1993; Bullerdiel *et al.*, 1993; Petersson *et al.*, 1994; Dietrich *et al.*, 1995; Dal Cin *et al.*, 1996; Burbano *et al.*, 1996a; Staats *et al.*, 1998; Petersson-Lundin *et al.*, 1998a). Um total de 122 casos foram

estudados citogeneticamente, 94 não apresentaram alterações cromossômicas clonais e 28 apresentaram. Destes 28, três apresentaram um maior número de células pseudodiplóides, um hiperdiploides, um tetraploides, e 23 apresentaram uma preponderância de células normais (46,XX) com os clones anormais sendo pseudodiploides (13 casos), hiperdiploides (5 casos) e hipodiploides (5 casos). Portanto a hipodiploidia apresentada pela maioria das células do caso 2 do presente trabalho, também foi observada em outros casos descritos e pode caracterizar citogeneticamente um pequeno grupo de alterações benignas que são classificadas como doença fibrocística. No entanto, uma maior quantidade de casos precisa ser analisada para se poder chegar a uma conclusão precisa sobre o significado do grau de ploidia nestas doenças benignas da mama.

Através de estudos genético-moleculares também se observa a importância das aneuploidias em doenças proliferativas benignas da mama (Dhingra *et al.*, 1992; Micale *et al.*, 1994; Sneige *et al.*, 1996). Sneige *et al.* (1996) afirmaram que aneuploidia cromossômica significativa pode ser detectada em epitélio da mama não proliferativo ou com hiperplasia atípica, em pacientes que tenham um alto risco para o desenvolvimento de carcinoma invasivo subsequente. Também, a importância das aneuploidias em doença proliferativa da mama foi enfatizada pelo estudo de Micale *et al.* (1994) que as encontrou restritas a lesões proliferativas ou malignas da mama, enquanto que nos tecidos normais correspondentes o complemento cromossômico era normal.

Nos oito tumores malignos estudados foram analisados, utilizando-se coloração convencional, os cromossomos de 598 metáfases. O número de células analisadas variou de 51 (caso 8) a 109 (caso 14), com uma média de $74,75 \pm 23,57$ células contadas por tumor. Das 598 metáfases, 227 (38%) apresentaram um número cromossômico diplóide, com frequências que variaram de 25% (caso 15) a 63,46% (caso 9). Duzentos e quarenta e três metáfases (40,64%) apresentaram um número cromossômico próximo ao diplóide (35-57 cromossomos) variando de 24,56% (caso 10) a 47% (caso 8). Destas, 209 (86%) eram hipodiploides e 34 (14%) hiperdiploides. Sete células (1,2%) eram próximas ao haplóide (≤ 34 cromossomos), 29 (4,8%) apresentaram um número cromossômico próximo ao triploide (58-80 cromossomos), 90 (15,1%) eram próximas ao tetraploide (81-103 cromossomos) e duas (0,3%) foram designadas como poliploides.

Nestes oito tumores malignos, 242 células foram analisadas pelo bandamento GTG, com uma média de $30,25 \pm 16,97$ células por tumor, variando de 11 (caso 11) a 52 (caso 10) células. Das 242, 85 (35,12%) eram normais, com frequências que variaram

de 15,78% (caso 9) a 47,5% (caso 15), 44 (18,18%) eram pseudodiplóides, variando de 6% (caso 14) a 40% (caso 8), 111 (45,87%) apresentaram um número cromossômico próximo ao diplóide com frequências variando de 26,92% (caso 10) a 66,67% (caso 12). Destas, 101 (90,99%) eram hipodiplóides e 10 (9,01%) hiperdiplóides. Duas células (0,8%) apresentaram um número cromossômico próximo ao haplóide.

As diferenças entre as frequências de células diplóides normais e próximas ao diplóide não foram importantes nas análises sem e com bandamento GTG, sendo importante, no entanto, a ausência de células com números cromossômicos próximo ao triplóide e ao tetraplóide na análise com bandamento que chegaram a cerca de 20% das células analisadas sem o bandamento. Na análise com bandamento GTG foram observadas várias metáfases poliplóides, principalmente nos casos 10, 13, 14 e 15, porém a qualidade de tais metáfases não permitiu uma análise completa e por esta razão as mesmas não foram incluídas na amostra.

Como aconteceu nas comparações entre as lesões benignas, as médias das frequências das células com diferentes graus de ploidia obtidos com e sem bandamento nos tumores malignos estudados neste trabalho apresentaram-se na mesma direção daqueles obtidos por Cavalli (1994) que utilizou a mesma metodologia. Obteve-se, respectivamente, para as células com 46 cromossomos 36,56% e 45,50%, próximas ao diplóide 43,26% e 42,50% (hipodiplóides 88,50% e 68,5%; hiperdiplóides 11,05% e 31,5%), com graus de ploidia diferentes dos acima citados (próximo ao haplóide, ao triplóide e ao tetraplóide) 4,4% e 2,4%. As frequências de células pseudodiplóides, observadas com bandamento neste trabalho e no de Cavalli (1994) foram, respectivamente iguais a 18,18% e 16%.

Na análise sem o bandamento, o número cromossômico modal foi igual a 46 cromossomos em quatro tumores (casos 8, 9, 10 e 13) e nos quatro restantes (casos 11, 12, 14 e 15) o número modal foi o próximo ao diplóide (35-57 cromossomos). As hipodiploidias foram mais frequentes do que as hiperdiploidias. Já na análise com bandamento, o número modal foi igual a 46 em três tumores (casos 10, 13 e 15), e quatro (casos 9, 11, 12 e 14) apresentaram um número modal próximo ao diplóide (35-57 cromossomos), sendo as hipodiplóides mais frequentes do que as hiperdiplóides. Em um tumor (caso 8) prevaleceram tanto as células pseudodiplóides como hipodiplóides.

Estudos que pretendem avaliar a ploidia de células cancerosas normalmente utilizam a citometria de fluxo (CF). Segundo Bièche & Lidereau (1995), este método consiste em se realizar a coloração do núcleo com um corante DNA específico, e então

se mede o conteúdo de DNA, que é proporcional à fluorescência emitida pelas células. Os resultados são expressos na forma de um histograma e revelam a distribuição das células no ciclo celular (fases G0/G1, S, G2M) e a presença ou ausência de uma população aneuplóide. A capacidade de detectar uma população aneuplóide depende do grau de alteração genômica (Cornelisse *et al.*, 1992). O câncer de mama é um dos tumores sólidos mais extensivamente estudados usando CF, sendo que, em torno de 60-80% dos casos mostram evidência clara de um índice de DNA aneuplóide (Deville & Cornelisse, 1994). O mais frequentemente observado é um conteúdo de DNA hipotetraplóide; tumores próximo ao diplóide, triploide, tetraplóide e hipertetraplóide constituem 5 a 15% dos cânceres de mama aneuplóides, sendo que um tipo pouco frequente de conteúdo de DNA não diplóide é o hipodiplóide, presente em 2% dos casos (Tanner *et al.*, 1998) e observado através da análise citogenética em alguns carcinomas do presente trabalho.

Steinarsdóttir *et al.* (1997) compararam os resultados sobre ploidia obtidos em 70 casos de câncer de mama analisados por citogenética e CF. A CF detectou aneuploidia em 60% dos casos, mas considerou normal a maioria dos clones citogeneticamente próximos ao diplóide e clones com aberrações simples. A citogenética revelou alterações cromossômicas em 50% das amostras, alterações simples e poliploidia foram detectadas por este método, porém clones com um alto índice de DNA detectados por CF, não foram detectados pela citogenética. Os dados em conjunto demonstraram que 74% da amostra era aneuplóide. Os autores ainda enfatizaram que técnicas de CF possuem limitações em detectar hipodiploidia em tecidos arquivados, como os utilizados por eles. Portanto alguns tumores que por CF foram considerados hiperdiplóides, poderiam ser hipodiplóides. Com essas conclusões percebemos que deve-se ter cautela ao interpretar os resultados obtidos pelos diferentes métodos.

Baseado num estudo comparativo de citometria de fluxo e citogenética, levando-se em conta a ploidia dos carcinomas mamários, Dutrillaux *et al.* (1991) sugeriram um esquema de evolução cariotípica: 1) alterações estruturais não balanceadas e perdas de cromossomos inteiros seriam as primeiras alterações genéticas da evolução do câncer de mama, fazendo com que o número cromossômico e o conteúdo de DNA diminuíssem, originando um clone celular hipodiplóide (o número cromossômico podendo chegar a 35) transitório; 2) o número cromossômico baixo com altas taxas de cromossomos rearranjados aumenta a probabilidade de que endorreduplicação forme clones

poliplóides. Em alguns casos, não há aparentemente forte vantagem seletiva dos clones poliplóides formados e a progressão tumoral continua no nível hipodiplóide; 3) freqüentemente, os clones endorreduplicados tendem a tomar o lugar das células próximas ao diplóide e os tumores tornam-se homogeneamente poliplóides; 4) cromossomos inteiros são perdidos nas células poliplóides, diminuindo o número cromossômico até chegar em torno de 52 cromossomos nos estágios mais avançados; 5) finalmente, alguns tumores poderiam passar ainda por uma segunda endorreduplicação, tornando-se tetraplóides.

Portanto, baseando-se na sugestão de Dutrillaux *et al.* (1991) e considerando-se os resultados sobre o grau de ploidia obtidos com coloração convencional nos tumores malignos analisados neste trabalho, poder-se-ia supor que os casos 8, 9, 10 e 13 (todos no grau diplóide) estariam nos estágios iniciais da evolução tumoral. Esta suposição ganha força quando se observa que os casos 8, 9 e 10 foram os únicos que não apresentaram metástases nos linfonodos e eram de baixo grau histológico (ver tabela 37 dos resultados). Além disso, os casos 11, 12, 14 e 15 apresentaram metástases em linfonodos, um grau histológico e/ou tamanho tumoral maior do que os dos casos 8, 9 e 10, um grau de ploidia entre 35-57 cromossomos e também a presença de células com número cromossômico superior a 57, indicando um estágio geneticamente mais avançado. É interessante notar que dentre estes quatro casos, aquele que apresentou uma menor freqüência de células poliplóides (11,30% no caso 11) foi o de menor grau histológico, e os dois que apresentaram as freqüências mais altas destas células (27,52% no caso 14 e 35,23% no 15) foram retirados das duas únicas pacientes que foram a óbito; isto está parcialmente de acordo com a análise de correlação entre características cariotípicas e histopatológicas em 125 casos de câncer de mama realizada por Pandis *et al.* (1996), que demonstrou que o número modal esteve positivamente correlacionado com o grau do tumor, atividade mitótica e idade do paciente, sendo que a presença de um grau poliplóide somente foi observado em tumores de grau III.

Dos oito casos analisados, o nº 10 (tumor de grau I, de tamanho pequeno e sem metástases em linfonodos) apresentou a maior freqüência de células com grau de ploidia próximo ao tetraplóide e maior número de aberrações estruturais. O fato deste tumor ter apresentado muitas células tetraplóides e ter um número maior de alterações estruturais poderia estar de acordo com o estudo de Cornelisse *et al.* (1992) que observaram um desequilíbrio alélico mais alto em tumores hipotetraplóides, sugerindo que tetraploidização de um precursor próximo ao diplóide seguido por perda cromossômica

está associada a um aumento nas aberrações cromossômicas estruturais na população tumoral. A correlação positiva entre tetraploidização e um aumento de aberrações estruturais tem sido independentemente determinada por análise citogenética (Dutrillaux *et al.*, 1991).

Neste trabalho o número cromossômico modal foi obtido por duas metodologias diferentes (coloração convencional e bandamento GTG). Analisando-se os dados da literatura, observa-se que a maioria dos estudos citogenéticos a partir de 1990 utilizou somente metáfases com bandamento G ou R para a obtenção do grau de ploidia (Dutrillaux *et al.*, 1990; Geleick *et al.*, 1990; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Ferti-Passantonopoulou *et al.*, 1991; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, 1996, 1998; Lu *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1995, 1996a; Adeyinka *et al.*, 1996, 1998), com poucos trabalhos utilizando também a análise com coloração convencional (Hainsworth *et al.*, 1991; Burbano *et al.*, 1996b) e outros que nem citam a questão da ploidia (Bullerdiek *et al.*, 1993, 1994; Pandis *et al.*, 1993b, 1994b, 1995a, 1995b; Teixeira *et al.*, 1994, 1997; Rohen *et al.*, 1995b; Adeyinka *et al.*, 1997; Cavalli *et al.*, 1997; Bernardino *et al.*, 1998). Porém, na análise dos oito carcinomas apresentada aqui, o emprego de ambas as metodologias foi de extrema importância, pois os resultados se complementaram, principalmente no que diz respeito às frequências de células poliplóides, desconsideradas na análise com bandamento. As células normais (46,XX) mesmo quando presentes em maior frequência não foram consideradas para a obtenção do grau de ploidia na maioria dos casos da literatura citados acima, quando utilizamos este procedimento nas células bandadas, pudemos complementar os resultados obtidos pela coloração convencional e percebemos um maior número de casos num grau diferente do diplóide normal.

No trabalho de Adeyinka *et al.* (1998) foi citado que de 371 casos citogeneticamente anormais publicados de câncer de mama primário não selecionados (Dutrillaux *et al.*, 1990; Geleick *et al.*, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a,b, 1995a; Lu *et al.*, 1993; Rohen *et al.*, 1993,1995b; Thompson *et al.*, 1993; Bullerdiek *et al.*, 1994; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1997; e dados não publicados por Adeyinka *et al.*): 141 (38%) apresentavam cariótipos complexos, ou seja, número cromossômico >57 ou mais do que três alterações numéricas e/ou estruturais (estes podendo ter um número cromossômico <57), sendo que clones com somente alterações numéricas derivadas de um cariótipo composto não foram considerados complexos; e 67 (18%) apresentaram clones

próximos ao triploide. A partir destes dados pode-se concluir que em torno de 43,94% (163 casos) dos casos analisados citogeneticamente se encontram num grau próximo ao diplóide e contêm cariótipos simples, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Carcinomas com um número cromossômico próximo ao diplóide foram descritos por vários pesquisadores, sendo que Teixeira *et al.* (1996a) afirmaram que com o método descrito por Pandis *et al.* (1992a), somente 20% dos cânceres de mama cariotipicamente anormais contêm clones altamente complexos que não são próximos ao diplóide, mesmo quando uma análise detalhada de múltiplas amostras do tumor é realizada. Segundo Teixeira *et al.* (1996a), um estudo de citometria de fluxo indicou que em torno de 50% de todos os carcinomas da mama têm histogramas de DNA diplóides (Wenger *et al.*, 1993; cf. Teixeira *et al.*, 1996a), portanto, os dados combinados indicaram que enquanto alguns neoplasmas mostram grande divergência genética durante a progressão tumoral outros permanecem geneticamente estáveis através dela, ou podem, de fato, tornar-se menos diversos quando a doença está muito avançada (Heim *et al.*, 1988). Para se obter informações mais consistentes de como estas suposições se aplicam ao câncer de mama necessita-se de um monitoramento longitudinal do processo neoplásico com múltiplas amostragens no decorrer do tempo, o que raramente é possível (Teixeira *et al.*, 1996a).

A conclusão de que os clones próximos ao diplóide ou pseudodiplóides realmente têm um potencial maligno ganha credibilidade com as descobertas de tais clones em lesões metastáticas, que também foram encontrados nos tumores primários de onde as metástases se originaram (Pandis *et al.*, 1994b, 1998; Teixeira *et al.*, 1996a). O tumor de mama metastático (caso 15) apresentado nesta dissertação apresentou uma grande porcentagem de células próximas ao diplóide, apesar de não termos analisado o tumor primário, podemos também ressaltar o potencial maligno destas células, utilizando este exemplo. Outras metástases mamárias cujos tumores primários não foram analisados ou não houve concordância entre primário e secundário, analisadas por Adeyinka *et al.* (1996) e por Gerbault-Seureau (1987) respectivamente, também apresentaram um baixo grau de ploidia, pseudodiploidia foi encontrada em ambos os casos. Além disso, estudos de CF mostraram que metástases em linfonodos podem ser diplóides (Bonsing *et al.*, 1993; cf. Pandis *et al.*, 1998).

Segundo Deville & Cornelisse (1994), a utilidade potencial da aneuploidia de DNA como um fator prognóstico tem sido investigada em numerosos estudos e

concluiu-se que o câncer de mama diplóide tem um prognóstico favorável, porém a magnitude desta vantagem quando comparada com tumores mostrando aneuploidia é pequena. Não se considerando a utilidade clínica da análise de ploidia de DNA em câncer de mama, esta pesquisa fornece informações globais sobre a evolução genética e a heterogeneidade deste tumor (Cornelisse *et al.*, 1993; cf Deville & Cornelisse, 1994). Portanto, o conteúdo de DNA continua sendo um poderoso marcador genético para estudar a estabilidade genética e a divergência clonal das populações celulares tumorais em câncer de mama.

No que se refere a células com número cromossômico diplóide, as informações obtidas estão de acordo com aquelas apresentadas por Nielsen *et al.* (1987, 1989), Thompson *et al.* (1993) e por Trent *et al.* (1993), que indicam uma tendência de diminuição de células normais de tecido normal para tumores microinvasivos e de tumores primários para metastáticos. No entanto, são contrários aos dados de Gebart *et al.* (1986) obtidos em tumores primários e metastáticos de mama e de Cavalli (1994) em análises realizadas em tumores benignos e malignos de mama. Em ambos os trabalhos, observaram-se apenas pequenas variações nas frequências de células normais nos dois tipos de tumores. Também, as pequenas variações nas frequências de células hipodiplóides e hiperdiplóides contrariam os dados de Nowell (1976, 1986), Geleick *et al.* (1990), Sandberg (1990) e Cavalli (1994), que admitem que há um aumento de células hiperdiplóides nos tumores em estágios mais avançados.

As diferenças de frequência e mesmo a presença de células normais em neoplasias humanas têm sido objeto de muitas controvérsias. Procedimentos metodológicos diversos, devido à obtenção de células pelo método direto ou cultivadas e a análise sem e com o emprego de bandamento cromossômico (Hill *et al.*, 1987; Hainsworth & Garson, 1990; Cavalli, 1994); seleção *in vitro* de células não diplóides e a origem das células normais de tecidos não tumorais adjacentes ao tumoral (Geleick *et al.*, 1990; Pandis *et al.* 1993a) são alguns dos fatores que têm sido discutidos sem que se alcance um consenso.

As frequências de células diplóides, hipodiplóides, hiperdiplóides e com outros graus de ploidia (próximos ao haplóide, ao triplóide e ao tetraplóide) dos tumores benignos e malignos de mama, foram comparadas considerando-se os dois tipos de procedimento metodológico. Sem o bandamento GTG, as frequências de células com número cromossômico próximo ao diplóide foram semelhantes nos tumores benignos (40,39%) e malignos (40,64%), o mesmo acontecendo com as frequências de células

hipodiplóides e hiperdiplóides (benignos 35,82% e 4,57%; malignos 34,95% e 5,69%, respectivamente). No entanto, as frequências de células diplóides e com números cromossômicos próximos ao haplóide, ao triploide e ao tetraploide diferiram de forma importante entre os tumores benignos (56,73% e 2,88%, respectivamente) e malignos (37,96% e 21,40%, respectivamente). Aplicando-se aos dados observados nestas quatro categorias de células (diplóides = 236 e 227; hipodiplóides = 149 e 209; hiperdiplóides = 19 e 34; próximas ao haplóide, ao triploide e ao tetraploide = 12 e 128, respectivamente para os tumores benignos e malignos) o teste do X^2 , obteve-se um valor igual a: $X^2_3 = 80,53$; $P < 0,001$, sendo que as diferenças foram devidas principalmente às frequências de células com ploidias próximas ao haplóide, ao triploide e ao tetraploide (X^2 parciais = 35,15 para os benignos e 25,11 para os malignos) e das diplóides (X^2 parciais = 11,16 para os benignos e 7,77 para os malignos).

A mesma análise realizada nas células com bandamento GTG indicou resultados homogêneos para as diferentes categorias de células, respectivamente nos tumores benignos e malignos: diplóides normais (43,50% e 35,12%), pseudodiplóides (20% e 18,18%), hipodiplóides (33% e 41,7%), hiperdiplóides (2,5% e 4,13%) e com outros graus de ploidia nos benignos (1% = 1 próxima ao haplóide e 1 próxima ao tetraploide) e nos malignos (0,8% = 2 próximas ao haplóide). O teste do X^2 aplicado aos valores observados (diplóides normais = 87 e 85; pseudodiplóides = 40 e 44; hipodiplóides = 66 e 101; hiperdiplóides = 5 e 10 e com outros graus de ploidia = 2 e 2, respectivamente nos tumores benignos e malignos) indicou um valor estatisticamente não significativo: $X^2_4 = 5,27$; $P > 0,20$. Os resultados do mesmo teste estatístico obtidos por Cavalli (1994) foram semelhantes aos acima descritos, isto é, significativo na análise sem o bandamento e não significativo na com bandamento.

A análise dos resultados descritos nessa discussão não permite uma conclusão segura sobre o comportamento das células com diferentes graus de ploidia tanto nos tumores benignos como nos malignos. A utilização de diferentes metodologias e o pequeno número de informações disponíveis são, provavelmente, responsáveis pelos resultados discrepantes que têm sido observados. Apenas pode-se avaliar que as informações obtidas pelo estudo de células com bandamento GTG são mais homogêneas quando se comparam os tumores benignos e malignos de mama. Conforme foi salientado por Cavalli (1994), é necessário que estudos semelhantes sejam realizados com maior frequência e preferencialmente pelo emprego de técnicas de bandamento

cromossômico para que a importância dos diferentes graus de ploidia na progressão tumoral possa ser melhor entendida.

2 - Aberrações cromossômicas numéricas e estruturais observadas nas lesões benignas da mama.

Neste trabalho foram apresentadas as análises citogenéticas de três lesões (uma ginecomastia e duas doenças fibrocísticas) e de quatro tumores benignos (quatro fibroadenomas) da mama.

Analisaram-se 200 metáfases com bandamento GTG nas sete alterações benignas da mama, sendo que três metáfases do caso 4 não foram consideradas, 87 (43,5%) apresentaram um cariótipo normal e 110 (55%) possuíam alterações cromossômicas, destas, 91 (82,73% das alteradas e 45,5% do total) apresentaram alterações cariotípicas clonais. Foram observadas 272 aberrações, com uma média de $38,86 \pm 18,50$ alterações por doença benigna, sendo que 158 (58,08%) delas formaram os 41 clones detectados.

As alterações cromossômicas que formaram os clones ocorreram com frequências muito variadas, tendo sido observadas desde três (caso 6) até 48 (caso 4) com uma média igual a $22,57 \pm 14,27$ alterações por lesão benigna. Aplicando-se aos nossos dados o coeficiente de regressão para verificar se a detecção das células com alterações clonais foi dependente ou não do número total de células analisadas, obtivemos um valor de $P > 0,10$ ($P = 0,156$) ($b = 0,305 \pm 0,183$; teste $t = 1,669$), portanto na nossa análise o número de células com alterações clonais detectadas foi independente do número total de células analisadas.

Não considerando os seis cromossomos marcadores, resultam 152 alterações cromossômicas clonais observadas mais frequentemente nos cromossomos 22 (15 = 9,87%), X (12 = 7,90%), 4 (12 = 7,90%) e 17 (12 = 7,90%). Não detectamos alterações cromossômicas clonais nos cromossomos 1, 3 e 21. Ao aplicarmos o teste do X^2 aos dados apresentados na tabela 20, obtivemos um valor de $P < 0,001$ ($X^2_{22} = 64,38$), indicando que a distribuição das alterações cromossômicas clonais observadas não se deu ao acaso. A casualidade somente é estatisticamente observada, quando se excluiu da amostra os sete cromossomos acima referidos, obtendo-se um valor de $P > 0,10$ ($X^2_{15} = 21,46$). Os cromossomos 9, 10, 18 e 19, embora não se encontrassem entre os mais frequentes, apresentaram uma frequência de alterações (11=7,24%; 10=6,58%;

11=7,24%; 10=6,58%, respectivamente) muito próxima àquelas observadas nos cromossomos mais freqüentemente alterados. Nos nossos dados, as alterações numéricas (131) foram muito mais freqüentes do que as estruturais (27) ($X^2_1=68,46$; $P<0,001$) e entre as numéricas, as monossomias (115) foram mais comuns que as trissomias (16) ($X^2_1=74,82$; $P<0,001$).

As 131 alterações numéricas clonais (tabela 19) detectadas nas sete alterações benignas da mama estudadas ocorreram principalmente nos cromossomos 22 (15=11,45%), 4 (12=9,16%), 17 (12=9,16%), 18 (11=8,40%), 10 (10=7,63%) e 19 (10=7,63%). A não casualidade da sua ocorrência em todos os cromossomos do genoma foi estatisticamente comprovada ($X^2_{22}=66,52$; $P<0,001$). Desconsiderando-se estes seis cromossomos e aqueles nos quais não se detectaram aberrações numéricas clonais, cromossomos 1, 3 e 21, e aplicando-se o teste X^2 nos 14 restantes, obteve-se um valor de $P>0,95$ ($X^2_{13}=5,79$) que indicou que as alterações numéricas ocorreram ao acaso nestes 14 cromossomos.

As alterações cromossômicas estruturais clonais (tabela 18) foram detectadas em cinco (71,43%) dos sete casos de alterações benignas da mama analisados neste trabalho. Os casos 2 (doença fibrocística) e 4 (fibroadenoma) não apresentaram tais aberrações. As alterações envolvendo o cromossomo X (del(X)(q23) no caso 3 e del(X)(q26) no caso 7) foram as mais freqüentes, observadas em nove (33,33%) das 27 células com aberrações estruturais, seguidas pela presença de cromossomos marcadores (nos casos 1 e 3) em seis (22,22%) células, del(12)(p12) do caso 1 em cinco (18,51%) células, a del(9)(q33) do caso 5 em quatro (14,81%) células e del(13)(q22) do caso 6 em três (11,11%) células. A del(12)(p12) foi detectada também no caso 7, porém não formou clone.

As alterações cromossômicas clonais envolvendo o cromossomo 22 foram as mais freqüentes neste trabalho, tendo sido observadas somente monossomias. A perda de um cromossomo 22 foi clonal em três (casos 2, 4 e 7, correspondendo a 42,86% do total de casos analisados) dos sete casos.

Em 1991, Khan & Evans constataram que o cromossomo 22 foi o mais freqüentemente envolvido em aberrações cromossômicas na análise conjunta de quatro tumores benignos (meningioma, leiomioma uterino, lipoma e adenoma pleomórfico da glândula salivar), sendo que esse fato aconteceu principalmente devido à alta incidência da monossomia do 22 em meningiomas. Sreekantaiah & Sandberg (1991), num trabalho de revisão, também destacaram a importância da monossomia do 22 em alterações

benignas, mais especificamente em meningiomas, leiomiomas e neurinomas. Em tumores mamários, o envolvimento deste cromossomo também foi observado, tendo sido sugerido por Cavalli (1994) que alterações no 22 poderiam estar relacionadas com a proliferação celular. Cavalli (1994) observou a monossomia do 22 em quatro fibroadenomas, 50% dos tumores benignos analisados e trissomia deste cromossomo num fibroadenoma e num papiloma, +22 também foi encontrada em três displasias mamárias por Cavaliéri (1993). Alterações envolvendo o cromossomo 22 foram detectadas em tumores filóides da mama (Birdsall *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 1997) e em hiperplasia epitelial (Dietrich *et al.*, 1995).

As aberrações cromossômicas estruturais foram as responsáveis pelo freqüente envolvimento do cromossomo X em alterações clonais observadas nas sete lesões benignas da mama neste trabalho. A monossomia clonal do X foi detectada no caso 2 e deleções no braço longo do X foram observadas nos casos 3 e 7.

A monossomia do X foi observada num fibroadenoma por Fletcher *et al.* (1991), cuja cultura a curto prazo estava inteiramente composta de células mesenquimais, num caso de fascite nodular da mama (Birdsall *et al.*, 1995b), que é uma proliferação aumentada benigna de fibroblastos e num caso de hiperplasia epitelial por Burbano *et al.* (1996a). Esta perda cromossômica é apontada por Petersson *et al.* (1997) como uma das aberrações repetidamente detectadas em câncer de mama e foi a alteração numérica mais freqüentemente observada nos fibroadenomas descritos por Cavalli (1994). Essas observações sugerem que a monossomia do X não deve ser excluída como uma das aberrações importantes no processo tumoral que ocorre nos tecidos da mama, apesar de sua presença ter sido detectada em tecidos normais (Mitelman *et al.*, 1997b).

A banda Xq26, alterada em um dos fibroadenomas estudados (caso 7), também foi encontrada rearranjada em outro fibroadenoma por Petersson *et al.* (1997). As aberrações estruturais envolvendo o cromossomo X foram observadas em outros casos de doença fibrocística além daquele (caso 3) apresentado neste trabalho (Petersson *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1996a; Petersson Lundin *et al.*, 1998a). Em tumores filóides foi demonstrada a ocorrência de alterações no cromossomo X por técnicas citogenéticas convencionais (Dietrich *et al.*, 1997) e por CGH (Lu *et al.*, 1997). Sendo que no trabalho de Lu *et al.* (1997) o único tumor que apresentou recorrência e que não apresentava ganho de 1q, tinha a perda do cromossomo X como a única anomalia. Perda do cromossomo X também foi encontrada por Warsó *et al.* (1995) numa linhagem celular derivada de um tumor filóides com história de recorrência, indicando a

monossomia do X como um forte indicador genético para um tratamento terapêutico mais radical. Sneige *et al.* (1996) detectaram por FISH aberrações cromossômicas numéricas do X em lesões hiperplásicas atípicas da mama.

Monossomias clonais do cromossomo 17 foram observadas nos casos 1, 3 e 4. Nenhuma alteração estrutural envolvendo este cromossomo foi observada.

Num trabalho de revisão sobre as aberrações citogenéticas observadas em fibroadenomas, Petersson *et al.* (1997) indicaram a monossomia do 17 como uma alteração numérica recorrente nesses tumores. As aberrações estruturais e numéricas clonais 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). Segundo a sugestão de Ozisik *et al.* (1994) pode haver uma relação causal entre as aberrações neste cromossomo e as alterações malignas originadas de fibroadenomas, suposição que merece ser avaliada com maior profundidade.

As aberrações no cromossomo 17 parecem ser menos freqüentes em casos de doença fibrocística da mama, tendo sido observadas por Petersson *et al.* (1994) num caso de doença fibrocística com hiperplasia lobular atípica, um padrão histológico associado com um risco substancialmente aumentado de desenvolvimento de câncer de mama. Foram também observadas por Nielsen & Briand (1989) numa linhagem epitelial estabelecida de uma doença fibrocística, por Burbano *et al.* (1996a) como alterações não clonais em quatro casos de hiperplasias epiteliais e por Cavaliéri (1993) numa displasia mamária.

A monossomia e alterações estruturais do cromossomo 17 foram detectadas também em tumores filóides da mama (Dietrich *et al.*, 1994b, 1997).

Estudos genético-moleculares têm encontrado alterações no cromossomo 17 em biópsias benignas da mama (Dhingra *et al.*, 1992; Meisner *et al.*, 1994; Micale *et al.*, 1994; Lakhani *et al.*, 1995; Millikan *et al.*, 1995; Sneige *et al.*, 1996). Micale *et al.* (1994) consideraram que as perdas do cromossomo 17, detectadas por eles utilizando FISH, em casos de hiperplasia moderada a florida, hiperplasia lobular atípica e carcinoma lobular *in situ* são consistentes com os dados que indicam a perda de TP53 e outros genes supressores tumorais (BRCA1, NM23, ERBB2) neste cromossomo, e acreditam que estas perdas podem ocorrer no início de uma seqüência de alterações genéticas. Millikan *et al.* (1995) encontraram mutações de ponto no gene TP53 em cinco amostras de tecidos benignos da mama e sugeriram que alterações na função

normal deste gene podem ocorrer no tecido mamário antes de alterações histológicas associadas a risco aumentado estarem aparentes. Lakhani *et al.*, (1995) detectaram LOH em 17p em dois de oito casos informativos de hiperplasia ductal atípica, com um marcador próximo ao TP53. Portanto, deleções alélicas em TP53 podem ocorrer em fases histológicas precoces do desenvolvimento do câncer de mama, e hiperplasia ductal atípica pode representar uma entidade neoplásica (Lakhani *et al.*, 1995).

A alta frequência do envolvimento do cromossomo 4 observada neste estudo deve-se exclusivamente à ocorrência de monossomias, pois não foram detectadas trissomias e nem alterações estruturais neste cromossomo. Perdas de um cromossomo 4 foram observadas nos casos 2 e 4.

Belda *et al.* (1993) demonstraram um rearranjo clonal envolvendo o cromossomo 4, t(4;14)(q24-25;q24.3), numa subpopulação de células mesenquimais de um tumor fibroso da mama. Os autores ressaltaram a importância de se verificar a ocorrência de rearranjos cromossômicos em 4q25, onde se localiza um fator de crescimento de fibroblastos. Dietrich *et al.* (1995) observaram alterações estruturais no cromossomo 4 numa hiperplasia epitelial e em um dos clones não relacionados de um fibroadenoma, sendo que a trissomia do cromossomo 4 foi encontrada em um dos dois clones anormais de outro fibroadenoma da mesma série e também foi detectada em um fibroadenoma descrito por Cavalli (1994). No estudo citogenético realizado por Rohen *et al.* (1996) alterações não clonais envolvendo o cromossomo 4 foram observadas em quatro dos trinta fibroadenomas analisados, sendo que relativamente poucas células foram analisadas nestes quatro tumores, portanto é possível que se um maior número de células tivesse sido analisado ou se os autores tivessem utilizado um método de sedimentação diferencial como o proposto por Dietrich *et al.* (1994a), tais alterações poderiam ter formado clones e uma maior heterogeneidade cariotípica poderia ter sido observada. Outros pesquisadores têm encontrado alterações estruturais e numéricas clonais no cromossomo 4 em fibroadenomas e em hiperplasias epiteliais (Staats *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1996a; Petersson *et al.*, 1997; Petersson Lundin *et al.*, 1998a), sendo que Petersson *et al.* (1997) salientaram a importância das translocações não balanceadas em 4p14 observadas em fibroadenomas, considerando que este é um ponto de quebra recorrente em câncer de mama.

Em dois tipos tumorais que não foram analisados neste trabalho, tumores filóides malignos e adenolipomas da mama, foram observadas monossomias e

alterações estruturais no cromossomo 4 (Dietrich *et al.*, 1994a, 1997; Rohen *et al.*, 1995a).

Apesar de não estar entre os cromossomos mais freqüentemente envolvidos em aberrações na nossa amostra, o cromossomo 9 apareceu alterado tanto numérica quanto estruturalmente numa porcentagem relativamente alta de células. A monossomia do 9 foi observada no caso 1 (ginecomastia) e a del(9)(q33) e a trissomia do 9 no caso 5 (fibroadenoma).

A trissomia do cromossomo 9 foi detectada em outros dois fibroadenomas (Cavalli, 1994; Petersson *et al.*, 1997) e a monossomia foi observada em fibroadenomas e numa hiperplasia epitelial (Cavalli, 1994; Burbano *et al.*, 1996a), sendo que a trissomia do 9 foi descrita por Petersson *et al.* (1997) como uma das aberrações repetidamente detectadas em câncer de mama. Aberrações estruturais clonais envolvendo o cromossomo 9 foram detectadas em fibroadenomas (Calabrese *et al.*, 1991; Fletcher *et al.*, 1991; Dietrich *et al.*, 1995), em hiperplasias epiteliais (Dietrich *et al.*, 1995) e em tumores filóides da mama (Dietrich *et al.*, 1994b, 1997). Dos seis papilomas da mama com aberrações clonais, de que temos conhecimento, descritos até o momento (Cavalli, 1994; Dietrich *et al.*, 1995; Petersson Lundin *et al.*, 1998b), dois apresentaram o cromossomo 9 alterado (Cavalli, 1994; Dietrich *et al.*, 1995), indicando um papel importante deste cromossomo em tais tumores benignos da mama.

As alterações numéricas envolvendo o cromossomo 18 foram observadas em três casos que apresentamos, houve ganho deste cromossomo em uma doença fibrocística (caso 3), ganho e perda clonais num fibroadenoma (caso 4) e somente perda em outro fibroadenoma (caso 7). A monossomia do cromossomo 18 foi detectada em dois fibroadenomas descritos por Cavalli (1994) e numa doença fibrocística (Petersson Lundin *et al.*, 1998a). A perda do cromossomo 18 também foi detectada em lesões hiperplásicas utilizando-se a técnica de FISH (Micale *et al.*, 1994). A trissomia do cromossomo 18 foi observada em três fibroadenomas mamários por Fletcher *et al.* (1991), Dietrich *et al.* (1995) e Dal Cin *et al.* (1998). Em todos estes casos a trissomia do cromossomo 18 foi encontrada em clones que apresentavam somente aberrações numéricas, como aconteceu no fibroadenoma com +18 (caso 4) descrito neste trabalho. Este ganho cromossômico foi observado também em doença fibrocística (Petersson *et al.*, 1994; Staats *et al.*, 1998a), sendo que uma célula com a trissomia do cromossomo 18 foi observada numa hiperplasia epitelial por Burbano *et al.* (1996a). Além dos casos

descritos acima o envolvimento do cromossomo 18 foi observado também em tumores filóides da mama (Dietrich *et al.*, 1994b, 1997).

Apesar da monossomia do cromossomo 10 ter sido observada em um grande número de células analisadas neste trabalho, ela foi clonal em apenas dois fibroadenomas. Monossomia do cromossomo 10 foi observada como aberração clonal em dois outros fibroadenomas descritos anteriormente (Fletcher *et al.*, 1991; Cavalli, 1994), porém fazendo parte de cariótipos que apresentavam várias outras alterações clonais. Um outro fibroadenoma apresentou uma alteração estrutural neste cromossomo (Petersson *et al.*, 1997). Aberrações numéricas e estruturais no cromossomo 10 foram também detectadas em hiperplasias epiteliais e em tumores filóides da mama (Rohen *et al.*, 1993; Dietrich *et al.*, 1994b; Petersson *et al.*, 1996; Petersson Lundin *et al.*, 1998a).

A situação observada em relação às alterações no cromossomo 19 é similar àquela do cromossomo 10 descrita acima, ou seja só foram detectadas monossomias em dois casos (na ginecomastia e num fibroadenoma). Cavalli (1994) descreveu a monossomia do cromossomo 19 em dois fibroadenomas e a trissomia deste cromossomo em outro. O mesmo ocorreu no trabalho de Fletcher *et al.* (1991) em que um dos fibroadenomas apresentou a monossomia do 19 e outro a trissomia do 19. Petersson *et al.* (1997) observaram a t(7;19)(q22;q13) como única alteração em um dos nove fibroadenomas anormais citogeneticamente analisados por eles. A monossomia do cromossomo 19 também foi clonal num caso de hiperplasia epitelial mamária e num tumor filóides da mama (Burbano *et al.*, 1996a; Dietrich *et al.*, 1997). É interessante notar o envolvimento freqüente do cromossomo 19 nas aberrações citogenéticas observadas em papilomas da mama, Cavalli (1994) encontrou a trissomia do cromossomo 19 em um deles e Petersson Lundin *et al.* (1998b) descreveu o der(19)(1;19)(q11;p13) em outro.

A del(12)(p12) foi observada no caso de ginecomastia (caso 1) apresentado por nós estando presente em 14,29% das células analisadas, sendo a única anomalia detectada em um dos dois clones encontrados. De acordo com um extensivo levantamento bibliográfico dos dados descritos na literatura e com o trabalho de Teixeira *et al.* (1998), esta foi a quarta amostra de ginecomastia analisada citogeneticamente, sendo que as outras três, duas com cariótipos normais e uma com aberrações, foram apresentadas por Teixeira *et al.* (1998). A principal diferença existente entre a ginecomastia citogeneticamente anormal descrita neste trabalho e aquela descrita por Teixeira *et al.* (1998) é o fato de que a última foi retirada de um

local onde um carcinoma havia sido previamente removido, e a que descrevemos foi retirada de uma mama sem nenhuma história de doença. A t(2;11)(p24;p13) foi a única alteração cromossômica descrita anteriormente em ginecomastia, portanto nenhuma aberração recorrente pôde ser detectada nesta condição benigna da mama masculina devido ao número limitado de dados. Entretanto, comparando os dados obtidos por nós e as alterações descritas em alterações benignas da mama feminina e malignas da mama masculina, observa-se que as aberrações detectadas na ginecomastia descrita neste trabalho foram observadas também por outros pesquisadores em tecidos mamários.

As aberrações envolvendo o braço curto do cromossomo 12 foram descritas num câncer de mama masculino: t(1;12)(p13p34;p11) e t(3;12)(p12;p11) (Mitchell, 1990), e numa metástase de linfonodo proveniente de um adenocarcinoma papilar masculino: t(5;12)(p15;p11) (Teixeira *et al.*, 1998). Alterações em 12p foram descritas anteriormente em lesões benignas da mama feminina: numa linhagem celular derivada de doença fibrocística (Nielsen & Briand, 1989), em fibroadenomas, nos quais os pontos de quebra se localizaram na banda 12p12 ou próximo a ela (Calabrese *et al.*, 1991; Cavalli, 1994; Dietrich *et al.*, 1995), num tumor filóides benigno (Dietrich *et al.*, 1994b) e numa hiperplasia epitelial (Dietrich *et al.*, 1995). Estes estudos demonstram o freqüente envolvimento e a alta instabilidade da região 12p no processo anormal do tecido mamário.

Além da del(12)(p12), foram observadas as monossomias clonais dos cromossomos 17 (em 11,4% das células), 9, 19 e 20 (8,57% das células) e a presença de um cromossomo marcador no segundo clone presente na amostra de ginecomastia. A discussão sobre a monossomia do cromossomo 17 em lesões benignas da mama foi realizada acima, porém além dos casos mencionados, a perda parcial ou completa de um cromossomo 17 foi também encontrada em quatro dos 10 casos de câncer de mama masculino estudados citogeneticamente (Rodgers *et al.*, 1985; Mitchell, 1990; Cavalli *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1998). A monossomia do cromossomo 9 também foi discutida acima, acrescentamos apenas que ela foi detectada por FISH num câncer de mama masculino (Balazs *et al.*, 1991). Aberrações envolvendo o cromossomo 19 não haviam sido detectadas em tecidos mamários masculinos e uma alteração estrutural possivelmente envolvendo o cromossomo 20 (add(?20)(q13)) foi observada num câncer de mama masculino por Mitchell (1990). Aberrações numéricas do cromossomo 20 foram detectadas por nós num fibroadenoma (caso 7) e em sete fibroadenomas descritos

anteriormente (Fletcher *et al.*, 1991; Cavalli, 1994; Petersson *et al.*, 1997), porém presenças adicionais deste cromossomo foram mais freqüentes do que ausências.

Embora os dados citogenéticos sobre ginecomastia sejam extremamente limitados, poder-se-ia especular, segundo Teixeira *et al.* (1998), que exista uma associação entre um subtipo de ginecomastia com aberrações cromossômicas clonais e o desenvolvimento de câncer de mama em homens, apesar do fato de que nenhuma transição histológica direta entre as duas patologias tenha sido demonstrada (Teixeira *et al.*, 1998). Além disso, Kasami *et al.* (1997) ao estudar a LOH em lesões hiperplásicas de doenças benignas da mama, concluíram que várias alterações genéticas detectadas em doenças proliferativas da mama podem não ser indicativas de malignidade clinicamente significativa para a mama remanescente. No caso do nosso paciente portador de ginecomastia, o acompanhamento clínico não revelou, até o momento, nenhum sinal de malignização na mama.

A análise citogenética das duas doenças fibrocísticas apresentadas neste trabalho não revelou nenhuma aberração clonal recorrente. A única característica similar entre as duas foi a perda total (caso 2) ou parcial (caso 3) de um cromossomo X.

O caso 2, uma doença fibrocística mamária florida com focos de hiperplasia epitelial típica, apresentou um único clone anormal hipodiplóide onde havia apenas aberrações numéricas, sendo que em meio a múltiplas perdas cromossômicas, identificou-se a trissomia do cromossomo 5. Dal Cin *et al.* (1998) afirmaram que tumores infantis e os raros tumores de adultos que apresentam somente alterações numéricas tendem a mostrar um baixo grau de malignidade, sugerindo que, na ausência de alterações estruturais, a presença de cromossomos supranumerários não esteja associada com um comportamento maligno agressivo.

A trissomia do cromossomo 5 foi observada anteriormente em um caso de doença fibrocística (Petersson *et al.*, 1994), em seis casos de fibroadenomas (Fletcher *et al.*, 1991; Cavalli, 1994; Dietrich *et al.*, 1995; Rohen *et al.*, 1996) e num tumor filóides (Dietrich *et al.*, 1997). A trissomia do 5 deve ser interpretada com cautela, devido a sua presença em tecidos não neoplásicos (Ray *et al.*, 1990; Ozisik *et al.*, 1994; cf. Rohen *et al.*, 1996).

Em um dos dois fibroadenomas com trissomia do 5 apresentados por Fletcher *et al.* (1991) as células analisadas eram provenientes de uma cultura a curto prazo composta inteiramente por elementos mesenquimais, o mesmo acontecendo no fibroadenoma com +5 descrito por Dietrich *et al.* (1995). Na série descrita por Cavalli

(1994) e no presente trabalho não foram utilizados métodos de sedimentação e cultura diferenciais (como o descrito por Dietrich *et al.*, 1994a) e nem uma pesquisa imunoistoquímica/ citogenética combinada (como utilizada por Fletcher *et al.*, 1991), que possibilitam a análise do cariótipo dos componentes epiteliais e mesenquimais do tumor separadamente (Dietrich *et al.*, 1997). Apesar disso, podemos supor que o clone do fibroadenoma com +5, alteração em 12q21-24 e -22 descrito por Cavalli (1994) era de origem mesenquimal, considerando a alta frequência de aberrações em 12q (mais especificamente 12q13-15) e monossomia do 22 em tumores mesenquimais (Khan & Evans, 1991; Sreekantaiah & Sandberg, 1991). A mesma suposição pode ser feita em relação ao segundo fibroadenoma com +5 descrito pela referida autora, desde que este também apresentou a del(6)(q23), que apesar de ser uma alteração característica de carcinomas mamários, foi também observada numa doença fibrocística *sem* hiperplasia epitelial (Dal Cin *et al.*, 1996), num caso de fascite nodular (Birdsall *et al.*, 1995b) e nas células mesenquimais de dois fibroadenomas (Fletcher *et al.*, 1991; Leuschner *et al.*, 1994). Além de 6q- foi observada, neste segundo fibroadenoma descrito por Cavalli (1994), a monossomia do cromossomo 22 e uma alteração estrutural no cromossomo 11. As aberrações cromossômicas no 11 estavam restritas às células de origem mesenquimal em outros três fibroadenomas descritos na literatura (Fletcher *et al.*, 1991; Stephenson *et al.*, 1992; Leuschner *et al.*, 1994).

De acordo com todos os fatos e suposições levantados acima e com a característica da doença fibrocística do caso 2, que apresentou apenas alguns focos de hiperplasia epitelial, a nossa hipótese é a de que as células aberrantes citogeneticamente detectadas neste caso poderiam ser de origem mesenquimal. Se esta hipótese pudesse ser confirmada poderíamos inferir um baixo risco de desenvolvimento de carcinoma de mama nesta paciente, pois além das células com alterações serem, supostamente, de origem não epitelial, foi detectada a presença de apenas um clone sem aberrações estruturais e a lesão apresentava um tamanho pequeno (27 mm), não apresentando hiperplasia epitelial atípica.

O caso 3, uma doença fibrocística mamária florida com hiperplasia epitelial atípica grave, apresentou dois clones anormais citogeneticamente não relacionados, uma característica cariotípica frequentemente encontrada em tumores malignos da mama (Heim *et al.*, 1997). Em um dos clones deste caso a del(X)(q23) foi a única alteração encontrada. No segundo clone, estiveram presentes, entre outras aberrações, a monossomia do cromossomo 17 e a trissomia do cromossomo 18, alterações discutidas

acima, e que já caracterizaram citogeneticamente vários carcinomas mamários (Bullerdiel *et al.*, 1994; Pandis *et al.*, 1995a).

As aberrações no cromossomo X foram observadas em três outros casos de doença fibrocística (Petersson *et al.*, 1994; Burbano *et al.*, 1996a; Petersson Lundin *et al.*, 1998a), além dos dois descritos neste trabalho, indicando a importância do freqüente envolvimento deste cromossomo nas doenças fibrocísticas mamárias.

Este é o quarto caso de doença fibrocística em que a trissomia do cromossomo 18 (Petersson *et al.*, 1994; Staats *et al.*, 1998) é observada como aberração clonal, sendo que em outro caso descrito por Burbano *et al.* (1996a) a mesma aberração também foi observada, porém como alteração não clonal. Estas observações sugerem fortemente que +18 caracteriza um subtipo de doença fibrocística que pode ter um risco significativamente aumentado de desenvolvimento de câncer de mama. Staats *et al.* (1998) analisaram dois casos de doença fibrocística que apresentaram trissomia e tetrassomia do 18 e concluíram que a ocorrência da trissomia do 18 em hiperplasias benignas e em câncer de mama sugere que esta aberração tem uma função importante nos estágios precoces da transformação maligna das células epiteliais da mama. Sneige *et al.* (1996) detectaram com sondas pericentroméricas a trissomia do 18 em três casos de hiperplasias atípicas. Segundo Sneige *et al.* (1996) a maioria das amostras de hiperplasias atípicas estudadas por eles mostrou ganhos e perdas cromossômicas similares àquelas observadas nos carcinomas, sugerindo que pelo menos um subtipo de hiperplasia atípica manifesta características submicroscópicas de malignidade. Utilizando análises de LOH, O'Connell *et al.* (1994) observaram que a maioria das lesões proliferativas associadas com câncer de mama apresentavam alterações clonais. Aneuploidia cromossômica significativa pode ser detectada em epitélio da mama não proliferativo ou com hiperplasia atípica, em pacientes que tenham um alto risco para o desenvolvimento de carcinoma invasivo.

Devido à presença de policlonalidade citogenética, de aberrações estruturais e numéricas clonais (principalmente a monossomia do 17 e a trissomia do 18 em um dos clones) e por se tratar de um caso de doença fibrocística com hiperplasia atípica, sugerimos que a paciente do caso 3 pode apresentar um risco aumentado de desenvolver câncer de mama. Isto é reforçado por estudos epidemiológicos que constataram que mulheres com hiperplasia atípica têm um risco mais alto de desenvolvimento de carcinoma mamário (Dupont *et al.*, 1993).

Em relação aos fibroadenomas podemos acrescentar à revisão realizada por Petersson *et al.* (1997), os dados apresentados por Dal Cin *et al.* (1998), por Cavalli (1994) e os do presente trabalho. Observou-se que os cromossomos e braços cromossômicos envolvidos recorrentemente em rearranjos estruturais são Xq26, 1q, 2q, 3p, 4q, 5q, 6, 8q, 9, 11, 12, 13q22, 14q, 15q, 16q, 20q11. As monossomias descritas em mais de três fibroadenomas foram: -X, -10, -17, -18, -19 e -22. As trissomias clonais em mais de três fibroadenomas foram: +5, +7, +11, +12, +14, +18 e +20. Nesta revisão foram observados cariótipos completamente diversos, sem que um padrão cariotípico pudesse ser reconhecido. Segundo Petersson *et al.* (1997), duas explicações possíveis para a variabilidade nas aberrações cromossômicas clonais descritas em fibroadenomas poderiam ser a natureza bifásica dos mesmos e a variação nas técnicas de cultura utilizadas por diferentes grupos.

Uma conclusão importante que tem emergido de evidências citogenéticas é que tanto os componentes estromais quanto os epiteliais dos fibroadenomas são neoplasticamente transformados e que eles apresentam diferentes anormalidades cariotípicas clonais restritas a linhagem (Dietrich *et al.*, 1995). Também foi observado que algumas das alterações cromossômicas que têm sido freqüentemente encontradas em carcinomas da mama são também observadas no componente epitelial dos fibroadenomas (Dietrich *et al.*, 1995).

Petersson *et al.* (1997) sugeriram que a descoberta de aberrações cromossômicas similares em fibroadenomas e carcinomas poderia indicar que mulheres com fibroadenomas cariotipicamente anormais têm um risco aumentado de desenvolver um câncer de mama subsequente.

Clones anormais não relacionados citogeneticamente foram observados em 57,14% dos casos apresentados neste trabalho. Policlonalidade citogenética tem sido descrita em tumores bifásicos benignos da mama como fibroadenomas (Dietrich *et al.*, 1995; Stephenson *et al.*, 1992), tumores filóides (Dietrich *et al.*, 1994b; Dietrich *et al.*, 1997) e harmartoma (Dietrich *et al.*, 1995), em doenças hiperproliferativas da mama (Dietrich *et al.*, 1995; Petersson *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1996; Petersson Lundin *et al.*, 1998a) e é uma característica comum de carcinomas mamários (Heim *et al.*, 1997). Nossos dados sugerem que a policlonalidade é um fenômeno que se apresenta em estágios iniciais da tumorigênese mamária, considerando que foi observada em alterações benignas que conferem nenhum ou baixo risco de câncer de mama (como na

ginecomastia e nos fibroadenomas) e também numa alteração de maior risco (na doença fibrocística com HE atípica severa).

3. Aberrações cromossômicas numéricas e estruturais observadas nos tumores malignos da mama

Neste trabalho foram apresentadas as análises citogenéticas de sete carcinomas primários da mama e de um carcinoma mamário metastático.

Analisaram-se 242 metáfases com bandamento GTG nas oito alterações malignas da mama, 85 (35,12%) apresentaram um cariótipo normal e 157 (64,88%) possuíam alterações cromossômicas. Destas, 135 (85,99% das alteradas e 55,79% do total) apresentaram alterações cariotípicas clonais. Foram observadas 475 aberrações, com uma média de $59,38 \pm 24,68$ alterações por tumor, sendo que 302 (63,58%) delas formaram os 74 clones detectados.

As alterações cromossômicas que formaram os clones ocorreram com frequências muito variadas, tendo sido observadas desde duas (caso 11) até 82 (caso 14) com uma média igual a $37,75 \pm 24,60$ alterações por tumor. Aplicando-se aos nossos dados o coeficiente de regressão para verificar se a detecção de células com alterações clonais foi dependente ou não do número total de células analisadas, obteve-se os seguintes valores: $b = 0,508 \pm 0,132$; teste $t = 3,840$, com um valor de $P < 0,01$. Portanto, na nossa análise o número de células com alterações clonais detectadas dependeu do número total de células analisadas.

Desconsiderando os oito cromossomos marcadores, resultam 294 alterações cromossômicas clonais observadas mais frequentemente nos cromossomos 17 ($34=11,56\%$), X e 18 ($22=7,48\%$), 15 ($21=7,14\%$), 19 e 21 ($20=6,8\%$), sendo que o cromossomo 14 apresentou uma baixa frequência ($4=1,36\%$) de aberrações cromossômicas clonais. Não foram detectadas alterações cromossômicas clonais nos cromossomos 1, 2 e 5. Estes dados indicam que as alterações cromossômicas não ocorreram ao acaso em todos os cromossomos do genoma, o que se confirma quando aplicamos aos dados da tabela 40 o teste do X^2 , que apresentou um valor significativo ao nível de 0,001 ($X^2_{22} = 123,13$). A casualidade somente foi estatisticamente observada, quando se excluiu da amostra os 10 cromossomos acima referidos, obtendo-se um valor de $P > 0,10$ ($X^2_{12} = 16,96$). Os cromossomos 8 ($18=6,12\%$), 10 e 22 ($17=5,78\%$), embora não se encontrassem entre os mais frequentes, apresentaram uma frequência de

alterações muito próxima àquela observada nos cromossomos mais freqüentemente alterados. Nos nossos dados, as alterações numéricas (276) foram muito mais freqüentes do que as estruturais (26) ($X^2_1 = 206,95$; $P < 0,001$) e entre as numéricas, as monossomias (230) foram mais comuns que as trissomias (46) ($X^2_1 = 122,67$; $P < 0,001$).

As 276 alterações numéricas clonais (tabela 39) detectadas nos oito tumores malignos da mama estudados ocorreram principalmente nos cromossomos 17 (31=11,23%), X (22=7,97%), 15 (21=7,61%), 18, 19 e 21 (20=7,25%). Uma freqüência muito baixa de aberrações numéricas ocorreu nos cromossomos 12 e 14 (4=1,45%), sendo que as mesmas não foram detectadas nos cromossomos 1, 2 e 5. A não casualidade de ocorrência de aberrações numéricas em todos os cromossomos do genoma foi estatisticamente comprovada ($X^2_{22} = 120,5$; $P < 0,001$). Desconsiderando-se os seis cromossomos com maior freqüência de aberrações e os cinco cromossomos com freqüência de aberrações numéricas clonais nula ou muito baixa, e aplicando-se o teste X^2 nos 12 restantes, obteve-se um valor de $P > 0,30$ ($X^2_{11} = 12,86$) que indicou que as alterações numéricas ocorreram ao acaso nestes 12 cromossomos.

As alterações cromossômicas estruturais clonais (tabela 38) foram detectadas em quatro (50%) dos oito casos de tumores malignos da mama analisados nesta dissertação, nos casos 9, 10, 12 e 15, sendo que o caso 10 foi o que apresentou um maior número de alterações estruturais (6 aberrações diferentes), seguido pelo caso 15 (com duas diferentes) e pelos casos 9 e 12 que apresentavam somente um tipo de aberração estrutural. A presença de cromossomos marcadores em oito das 26 células (30,78%) com aberrações estruturais e as alterações envolvendo os cromossomos 12, der(12;15)(q10;q10) no caso 9, del(12)(p12) no caso 10, e 8, del(8)(q23) no caso 15 observadas em 19,23% das células analisadas foram as mais freqüentes, seguidas pelas aberrações nos cromossomos 6 e 17 em 11,54% e no cromossomo 18 em 7,70% das células analisadas. No caso 13 a del(1)(q32) foi observada como aberração não clonal e no 14 o mesmo aconteceu com a del(11)(q23).

Os dados de 480 tumores primários de mama com aberrações cromossômicas clonais descritos por Rodgers *et al.*, 1984, 1985; Dutrillaux *et al.*, 1986; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Hill *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1989; Dutrillaux *et al.*, 1990; Geleick *et al.*, 1990; Mitchell, 1990; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Ferti-Passantonopoulou *et al.*, 1991; Hainsworth *et al.*, 1991; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, b, 1994b, 1995a, 1995b, 1998; Bullerdiel *et al.*, 1993, 1994; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a, b, 1997, 1998; Cavalli *et al.*, 1995, 1997;

Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Adeyinka *et al.*, 1997, 1998; Bernardino *et al.*, 1997, 1998; e de 57 carcinomas mamários metastáticos descritos por Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1989; Tarkkanen *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1994b, 1998; Adeyinka *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1996, 1998; Bernardino *et al.*, 1997, constituíram a base de informações para a discussão abaixo.

O cromossomo 17 foi o mais freqüentemente envolvido em aberrações cromossômicas nos oito carcinomas mamários estudados citogeneticamente. Alterações no 17 foram observadas em 75% dos tumores: casos 9, 10, 12, 13, 14 e 15. A monossomia deste cromossomo ocorreu em 62,5% dos tumores e esteve presente em quatro células (7,69%) do caso 10; três células (20%) do caso 12; seis células (15%) do caso 13; 10 células do caso 14 (20%) e em quatro células (10%) do caso 15. A trissomia do 17 foi observada como aberração clonal em quatro células (21,05%) do caso 9. Uma alteração estrutural no 17, del(17)(p12), foi detectada em três células (20%) do caso 12.

A monossomia do 17 foi observada em três casos de câncer de mama masculino (Rodgers *et al.*, 1985; Cavalli *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1998) estabelecendo-se como uma das poucas aberrações recorrentes nestes cânceres. Também foi observada em 52 (10,83% dos 480 que revisamos) casos de câncer de mama primário feminino e em 15 (26,32%) metastáticos (Rodgers *et al.*, 1984; Dutrillaux *et al.*, 1990; Geleick *et al.*, 1990; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Cavalli *et al.*, 1997; Bernardino *et al.*, 1997, 1998; Pandis *et al.*, 1993b, 1995a, 1998). Pandis *et al.* (1995a) constatando que -17 é uma aberração freqüentemente encontrada em câncer de mama, admitiram que a mesma seja secundária, pois raramente foi encontrada como anomalia única no cariótipo.

Na comparação entre câncer de mama primário e metastático realizada por Pandis *et al.* (1998), percebeu-se que a monossomia do cromossomo 17 ocorreu mais freqüentemente nos tumores metastáticos. A presença desta aberração tanto nos tumores primários como nas lesões de linfonodo indica que talvez ela possa apresentar uma função no estabelecimento das metástases. Porém, segundo os referidos autores, não está claro se a freqüência aumentada desta monossomia em doença mais avançada significa que a mesma tenha um papel específico no processo metastático ou se é meramente uma das manifestações de um aumento na complexidade cariotípica em

geral. A monossomia do cromossomo 17 foi detectada em casos de ginecomastia, doença fibrocística, fibroadenoma, carcinoma primário e metastático na análise realizada neste trabalho, sugerindo que a frequência aumentada desta aberração nas metástases pode ser um sinal do aumento da instabilidade genética que ocorre durante a progressão tumoral. Segundo os nossos resultados e aqueles relacionados à monossomia do 17 em tumores benignos (discutido anteriormente), esta aberração deve ser importante não só para o início da carcinogênese, mas também para a manutenção e progressão tumoral, mantendo-se como uma alteração clonal até a formação de metástases.

A trissomia do 17 foi observada em apenas seis carcinomas mamários primários e em um metastático (Pandis *et al.*, 1992b, 1995b, 1998; Teixeira *et al.*, 1997; Adeyinka *et al.*, 1998), em nenhum caso ela apareceu como aberração única, estando sempre acompanhada por alterações estruturais importantes em câncer de mama como o der(1;16). No único tumor deste trabalho onde foi encontrada a trissomia clonal do cromossomo 17 (caso 9), esta também esteve acompanhada por várias outras alterações numéricas e de uma aberração estrutural. O ganho do braço longo do 17 foi encontrado por outros pesquisadores na forma de i(17q) em câncer de mama (Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Hill *et al.*, 1987; Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Bernardino *et al.*, 1997). Uma outra forma de amplificação de material do 17 foi descrita no trabalho de Bernardino *et al.* (1998) que descreveram a ocorrência freqüente de hsr em ambos os braços do cromossomo 17. A maioria destas hsr continham seqüências do próprio cromossomo 17, sendo que o gene *ERRBB2* (em 17q21) estava altamente amplificado. Os autores chegaram à conclusão de que hsr em 17p podem corresponder a sítios de amplificação *in situ* originadas por deleções da região distal de 17p e amplificação de genes alvos, entretanto hsr em 17q2 aparece sem a ocorrência de uma deleção distal, o que está de acordo com outros dados citogenéticos mostrando que o braço cromossômico 17q é raramente perdido em câncer de mama. No estudo de Bernardino *et al.* (1998) foram observadas amplificações de seqüências do cromossomo 17, principalmente de 17q21-23 e dos genes *GHI* (em 17q22) e *ERRBB2*, em hsr localizadas também no cromossomo 8.

Perda de material no braço curto do cromossomo 17 resultante de deleções, translocações não balanceadas, presença de i(17)(q) ou da formação de hsr(17p) foi observada num caso de câncer de mama masculino (Mitchell, 1990), em vários carcinomas primários e em dois carcinomas metastáticos da mama feminina (Rodgers *et*

al., 1984; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1995a,b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1996a; Bernardino *et al.*, 1997). A del(17)(p12), observada em um dos nossos casos, e a del(17)(p11) foram detectadas em outros seis e oito casos de câncer de mama, respectivamente (Mitelman *et al.*, 1997a).

No estudo realizado por Steinarsdóttir *et al.* (1995), cerca de 40% dos casos de câncer de mama anormais citogeneticamente apresentaram alterações no cromossomo 17, sendo que as principais aberrações levaram a perdas do cromossomo inteiro ou do braço curto. Num estudo das alterações em TP53 em câncer de mama foi encontrada uma associação significativa entre mutações no gene e desequilíbrio alélico em ambos os braços do 17 (Thorlacius *et al.*, 1993; cf. Steinarsdóttir *et al.*, 1995). Além disso, foi demonstrado que alterações em TP53 estão significativamente associadas a alterações cromossômicas complexas em tumores primários da mama (Eyfjörð *et al.*, 1995; cf. Steinarsdóttir *et al.*, 1995). O fato de mutações em TP53 estarem associadas a um aumento na complexidade cariotípica durante a evolução do câncer de mama também foi demonstrado por Bernardino *et al.* (1998) que ao estudarem um carcinoma primário e sua metástase, encontraram na última alterações que levavam à perda de 17p que não foram detectadas no tumor primário. Considerando-se as frequências de LOH em 17p (Deville & Cornelisse, 1994) e de mutações em TP53 (Berns *et al.*, 1996; cf. Bernardino *et al.*, 1998) nos casos de câncer de mama, Bernardino *et al.* (1998) resolveram avaliar a quantidade da proteína p53 nos tecidos do tumor primário e da metástase e constataram que os rearranjos citogenéticos que levaram à perda de 17p no tumor secundário eram acompanhados por uma expressão aumentada da proteína, que está correlacionada com mutação no gene TP53.

O caso 12 apresentado neste trabalho, com a del(17)(p12), era um tumor de grau III, de tamanho grande e que apresentou metástase em linfonodos. As únicas pacientes que tiveram recorrência da doença, cujos tumores foram analisados por Rodgers *et al.* (1984) apresentaram alterações que levaram à perda de 17p. O caso com del(17)(p12) descrito por Lu *et al.* (1993) também apresentou o envolvimento de metástases em linfonodos. Não houve informação disponível para verificarmos se os outros carcinomas com deleção em 17p também possuíam metástase em linfonodo ou recorrência da doença. Porém, podemos supor, baseados no caso apresentado neste trabalho e pelos outros dois grupos de pesquisadores acima citados, que a monossomia de 17p está associada à presença de doença mais agressiva. Podemos especular ainda que a

importância da monossomia do 17, presente em todos os casos que apresentavam comprometimento do linfonodo, foi devido à perda de importantes genes supressores localizados em 17p e não em 17q. Todas estas suposições estão de acordo com os resultados obtidos por Takita *et al.* (1992) que investigaram LOH em 11p, 13q, 16q, 17p, e 17q, e indicaram uma associação significativa entre perda de supressores em 11p e 17p e metástases para linfonodos, sugerindo que a perda de 17p pode determinar a perda de 11p e que LOH em 11p e/ou 17p pode ser um bom marcador para se estimar o risco da presença de metástases em linfonodos e para o prognóstico da doença.

O segundo cromossomo mais envolvido tanto nas alterações clonais totais (numéricas e estruturais) como também somente nas numéricas foi o cromossomo X. A monossomia do X esteve presente em 15 das 135 (11,11%) células com aberrações clonais, trissomia em sete células (5,19%) e nenhuma aberração estrutural clonal envolvendo este cromossomo foi detectada. Apesar das aberrações do cromossomo X estarem presentes numa frequência relativamente alta das metáfases analisadas e de serem responsáveis pelas segundas maiores frequências de aberrações clonais totais (7,48%) e numéricas (7,97%), apenas três casos (37,5% dos tumores analisados) apresentaram alterações neste cromossomo: no caso 14 havia monossomia do X em 10% e trissomia em 14% das células analisadas; o caso 9 apresentou perda do X em 21,05% das células e o caso 10 em 11,54% das metáfases analisadas.

Em torno de 15% dos 480 tumores primários referidos no início desta discussão apresentavam a monossomia clonal do cromossomo X e em 2,5% deles foi detectada a trissomia deste cromossomo incluindo três tumores de mama masculinos neste último grupo (Dutrillaux *et al.*, 1986; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Pandis *et al.*, 1993a, 1995a,b, 1998; Bullerdiel *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1997, 1998; Cavalli *et al.*, 1997; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Adeyinka *et al.*, 1998; Bernardino *et al.*, 1997, 1998). Em carcinomas mamários metastáticos, a monossomia do X foi observada em nove casos (15,8% dos casos revisados por nós) e a trissomia em quatro casos (7,02%) (Tarkkanen *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1998; Adeyinka *et al.*, 1996; Bernardino *et al.*, 1997).

Pandis *et al.* (1995a) encontraram a monossomia do cromossomo X em 11 tumores mamários, sendo que no mapa de desequilíbrios genéticos originados por aberrações estruturais e numéricas em 103 casos descritos por eles, a monossomia do cromossomo X sugere uma ocorrência não casual. Entretanto, verifica-se que é difícil

encontrar esta aberração como uma anomalia única no cariótipo, o que levou os autores a sugerirem que a monossomia do X é uma alteração secundária.

Cavalli *et al.* (1997) também detectaram uma alta frequência de tumores primários com $-X$, alteração encontrada em todos os tipos histológicos de câncer de mama (exceto lobular) analisados. Os referidos autores tiveram o cuidado de ressaltar que esta aberração foi descrita em vários outros tipos tumorais e que se tem questionado se ela é ou não característica de células neoplásicas. Porém, baseados nos resultados de uma análise de LOH e no mapeamento de deleção no cromossomo X em câncer de mama (Loupart *et al.*, 1995;cf. Cavalli *et al.*, 1997) que revelou uma alta frequência de perdas em algumas regiões do X, Cavalli *et al.* (1997) concluíram que devem existir genes supressores tumorais de importância na carcinogênese mamária localizados neste cromossomo.

Bernardino *et al.* (1997) também apresentaram informações sobre o envolvimento do cromossomo X em células neoplásicas. Estes autores detectaram monossomia do X e uma translocação X;21 num tumor primário de mama e nos dois clones anormais encontrados na sua metástase em linfonodo, indicando que as células com X alterado numérica e estruturalmente invadiram o linfonodo num estágio inicial da evolução tumoral.

Poucos tumores primários de mama feminina apresentaram a trissomia do X. Thompson *et al.* (1993) encontraram esta aberração como única anomalia em 80% das células de um carcinoma ductal infiltrante grau III retirado de uma mulher de 42 anos de idade. Apesar dos autores não terem analisado citogeneticamente o sangue periférico da paciente, eles supuseram que $+X$ poderia ser uma aberração constitucional. Em um dos seis carcinomas com $+X$ analisados por Pandis *et al.* (1995a), a trissomia deste cromossomo também apareceu como anomalia única, porém os autores não discutiram a relevância desta alteração e nem mencionaram o cariótipo constitucional da paciente. Os outros casos de câncer de mama feminino com $+X$, encontrados na análise de 480 tumores, conforme já nos referimos, apresentaram várias outras aberrações estruturais e numéricas clonais características de câncer de mama e nesses casos também não foram mencionados os cariótipos constitucionais das pacientes. A trissomia do X foi detectada por nós num carcinoma ductal infiltrante grau III de uma paciente de 74 anos de idade (caso 14). Além desta alteração, observamos também as monossomias dos cromossomos 11 e 17 e a trissomia do 18 que são frequentes em câncer de mama. Devido ao óbito da paciente, não foi possível avaliarmos se $+X$ era constitucional,

porém devemos salientar que a frequência das células com aneuploidias do X aumenta com a idade, particularmente em indivíduos com mais de 60 anos de idade (Fitzgerald, 1983; cf. Barrios *et al.*, 1991).

Apesar dos estudos citogenéticos em câncer de mama masculino serem escassos, pode-se perceber que a trissomia do cromossomo X vem se caracterizando como uma aberração cromossômica não casual. Esta aberração foi detectada em três casos pela análise citogenética convencional (Dutrillaux *et al.*, 1986; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 1998) e em três casos analisados com a técnica de FISH (Balazs *et al.*, 1991; Wolman *et al.*, 1995). Dutrillaux *et al.* (1986) e Gerbault-Seureau *et al.* (1987) avaliaram os cariótipos constitucionais de dois pacientes, cujos tumores mamários apresentaram +X, encontraram todas as células do sangue periférico com 46,XY e puderam afastar a possibilidade da ocorrência da Síndrome de Klinefelter (47,XXY). Dutrillaux *et al.* (1986) demonstraram que o X adicional num carcinoma de mama masculino e em outros tipos tumorais analisados por eles eram ativos. Teixeira *et al.* (1998) salientaram que o fato do X se apresentar trissômico em células de câncer de mama masculino é interessante porque pacientes com a Síndrome de Klinefelter (47,XXY) têm um alto risco de desenvolver carcinoma mamário.

O cromossomo 18 apresentou a mesma frequência de aberrações totais do cromossomo X, ou seja foi responsável por 7,48% de todas as aberrações clonais detectadas neste trabalho. Porém, diferente do que foi observado no X, foi detectada, além de monossomia (em 10 metáfases) e trissomia (em 10 metáfases), uma alteração estrutural envolvendo o braço curto do 18 em duas metáfases, que correspondeu a 7,7% de todas as aberrações estruturais clonais detectadas nos tumores malignos. As aberrações do cromossomo 18 estiveram presentes em três carcinomas (37,5% dos casos): o caso 13 apresentou +18 em 15% das metáfases, o caso 14 apresentou -18 em 14% e +18 em 8% das metáfases e o caso 15 tinha -18 em 7,5% e a del(18)(p11) em 5% do total de metáfases analisadas.

A monossomia do 18 também foi observada com várias outras aberrações em casos de câncer de mama primário (Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1993b, 1995a,b, 1998; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995; Cavalli *et al.*, 1997; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Bernardino *et al.*, 1997, 1998) e em tumores metastáticos (Trent *et al.*, 1993; Adeyinka *et al.*, 1996; Pandis *et al.*, 1998).

A monossomia do cromossomo 18 foi uma das alterações numéricas mais

freqüentemente observadas nos casos de metástases mamárias descritos por Trent *et al.* (1993). Em outro estudo (Pandis *et al.*, 1998) onde foram analisadas amostras de tumores primários e suas metástases correspondentes, -18 foi observada em três casos, tanto nos cânceres primários como nas suas respectivas metástases. Esta aberração, no entanto, foi detectada adicionalmente somente em outras duas metástases, não estando presente nos seus tumores primários, o que pode indicar que esta aberração surgiu como uma das manifestações de um aumento na complexidade cariotípica em geral observada nas metástases.

A trissomia do cromossomo 18 caracteriza um subgrupo citogenético de carcinomas mamários e foi encontrada em 33 dos 480 carcinomas primários que revisamos, incluído um masculino (Geleick *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, 1995a, 1998; Bullerdiek *et al.*, 1993, 1994; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1997; Adeyinka *et al.*, 1997, 1998; Teixeira *et al.*, 1998) e em apenas um carcinoma metastático (Zhang *et al.*, 1989).

Geleick *et al.* (1990) detectaram +18, como única aberração clonal, num carcinoma medular de grau III com envolvimento do linfonodo axilar. Pandis *et al.* (1993a) observaram +18 num carcinoma ductal grau II e em outro ductal de grau III, ambos com metástases no linfonodo, e num terceiro carcinoma ductal grau III sem a presença de invasão de linfonodo. Bullerdiek *et al.* (1994) encontraram +18 como única anomalia num caso de carcinoma medular tipo II com estroma linfóide e linfonodo negativo. Estes autores indicaram +18 como a primeira anormalidade citogenética que pode ter uma função importante na gênese de carcinomas medulares e acrescentaram que esta alteração pode atuar como uma anormalidade primária ou secundária na gênese de outros tipos de câncer de mama. Numa série de 39 carcinomas de mama com aberrações cromossômicas descrita por Rohen *et al.* (1995b), 10 apresentaram trissomia clonal do 18, sendo que em seis deles esta foi a única aberração encontrada. Uma situação similar foi observada na série de 79 casos anormais descrita por Pandis *et al.* (1995a), onde foi encontrada esta trissomia em sete carcinomas, em três foi a única anomalia encontrada e em outros dois foi a única num dos clones. Estes resultados levaram os autores a considerarem a trissomia do cromossomo 18 como associada de forma não casual aos carcinomas mamários.

Adeyinka *et al.* (1998), avaliando as características citogenéticas de câncer de mama invasivo de tipos histológicos que têm um bom prognóstico (medular, mucinoso,

papilar, tubular e cibreforme), indicaram +18 como uma aberração recorrente em carcinomas medulares e tubulares.

Pandis *et al.* (1998), comparando tumores primários e metastáticos, encontraram o seguinte cariótipo 47-48, XX, +18 [cp2] em um dos clones de um tumor primário, porém o mesmo não foi observado na sua metástase de linfonodo.

Nossos dados ressaltaram mais uma vez a importância da trissomia do 18 em câncer de mama. Esta foi a única trissomia recorrente encontrada nos tumores malignos analisados, observada em dois carcinomas ductais invasores de grau III que apresentavam metástases em linfonodos (casos 13 e 14), caracterizados também por um grande número de perdas cromossômicas e pela ausência de alterações estruturais clonais. Como foi discutido anteriormente, +18 também está presente entre as alterações mais frequentemente observadas em doença fibrocística da mama e fibroadenomas, sendo que neste trabalho também detectamos esta aberração nas mesmas doenças benignas da mama. Estes fatos fortalecem ainda mais a hipótese de que esta trissomia realmente seja uma alteração primária em câncer de mama.

O único carcinoma de mama metastático analisado no nosso trabalho apresentou, além da monossomia do 18, uma alteração estrutural envolvendo o braço curto deste cromossomo, del(18)(p11). Bernardino *et al.* (1997) observaram deleção no braço curto do 18, envolvendo justamente a banda 18p11, der(18)t(1;18)(q11;p11), em 20 células de um câncer de mama primário, sendo que em um dos clones da metástase deste tumor foi detectada outra alteração, der(18)t(12;18)(q12;p1), que levou à perda de todo o braço curto do 18. A del(18)(p11) também foi observada num carcinoma intraductal sem envolvimento de linfonodo na série descrita por Cavalli *et al.* (1997) e em outros dois carcinomas mamários, segundo a revisão de Mitelman *et al.* (1997a) que analisaram em conjunto 455 casos de câncer de mama citogeneticamente anormais descritos até junho de 1996. Translocações envolvendo 18p11 foram descritas em poucos casos de câncer de mama, incluindo um carcinoma masculino (Mitchell, 1990; Pandis *et al.*, 1995a; Rohen *et al.*, 1995b). No caso que descrevemos, infelizmente, não tivemos condições de analisar citogeneticamente o tumor primário da paciente, portanto não pudemos avaliar a relação clonal entre as duas lesões e nem se a del(18)(p11) era característica também do tumor primário ou se era uma aberração tardia no processo tumoral, consequência da alta instabilidade das células metastáticas.

As alterações detectadas no cromossomo 15 foram responsáveis por 7,14% das alterações observadas neste trabalho, sendo que a frequência de alterações numéricas

no 15 (7,61%) foi a terceira mais alta. Vinte e uma metáfases (15,56% do total de metáfases com aberrações clonais) apresentaram monossomia do cromossomo 15 e dois (1,48%) uma alteração estrutural envolvendo a região centromérica deste cromossomo. Quatro tumores (50% dos casos) apresentaram a monossomia do 15: o caso 9 apresentou -15 em 47,37% das células, o caso 12 em 26,67%, o caso 13 em 10% e o caso 14 em 8%. A aberração estrutural envolvendo o 15, der(12;15)(q10;q10), foi detectada em 10,53% das metáfases do caso 9.

A monossomia do 15 foi descrita em 42 dos 480 tumores primários por nós revisados (Rodgers *et al.*, 1984; Dutrillaux *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1993b, 1995a,b, 1998; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1997; Cavalli *et al.*, 1997; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Bernardino *et al.*, 1998) e em 11 carcinomas mamários metastáticos (Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1998).

A monossomia do cromossomo 15 foi uma das aberrações mais freqüentes no estudo citogenético em câncer de mama realizado por Steinarsdóttir *et al.* (1995) que compararam os resultados obtidos a partir da preparação direta das células tumorais e após cultura a curto prazo. Os autores constataram também que aberrações no cromossomo 15 foram mais freqüentes nas células cujas metáfases foram obtidas a partir de preparação direta e que pacientes com uma história familiar de câncer de mama mostraram uma freqüência mais alta de alterações estruturais dos cromossomos 1, 3 e 15. A monossomia do 15 foi uma das três aberrações numéricas mais comuns nos carcinomas metastáticos da mama descritos por Trent *et al.* (1993).

Apesar da monossomia do cromossomo 15 ter sido descrita em vários carcinomas da mama, ela nunca apareceu como anomalia única, sempre esteve presente com várias outras aberrações, indicando que esta monossomia não é tão importante patogeneticamente na carcinogênese mamária. Nos tumores malignos analisados neste trabalho a monossomia do cromossomo 15 também esteve presente junto com outras aberrações que consideramos de maior importância: com o der(12;15) e -X no caso 9, com a del(17)(p12) e -17 no caso 12, com as trissomias do 8 e 18 no caso 13, e com -17 e +18 no caso 14. Entretanto, a região centromérica do 15 foi indicada por Pandis *et al.* (1995a) como freqüentemente envolvida em rearranjos estruturais em casos de câncer de mama, e, além disso, o mapa de desequilíbrio cromossômico realizado por estes mostrou que, ao lado dos ganhos de 1q e perdas de 1q, 3p, 6q, e 16q, rearranjos

no 15 (7,61%) foi a terceira mais alta. Vinte e uma metáfases (15,56% do total de metáfases com aberrações clonais) apresentaram monossomia do cromossomo 15 e dois (1,48%) uma alteração estrutural envolvendo a região centromérica deste cromossomo. Quatro tumores (50% dos casos) apresentaram a monossomia do 15: o caso 9 apresentou -15 em 47,37% das células, o caso 12 em 26,67%, o caso 13 em 10% e o caso 14 em 8%. A aberração estrutural envolvendo o 15, der(12;15)(q10;q10), foi detectada em 10,53% das metáfases do caso 9.

A monossomia do 15 foi descrita em 42 dos 480 tumores primários por nós revisados (Rodgers *et al.*, 1984; Dutrillaux *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1993b, 1995a,b, 1998; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1997; Cavalli *et al.*, 1997; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Bernardino *et al.*, 1998) e em 11 carcinomas mamários metastáticos (Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1998).

A monossomia do cromossomo 15 foi uma das aberrações mais freqüentes no estudo citogenético em câncer de mama realizado por Steinarsdóttir *et al.* (1995) que compararam os resultados obtidos a partir da preparação direta das células tumorais e após cultura a curto prazo. Os autores constataram também que aberrações no cromossomo 15 foram mais freqüentes nas células cujas metáfases foram obtidas a partir de preparação direta e que pacientes com uma história familiar de câncer de mama mostraram uma freqüência mais alta de alterações estruturais dos cromossomos 1, 3 e 15. A monossomia do 15 foi uma das três aberrações numéricas mais comuns nos carcinomas metastáticos da mama descritos por Trent *et al.* (1993).

Apesar da monossomia do cromossomo 15 ter sido descrita em vários carcinomas da mama, ela nunca apareceu como anomalia única, sempre esteve presente com várias outras aberrações, indicando que esta monossomia não é tão importante patogeneticamente na carcinogênese mamária. Nos tumores malignos analisados neste trabalho a monossomia do cromossomo 15 também esteve presente junto com outras aberrações que consideramos de maior importância: com o der(12;15) e -X no caso 9, com a del(17)(p12) e -17 no caso 12, com as trissomias do 8 e 18 no caso 13, e com -17 e +18 no caso 14. Entretanto, a região centromérica do 15 foi indicada por Pandis *et al.* (1995a) como freqüentemente envolvida em rearranjos estruturais em casos de câncer de mama, e, além disso, o mapa de desequilíbrio cromossômico realizado por estes mostrou que, ao lado dos ganhos de 1q e perdas de 1q, 3p, 6q, e 16q, rearranjos

estruturais também parecem levar a perdas não casuais de 1p, 8p, 11p, 11q, 15p, 17p, 19p, e 19q.

Nós detectamos uma alteração estrutural na região centromérica do cromossomo 15 que levou à perda de 15p: o der(12;15)(q10;q10). Esta aberração foi descrita recentemente em outro caso de câncer de mama (Bernardino *et al.*, 1998), sendo que no mesmo trabalho foi também observado o der(15;22)(q10;q10). Pandis *et al.* (1995a) descreveram um der(12;15) num carcinoma ductal, com pontos de quebra diferentes, mas que também levou à perda de 15p, além disso, estes autores demonstraram a ocorrência de outros rearranjos envolvendo 15q10, entre eles: i(15)(q10), der(8;15)(q10;q10), der(14;15)(q10;q10), etc. Outros pesquisadores (Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1996a,1997; Pandis *et al.*, 1998) também detectaram o envolvimento de 15q10 e perda de 15p em várias alterações estruturais em carcinomas mamários.

O cromossomo 19 esteve envolvido em alterações em cinco (62,5%) dos oito carcinomas apresentados neste trabalho, porém somente monossomias deste cromossomo foram detectadas como alterações clonais, presentes em 20 (14,82%) das 135 metáfases alteradas e responsáveis por 6,8% das alterações totais e por 7,25% das numéricas. A monossomia clonal do cromossomo 19 foi detectada em 26,67% das metáfases do caso 8, em 7,69% do caso 10, em 33,33% do caso 12, 7,5% do caso 13 e em 10% do caso 15.

A monossomia do 19 foi freqüentemente observada em carcinomas primários da mama (Rodgers *et al.*, 1984; Dutrillaux *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1993a, 1995a,b, 1998; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1997; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Adeyinka *et al.*, 1998; Bernardino *et al.*, 1998), na maioria dos casos fazendo parte de um cariótipo complexo. Porém, esta aberração foi descrita como única num dos clones anormais de um carcinoma papilar (Adeyinka *et al.*, 1998) e também em carcinomas ductais infiltrantes (Thompson *et al.*, 1993; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1997).

Cavalli *et al.* (1997) encontraram a monossomia do cromossomo 19 em todos os tipos histológicos de tumores mamários por eles analisados, exceto no carcinoma lobular, porém os autores acreditam que esta aberração possa ser resultado do tempo de cultura *in vitro* e/ou da instabilidade causada por hsr localizadas em 19q.

A monossomia do cromossomo 19 foi observada como anomalia única num dos clones de um carcinoma de mama metastático (Adeyinka *et al.*, 1996) e como parte de

um cariótipo complexo em outras nove metástases da mama (Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1998). Os tumores primários dos quais as metástases se originaram e que foram analisados citogeneticamente também apresentaram a monossomia deste cromossomo (Pandis *et al.*, 1998).

Apesar da monossomia do cromossomo 19 poder ser resultado do tempo de cultura, acreditamos que se deve dar mais atenção às perdas deste cromossomo, principalmente pelo fato de já se ter encontrado -19 como anomalia única em alguns casos, pela sua ocorrência em tumores benignos (verificada neste e em outros trabalhos) e pela observação de Pandis *et al.* (1995a) que admitem que perdas não casuais de 19p e 19q são freqüentemente originadas pelos rearranjos estruturais em câncer de mama. Portanto, algum gene supressor tumoral, de importância na iniciação da carcinogênese mamária, pode estar localizado no cromossomo 19.

Neste trabalho, vinte alterações numéricas clonais foram identificadas no cromossomo 21, dezoito monossomias e duas trissomias. Nenhuma aberração estrutural envolvendo este cromossomo foi observada. A monossomia do cromossomo 21 foi detectada em quatro (50%) tumores malignos da mama analisados, estando presente em 9,61% das células do caso 10, em 20% no caso 12, em 10% no caso 13 e em 12% no caso 14. Trissomia clonal do cromossomo 21 foi observada apenas no caso 12, em 13,33% das metáfases analisadas.

A monossomia do 21 foi descrita em 35 carcinomas primários da mama e a trissomia deste cromossomo em 13 (Dutrillaux *et al.*, 1990; Geleick *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1992b, 1995a, b, 1998; Bullerdiel *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Adeyinka *et al.*, 1997; Bernardino *et al.*, 1997, 1998; Cavalli *et al.*, 1997). Em relação aos carcinomas mamários metastáticos, -21 foi observada em 14 casos e +21 em três (Trent *et al.*, 1993; Adeyinka *et al.*, 1996; Bernardino *et al.*, 1997; Pandis *et al.*, 1998).

A monossomia do cromossomo 21 foi a única aberração clonal detectada num carcinoma ductal invasor por Geleick *et al.* (1990) e esteve presente como parte de cariótipos complexos em carcinomas bilaterais (Pandis *et al.*, 1995b). Nos outros carcinomas, a monossomia do 21 ocorreu associada a outras alterações estruturais e/ou numéricas, sendo que nenhum autor ressaltou sua importância na carcinogênese mamária. Também no nosso estudo, a monossomia do cromossomo 21 ocorreu em tumores que apresentaram alterações consideradas de maior relevância no câncer de mama, portanto é necessário esclarecer o significado da alta freqüência desta

monossomia nos carcinomas mamários.

A mesma situação se repete com relação à trissomia do 21 sempre presente em cariótipos complexos e aparentemente sem uma importância fundamental na tumorigênese mamária. Neste trabalho ela foi detectada num tumor (caso 12) que apresentava muitas perdas cromossômicas, em que a del(17)(p12) pareceu ser a aberração principal.

As aberrações detectadas no cromossomo 8 foram responsáveis por 6,12% das aberrações totais, por 4,71% das numéricas e por 19,23% das estruturais, e foram observadas em 50% dos tumores malignos analisados neste trabalho. Monossomia clonal do cromossomo 8 foi detectada em dois casos: em 7,69% das células do caso 10 e em 12% das células do caso 14. A trissomia do 8 foi observada em apenas um caso, em 7,5% das metáfases do caso 13, e uma aberração estrutural clonal, del(8)(q23), foi identificada em 12,5% das células do caso 15.

Alterações numéricas envolvendo o cromossomo 8 são freqüentemente observadas em câncer de mama, sendo que 55 e 31 casos primários da doença, dos 480 que revisamos, apresentaram monossomia e trissomia, respectivamente, deste cromossomo (Rodgers *et al.*, 1984, 1985; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Hill *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a, b, 1995a,b, 1998; Bullerdiel *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1997, 1998; Cavalli *et al.*, 1995, 1997; Rohen *et al.*, 1995b; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 1996b; Adeyinka *et al.*, 1998; Bernardino *et al.*, 1997, 1998). Dez e cinco carcinomas mamários metastáticos apresentaram, respectivamente, monossomia e trissomia do cromossomo 8 (Trent *et al.*, 1993; Pandis *et al.*, 1998; Adeyinka *et al.*, 1996; Bernardino *et al.*, 1997).

O cromossomo 8 foi o mais freqüentemente perdido nos tumores mamários no grau diplóide analisados por Rodgers *et al.* (1994) e também naqueles no grau triplóide/tetraplóide descritos por Hill *et al.* (1987), o que sugere, segundo os últimos autores, o envolvimento não casual desta monossomia neste tipo tumoral. Na grande série de carcinomas mamários analisados citogeneticamente por Pandis *et al.* (1995a), a monossomia do cromossomo 8 ocorreu não casualmente, porém não foi encontrada como anomalia única em nenhum dos casos, o que levou os autores a considerá-la como uma aberração secundária em câncer de mama. Dois tumores primários e suas metástases correspondentes descritos por Pandis *et al.* (1998) apresentaram a monossomia do cromossomo 8. Porém, esta aberração foi observada adicionalmente em

outras duas metástases, porém não nos tumores primários, fortalecendo a sugestão de que -8 é uma aberração secundária.

Bullerdiak *et al.* (1993) analisando citogeneticamente 15 tumores malignos, encontraram aberrações cromossômicas clonais em quatro deles. Em dois casos com envolvimento de linfonodo, estes autores observaram a trissomia do 8 como a única alteração cariotípica, sugerindo a sua associação a um subgrupo particular de carcinomas ductais. Bullerdiak *et al.* (1993) acrescentaram ainda que +8 pode estar mais relacionada com a proliferação celular do que com o processo de malignização. Num trabalho descrito por Rohen *et al.* (1995b), a trissomia do cromossomo 8 esteve presente como aberração clonal em 10 casos de carcinoma ductal invasor e em um caso de carcinoma lobular invasivo. Cavalli *et al.* (1997) encontraram esta trissomia em 4/15 carcinomas ductais invasores por eles analisados, sendo que dois deles apresentaram metástases em linfonodo axilar, como aconteceu no caso 13 descrito neste trabalho e que tem esta trissomia e o envolvimento do linfonodo. A trissomia do cromossomo 8 foi observada em casos de carcinoma tubular, medular, mucinoso (Pandis *et al.*, 1995a; Rohen *et al.*, 1995b; Adeyinka *et al.*, 1998) e está entre as 11 alterações citogenéticas mais recorrentes em câncer de mama, caracterizando um subgrupo citogenético.

Cerca de 60% dos casos de câncer de mama contém hsr em 8p1, porém, segundo o trabalho de Bernardino *et al.* (1998), somente a minoria delas apresentava seqüências de DNA provenientes do cromossomo 8 e quando isto aconteceu, era o gene FGFR1 (8p1) que estava amplificado. Portanto não podemos considerar que o efeito patogênético das hsr(8) seja o mesmo das trissomias do 8.

A del(8)(q23) encontrada no único carcinoma metastático analisado neste trabalho, foi detectada também por Bernardino *et al.* (1998) num tumor primário e também por Hainsworth *et al.* (1991) num carcinoma ductal infiltrante grau II de uma paciente com 71 anos de idade. A del(8)(q22), cuja consequência é a perda da região distal de 8q, foi descrita num caso de câncer de mama por Hill *et al.* (1987). Outras aberrações estruturais do cromossomo 8, como translocações envolvendo a região centromérica e isocromossomos 8q, têm sido descritas em tumores mamários primários e metastáticos (Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Pandis *et al.*, 1992b, 1993a,b, 1995a; Thompson *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Muleris *et al.*, 1994; Adeyinka *et al.*, 1996; Bernardino *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 1998) que levam principalmente à perda de 8p e ganho de 8q. De acordo com a revisão que realizamos sobre os dados citogenéticos de 480 tumores, esta aberração estrutural não foi descrita

em nenhum dos outros carcinomas mamários metastáticos publicados até o momento e nem a banda 8q23 esteve envolvida em outro tipo de rearranjo.

O cromossomo 22 se apresentou alterado numa alta porcentagem de tumores apresentados neste trabalho, em 62,5% dos casos ou seja, em cinco dos oito tumores malignos analisados. A monossomia do cromossomo 22, o único tipo de aberração observada, esteve presente em 17 (12,60%) das 135 metáfases alteradas e sendo responsável por 5,78% das aberrações totais e por 6,16% das numéricas. Monossomias clonais do 22 foram detectadas em 15,79% das células do caso 9, em 26,67% do caso 12, 10% do caso 13, 12% do caso 14 e em 7,5% das metáfases do caso 15.

A monossomia do cromossomo 22 foi descrita em outros 63 tumores primários da mama (Rodgers *et al.*, 1984; Dutrillaux *et al.*, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Pandis *et al.*, 1993a, b, 1995a, 1998; Lu *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1996a, 1997; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Cavalli *et al.*, 1997; Adeyinka *et al.*, 1998; Bernardino *et al.*, 1998) e em 13 carcinomas mamários metastáticos (Tarkkanen *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Adeyinka *et al.*, 1996; Bernardino *et al.*, 1997; Pandis *et al.*, 1998).

Como foi discutido anteriormente, a monossomia do cromossomo 22 é freqüentemente encontrada em tumores mesenquimais benignos, sendo que esta aberração também ocorre não casualmente em câncer de mama primário, sendo considerada como uma anomalia secundária na carcinogênese mamária por ser raramente detectada como anomalia única (Pandis *et al.*, 1995a). Monossomia clonal do 22 foi observada em todos os tipos histológicos de tumores mamários analisados por Cavalli *et al.* (1997), exceto no lobular, e foi encontrada em 50% dos tumores da série descrita por Bernardino *et al.* (1998).

A monossomia do 22 foi uma das alterações clonais observadas no carcinoma metastático descrito neste trabalho e tem se mostrado como uma aberração recorrente também nas outras metástases analisadas. Trent *et al.* (1993), descrevendo alterações cariotípicas clonais em 34 casos de doença metastática, observaram a monossomia do 22 em seis casos. Tarkkanen *et al.* (1993) e Adeyinka *et al.* (1996) detectaram -22 em cariótipos complexos de metástases mamárias ósseas. Bernardino *et al.* (1997) observaram -22 numa metástase de linfonodo, porém a mesma não esteve presente no cariótipo do tumor de mama primário.

Pandis *et al.* (1998) indicaram a monossomia parcial ou total do 22 como uma aberração que ocorre muito mais freqüentemente no câncer de mama metastático do que

no primário. Segundo os autores, a monossomia do cromossomo 22 ocorreu tanto no tumor primário quanto nas suas metástases de linfonodo, o que sugere que ela possa ter uma função importante no estabelecimento das metástases, pois esta perda foi encontrada pelo mesmo grupo (Pandis *et al.*, 1995a) em torno de 10% de carcinomas mamários não selecionados, uma frequência baixa comparada ao aparecimento desta aberração em 63,64% dos carcinomas que têm envolvimento do linfonodo. No nosso estudo somente um dos cinco carcinomas mamários que possuíam metástases em linfonodo não apresentou a monossomia do 22 no seu cariótipo.

Pandis *et al.* (1998) não esclareceram se a frequência aumentada da monossomia do 22 em doença mais avançada significa uma função específica para ela no processo metastático ou se é meramente uma das manifestações de um aumento geral na complexidade cariotípica. De qualquer maneira, as possíveis alterações no nível gênico que poderiam predispor ao aparecimento de metástases quando há monossomia do cromossomo 22 são desconhecidas.

As aberrações envolvendo o cromossomo 10 apresentaram uma frequência próxima daquelas observadas nos mais frequentemente envolvidos, 5,78% das alterações totais e 6,16% das numéricas. Foram observadas monossomias deste cromossomo em nove (6,67%) e trissomia em oito (5,93%) das 135 células com aberrações clonais. O cromossomo 10 se apresentou alterado em quatro carcinomas (50% da amostra), sendo observadas monossomias em 20% das células do caso 8, em 20% do caso 12 e em 6% do caso 14 e a trissomia do 10 apareceu em 15,38% do total de células analisadas do caso 10.

Alterações numéricas do cromossomo 10 foram observadas em relativamente poucos casos de câncer de mama primário, monossomias em 36 casos e trissomias em apenas 10 casos (Rodgers *et al.*, 1984; Dutrillaux *et al.*, 1990; Mitchell & Santibanez-Koref, 1990; Pandis *et al.*, 1993b, 1995a,b, 1998; Thompson *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1997; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Adeyinka *et al.*, 1997, 1998; Bernardino *et al.*, 1997, 1998; Cavalli *et al.*, 1997). A mesma situação se repetiu nos 57 carcinomas mamários metastáticos que revisamos, oito apresentaram a monossomia do cromossomo 10 e apenas dois casos a trissomia deste cromossomo (Tarkkanen *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1993; Bernardino *et al.*, 1997; Pandis *et al.*, 1998).

No estudo comparativo entre os cariótipos obtidos a partir de preparação direta e cultura a curto prazo realizado por Steinarsdóttir *et al.* (1995), as aberrações no cromossomo 10 foram mais frequentes nas células de preparação direta, sendo que

trissomias foram pouco comuns de uma maneira geral. Na preparação direta, +10 foi observada em dois casos (em um deles como única anomalia).

Usando uma técnica de CGH modificada para estudar carcinomas que tenham hsr, Muleris *et al.* (1994) encontraram uma frequência alta de amplificação em 10q22, compatível com a amplificação recorrente de genes em 10q indicada pela descrição de amplificação de FGFR2 (Adnane *et al.*, 1991; cf. Muleris *et al.*, 1994).

Considerando-se somente as alterações estruturais e retirando-se os cromossomos marcadores, o cromossomo 12, juntamente com o 8, foi o mais alterado, sendo responsável por 19,23% das aberrações estruturais observadas nos tumores malignos. Duas aberrações diferentes levando à perda de material cromossômico em 12p foram detectadas: o der(12;15)(q10;q10) em 10,53% das células do caso 9 e a del(12)(p12) em 5,77% das células do caso 10. Além destas aberrações estruturais, o cromossomo 12 esteve envolvido em aberrações numéricas em um caso, como monossomia em 21,05% do total de células analisadas no caso 9.

Alterações envolvendo 12p são freqüentes tanto em alterações benignas (como discutido anteriormente) como em tumores malignos da mama (Rodgers *et al.*, 1984; Gerbault-Seureau *et al.*, 1987; Dutrillaux *et al.*, 1990; Mitchell, 1990; Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993; Muleris *et al.*, 1994; Pandis *et al.*, 1995a, 1998; Steinarsdóttir *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1996a, 1997, 1998; Adeyinka *et al.*, 1997, 1998; Bernardino *et al.*, 1998). Em carcinomas mamários metastáticos foi observada a presença de hsr em 12p por Trent *et al.* (1993), e uma aberração estrutural (add12p12) foi observada por Pandis *et al.* (1998) em outra metástase. Todos esses estudos demonstram o envolvimento comum da região 12p em câncer de mama, uma região altamente instável na carcinogênese mamária.

Como foi descrito anteriormente o der(12;15)(q10;q10) foi identificado em outro caso de câncer de mama (Bernardino *et al.*, 1998) e Pandis *et al.* (1995a) também descreveram um der(12;15) num carcinoma ductal, com pontos de quebra diferentes.

Teixeira *et al.* (1997) descreveram a del(12)(p12) num carcinoma papilífero *in situ*, sendo que esta aberração foi identificada em outros três carcinomas mamários (Lu *et al.*, 1993; Mitelman *et al.*, 1997a) e a del12p11 em quatro (Hainsworth *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1993).

A região 12p12-12p13.1 contém vários genes relacionados à transformação maligna (CCND2, FGF6, TEL, KIP1, KRAS2 and PTHLH) que constitutivamente estão envolvidos na regulação do ciclo celular e/ou na proliferação celular (Ponce-Castañeda

et al., 1995; Murty & Chaganti, 1998). Um mapa detalhado das alterações alélicas que ocorrem no braço curto do cromossomo 12 ainda não foi descrito em carcinomas mamários, porém Spirin *et al.* (1996) detectaram LOH no locus 12p13 em cinco amostras de câncer de mama, quatro das quais não apresentavam nenhuma alteração detectável em KIP1 sugerindo que outro gene supressor tumoral esteja possivelmente localizado nesta região cromossômica e pode estar freqüentemente alterado em câncer de mama. Numa série de cânceres de mama masculinos foram pesquisadas mutações no gene KRAS2 (Schroer *et al.*, 1993) e 13% dos tumores mostraram mutações no 12º codon deste gene.

Em somente um (12,5%) dos tumores malignos analisados neste trabalho foi detectada a presença de clones não relacionados citogeneticamente, uma freqüência relativamente baixa quando comparada com aquela encontrada por outros grupos, onde esta característica foi detectada em torno de 40% dos casos analisados que têm um cariótipo anormal (Pandis *et al.*, 1993a, 1995a, 1995b, 1998; Teixeira *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1997; Steinarsdóttir *et al.*, 1995). Este tipo de policlonalidade é raramente observado em neoplasias hematológicas e mesenquimais (Heim & Mitelman, 1995), mas tem sido descrito em carcinomas de outros sítios, como de cólon (Bardi *et al.*, 1995), pâncreas (Gorunova *et al.*, 1995) e de cabeça e pescoço (Jin *et al.*, 1995).

Finalmente, comparando as informações obtidas das aberrações numéricas e estruturais nas lesões benignas e malignas da mama, podemos constatar que nas benignas foram observadas 272 aberrações cromossômicas, sendo que 158 delas formaram clones com uma média igual a $22,57 \pm 14,27$ aberrações clonais por lesão e nas malignas, foram detectadas 475 aberrações cromossômicas, sendo que 302 formaram clones com uma média igual a $37,75 \pm 24,60$ alterações clonais por tumor. A diferença entre as médias, avaliada pelo teste t, indicou um valor não significativo ($t=1,43$; $0,20 > P > 0,10$). Nas lesões benignas foram identificadas, em 200 metáfases, 131 alterações numéricas (115 monossomias e 16 trissomias) e 27 estruturais. Nos tumores malignos, em 242 células analisadas, foram encontradas 276 alterações numéricas (230 monossomias e 46 trissomias) e 26 estruturais. Aplicando-se a estes dados o teste do X^2 verificou-se que as aberrações numéricas e estruturais não se distribuem igualmente em ambos os tipos de tumores ($X^2_1 = 7,33$; $P < 0,01$). Este valor foi devido principalmente aos resultados encontrados nos X^2 parciais (6,49) nas alterações estruturais. Comparando isoladamente a distribuição das monossomias e das trissomias nas lesões benignas e malignas, verificou-se um valor de $X^2_1 = 1,37$; $P > 0,10$, indicando que as

diferenças, em relação às aberrações numéricas, observadas nos dois tipos de lesões mamárias não são significativas. Portanto, as médias das alterações cromossômicas clonais observadas nas doenças benignas e malignas não diferiram significativamente. No entanto, enquanto que, em ambos os casos, as aberrações numéricas apresentaram-se igualmente distribuídas, o mesmo não aconteceu com as estruturais. Neste trabalho, as aberrações estruturais foram mais freqüentemente encontradas nas lesões benignas, o oposto do que ocorreu no trabalho descrito por Cavalli (1994) que encontrou uma maior freqüência de aberrações estruturais nos tumores malignos.

Nas 15 lesões mamárias estudadas foram identificados 11 pontos de quebra: Xq23, Xq26, 6q23, 8q23, 9q33, 12p12, 12q10, 13q22, 15q10, 17p12, 18p11. Dos 11 pontos de quebra identificados, cinco coincidiram com a localização de oncogenes (MCF2 ou DBL em Xq26.3-q27.1; MYB em 6q22-q23; EIF3S6 ou INT6 em 8q22-q23; KRAS2 em 12p12; YES1 em 18p11), um com a presença de um gene supressor tumoral (MCL em 18p11), um com a localização de genes que codificam receptores de fatores de crescimento (TGFB1 em 9q33-q34) e um com o loco do gene que codifica uma proteína de membrana (EMP1, CL-20 ou TMP em 12p12).

VI. CONCLUSÕES

Com o principal objetivo de ampliar o conhecimento citogenético sobre as lesões benignas e malignas da mama humana, analisamos citogeneticamente 7 lesões benignas da mama e 8 carcinomas mamários. As amostras dos tecidos tumorais foram coletadas 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 collagenase, seguida de cultura celular a curto-médio prazo. As metáfases foram analisadas com coloração convencional e com bandamento GTG.

Nas 7 lesões benignas analisadas, foram contados os cromossomos de 416 metáfases em coloração convencional, obtendo-se um número cromossômico modal igual a 46 em todos os casos. Das 416 células analisadas, 236 (56,73%) apresentaram 46 cromossomos, com frequências entre 32,81% (caso 4) a 78,33% (caso 6), 168(40,38%) células apresentaram número cromossômico próximo ao diplóide (35-57 cromossomos), com frequências variando de 21,67% (caso 6) a 59,38% (caso 2). Entre as células com número cromossômico próximo ao diplóide, as hipodiplóides (149) foram mais frequentes (88,69%) do que as hiperdiplóides (19 = 11,31%). As células com número cromossômico próximo ao haplóide (≤ 34), 2 = 0,48%, próximo ao triploide (58-80 cromossomos), 4 = 0,96% e próximo ao tetraploide (81-103 cromossomos), 6 = 1,44%, totalizaram 2,88% (12 células) das 416 estudadas. Duzentas células foram analisadas pelo emprego do bandamento GTG, das quais 87 (43,50%) eram normais, 40 (20%) pseudodiplóides, 71 (35,5%) apresentaram número cromossômico próximo ao diplóide, das quais 66 (92,96%) eram hipodiplóides e 5 (7,04%) hiperdiplóides. Uma célula (0,5%) apresentou 33 cromossomos e uma célula (0,5%) apresentou 91 cromossomos.

Nas lesões benignas houve uma diminuição da frequência de células consideradas com número cromossômico diplóide normal, quando analisadas com coloração comum e com bandamento GTG. Como esperado, esta diferença deve-se, principalmente, a inclusão na contagem de células sem bandamento de células pseudodiplóides não identificáveis nesta análise. As frequências de células com número cromossômico próximo ao diplóide e diferentes do diplóide não contribuíram de forma importante para as diferenças observadas nos dois tipos de análises das lesões benignas.

Nos 8 tumores malignos estudados foram analisados, utilizando-se coloração convencional, os cromossomos de 598 metáfases, um número cromossômico modal igual a 46 foi obtido em todos os casos. Duzentas e vinte e sete metáfases (38%) apresentaram um número cromossômico diplóide, duzentas e quarenta e três metáfases (40,64%) apresentaram um número cromossômico próximo ao diplóide (35-57 cromossomos), destas, 209 (86%) eram hipodiplóides e 34 (14%) hiperdiplóides. Sete células (1,2%) eram próximas ao haplóide (≤ 34 cromossomos), 29 (4,8%) apresentaram um número cromossômico próximo ao triplóide (58-80 cromossomos), 90 (15,1%) eram próximas ao tetraplóide (81-103 cromossomos) e 2 (0,3%) foram designadas como poliplóides. Duzentas e quarenta e duas células foram analisadas pelo bandamento GTG, das quais 85 (35,12%) eram normais, 44 (18,18%) eram pseudodiplóides, 111 (45,87%) apresentaram um número cromossômico próximo ao diplóide, das quais 101 (90,99%) eram hipodiplóides e 10 (9,01%) hiperdiplóides. Duas células (0,8%) apresentaram um número cromossômico próximo ao haplóide.

As diferenças entre as frequências de células diplóides normais e próximas a diplóide não foram importantes nas análises sem e com bandamento GTG nos tumores malignos, sendo importantes, no entanto, a ausência de células com números cromossômicos próximo ao triplóide e ao tetraplóide na análise com bandamento que chegaram a cerca de 20% das células analisadas sem o bandamento.

As frequências de células com diferentes graus de ploidia das alterações benignas e malignas da mama foram comparadas considerando-se os dois tipos de procedimentos metodológicos. Sem o bandamento GTG, o teste do X^2 aplicado aos valores observados (diplóides normais = 236 e 227; hipodiplóides = 149 e 209; hiperdiplóides = 19 e 34; próximas ao haplóide, ao triplóide e ao tetraplóide = 12 e 128) respectivamente nos tumores benignos e malignos, indicou um valor estatisticamente significativo ($X^2_3 = 80,53$; $P < 0,001$). As frequências de células diplóides e com números cromossômicos próximos ao haplóide, ao triplóide e ao tetraplóide diferiram de forma importante entre os tumores benignos (56,73% e 2,88%, respectivamente) e malignos (37,96% e 21,40%, respectivamente). Indicando uma tendência de diminuição do número de células normais e um aumento de células poliplóides de acordo com o aumento na malignidade das lesões.

A mesma análise, realizada nas células com bandamento GTG, indicou resultados homogêneos para as diferentes categorias de células nos tumores benignos e malignos. O

teste do X^2 aplicado aos valores observados (diplóides normais = 87 e 85; pseudodiplóides = 40 e 44; hipodiplóides = 66 e 101; hiperdiplóides = 5 e 10 e com outros graus de ploidia = 2 e 2, respectivamente nos tumores benignos e malignos) indicou um valor estatisticamente não significativo: $X^2_4 = 5,27$; $P > 0,20$. Através do bandamento GTG não foram observadas diferenças significativas entre as lesões mamárias benignas e malignas, principalmente pelo fato de células poliplóides que foram observadas na análise com bandamento nos tumores malignos não terem sido analisadas e portanto excluídas da análise da ploidia.

Foram analisadas 200 metáfases com bandamento GTG das sete alterações benignas da mama, sendo que 3 metáfases (47,XXY do caso 4) não foram consideradas, 87 (43,5%) apresentaram um cariótipo normal e 110 (55%) tinham alterações cromossômicas, destas, 91 (82,73% das alteradas e 45,5% do total) apresentaram alterações cariotípicas clonais. Foram observadas 272 aberrações, sendo que 158 (58,82%) delas formaram os 41 clones detectados. As alterações numéricas (131) foram muito mais freqüentes do que as estruturais (27), e entre as numéricas, as monossomias (115) foram mais comuns que as trissomias (16). As aberrações cromossômicas clonais ocorreram mais freqüentemente nos cromossomos 22, X, 4 e 17.

Analisaram-se 242 metáfases com bandamento GTG das oito alterações malignas da mama, 85 (35,12%) apresentaram um cariótipo normal e 157 (64,88%) tinham alterações cromossômicas. Destas, 135 (85,99% das alteradas e 55,79% do total) apresentaram alterações cariotípicas clonais. Foram observadas 475 aberrações, sendo que 302 (63,58%) delas formaram os 74 clones detectados. As alterações numéricas (276) foram muito mais freqüentes do que as estruturais (26) e entre as numéricas, as monossomias (230) foram mais comuns que as trissomias (46). As aberrações cromossômicas clonais foram observadas mais freqüentemente nos cromossomos 17, X e 18, 15, 19 e 21.

Comparando as alterações cromossômicas dos tumores benignos e malignos, verificou-se que nos primeiros observou-se, em média, $22,57 \pm 14,27$ alterações clonais por caso e nos malignos, $37,75 \pm 24,60$. A diferença entre as médias avaliada pelo teste t indicou um valor não significativo ($t=1,43$; $0,20 > P > 0,10$). Observou-se também que as aberrações numéricas e as estruturais não se distribuem igualmente nos dois tipos de tumores ($X^2_1 = 7,33$; $P < 0,01$) sendo a diferença devido principalmente às aberrações

estruturais. As monossomias e trissomias distribuíram-se igualmente nos dois tipos de tumores ($X^2_1=1,37$; $P>0,10$).

Nos dois tipos de lesões mamárias estudadas verificou-se que as alterações cromossômicas não ocorreram ao acaso em alguns cromossomos e a união dos resultados obtidos por nós com aqueles já descritos na literatura demonstrou que certas aberrações não são casuais em câncer de mama, podendo-se já começar a distinguir quais são as alterações primárias e secundárias na tumorigênese mamária. Adicionalmente, pudemos verificar que alguns pontos de quebra alterados neste trabalho coincidiram com a presença de locos gênicos dos seguintes genes relacionados ao câncer: o gene MCF2 ou DBL (Xq26.3-q27.1); MYB (6q22-q23); EIF3S6 ou INT6 (8q22-q23); TGFBR1 (9q33-q34); EMP1 e KRAS2 (12p12); e YES1 e MCL (18p11).

REFERÊNCIAS:

- ADEYINKA, A; PANDIS, N; NILSSON, J. *et al.*. Different cytogenetic patterns in skeletal breast cancer metastases. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.16, p.72-74, 1996.
- ADEYINKA, A; PANDIS, N; BARDI, G *et al.*. A subgroup of breast carcinomas is cytogenetically characterized by trisomy 12. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.97, p.119-121, 1997.
- ADEYINKA A, MERTENS F, IDVALL I *et al.*. Cytogenetic findings in invasive breast carcinomas with prognostically favourable histology: a less complex karyotypic pattern? **International Journal of Cancer (Pred Oncol)** v.79, p.361-364, 1998.
- AFIFY, A.; BLAND, K. I.; MARK, H. F. L.. Fluorescent *in situ* hybridization assessment of chromosome 8 copy number in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.38, p.201-208, 1996.
- AHMADIAN, M.; WISTUBA, I. I.; FONG, K. M. *et al.*. Analysis of the *FHIT* gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. **Cancer Research**, v.57, p.3664-3668, 1997.
- ANDERSEN, T. I.. Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. **Acta Oncol.**, v.35, p.407-410, 1996.
- ANELLI, A.; ANELLI, T.F.M.; YOUNGSON B. *et al.*. Mutations of the p53 gene in male breast cancer. **Cancer**, v.75, p.2233-2238, 1995.
- BALAZS, M.; MAYALL, B. H.; WALDMAN, F. M.. Interphase cytogenetics of a male breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.55, p.243-247, 1991.
- BARDI, G.; JOHANSSON, B.; PANDIS, N. *et al.*. Cytogenetic analysis of 52 colorectal carcinomas – non-random aberration pattern and correlation with pathologic parameters. **International Journal of Cancer**, v.55, p.422-428, 1993.

- BARDI, G.; SUKHIKH, T.; PANDIS, N. *et al.*. Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.12, p.97-109, 1995.
- BARRIOS, L.; CABALLÍN, MR; MIRÓ, R. *et al.*. Chromosomal instability in breast cancer patients. **Human Genetics**, v.88, p.39-41, 1991.
- BEIGUELMAN, B.. Genética Médica. 2. Dinâmica dos genes nas populações e nas famílias. EDART e Editora Universidade de São Paulo, São Paulo, 389p., 1977.
- BELDA, F.; LESTER, S. C.; PINKUS, J. L. *et al.*. Lineage restricted chromosome translocation in a benign fibrous tumor of the breast. **Human Pathology**, v.24, p.923-927, 1993.
- BELLO, M.J.; REY, R.A.. Cytogenetic analysis of metastatic effusions from breast tumors. **Neoplasma**, v.35, p.71-81, 1989.
- BERNARDINO, J.; GERBAULT-SEUREAU, M.; SASTRE, X. *et al.*. Unusual clonal chromosomal evolution in a breast carcinoma and its lymph node metastasis in a patient with Down Syndrome. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.19, p.195-199, 1997.
- BERNARDINO, J.; APIOU, F.; GERBAULT-SEUREAU, M. *et al.*. Characterization of recurrent homogeneously staining regions in 72 breast carcinomas. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.23, p.100-108, 1998.
- BIÈCHE, I.; LIDEREAU, R.. Genetic alterations in breast cancer. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.14, p.227-251, 1995.
- BIRDSALL, S. H.; MACLENNAN, K. A., GUSTERSON, B. A.. t(6;12)(q23;q13) and t(10;16)(q22;p11) in a phyllodes tumor of breast. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.60, p.74-77, 1992.

BIRDSALL, S. H.; SUMMERSGILL, B. M.; EGAN, M. *et al.*. Additional copies of 1q in sequential samples from a phyllodes tumor of the breast. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.83, p.111-114, 1995a.

BIRDSALL, S. H.; SHIPLEY, J. M.; SUMMERSGILL, B. M. *et al.*. Cytogenetic findings in a case of nodular fasciitis of the breast. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.81, p.166-168, 1995b.

BUCHHAGEN, D. L.; QIU, L.; ETKIND, P. *et al.*. Homozygous deletion, rearrangement and hypermethylation implicate chromosome region 3p14.3-3p21.3 in sporadic breast-cancer development. **International Journal of Cancer**, v.57, p.473-479, 1994.

BULLERDIEK, J; LEUSCHNER, E; TAQUIA, E *et al.*. Trisomy 8 as a recurrent clonal abnormality in breast cancer? **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.65, p.64-67, 1993.

BULLERDIEK, J; BONK, U; STAATS, B *et al.*. Trisomy 18 as the first chromosome abnormality in a medullary breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.73, p.75-78, 1994.

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

BURBANO, R. R.; NETO, J. B.; PHILBERT, P. M. P. *et al.*. Cytogenetic analysis of breast carcinoma. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.137-143, 1996b

CALABRESE, G.; DI VIRGILIO, C.; CIANCHETTI, E. *et al.*. Chromosome abnormalities in breast fibroadenomas. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.3, p.202-204, 1991.

CASPERSSON, T.; FARKER, S.; FOLEY, G. E. *et al.*. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. **Exp. Cell Res.**, v.49, p. 219-222, 1968.

- CASPERSON, T.; ZECH, L.; JOHANSON, C.. Analysis of the human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. **Exp. Cell Res.**, v.62, p490-492, 1970.
- CAVALIÉRI, L.M.B.. Lesões Expansivas Mamárias: Avaliação Citogenética. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado e Melhoramento da Universidade Estadual de Londrina, Pr. para obtenção do grau de mestre, 1993.
- CAVALLI, L. R.. Estudo Citogenético em Tumores Primários de Mama. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do grau de mestre, 1994.
- CAVALLI, L. R.; ROGATTO, S. R.; RAINHO, C. A. *et al.*. Cytogenetic report of a male breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.81, p.66-71, 1995.
- CAVALLI, L.R.; CAVALIÉRI, L.M.B.; RIBEIRO, L.A. *et al.*. Cytogenetic evaluation of 20 primary breast carcinomas. **Hereditas**, v.126, p.261-268, 1997.
- CHUAQUI, R. F.; SANZ-ORTEGA, J.; VOCKE, C. *et al.*. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 8 in male breast carcinomas. **Cancer Research**, v.55, p.4995-4998, 1995.
- CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; EMMERT-BUCK, M. R. *et al.*. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in atypical ductal hyperplasia and *in situ* carcinoma of the breast. **American Journal of Pathology**, v.150, p.297-303, 1997.
- CORNELISSE, C. J.; DIJKSHOORN, N. K.; VAN VLIET, M. *et al.*. Fractional allelic imbalance in human breast cancer increases with tetraploidization and chromosome loss. **International Journal of Cancer**, v.50, p.544-548, 1992.
- COUCH, F.J.; ROMMENS, J. M.; NEUHAUSEN, S. L. *et al.*. Generation of a integrated transcription map of the BRCA2 region on chromosome 13q12-q13. **Genomics**, v.36, p.86-99, 1996.

- CROPP, C. S.. Mutations in breast cancer. **Cancer Letters**, v.90, p.51-56, 1995.
- DAL CIN, P.; MOERMAN, P.; de WEVER I.; *et al.*. Is i(1)(q10) a chromosome marker in phyllodes tumor of the breast? **Cancer Genetics Cytogenetics** 83:174-175, 1995.
- DAL CIN, P.; MOERMAN, P.; CHRISTIAENS, M. R. *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 Chromosomes & Cancer**, v.16, p.68-71, 1996.
- DAL CIN, P.; PAUWELS, P.; MOERMAN, P. *et al.*. Hyperdiploidy in benign breast lesions. **Cancer Genetics Cytogenetics**, 101:162-163, 1998.
- DASGUPTA, J. D.; CEMACH, K.; DUBEY, D. P. *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.
- DEVILEE, P.; CORNELISSE, C. J.. Somatic genetic changes in human breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1198, p.113-130, 1994.
- DHINGRA, K.; SAHIN, A.; SUPAK, J. *et al.*. Chromosome *in situ* hybridization on formalin-fixed mammary tissue using non-isotopic, non-fluorescent probes: technical considerations and biological implications. **Breast Cancer Res. and Treat.**, v.23, p.201-210, 1992.
- DIETRICH, C. U.; PANDIS, N.; BARDI, G. *et al.*. Karyotypic changes in phyllodes tumors of the breast. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.78, p.200-206, 1994a.
- DIETRICH, C. U.; PANDIS, N.; ANDERSEN, J. A. *et al.*. Chromosome abnormalities in adenolipomas of the breast: karyotypic evidence that the mesenchymal component constitutes the neoplastic parenchyma. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.72, p.146-150, 1994b.

- DIETRICH, C.; PANDIS, N.; TEIXEIRA, M. R. *et al.* Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal breast tissue. **International Journal of Cancer**, v.60, p.49-53, 1995.
- DIETRICH, C.; PANDIS, N.; RIZOU, H. *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.
- DRUKER, B. J.; MAMAON, H. J.; ROBERTS, T. M.. Oncogenes, growth factors, and signal transduction. **N. Engl. J. Med.**, v.321, p.1383-1390, 1989.
- DUPONT, W.D.; PARL, F.F.; HARTMANN, W.H. *et al.* Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. **Cancer**, v.71, p.1258-1265, 1993.
- DUTRILLAUX, B.; MULERIS, M.; GERBAULT SEUREAU, M.. Imbalance of sex chromosomes, with gain of early-replicating X, in human solid tumors. **International Journal of Cancer**, v.38, p.475-479, 1986.
- DUTRILLAUX, B.; GERBAULT SEUREAU, M.; ZAFRANI, B.. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiplod cases with few chromosome changes. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.49, p.203-217, 1990.
- DUTRILLAUX, B.; GERBAULT SEUREAU, M.; REMVIKOS, Y. *et al.* Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.19, p.245-255, 1991.
- FERTI-PASSANTONOPOULOU, A.; PANANI, AD.. Common cytogenetic findings in primary breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.27, p.289-298, 1987.
- FERTI-PASSANTONOPOULOU, A.; PANANI, AD; RAPTIS, S.. Preferential involvement of 11q23-24 and 11p15 in breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.51, p.183-188, 1991.

- FLETCHER, J. A.; PINKUS, G. S.; WEIDNER, N. *et al.*. Lineage restricted clonality in biphasic solid tumors. **American Journal of Pathology**, v.138, p.1199-1207, 1991.
- FORD, D.; EASTON, D. F.. The genetics of breast and ovarian cancer. **Br. J. Cancer**, v.72, p.805-812, 1995.
- FRIEDMAN, M.; HOLTH, L.T.; ZOGHBI, H.Y. *et al.*. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HGM-I(Y) nonhistone protein gene. **Nucleic Acids Res.**, v.21, p.4259-4267, 1993.
- FRIEDMAN, L.S.; GAYTHER, S. A.; KUROSAKI, T. *et al.*. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. **Am. J. Hum. Genet.**, v.60, p.313-319, 1997.
- FRIEND, S. H.; DRYJA, T. P.; WEINBERG, R. A.. Oncogenes and tumor supressing genes. **N. Engl. J. Med.**, v.318, p.618-622, 1988.
- GARNE, J. P.; ASPEGREN, K.; BALLDIN, G. *et al.*. Increasing Incidence of and Declining Mortality from Breast Carcinoma. **Cancer**, v.79(1), p. 69-74, 1997.
- GEBHART, E.; BRUDERLEIN, S.; AUGUSTUS, M. *et al.*. Cytogenetic studies of human breast carcinomas. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.8, p.125-138, 1986.
- GELEICK, D.; MÜLLER, H.; MATTER, A. *et al.*. Cytogenetics of breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.46, p.217-229, 1990.
- GERBAULT SEUREAU, M.; VIELH, P.; ZAFRANI, B. *et al.*. Cytogenetic study of twelve human near-diploid breast cancers with chromosomal changes. **Ann. Genetic**, v.30, p.138-144, 1987.
- GIAMMARINI, A.; ROCCHI, M.; ZENNARO, W. *et al.*. XX male with breast cancer. **Clinical Genetics**, v.18, p.103-108, 1980.

- GIBAS, Z.; PROUT, G. R.; CONNOLLY, J. G. *et al.* Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. **Cancer Research**, v.44, p.1257-1264, 1984.
- GOMPEL, C.; VAN KERKEM, C.. The Breast. In: Steven G Silverberg (ed.), Principles of Surgical Pathology, p.245-288, 1990.
- GORUNOVA, L.; JOHANSSON, B.; DAWISKIBA, S. *et al.* Massive cytogenetic heterogeneity in a pancreatic carcinoma: fifty-four karyotypically unrelated clones. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.14, p.259-266, 1995.
- GREENMAN, J.; MOHAMMED, S.; ELLIS, D. *et al.* Identification of misense and truncating mutations in the BRCA1 gene in sporadic and familial breast and ovarian cancer. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.21, p.244-249, 1998.
- HAIBACH, H.; ROSENHOLTZ, M. J.. Prepubertal gynecomastia with lobules and acini: a case report and review of the literature. **American Journal of Clinical Pathology**, v.80, p.252-255, 1983.
- HAINSWORTH, P. J.; GARSON, O. M.. Breast Cancer Cytogenetics and Beyond. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v.60, p.327-336, 1990.
- HAINSWORTH PJ, RAPHAEL KL, STILLWELL RG *et al.* Cytogenetic features of twenty-six primary breast cancers. **Cancer Genetics Cytogenetics** v.52, p.205-218, 1991.
- HAINSWORTH PJ, RAPHAEL KL, STILLWELL RG *et al.* Rearrangement of chromosome 1p in breast cancer correlates with poor prognostic features. **British Journal of Cancer**, v.66, p.131-135, 1992.
- HANDS, L.J.; GREENALL, M.J.. Gynaecomastia. **Br J Surg**, v.78, p.907-911, 1991.

- HARRIS, J. R.; MORROW, M.; BONADONNA, G.. Cancer of the breast. In: DeVita Jr, Hellman e Rosenberg (eds.), Cancer Principles and Practice of Oncology; 4rd edition, p.1264-1326, 1993.
- HARNDEN, D.G.; MACLEAN, N.; LANGLANDS, A. O.. Carcinoma of the breast and Klinefelter's syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v.8, p.460, 1971.
- HEIM, S.; NILBERT, M.; VANNI, R. *et al.*. A specific translocation, t(12;14)(q14-15;q23-24), characterizes a subgroup of uterine leiomyomas. **Cancer Genetics Cytogenetics** v.32, p.13-17, 1988.
- HEIM, S.. Is cancer cytogenetics reducible to the molecular genetics of cancer cells? **Genes Chromosomes & Cancer**, v.5, p.188-196, 1992.
- HEIM, S.; MITELMAN, F.. Cancer Cytogenetics, 2nd ed., New York:Wiley-Liss, 1995.
- HEIM, S.; TEIXEIRA, M. R.; DIETRICH, C. U. *et al.*. Cytogenetic polyclonality in tumors of the breast. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.95, p.16-19, 1997.
- HILL, S. M., RODGERS, C. S.; HULTÉN, M. A.. Cytogenetic analysis in human breast carcinoma. II. Seven cases in the triploid/tetraploid range investigated using direct preparations. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.24, p.45-62, 1987.
- HULTÉN, M.; HILL, S. M.; RODGERS, C. S. *et al.*. Chromosomes 1 and 16 in sporadic breast cancer. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.8, p.204, 1993.
- ICHIKAWA, D.; HASHIMOTO, N.; HOSHIMA, M. *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.
- INTERLANDI, J. W.; RUSSELL, M.H.; KIRCHNER, F. *et al.*. Genetic and endocrine findings in a 31-year-old 45, X/ 46, Xdel(Y)(q12) male. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.53, p.1047-1055, 1981.

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

JIN, Y.; MERTENS, F.; MANDAHL, N. *et al.*. Chromosome abnormalities in eighty-three head and neck squamous cell carcinomas: influence of culture conditions on karyotypic pattern. **Cancer Research**, v.53, p.2140-2146, 1993.

JIN, Y.; MERTENS, F.; JIN, C. *et al.*. Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured primary squamous cell carcinomas of the head and neck. **Cancer Research**, v.55, p.3204-3210, 1995.

KASAMI, M.; VNENCAK-JONES, C. L.; MANNING, S. *et al.*. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in breast hyperplasia - No obligate correlation of these genetic alterations with subsequent malignancy. **American Journal of Pathology**, v. 150, p.1925-1932, 1997.

KASTURY, K.; OHTA, M.; LASOTA, J. *et al.* Structure of the human receptor tyrosine phosphatase γ gene (*PTPRG*) and relation to the familial RCC t(3;8) chromosome translocation. **Genomics**, v.32, p.225-235, 1996.

KERANGUEVEN, F.; ESSIUX, L.; DIB, A. *et al.*. Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative third susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. **Oncogene**, v.10, p.1023-1026, 1995.

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

KNUDSON, A. G.. Mutation and cancer: a statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.68, p.820-823, 1971.

KNUDSON, A. G.. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Research**, v.45, p.1437-1443, 1985.

- KOJIMA, A.; IKEUCHI, T.; INOMATA, M. *et al.* Y/6 chromosome translocation in a male with triple primary cancers involving the breast. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.117, p.479-483, 1991.
- KOKALJ-VOKAC, N; ALEMEIDA, A; GERBAULT-SEUREAU, M. *et al.* Two-color FISH characterization of i(1q) and der(1;16) in human breast cancer cells. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.7, p.8-14, 1993.
- KOVACS, G.. Preferential involvement of chromosome 1q in a primary breast carcinoma. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.3, p.125-129, 1981.
- LAKHANI, SR.; COLLINS, C; STRATTON, MR. *et al.* Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss of heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. **J. Clin. Pathol.**, v.48, p.611-615, 1995.
- LEUSCHNER, E.; MAYER-BOLTE, K.; CASELITZ, J. *et al.* Fibroadenoma of the breast showing a translocation (6;14), a ring chromosome and two markers involving parts of chromosome 11. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.76, p.145-147, 1994.
- LEUSCHNER, E.; STAATS, B.; GOHLA, G. *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization studies on breast tumor samples for distinguishing between different subsets of breast cancer. **Acta Cytologica**, v.40, p.151-157, 1996.
- LIMON, J.; DAL CIN, P. E SANDBERG, A. A.. Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.23, p.305-313, 1986.
- LIU, B.; PARSONS, R.; PAPADOPOULOS, N. *et al.* Analysis of mismatch repair genes in hereditary non polyposis colorectal cancer patients. **Nature Med.**, v.2, p.169-174, 1996.

- LIZARD-NACOL, S.; LIDEREAU, R.; COLLIN, F. *et al.*. Benign breast disease: absence of genetic alterations at several loci implicated in breast cancer malignancy. **Cancer Research**, v.55, p.4416-4419, 1995.
- LOBACCARO, J.M.; LUMBROSO, S.; BELON, C. *et al.*. Male breast cancer and the androgen receptor gene. **Nature Genetics**, v.5, p.109-110, 1993.
- LOTHE, R. A.. Microsatellite instability in human solid tumors. **Mol. Med. Today**, v.2, p61-68, 1997.
- LU Y, XIAO S, YAN Y. *et al.*. Direct chromosome analysis of 50 primary breast carcinomas. **Cancer Genetics Cytogenetics** v.69, p.91-99, 1993.
- LU, Y. J.; BIRDSALL, S.; OSIN, P. *et al.*. Phyllodes tumors of the breast analyzed by comparative genomic hybridization and association of increased 1q copy number with stromal overgrowth and recurrence. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.20, p.275-281, 1997.
- MANDAHL, M.; HEIM, S.; JOHANSSON, B. *et al.*. Lipomas have characteristic structural chromosomal rearrangements of 12q13-q14. **Int. J. Cancer**, v.39, p.685-688, 1987.
- MARCUS, J. N.; PAGE, D.; WATSON, P. *et al.*. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast carcinoma phenotypes. **Cancer**, v.80, p.543-556, 1997.
- MEISNER, L. F.; HAN, K.; LEE, W. *et al.*. Assessing aneuploidy in normal tissues with FISH: pitfalls and insights. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.72, p.78-80, 1994.
- MERTENS, F.; JOHANSSON, B.; HÖGLUND, M. *et al.*. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. **Cancer Research**, v.57, p.2765-2780, 1997.

- MICALE, M. A.; VISSCHER, D. W.; GULINO, S. E. *et al.* Chromosomal aneuploidy in proliferative breast disease. **Human Pathology**, v.25,p.29-35, 1994.
- MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EDENS, D. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v.266, p.66-71, 1994.
- MILLIKAN, R.; HULKA, B.; THOR, A. *et al.* p53 mutations in benign breast tissue. **Journal of Clinical Oncology**, v.13, p.2293-2300, 1995.
- MITCHELL, E. L. D.; SANTIBANEZ-KOREF, M.F.. 1p13 is the most frequently band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.2, p.278-289, 1990.
- MITCHELL, E. L. D.. A cytogenetic study of male breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.47, p.107-112, 1990.
- MITELMAN, F.; MERTENS, F. E JOHANSSON, B.. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. **Nature Genetics**, supplement v.15, p.417-473, 1997a.
- MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MANDAH, N. *et al.* Clinical Significance of Cytogenetic Findings in Solid Tumors. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.95, p.1-8, 1997b.
- MOORHEAD, P.S.; NOWEEL, P.C.; MELLMAN, W.J. *et al.* Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood. **Exper Cell Res**, v.20, p.613-616, 1960.
- MOSS, S. M.. Breast Carcinoma Mortality Rates and Screening. **Cancer**, v.79(1), p.1-2, 1997.
- MULERIS, M.; ALMEIDA, A.; GERBAULT-SEUREAU, 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.

MURTY, V.V.V.S.; CHAGANTI, R.S.K.. A genetic perspective of male germ tumors. **Seminars in Oncology**, v.25, p.133-144, 1998.

NAGADOWSKA, M. M.; FENTIMAN, I. S.. Male breast cancer. Review. **Brit. J. Hosp. Med.**, v.49, p.104-110, 1993.

NAROD, S. A.. Hereditary breast carcinoma syndromes. **Cancer suppl.**, v.80, p.537-542, 1997.

NEGRINI, M.; MONACO, C.; VORECHOVSKY, I. *et al.* The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. **Cancer Research**, v.56, p.3173-3179, 1996.

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

NIELSEN, K. V.; BRIAND, P.. Cytogenetic analysis of in vitro karyotype evolution in a cell line established from nonmalignant human mammary epithelium. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.39, p.103-118, 1989.

NIELSEN, K.V.; BLICHERT-TOLF, M.; ANDERSEN, J.. Chromosome analysis of *in situ* breast cancer. **Acta Oncol.**, v.28, p.919-922, 1989.

NOWELL, P. C.; 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 Populations. **Science**, v.194, p.23- 28, 1976.

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

O'CONNELL, P.; PEKKEL, V.; FUQUA, S. *et al.*. Molecular genetic studies of early breast cancer evolution. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.32, p.5-12, 1994.

ODAGIRI, E.; KANDA, N.; JIBIKI, K. *et al.*. Reduction of telomeric length and c-*erbB-2* gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. **Cancer**, v.73, p.2978-2984, 1994.

OHTA, M.; INOUE, H.; COTTICELLI, M. G. *et al.*. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. **Cell**, v.84, p.587-597, 1996.

OLSSON, H.; ALM, P.; KRISTOFFERSSON, U. *et al.*. Hypophyseal tumor and gynecomastia preceding bilateral breast cancer development in a man. **Cancer**, v.53, p.1974-1977, 1984.

OZISIK, Y. Y.; MELONI, A. M.; STEPHENSON, C. F. *et al.*. Chromosome abnormalities in breast fibroadenomas. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.77, p.125-128, 1994.

PALKA, G.; PARRUTI, G.; CALABRESE, G. *et al.*. Studio citogenetico su 140 pazienti con alterazioni della sfera sessuale. **Minerva Medica**, v.78, p.855-859, 1987.

PALKA, G.; BIANCHI, P.G.; CALABRESE, G. *et al.*. Studio citogenetico in 201 soggetti con alterata fitness riproduttiva. **Minerva Ginecologica**, v.42, p.855-859, 1990.

PANAGOPOULOS, I.; PANDIS, N.; THELIN, S. *et al.*. The *FHIT* and *PTPRG* genes are deleted in benign proliferative breast disease associated with familial breast cancer and cytogenetic rearrangements of chromosome band 3p14. **Cancer Research**, v.56, p.4871-4875, 1996.

- PANDIS, N.; HEIM, S.; BARDI, G *et al.*. Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. **Genes Chromosomes & Cancer**, v. 5, p.14-20, 1992a.
- PANDIS, N.; HEIM, S.; BARDI, G. *et al.*. Whole-arm t(1;16) and i(1q) as sole anomalies identify gain of 1q as a primary chromosomal abnormality in breast cancer. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.5, p.235-238, 1992b.
- PANDIS N, HEIM S, BARDI G *et al.*. Chromosome analysis of 20 breast carcinomas: cytogenetic multiclonality and karyotypic-pathologic correlations. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.6, p.51-57, 1993a.
- PANDIS, N.; JIN, Y.; LIMON, J. *et al.*. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 as a primary chromosome abnormality in carcinomas of the breast. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.6, p.151-155, 1993b.
- PANDIS, N., BARDI, G., HEIM, S.. Interrelationship between methodological choices and conceptual models in solid tumor cytogenetics. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.76, p.77-84, 1994a.
- PANDIS, N., BARDI, G., JIN, Y. *et al.*. Unbalanced t(1;16) as the sole karyotypic abnormality in a breast carcinoma and its lymph node metastasis. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.75, p.158-159, 1994b.
- PANDIS, N.; JIN, Y.; GORUNOVA, L. *et al.* Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. **Genes Chromosomes & Cancer** v.12, p.173-185, 1995a.
- PANDIS, N.; TEIXEIRA, M. R.; GERDES, A. M. *et al.*. Chromosome abnormalities in bilateral breast carcinomas. Cytogenetic Evaluation of the Clonal Origin of Multiple Primary Tumors. **Cancer**, v.76, p.250-258, 1995b.

PANDIS, N.; IDVALL, I.; BARDI, G. *et al.*. Correlation between karyotypic pattern and clinicopathologic features in 125 breast cancer cases. **International Journal of Cancer**, v.66, p.191-196, 1996.

PANDIS N; BARDI G; MITELMAN F. *et al.*. Deletion of the short arm of chromosome 3 in breast tumors. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.18, p.241-245, 1997.

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

PATHAK, S.; WANG, Z.; DHALIWAL, M.K. *et al.*. Telomeric association: another characteristic of cancer chromosomes? **Cytogenetic Cell Genetic**, v.47, p.228-229, 1988.

PETERSSON, C.; JOHANSSON, B.; PANDIS, N. *et al.*. Clonal chromosome aberrations in fibrocystic breast disease associated with increased risk of cancer. **Int J Oncol**, v.5, p.1207-1210, 1994.

PETERSSON, C.; PANDIS, N.; MERTENS, F. *et al.*. Chromosome aberrations in prophylactic mastectomies from women belonging to breast cancer families. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.16, p.185-188, 1996.

PETERSSON, C.; PANDIS, N.; RIZOU, H. *et al.*. Karyotypic abnormalities in fibroadenomas of the breast. **International Journal of Cancer**, v.70, p.282-286, 1997.

PETERSSON LUNDIN C.; MERTENS F.; RIZOU H.; *et al.* Cytogenetic changes in benign proliferative as well as nonproliferative lesions of the breast. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.107, p.118-120, 1998a.

PETERSSON LUNDIN, C.; MERTENS, F.; INGVAR, C. *et al.* Trisomy 16 as the primary chromosome aberration in a papilloma of the breast. . **Cancer Genetics Cytogenetics** v.106, p.90-91, 1998b.

PONCE-CASTAÑEDA, M.V.; LEE, M.H.; LATRES, E. *et al.* p27^{kip1}: Chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. **Cancer Research**, v.55, p.1211-1214, 1995.

PRECHTEL, D.; WERENSKIOLD, A.K.; PRECHTEL, K. *et al.* Frequent loss of heterozygosity at chromosome 13q12-13 with BRCA2 markers in sporadic male breast cancer. **Diagn. Mol. Pathol.**, v.7, p.57-62, 1998.

RIED, T.; JUST, K. E.; HOLTGREVE-GREZ, H. *et al.* Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. **Cancer Research**, v.56, p.5415-5423, 1995.

RODGERS, C. S.; HILL, S. M.; HULTEN, M. A.. Cytogenetic analysis in human breast carcinoma. I. Nine cases in the diploid range investigated using direct preparations. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.13, p.95-119, 1984.

RODGERS, C. S.; HILL, S. M.; HULTEN, M. A.. Cytogenetic analysis in a case of cancer of the male breast. **Cancer Genetics Cytogenetics** v.15, p.113-117, 1985.

ROHEN, C; BONK, U.; STAATS, B. *et al.* Two human breast tumors with translocations involving 12q13-15 as the sole cytogenetic abnormality. **Cancer Genetics Cytogenetics** v.69, p.68-71, 1993.

ROHEN, C.; CASELITZ, J.; STERN, C. *et al.* A hamartoma of the breast with an aberration of 12q mapped to the MAR region by fluorescence *in situ* hybridization. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.84, p.82-84, 1995a.

ROHEN, C.; MEYER-BOLTE, K.; BONK, U *et al.*. Trisomy 8 and 18 as frequent clonal and single-cell aberrations in 185 primary breast carcinomas. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.80, p.33-39, 1995b.

ROHEN, C.; STAATS, B.; BONK, U. *et al.*. Significance of clonal chromosome aberrations in breast fibroadenomas. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.87, p.152-155, 1996.

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

SANDBERG, A. A.. Chromosomal lesions and solid tumors. **Hospital Practice**, October 15, p.93-106, 1988.

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

SAINT-RUF, C.; GERBAULT-SEUREAU, M.; VIEGAS-PÉQUINOT, E. *et al.*. Recurrent homogeneously staining regions in 8p1 in breast cancer and lack of amplification of POLB, LHRH, and PLAT genes. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.52, p.27-35, 1991.

SANZ-ORTEGA, J.; CHUAQUI, R.; ZHUANG, Z. *et al.*. Loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in microdissected human male breast carcinomas. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.87, p1408-1410, 1995.

SASCO, A.J.; LOWENFELS, A.B.; PASKER-DE JONG, P.. Review article: epidemiology of male breast cancer. A meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. **International Journal of Cancer**, v.53, p.538-549, 1993.

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

SCHROER, K.R.; FORTIER, C.M.; WOLMAN, S.R. *et al.* K-RAS mutations in male breast cancer. **Lab Invest**, v.68, p.19A, 1993.

SEITZ, S.; ROHDE, K.; BENDER, E. *et al.* Deletion mapping and linkage analysis provide strong indication for the involvement of the human chromosome region 8p12-p22 in breast carcinogenesis. **Br. J. Cancer**, v.76, p.983-991, 1998.

SEROVA, O. M.; MAZOYER, S.; PUGET, N. *et al.* Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes? **Am. J. Hum. Genet.**, v.60, p.486-495, 1997.

SNEIGE, N.; SAHIN, A.; DINH, M. *et al.* Interphase Cytogenetics in mammographically detected breast lesions. **Human Pathology**, v.27, p.330-335, 1996.

SOBOL, H.; BIRNBAUM, D.; EISINGER, F.. Evidence for a third breast-cancer susceptibility gene. **Lancet**, v.344, p.1151-1152, 1994.

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

SOZZI, G.; VERONESE, M. L.; NEGRINI, M. *et al.* The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. **Cell**, v.85, p.17-26, 1996a.

SOZZI, G.; ALDER, H.; TORNIELLI, S. *et al.* Aberrant *FHIT* transcripts in Merkel cell carcinoma. **Cancer Research**, v.56, p.2472-2474, 1996b.

SPIRIN, K.S.; SIMPSON, J.F.; TAKEUCHI, S. *et al.* *p27/Kip1* mutation found in breast cancer. **Cancer Research**, v.56, p.2400-2404, 1996.

SREEKANTIAIAH, C.; SANDBERG, A. A.. Clustering of aberrations to specific chromosome regions in benign neoplasms. **International Journal of Cancer**, v.48; p.194-198, 1991.

STAATS, B.; BONK, U.; WANSCHURA, S. *et al.* A fibroadenoma with a t(4;12)(q27;q15) affecting the HMGI-C gene, a member of the high mobility group protein gene family. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.38, p.299-303, 1996.

STAATS, B.; BONK, U.; GOHLA, G., *et al.* Two cases of fibrocystic breast disease with polysomy 18 as the sole clonal cytogenetic abnormality. **Cancer Genetics Cytogenetics** v.103, p.91-94, 1998.

STEEG, P. S.; CLARE, S. E.; LAWRENCE, J. A. *et al.* Molecular anlysis of premalignant and carcinoma *in situ* lesions of the human breast. **American Journal of Pathology**, v.149, p.733-738, 1996.

STEINARSDÓTTIR M.; PÉTURSDÓTTIR, I.; SNORRADÓTIR, S. *et al.* Cytogenetic studies of breast carcinomas: different karyotypic profiles detected by direct harvesting and short-term culture. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.13, p.239-248, 1995.

STEINARSDÓTTIR M.; JÓNASSON, J. G.; PÉTURSDÓTTIR, I. *et al.* A comparison of cytogenetic studies and flow cytometry in breast carcinomas. **Cytometry**, v.28, p.323-328, 1997.

STEPHENSON, C. F.; DAVIS, R. I.; MOORE, G. E. *et al.* Cytogenetic and fluorecence *in situ* hibridization analysis of breast fibroadenomas. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.63, p.32-36, 1992.

STRATTON, M. R.; FORD, D.; NEUHASEN, S. *et al.* Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. **Nature Genetics**, v.7, p.103-107, 1994.

SUMNER, A.T.. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl. Cell Res.**, v.75, p.304-306, 1972.

TAKITA, K.; SATO, T.; MIYAGI, M. *et al.* Correlation of loss of alleles on the short arms of chromosomes 11 and 17 with metastasis of primary breast cancer to lymph nodes. **Cancer Research**, v.52, p.3914-3917, 1992.

- TANNER, M. M.; KARHU, R. A.; NUPPONEN, N. N. *et al.*. Genetic Alterations in hypodiploid breast cancer. Frequent loss of chromosome 4 and amplification of cyclin D1 oncogene. **American Journal of Pathology**, v. 153, p.191-199, 1998.
- TARKKANEN, M.; KAIPAINEN, A.; KARAHAJU, E. *et al.*. Cytogenetic study of 249 consecutive patients examined for a bone tumor. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.68, p.1-21, 1993.
- TEIXEIRA, M. R.; PANDIS, N.; BARDI, G. *et al.*. Cytogenetic analysis of multifocal breast carcinomas: detection of karyotypically unrelated clones as well as clonal similarities between tumour foci. **Br. J. Cancer**, v.70, p.922-927, 1994.
- TEIXEIRA, M. R.; PANDIS, N.; BARDI, G. *et al.*. Clonal Heterogeneity in Breast Cancer: Karyotypic Comparisons of Multiple Intra- and Extra-Tumorous Samples from 3 Patients. **International Journal of Cancer**, v.63, p.63-68, 1995.
- TEIXEIRA, M. R.; PANDIS, N.; BARDI, G. *et al.*. Karyotypic Comparisons of Multiple Tumorous and Macroscopically Normal Surrounding Tissue Samples from Patients with Breast Cancer. **Cancer Research**, v.56, p.855-859, 1996a.
- TEIXEIRA, MR.; PANDIS, N; GERDES, A. *et al.*. Cytogenetic abnormalities in an in situ ductal carcinoma and five prophylactically removed breasts from members of a family with hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.38, p.177-182, 1996b.
- TEIXEIRA, M.R.. Intra- and intertumor cytogenetic heterogeneity in breast cancer. Thesis of the Department of Genetics, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Medical Faculty, University of Oslo, 1997.
- TEIXEIRA, M. R.; PANDIS, N.; BARDI, G. *et al.* Discrimination between Multicentric and Multifocal Breast Carcinoma by Cytogenetic Investigation of Macroscopically Distinct Ipsilateral Lesions. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.18, p.170-174, 1997.

- TEIXEIRA, M. R.; PANDIS, N.; DIETRICH, C. U. *et al.*. Chromosome banding analysis of gynecomastias and breast carcinomas in men. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.23, p.16-20, 1998.
- THOMAS, D. B. Male breast cancer. Breast cancer in men. **Epidemiol Rev.**, v.15, p.220-231, 1993.
- THOMPSON, F.; EMERSON, J.; DALTON, W. *et al.*. Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas. I. Twenty-eight cases with primary disease. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.7, p.185-193, 1993.
- TIRKKONEN, M.; TANNER, M.; KARHU, R.. *et al.* Molecular Cytogenetics of primary breast cancer by CGH. **Genes Chromosomes & Cancer**, v.21, p.177-184, 1998.
- TRENT, J. M.. Cytogenetic and molecular biologic alterations in human breast cancer: a review. **Breast Cancer Res Treat**, v.5, p.221-229, 1985.
- TRENT, J.; YANG, J; EMERSON, 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.
- TSUDA, H.; TAKARABE, T.; SUSUMU, N. *et al.*. Detection of numerical and structural alterations and fusion of chromosomes 16 and 1 in low-grade papillary breast carcinoma by fluorescence *in situ* hybridization. **American Journal of Pathology**, v.151, p.1027-1034, 1997.
- UDAYAKUMAR, A. M.; BHARGAVA, M. K. Chromosomal abnormalities in the lymphocytes of a male breast cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.78, p.99-101, 1994.
- VISSCHER, D. W.; WALLIS, T. L.; CRISSMAN, J. D.. Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics. **Cancer**, v.77, p.315-320, 1995.

- WAKE, N.; SLOCUM, H. K.; RUSTUM, Y. M. *et al.* Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XLIV. A method for chromosomal analysis of solid tumors. **Cancer Genetics Cytogenetics**, v.3, p.1-10, 1981.
- WANSCHURA, S.; KAZMIERCZAK, B.; SCHOENMAKERS, E. *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.
- WARSO, M. A.; MEHTA, R. R.; HART, G. D. *et al.* A cell line derived from a clinically benign phyllodes tumor: Characterization and implications. **Anticancer Res.**, v.15; p.399-404, 1995.
- WILLIAMS, W. R.; STRONG, L. C.. Genetic epidemiology of soft-tissue sarcoma in children. In: Muller, H.J., Weber, W. (eds.), Familial Cancer, p.151-153, 1985.
- WOLMAN, S.R.; SANFORD, J.; RATNER, S. *et al.* Breast cancer in males: DNA content and sex chromosome constitution. **Mod. Pathol.**, v.8, p.239-243, 1995.
- WOOSTER, R.; MANGION, J.; EELES, R. *et al.* A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome. **Nature Genetics**, v.2, p.132-134, 1992.
- WOOSTER, R.; NEUHAUSEN, S. L.; MANGION, J. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v.265, p.2088-2090, 1994.
- WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v.378, p.789-792, 1995.
- YUNIS, J. J.. High resolution of human chromosomes. **Science**, v.191, p.1268-1270, 1976.

ZAFRANI, B.; GERBAULT-SEUREAU, M.; MOSSERI, V. *et al.*. Cytogenetic study of breast cancer: Clinicopathologic significance of homogeneously staining regions in 84 patients. **Human Pathology**, v.23, p.542-547, 1992.

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

ZHANG, R.; WILEY, J.; HOWARD, S. P. *et al.*. Rare clonal karyotypic variants in primary cultures of human breast carcinoma cells. **Cancer Research**, v.49, p.444-449, 1989.