

Ao meu pai

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação só foi possível com a colaboração e contributo, de forma directa ou indirecta, de várias pessoas e entidades, às quais gostaria de exprimir o meu profundo reconhecimento:

Ao Magnífico Reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, **PROFESSOR DOUTOR CARLOS SEQUEIRA** e ao cessante reitor, **PROFESSOR DOUTOR ARMANDO MASCARENHAS FERREIRA**, pela disponibilidade dos meios para a realização desta dissertação.

Ao Presidente da Escola das Ciências da Vida e do Ambiente, **PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO FONTEINHAS FERNANDES**, pela aceitação da intenção de mestrado.

À Coordenação do Mestrado em Genética Molecular Comparativa e Tecnológica, na pessoa do **PROFESSOR DOUTOR VALDEMAR CARNIDE**, por ter aceite o projecto de dissertação.

Ao Director de Serviço do Centro de Diagnóstico Pré-natal do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, **DOUTOR OSVALDO MOUTINHO** e à anterior Directora de Serviço, **DOUTORA EUFÉMIA RIBEIRO**, a possibilidade de realização deste Mestrado, disponibilizando os meios e infra-estruturas do Serviço.

À minha orientadora, **PROFESSORA DOUTORA RAQUEL CHAVES**, por todo o empenho, sabedoria e compreensão, pelo constante entusiasmo e incentivo, pela leitura crítica da presente dissertação, e pela amizade de longa data reforçada com a realização deste trabalho.

À **DOUTORA ROSÁRIO PINTO LEITE**, por todo o apoio e disponibilidade, pelos constantes incentivos, pela leitura crítica desta dissertação, pela experiência e ensinamentos transmitidos desde o estágio de licenciatura até hoje, e acima de tudo pela amizade alicerçada ao longo destes dez anos.

Ao **PEDRO BOTELHO**, por toda a amizade, companheirismo e permanente disponibilidade.

À **ANA LUÍSA BORGES**, pela amizade, paciência e constante apoio no decorrer do Mestrado.

À **ANA PAÇO**, pela disponibilidade em ensinar e ajudar.

À **ENFERMEIRA ISABEL PINTO**, às **SENHORAS DONA LURDES REGO** e **DONA ROSA RIBEIRO**, por todo o apoio, solidariedade e amizade proporcionada.

Um agradecimento especial:

À minha **MÃE**, uma pessoa excepcional, com uma força e dedicação que nos contagia, com quem tenho aprendido muito ao longo da vida em especial nos últimos anos.

Ao **MIGUEL**, por todo o apoio e compreensão, pela paciência e dedicação incondicional, pela profunda amizade e carinho, e pela alegria sempre dispensada.

A todos, o meu sincero obrigada!

RESUMO

As doenças hemato-oncológicas são um grupo de doenças oncológicas com grande incidência, constituindo cerca de 10 a 15% de todos os cancros. Nas últimas décadas, este tipo de neoplasia tem vindo a crescer dado o aumento da esperança de vida, sendo designada por doença do idoso, uma vez que a população abrangida tem, em média, uma idade superior a 60 anos (Altekruse *et al.*, 2009).

A genética tem adquirido, ao longo das últimas décadas, um papel importante na investigação oncológica e no direccionamento clínico de pacientes com cancro. A relação entre malignidade e alterações cromossómicas tem feito do estudo citogenético um critério primordial na classificação das doenças hemato-oncológicas, bem como no diagnóstico, prognóstico (dividido em três factores de risco: favorável, intermédio ou desfavorável), monitorização e terapêutica a aplicar (Fadl-Elmula, 2001; Steensma e List, 2005).

As células neoplásicas caracterizam-se por terem ciclos celulares alterados e os cromossomas destas células apresentam-se com baixa resolução de bandas. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) melhorou substancialmente a sensibilidade da análise citogenética, tornando-a num importante complemento no estudo citogenético das doenças hemato-oncológicas (Kearney, 2001; Bejjani e Shaffer, 2008).

Nesta dissertação procedeu-se à caracterização citogenética de 50 casos com doenças hemato-oncológicas. Dos casos estudados, 72% apresentavam alterações cromossómicas, o que está de acordo com o descrito na literatura; dependendo do tipo de patologia, a frequência de anomalias detectadas está compreendida entre os 20 e 90%. Das anomalias observadas, 86.1% foram detectadas pela citogenética convencional e nas restantes, a sua detecção só foi possível recorrendo à técnica de FISH.

As alterações foram detectadas em 7 casos de leucemia mielóide crónica (LMC), 1 caso de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), 7 casos de síndromes mielodisplásicas (SMD), 2 casos de leucemia mielóide aguda (LMA), 8 casos de leucemia linfática crónica (LLC), 7 casos de mieloma múltiplo (MM) e 4 casos de linfoma não-Hodgkin (LNH). Das anomalias encontradas, 88.9% estavam previamente associadas à patologia, sendo que 83.3% eram frequentes e em 5.6% as alterações eram raras. As restantes anomalias (11.1%) não estavam associadas à patologia e não estavam descritas na literatura. Quatro dos casos com anomalias frequentes estavam associados a outros rearranjos cromossómicos, raros ou não descritos.

Quanto ao valor prognóstico das anomalias observadas verificou-se que 11.1% estavam associadas a um prognóstico intermédio e 47.2% a um prognóstico desfavorável. Estes resultados são de extrema importância em termos clínicos, uma vez que permitem identificar os casos cuja doença irá progredir de forma mais rápida e / ou agressiva, possibilitando uma orientação terapêutica mais adequada.

O estudo citogenético permitiu um diagnóstico diferencial em três casos de LNH, identificando o tipo de linfoma: dois linfomas do manto (LM) e um caso de linfoma folicular (LF). O resultado citogenético foi importante pois como têm características evolutivas distintas, os LM são um tipo de LNH agressivo e os LF são na sua maioria indolentes, permitiu uma orientação clínica adequada à patologia.

A aplicação da técnica de FISH é uma prática corrente na caracterização citogenética das doenças hemato-oncológicas. É uma técnica rápida, de fácil execução e eficaz, com maior especificidade e resolução do que a citogenética convencional, permitindo a detecção de rearranjos cromossómicos subtis ou crípticos como por exemplo a $t(4;14)$. Esta técnica foi aplicada como complemento da análise citogenética, no despiste das anomalias mais comuns de algumas patologias, algumas de difícil detecção pela citogenética convencional; e na caracterização de rearranjos cromossómicos observados. A técnica de FISH teve um contributo importante na caracterização de alterações cromossómicas, sendo sem dúvida um grande complemento das técnicas convencionais.

ABSTRACT

Hematologic malignancies are a group of tumors' with high incidence, over 10-15% of all cancers. In the last decades, this type of cancer has increased because of the upper life expectancy; being called elderly disease, the average age of patients is higher than 60 years (Altekruse *et al.*, 2009).

Over the past decades, genetics has acquired an important role in cancer research and in the clinical management of cancer patients. The relationship between malignancy and chromosomal abnormalities has made cytogenetic study an important condition in the classification of hematologic malignancies as well as in diagnosis, prognosis (with three predictive factors: favorable, intermediate or unfavorable), monitoring and treatment to be applied (Fadl-Elmula, 2001; Steensma and List, 2005).

The leukemia cells are characterized by an altered cell cycle and chromosomes with poor resolution. The fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique has greatly enhanced the sensitivity of cytogenetic analysis, making it an important complement in the cytogenetic study of hematologic malignancies disorders (Kearney, 2001; Bejjani and Shaffer, 2008).

In this work, we preceded to cytogenetic analyses of 50 cases with hematologic malignancies disorders. Of the cases studied, 72% had chromosomal abnormalities, which are in accordance with described in the literature; depending on the type of disease, the frequency of abnormalities detected range between 20 and 90%. The conventional cytogenetic detected 86.1% of the abnormalities observed, in the remaining its detection was only possible using the FISH technique.

The chromosomal anomalies were detected in seven cases of chronic myeloid leukemia (CML), a case of chronic myelomonocytic leukemia (CMML), seven cases of myelodysplastic syndromes (MDS), two cases of acute myeloid leukemia (AML), eight cases of chronic lymphocytic leukemia (LLC), seven cases of multiple myeloma (MM) and four cases of non-Hodgkin lymphoma (NHL). Of the anomalies found, 88.9% were previously associated with disease, being 83.3% frequent and 5.6% rare. The remaining anomalies (11.1%) were not associated with pathology and were not described. Four cases with common abnormalities were associated with rare or not reported chromosomal rearrangements.

Chromosomal abnormalities had predictive factors, of the abnormalities observed 11.1% were associated with an intermediate prognosis and 47.2% with an unfavorable prognosis. These

results are extremely important in clinical, identifying the cases whose disease will progress more quickly and / or aggressive, allowing a better therapeutic orientation.

The cytogenetic study allowed a differential diagnosis in three cases of NHL, identifying the type of lymphoma: two mantle lymphomas (ML) and one case of follicular lymphoma (FL). The cytogenetic result was important because as they have distinct characteristics, the ML is an aggressive NHL and LF are mostly indolent, allowed a suitable clinical orientation.

The application of FISH technique is a common practice in cytogenetic analysis of hematologic malignancies disorders. It is a quick, easy and effective technique, with greater specificity and resolution than conventional cytogenetics, allowing the detection of subtle or cryptic chromosomal rearrangements such as t(4;14). This technique was applied in order to complement the cytogenetic analysis in the screening of common abnormalities in certain diseases, some of them difficult to detect through conventional cytogenetic analysis and in the characterization of chromosomal rearrangements. The FISH technique was an important contribution to the characterization of chromosomal alterations, and undoubtedly a great complement to conventional techniques.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE GERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XVI
ÍNDICE DE TABELAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Citogenética: perspectiva histórica.....	2
1.2. Citogenética Convencional: a identificação de cromossomas	5
1.3. Citogenética Molecular	7
1.3.1. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	8
1.3.1.1. Tipo de sondas.....	8
1.3.1.1.1. Sondas comerciais.....	8
1.3.1.1.2. Sondas “painting” desenvolvidas no laboratório	9
1.3.1.2. Tipo de marcação da sonda	11
1.3.2. Genómica comparativa	12
1.3.2.1. “Chromosome bar coding”	13
1.4. Doenças hemato-oncológicas	14
1.4.1. Sistema hematopoiético: princípios gerais	14
1.4.2. Classificação das doenças hemato-oncológicas	15
1.4.3. Neoplasias mielóides.....	17
1.4.3.1. Doenças mieloproliferativas (DMP).....	17
1.4.3.1.1. Leucemia mielóide crónica (LMC)	18
1.4.3.2. Doenças mieloproliferativas / mielodisplásicas (DMP / SMD)	20
1.4.3.2.1. Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).....	20
1.4.3.3. Síndromes mielodisplásicas (SMD)	20
1.4.3.4. Leucemia mielóide aguda (LMA)	22
1.4.4. Neoplasias linfóides	22
1.4.4.1. Neoplasias das células B (NCB)	23

1.4.4.1.1. Leucemia linfática crónica (LLC)	23
1.4.4.1.2. Mieloma múltiplo (MM).....	24
1.4.4.2. Neoplasias das células T e NK (NCT)	26
1.4.4.3. Linfoma Hodgkin (LH)	26
1.4.4.4. Linfoma não-Hodgkin (LNH)	26
1.4.4.4.1. Linfoma do manto (LM)	26
1.4.4.4.2. Linfoma folicular (LF).....	27
1.5. Objectivos	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Material Biológico	29
2.2. Citogenética Convencional	29
2.2.1. Cultura celular	29
Protocolo 1 - Cultura celular.....	30
2.2.2. Manipulação das células até à obtenção de cromossomas	31
2.2.2.1. Inibidor mitótico	31
2.2.2.2. Solução hipotónica	31
2.2.2.3. Fixador	32
2.2.2.4. Espalhamento	32
Protocolo 2 - Manipulação das células	32
2.2.3. Técnicas de bandeamento cromossómica	33
2.2.3.1. Bandeamento GTL	33
Protocolo 3 - Método de bandeamento GTL.....	34
2.2.4. Microscopia e análise cromossómica.....	34
2.3. Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	35
2.3.1. Preparação das lâminas	35
2.3.2. Preparação da sonda.....	35
2.3.3. Desnaturação da sonda e da amostra.....	35
2.3.4. Hibridação da sonda com o <i>locus</i> em estudo.....	36
2.3.5. Lavagem pós-hibridação	36
2.3.6. Detecção	36
2.3.7. Contraste.....	36
2.3.8. Tipo de sondas	36
2.3.8.1. Sondas comerciais	37
Protocolo 4 - Sonda de sequência única / α -satélite (VYSIS).....	37
Protocolo 5 - Sonda subtelomérica (VYSIS)	38
Protocolo 6 - Sonda “painting” (CAMBIO).....	38

2.3.8.2. Sondas “painting” específicas para cromossomas humanos desenvolvidas no Laboratório de Genómica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB, CGB - UTAD.....	40
Protocolo 7 - Amplificação das sondas “painting” de humano por DOP-PCR	40
Protocolo 8 - Electroforese em gel de agarose	41
Protocolo 9 - Marcação das sondas por DOP-PCR.....	42
Protocolo 10 -Precipitação das sondas.....	43
Protocolo 11 - Hibridação das sondas “painting” obtidas por DOP-PCR.....	43
2.3.9. Microscopia e análise	45
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	46
3.1. Neoplasias mielóides.....	50
3.1.1. Doenças mieloproliferativas (DMP)	50
3.1.2. Doenças mieloproliferativas / mielodisplásicas (DMP / SMD).....	55
3.1.3. Síndromes mielodisplásicas (SMD)	60
3.1.4. Leucemia mielóide aguda (LMA).....	68
3.2. Neoplasias linfóides	72
3.2.1. Neoplasias das células B (NCB).....	72
3.2.1.1. Leucemia linfática crónica (LLC)	73
3.2.1.2. Mieloma múltiplo (MM)	82
3.2.2. Linfomas não-Hodgkin (LNH)	89
4. CONCLUSÕES	97
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	100
6. BIBLIOGRAFIA.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cariótipo humano com bandas GTG, dividido em sete grupos segundo a Convenção de Denver (1960). Grupo A – cromossomas (#) metacêntricos grandes; B - # sub-metacêntricos grandes; C - # sub-metacêntricos e metacêntricos de tamanho médio; D - # acrocêntricos de tamanho médio; E - # metacêntricos e sub-metacêntricos; F - # metacêntricos de pequena dimensão; G - # acrocêntricos de pequena dimensão.	5
Figura 2 - Princípios básicos da técnica de FISH (adaptado de Bryan, 2009).	8
Figura 3 – Reacção de PCR (adaptado de Mohammed, 2009).....	10
Figura 4 – A marcação da sonda pode ser de dois tipos, directa (a) ou indirecta (b) (adaptado de Chaves, 2002).	12
Figura 5 – Ideograma dos cromossomas humanos com as sondas “painting” de <i>H. syndactylus</i> (adaptado de Genomics, 2010).	14
Figura 6 – Hematopoiese (adaptado de Vilela, 2006).	15
Figura 7 – Organigrama das doenças hemato-oncológicas, segundo a classificação WHO.	16
Figura 8 – Tipo de célula mielóide e alterações genéticas envolvidas nas diferentes DMP (adaptado de Levine <i>et al.</i> , 2007).	18
Figura 9 – Comparação entre a hematopoiese normal e a de pacientes com SMD (adaptado de Corey <i>et al.</i> , 2007).	21
Figura 10 – a) Cariograma, em bandas GTL, do sexo feminino com a translocação t(9;22) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 9 e 22 assinalando os pontos de quebra.	51
Figura 11 - Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(9;22) e uma trissomia 8 (assinalado com setas).	52
Figura 12 – a) Esquema da sonda para os genes <i>BCR - ABL1</i> (adaptado Smith <i>et al.</i> , 2003); b) a sonda aplicada numa metáfase com a t(9;22), observa-se um sinal vermelho no cromossoma (#) 9 normal, um sinal verde no # 22 normal e dois sinais amarelos nos # 9 e 22 envolvidos na translocação.	53
Figura 13 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(9;22)(q34;q11) (assinalado com setas); b) na técnica de FISH observa-se apenas um sinal de fusão no derivativo do # 22, com deleção do gene <i>ABL1</i> no derivativo # 9, que marca apenas a verde.....	53
Figura 14 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(8;22) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 8 e 22 assinalando os pontos de quebra.....	54
Figura 15 – FISH com a sonda para os genes <i>BCR-ABL1</i> , observam-se 3 sinais verdes (<i>BCR</i>) e 2 vermelhos (<i>ABL1</i>).	54

- Figura 16 – Cariograma, em bandas GTL, com uma translocação entre os # 1 e 5, com deleção intersticial do ramo longo do # 5 e uma translocação t(15;22) (assinalado com setas). 56
- Figura 17 – Representação, com idiogramas, da translocação desequilibrada entre os # 1 e 5 e da deleção intersticial no # 5, desde a banda q14 até à banda q31. 57
- Figura 18 - Metáfase com sondas subteloméricas para os: a) # 1 (p-verde; q-vermelho), # Xp e Yp a amarelo; b) # 5 (p-verde; q-vermelho). Em que se confirma a t(1;5). 57
- Figura 19 - Idiograma dos # 15 e 22 assinalando os pontos de quebra. 58
- Figura 20 - Metáfase com sondas subteloméricas para o: a) # 15q (amarelo), com uma região controlo no 15q22 (azul-claro), e # 10 (p-verde; q-vermelho); b) # 22q (amarelo), com uma região controlo no 22q11 (azul-claro) e # 3 (p-verde; q-vermelho). 59
- Figura 21 – Cariogramas, em bandas GTL, com: a) trissomia 8; b) trissomia 8 e deleção do 20q; c) monossomia do # 7 e um isocromossoma do 17q; e d) deleção do 5q (as alterações estão assinaladas com uma seta). 62
- Figura 22 – Representação do idiograma e o par do cromossoma 5 com deleção: a) parcial, caso n.º 10 e b) intersticial, caso n.º 7. 62
- Figura 23 - FISH com a sonda para a região 5q31, observam-se dois sinais verdes, relativos à região controlo (5p) e apenas um sinal vermelho para a região 5q31, no # 5 normal. 63
- Figura 24 - a) Cariograma, em bandas GTL, com deleção no 5q e uma translocação desequilibrada entre os cromossomas 6 e 12 (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 6 e 12 assinalando os pontos de quebra e a perda dos ramos curtos. 64
- Figura 25 – FISH com sondas WCP para os: a) # 6 (verde), marca o # 6 normal e parte do derivativo; b) # 12 (verde), com marcação no #12 normal e no # derivativo. 65
- Figura 26 – Esquema com o par de # 7 e 12, em bandas GTL e respectivos idiogramas, com a região delectada assinalada. 66
- Figura 27 – Cariograma, em bandas GTL, representativa do clone c). A deleção do 7q e do 12p estão assinalados com uma seta. Os # de origem desconhecida estão assinalados com um círculo. ... 66
- Figura 28 – Metáfase com sondas WCP para os # 7 (verde) e # 11 (amarelo). As setas assinalam os # de origem desconhecida. A técnica de FISH permitiu identificar o cromossoma de maior dimensão (a amarelo) como pertencente ao # 11. 67
- Figura 29 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(8;16) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 8 e 16 assinalando os pontos de quebra. 69
- Figura 30 – Metáfase com sondas subteloméricas para o # 8p (verde), # 8q (vermelho) e # 17p (amarelo). 69

Figura 31 - FISH com sondas subteloméricas para o ramo curto (verde) e ramo longo (vermelho) do # 16.	70
Figura 32 - a) Cariograma, em bandas GTL, com monossomia do cromossoma X e uma translocação $t(8;19)(q24.1;q13.1)$ (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 8 e 19 assinalando os pontos de quebra.....	71
Figura 33 – FISH com sondas subteloméricas para o ramo curto (verde) e ramo longo (vermelho) do # 19.	71
Figura 34 – a) Cariograma, em bandas GTL, com uma trissomia 12 (assinalada com uma seta); b) Metáfase parcial, com a sonda α -satélite para o cromossoma 12, com marcação a vermelho em três cromossomas.	75
Figura 35 – Cariograma, em bandas GTL, com uma trissomia 12 e 18 (assinalado com setas).	75
Figura 36 – Cariograma, em bandas GTL, com trissomia 12 e duas translocações: $t(7;14)$ e $t(13;17)$ (assinalado com setas).....	76
Figura 37 - Esquema com o par de cromossomas 7 e 14, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados.	76
Figura 38 - Esquema com o par de cromossomas 13 e 17, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados.	77
Figura 39 – FISH, em núcleos, com a sonda: a) α -satélite para o # 12 (vermelho), em que se observam três sinais; b) sequência única para a região 17p13 (vermelho), observando-se apenas um sinal.	78
Figura 40 – Cariograma, em bandas GTL, com deleção da banda q14 no cromossoma 13.....	79
Figura 41 – FISH com a sonda para o # 13q14 (vermelho), na metáfase e nos núcleos observa-se apenas um sinal.....	79
Figura 42 - Cariograma, em bandas GTL, com deleção das bandas q22 a q23 no cromossoma 11.....	80
Figura 43 – FISH com a sonda para a região 11q23 (vermelho), observam-se núcleos com um e dois sinais.	80
Figura 44 - Idiograma dos # 4 e 14 assinalando os pontos de quebra envolvidos na translocação.	83
Figura 45 – Par de # 4 e 14, em bandas GTL, de um caso com a translocação $t(4;14)(p16;q32)$, em que não se observa nenhuma diferença entre os cromossomas.	84
Figura 46 - a) Esquema da sonda para os genes <i>IGH - FGFR3</i> (adaptado Heidelberg); b) a sonda aplicada em núcleos, um núcleo é positivo para a translocação $t(4;14)$ (assinalado com uma seta).....	84
Figura 47 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação $t(11;14)$ (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 11 e 14 assinalando os pontos de quebra.....	85

- Figura 48 - a) Esquema da sonda para os genes *IGH - CCND1* (adaptado Heidelberg); b) a sonda aplicada numa metáfase com a t(11;14), observa-se um sinal vermelho no # 11 normal, um sinal verde no # 14 normal e dois sinais amarelos nos # 11 e 14 envolvidos na translocação. 86
- Figura 49 - Cariograma, em bandas GTL, com uma trissomia 8 e duas translocações: t(6;19) e t(11;14) (assinalado com setas)..... 86
- Figura 50 - Esquema com o par de cromossomas 6 e 19, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados. 87
- Figura 51 - Cariograma, em bandas GTL, com deleção da banda q14 no cromossoma 13. 88
- Figura 52 – FISH, em núcleos, com a sonda para a região 13q14, observam-se quatro núcleos com um único sinal. 88
- Figura 53 - Esquema com o par # 11 e 14, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados. 90
- Figura 54 - FISH com a sonda para a t(11;14), observa-se um sinal vermelho no # 11 normal, um sinal verde no # 14 normal e dois sinais amarelos nos # envolvidos na translocação..... 90
- Figura 55 – Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(11;14)(q13;q32) e um isocromossoma do ramo longo do cromossoma 17 (assinalado com setas). 91
- Figura 56 – FISH, em metáfase, com a sonda subtelomérica para o: a) # 17p, a amarelo, apenas se observa sinal no # 17 normal, e para ambos os ramos do # 8 (p-verde e q-vermelho); b) # 17q (amarelo) observam-se três sinais, um no # 17 normal e dois no isocromossoma do 17, e ramo curto (verde) e longo (vermelho) do # 9. 92
- Figura 57 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(14;18) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 14 e 18 assinalando os pontos de quebra..... 93
- Figura 58 - a) Esquema da sonda para os genes *BCL2 - IGH* (adaptado Heidelberg); b) a sonda aplicada em núcleos, dois núcleos são positivos para a t(14;18) (assinalados)..... 93
- Figura 59 – Cariograma, em bandas GTL, em que se observam vários rearranjos assinalados a vermelho. 94
- Figura 60 – Técnica de FISH com a sonda para a translocação: a) t(14;18), nos núcleos observam três sinais verdes (14q32); b) t(11;14) observam-se três # com marcação a verde (14q32), um # acrocêntrico (# 14 normal), e dois # de origem desconhecida. 95
- Figura 61 - FISH com sondas WCP para os # 14 (vermelho), # 19 (verde) e # 17 (amarelo). A amarelo observam-se dois # 17 normais; a verde, o # 19 normal e o derivativo, em que a marcação é parcial; e a vermelho, o # 14 normal e parte de um # metacêntrico. 96

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência dos 24 casos de neoplasias mielóides pelos quatro grupos.....	47
Gráfico 2 – Frequência dos 26 casos de neoplasias linfóides pelos diferentes grupos.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Tipo de bandas, autores e ano em que surgiram (Verma e Babu, 1995; Barch <i>et al.</i> , 1997).....	6
Tabela 2 – Alterações citogenéticas nos SMD e seu valor prognóstico (Gmidène <i>et al.</i> , 2008; Haase, 2008).	21
Tabela 3 – Alterações citogenéticas nas LMA e seu valor prognóstico (Appelbaum <i>et al.</i> , 2001).....	22
Tabela 4 – Alterações citogenéticas nas LLC e seu valor prognóstico (Wiktor e Dyke, 2004; Quitero-Rivera <i>et al.</i> , 2009).....	24
Tabela 5 – Alterações citogenéticas nos MM e seu valor prognóstico (Kyle e Rajkumar, 2009).....	25
Tabela 6 – Diferentes tipos de cultura utilizadas nas 50 amostras e suas características consoante o tipo de DHO.....	30
Tabela 7 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de LMC.....	50
Tabela 8 – Resultados da análise citogenética obtidos nos dois casos de LMMC.....	56
Tabela 9 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de SMD.....	61
Tabela 10 – Resultados da análise citogenética obtidos nos dois casos de LMA.	68
Tabela 11 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de LLC.....	73
Tabela 12 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de MM.....	82
Tabela 13 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos seis casos de LNH.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- – monossomia

– cromossoma

% – percentagem

~ – aproximadamente

+ – extra

5TAMRA – 5-carboxitetrametilrodamina

AT – adenina e timina

bp – par de base

BSA – albumina de soro bovino

CGH – hibridação genómica comparativa

CHTMAD – Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro

CO₂ / O₂ – dióxido de carbono / oxigénio

DAPI – “4'-6-diamidino-2-phenylindole”

del – deleção

der – derivativo

DHO – doenças hemato-oncológicas

DMP – doenças mieloproliferativas

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxinucleotídeo trifosfato

DOP-PCR – “degenerate oligonucleotide primed” PCR

dup – duplicação

dUTP – desoxiuridina trifosfato

EtBr – brometo de etídeo

FACS – “fluorescence activated cell sorting”

FISH – hibridação *in situ* fluorescente

FITC – fluoresceinai isotiocianato

g, mg, ug – grama, miligrama e micrograma

GC – guanina e citosina

h, min, seg – horas, minutos, segundos

i – isocromossoma

IBB, CGB - UTAD – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Genética e Biotecnologia da UTAD

ISH – hibridação *in situ*

IPO – Instituto Português de Oncologia

ISCN – “International System for Human Cytogenetic Nomenclature”

Kb – kilobase

KCl – cloreto de potássio

l, ml, ul – litro, mililitro, microlitro

LF – linfoma folicular

LH – linfoma Hodgkin

LLC – leucemia linfática crónica

LM – linfoma do manto
LMA – leucemia mielóide aguda
LMC – leucemia mielóide crónica
LNH – linfoma não-Hodgkin
M – molar
mar – “marker”
Mb – megabase
MGUS – gamopatia monoclonal de significado indeterminado
MM – mieloma múltiplo
MO – medula óssea
n.º – número
NCB – neoplasias das células B
NCT – neoplasias das células T e NK
NK – linfócitos “natural killer”
°C – graus Celsius
p – ramo curto do cromossoma
PBS – tampão fosfato salino
PCR – “polymerase chain reaction”
Ph – cromossoma “Philadelphia”
PHA-M – fitohemaglutinina
q – ramo longo do cromossoma
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
SMD – síndromes mielodisplásicas
SP – sangue periférico
SSC – citrato sódio salino
t – translocação
TBE – tris borato EDTA
ter – terminal
TPA – 1,2-O-tetradecanoilforbol-1,3-acetato
TRITC – isotiocianato de tetrametilrodamina
UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
UV – ultravioleta
WCP – “whole chromosome painting”
WHO – “World Health Organization Classification of Tumours”

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Citogenética: perspectiva histórica

A herança das características físicas tem sido objecto de curiosidade e interesse ao longo dos tempos. Os hebreus e os gregos, bem como as posteriores escolas medievais, descreveram vários fenómenos genéticos e propuseram teorias para explicá-las, muitas delas incorrectas (Jorde *et al.*, 1995).

A primeira observação de elementos cromatídeos de que há registo foi realizada por Eduard Strasburger, em 1875, a partir de células vegetais (Lawce e Brown, 1997) e em 1877, Walther Flemming observou-os dentro do núcleo de células animais (Connor e Ferguson-Smith, 1984). Flemming criou as palavras mitose, cromatina, profase, metáfase, anafase e telofase e Waldeyer, em 1888, a palavra cromossoma (cromo de *chromos* – corado e soma de *corpo*, isto é corpo corado) (Lawce e Brown, 1997).

As décadas seguintes foram um período de considerável trabalho experimental e teórico, com o desenvolvimento de técnicas de cultura em vários tipos de células de mamíferos e a introdução da colchicina e da solução hipotónica na manipulação das culturas. Estes desenvolvimentos culminaram numa importante descoberta, em 1956, a determinação do número correcto de cromossomas humanos, 46, por Tjio e Levan (Vogel e Motulsky, 1997).

Três anos depois foi descrita a primeira alteração cromossómica humana, a trissomia 21 por Lejeune e seus colegas. Outras alterações numéricas foram descritas nos anos seguintes como por exemplo, o síndrome de Turner, a trissomia 13 e 18, o síndrome Klinefelter (Smeets, 2004). Em 1960, Nowell e Hungerford descreveram a primeira anomalia cromossómica adquirida, o cromossoma “Philadelphia” observado em células de medula óssea num doente com leucemia mielóide crónica (Lorentz *et al.*, 2002). A associação de patologias há muito identificadas, com a causa cromossómica conduziu ao desenvolvimento de uma nova ciência, nos anos 60, a **Citogenética Clínica** (Lawce e Brown, 1997).

O seu rápido desenvolvimento levou um pequeno grupo de investigadores a reunir-se em Denver, em 1960, para estabelecer um sistema comum de nomenclatura que permitiria melhorar a comunicação entre investigadores desta área. O sistema proposto nesse encontro, intitulado “A Proposed Standard System of Nomenclature of Human Mitotic Chromosomes” mais conhecido como Convenção de Denver, representa a base de todas as nomenclaturas subsequentes. Desta

convenção resultou a classificação dos cromossomas em sete grupos, de A a G, baseado no tamanho decrescente dos cromossomas e na posição do centrómero (ISCN, 2009).

Em 1968, Casperson e seus colaboradores publicaram as primeiras imagens de cromossomas vegetais com bandas, corados com “quinacrine mustard”. Ao aplicarem este método aos cromossomas humanos verificaram que cada cromossoma tinha um padrão de coloração constante, que consistia em regiões claras e escuras alternadas, às quais denominaram de **bandas** (ISCN, 2009). Em 1970, o grupo de Casperson publicou o primeiro cariótipo bandeado (Smeets, 2004).

A década de 70 fica marcada pelo desenvolvimento de muitas outras técnicas de bandeamento, e por conseguinte, a primeira revolução na análise citogenética. Estas técnicas aumentaram a capacidade de identificar anomalias cromossómicas responsáveis por síndromes malformativos e permitiram reconhecer regiões de cromossomas envolvidas em alterações cromossómicas estruturais (Lawce e Brown, 1997). Em 1973, Rowley demonstrou que o cromossoma “Philadelphia” resultava afinal de uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22 (Deininger *et al.*, 2000). Na área oncológica, estas técnicas permitiram a identificação de anomalias cromossómicas específicas e associá-las a certos tipos de leucemias e linfomas (Kearney, 2001).

Apesar do grande avanço na citogenética clínica com a introdução do padrão de bandas, a resolução dos cromossomas era limitada (≈ 300 bandas). Yunis (1976) e Uta Franke (1978) introduziram as bandas de alta resolução, com cromossomas em prometáfase ou mesmo em profase obtidos pela sincronização das culturas de linfócitos. A resolução de 300 a 400 bandas até então observada, aumenta 3 a 4 vezes para um nível de quase 2000 bandas. Esta resolução permitiu detectar rearranjos muito subtis, como por exemplo microdelecções, o Tumor de Wilms (11q13) em tumores sólidos, retinoblastoma, Síndrome Prader-Willi, entre outros (Smeets, 2004).

Contudo, em alguns casos as alterações cromossómicas detectadas eram muito pequenas ou complexas para serem totalmente identificadas pelas técnicas de bandeamento. Eram necessárias técnicas mais sensíveis e refinadas, o que levou ao desenvolvimento de uma nova técnica, a hibridação *in situ* (Smeets, 2004). Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Gall e Pardue, em 1969; hibridaram sondas de DNA radioactivas de sequências repetitivas de cromossomas de rato e *Drosophila*. A técnica de hibridação *in situ* (ISH) isotópica consistia em sondas de ácidos nucleicos marcadas com isótopos e detectadas após hibridação por auto-radiografia. A ISH

isotópica era o único método que podia fornecer, simultaneamente, informação ao nível celular e molecular, pela visualização de sequências de DNA nos cromossomas, nas células e em secções de tecidos. Na década de 70 foram várias as aplicações da ISH isotópica no diagnóstico clínico e na investigação (Serakinci e Kolvraa, 2009).

Nos anos 80 desenvolveram-se técnicas de hibridação *in situ* não-isotópica, com vantagens relativamente à auto-radiografia, incluindo rapidez, segurança pela não utilização de materiais radioactivos e resolução do sinal (Lichter e Ward, 1990). Esta técnica foi designada por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). As primeiras FISH foram realizadas por Landegent e seus colaboradores, em 1985 (Vogel e Motulsky, 1997).

A introdução da técnica de FISH na análise citogenética deu origem a uma nova revolução da citogenética com uma elevada resolução e um espectro mais amplo de teste, sendo possível detectar rearranjos crípticos ou alterações apenas visíveis em termos moleculares. Da associação da citogenética convencional com a biologia molecular nasceu a **Citogenética Molecular** (Smeets, 2004).

Rapidamente, a técnica de FISH se tornou de rotina nos laboratórios de diagnóstico, com várias aplicações, nomeadamente, na caracterização de rearranjos complexos, na detecção de deleções crípticas e na análise de células em interfase (Serakinci e Kolvraa, 2009). Actualmente, são centenas as sondas disponíveis que permitem marcar especificamente diferentes regiões de um cromossoma.

Nos anos 90, a associação de várias metodologias, designadamente, a técnica de FISH, o “flow-sorting”, a microdissecção e o desenvolvimento do “Degenerate Oligonucleotide Primed - Polimerase Chain Reaction” (DOP-PCR) permitiu a comparação de genomas, a qual se inclui na **Genómica Comparativa**. A combinação dos conhecimentos das técnicas convencionais (bandeamento) com as técnicas moleculares (“chromosome painting”, mapeamento e sequenciação) levou ao aparecimento de uma “nova” citogenética, a **Citogenómica** (Dobigny e Yang, 2008). Esta área tem diversas aplicações desde o diagnóstico clínico, especialmente ao nível oncológico, à investigação, bem como a determinação de mecanismos cromossómicos evolutivos e aspectos funcionais do genoma.

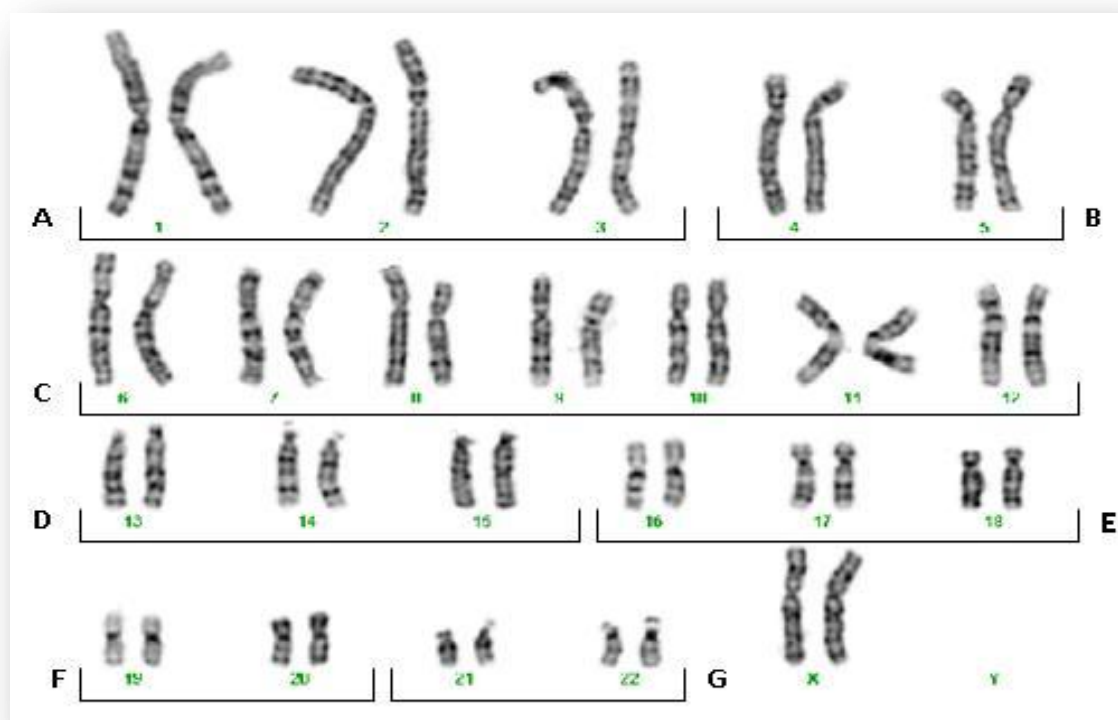
Desde então muitas outras técnicas têm sido desenvolvidas, como por exemplo “fiber” FISH, hibridação genómica comparativa (CGH), “spectral karyotyping” (SKY), “multiplex” FISH (M-FISH), “color banding”, e mais recentemente o “array” CGH (Li, 2002; Speicher e Carter, 2005). As técnicas actualmente disponíveis permitem detectar deleções ou rearranjos num único gene,

visualizar translocações crípticas, determinar o número de cópias amplificadas de um oncogene e os rearranjos complexos podem ser completamente caracterizados (Vorsanova *et al.*, 2010).

As últimas décadas foram de avanços significativos na Biologia Molecular com grande impacto na Genética Humana: em pouco anos, diversas síndromes foram identificados e existe uma nova apreciação da diversidade do genoma humano. Actualmente, a citogenética tem várias aplicações desde o diagnóstico clínico, ao estudo evolutivo das espécies, investigação genómica, entre outras. As alterações cromossômicas constituem uma parte importante de doenças genéticas, cerca de 70%, e desempenham um papel importante na patogénia do cancro (Bejjani e Shaffer, 2008).

1.2. Citogenética Convencional: a identificação de cromossomas

A citogenética convencional estuda a estrutura, patologia, função e evolução dos cromossomas e permite ter uma visão global do genoma, pela análise do cariótipo (Lawce e Brown, 1997). O cariótipo ou mapa cromossómico é o alinhamento sistemático dos cromossomas de uma célula em grupos (de A a G), com base no tamanho decrescente dos cromossomas, na posição do centrómero e no padrão de bandas de cada um deles (figura 1). O centrómero dos cromossomas (#) pode ser metacêntrico (# 3, 16, 19 e 20), submetacêntrico (# 2, 4 a 12, 17, 18 e X) ou acrocêntrico (# 13 a 15, 21, 22 e Y) (ISCN, 2009).



O termo **banda** define-se como parte de um cromossoma que se pode distinguir dos segmentos adjacentes por parecer escura ou clara através de uma ou mais técnicas de bandeamento (ISCN, 2009). Cada cromossoma apresenta uma série contínua de bandas claras e escuras, sendo o padrão de bandas obtido específico de cada par de cromossomas (Barch *et al.*, 1997).

Na tabela 1 estão representados alguns tipos de bandas existentes.

Tabela 1 – Tipo de bandas, autores e ano em que surgiram (Verma e Babu, 1995; Barch *et al.*, 1997).

Método	Autores	Tipo de bandas
Q	Casperson <i>et al.</i> (1970)	Fluorescente que cora zonas ricas em bases A-T e pobres em bases G-C
C	Pardue e Gall (1970) Arrighi e Hsu (1971)	Cora complexos de sequências de DNA altamente repetitivas (centrómeros e constrições secundárias dos # 1, 9 e 16)
G	Sumner <i>et al.</i> (1971)	Sobreponíveis às bandas Q mas coradas com Giemsa
R	Dutrillaux e Lejeune (1971)	Inversas às G e Q
T	Dutrillaux (1973)	Marca as regiões distais dos cromossomas. Bandas R específicas
NOR	Hsu (1975) Bloom (1976)	Identifica o RNA ribossômico 18S e 28S (regiões organizadoras do nucléolo)
DA-DAPI	Schweitzer (1978)	Cora as constrições secundárias dos # 1, 9 e 16, o braço curto do # 15, e a parte distal do # Y
5-BrdU	Zakharov (1981)	Técnica dinâmica que permite diferenciar os dois # X

As bandas dos cromossomas reflectem a organização funcional do genoma que regula a replicação, reparação, transcrição de DNA e recombinação genética. As bandas são estruturas de grande dimensão, cada uma com, aproximadamente, 5 a 10 milhões de pares de base (Mb) de DNA, que podem incluir centenas de genes. A base molecular dos métodos de bandeamento é conhecida por envolver a composição de nucleotídeos, associação a proteínas e organização funcional do genoma (ISCN, 2009). Por exemplo, bandas G positivas (bandas escuras) são ricas em adenina-timina (AT), com replicação tardia e poucos genes activos, enquanto as bandas G negativas (claras) são ricas em citosina-guanina (CG), com replicação precoce e ricas em genes activos (Barch *et al.*, 1997).

As técnicas de bandeamento, consoante os objectivos pretendidos, podem ser divididas em dois grupos (Barch *et al.*, 1997; Gustashaw, 1997):

- a) Técnicas básicas** – produzem padrões de bandeamento específicos (consoante a técnica) ao longo do comprimento de todos os cromossomas.

A vantagem destas técnicas consiste no facto de o padrão de bandas obtido ser idêntico de célula para célula, de tecido para tecido e, excepto em regiões polimórficas, de indivíduo para indivíduo dentro da mesma espécie. Mesmo em rearranjos de um cromossoma, como os que ocorrem numa translocação, o padrão de bandas mantém-se no segmento rearranjado, permitindo a identificação do segmento translocado. A fidelidade do padrão de bandas deve-se à organização das sequências de DNA e das proteínas associadas aos cromossomas. Exemplos destas técnicas são: o bandeamento Q, G e R. A opção por cada uma das técnicas depende da experiência do laboratório;

b) Técnicas selectivas – coram apenas uma região ou banda específica de alguns ou de todos os cromossomas.

Exemplos: a técnica de bandeamento C revela a heterocromatina centromérica e a porção distal do cromossoma Y; a técnica de bandeamento NOR identifica os locais activos de RNA, nas regiões organizadoras do nucléolo, que se localizam no ramo curto dos cromossomas acrocêntricos (# 13, 14, 15, 21 e 22) e a coloração DA-DAPI, especialmente utilizada para sinalizar o ramo curto do cromossoma 15, também identifica a heterocromatina nos cromossomas 1, 9, 15, 16 e Y.

A citogenética convencional tem apenas capacidade para detectar rearranjos superiores a 3-5 milhões de pares de base, a introdução das técnicas moleculares contornou algumas das limitações da citogenética clássica e tornaram-se num complemento da análise citogenética (Bejjani e Shaffer, 2008).

1.3. Citogenética Molecular

A citogenética molecular tem por base a técnica de FISH. As últimas décadas foram de grande desenvolvimento das técnicas de citogenética molecular, com o intuito de aumentar a resolução de detecção de anomalias cromossómicas (Speicher e Carter, 2005). O desenvolvimento das metodologias com base no FISH está associado a uma melhoria da sensibilidade, especificidade e resolução da técnica; devido a uma melhor compreensão das propriedades físicas e químicas dos ácidos nucleicos e da cromatina, bem como a avanços no campo da microscopia de fluorescência e digitalização da imagem e à crescente disponibilidade de recursos genómicos e de ferramentas de bioinformática (Volpi e Bridger, 2008).

1.3.1. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de FISH baseia-se no princípio da detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos, em material citológico fixo numa lâmina, através da utilização de sondas de DNA específicas, marcadas com um fluorocromo ou capazes de se associarem indirectamente a eles (figura 2) (Rooney, 2001; Fan, 2002). Assim, os componentes básicos da técnica de FISH são a sonda e a sequência alvo (*locus*), à qual a sonda hibrida.

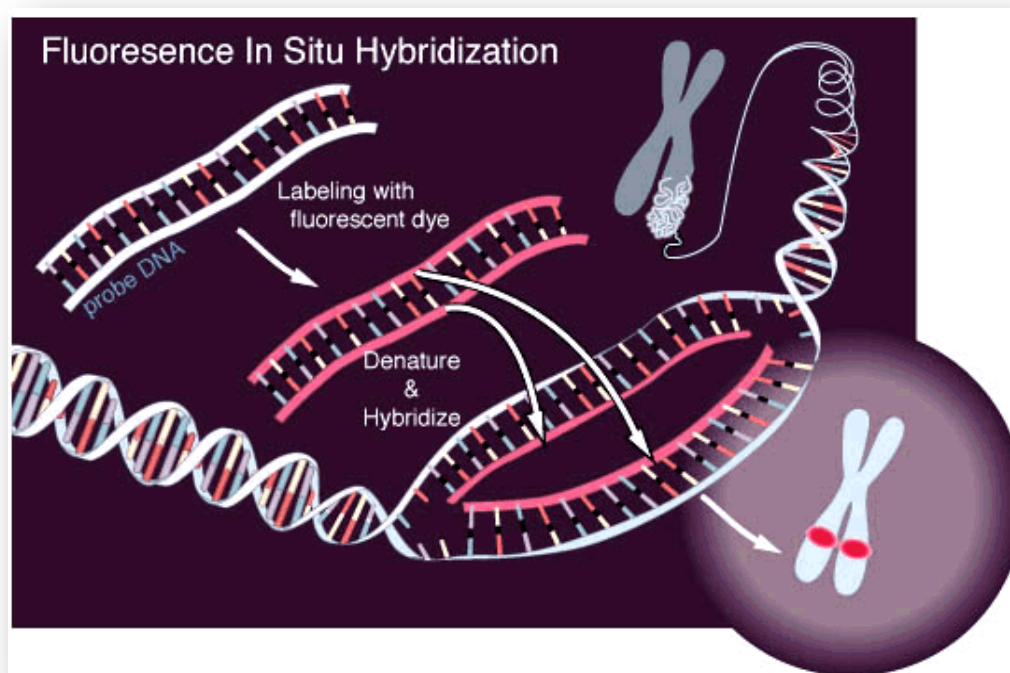


Figura 2 - Princípios básicos da técnica de FISH (adaptado de Bryan, 2009).

1.3.1.1. Tipo de sondas

As sondas utilizadas na técnica de FISH são sequências de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, complementares aos *loci* que se pretendem estudar (Rooney, 2001). A escolha das mesmas deve ser feita de acordo com o tipo de anomalia a investigar.

1.3.1.1.1. Sondas comerciais

Actualmente, estão disponíveis no mercado um grande número de sondas, a maioria delas foram obtidas a partir de fragmentos de DNA isolados, purificados e amplificados para o uso no Projecto do Genoma Humano e que foram conservados por inserção em bactérias que os replicam continuamente (Barch *et al.*, 1997; Kearney, 2001; Rooney, 2001).

O desenvolvimento de diferentes tipos de sondas permitiu (Muhlmann, 2002):

- a) Obter resultados a partir de células em interfase;
- b) Identificar, de forma rápida, sequências específicas nos cromossomas quer em metáfase quer em interfase;
- c) Interpretar rearranjos cromossómicos complexos;
- d) Determinar os domínios dos cromossomas em interfase;
- e) O seu resultado em cores é de fácil interpretação, explicação e compreensão;

As sondas podem ser divididas em três grandes grupos (Fan, 2002):

- a) **Sondas de sequência repetitiva** – contêm cerca de 100 a 5000 cópias de uma sequência. Incluem as sondas para os centrómeros dos cromossomas e regiões adjacentes, a maioria definida por DNA satélite. O DNA satélite consiste em sequências de DNA altamente repetitivas, com diferente organização, abundância e complexidade, podendo ser separadas por centrifugação diferencial em várias fracções: DNA α -satélite (localiza-se nos centrómeros de todos os cromossomas), DNA β -satélite (na heterocromatina pericêntrica dos cromossomas acrocêntricos) e DNA satélite clássico (são repetições curtas localizadas na heterocromatina pericêntrica dos # 1, 9, 16 e ramo longo do Y). Este tipo de sondas é, preferencialmente, utilizado na análise de anomalias cromossómicas numéricas e pode ser aplicado quer em metáfases quer em núcleos em interfase;
- b) **Sondas de sequência de cópia única** – constituem sequências de cDNA, utilizadas para detectar regiões específicas nos cromossomas, sendo particularmente úteis na identificação de deleções ou duplicações, bem como locais de quebra, por exemplo em caso de translocação. Podem ser aplicadas em metáfases e em núcleos em interfase.
- c) **Sondas “painting”** – são sondas complexas que contêm sequências específicas para todo o cromossoma, utilizadas para detectar os pares de cromossomas em núcleos em interfase ou metáfase. Estão preferencialmente indicadas para o estudo de rearranjos complexos, de translocações e identificação de cromossomas “marker”.

1.3.1.1.2. Sondas “painting” desenvolvidas no laboratório

As sondas “painting” podem ser obtidas por “flow-sorting”, também denominado por “Fluorescence Activated Cell Sorting” (FACS) ou por microdissecção de cromossomas numa metáfase (Ried *et al.*, 1998; Langer *et al.*, 2004).

No método “flow-sorting”, os cromossomas são seleccionados utilizando um sistema de laser que distingue os cromossomas pelo tamanho e pela afinidade do fluorocromo (com base no

conteúdo AT, CG). Na microdissecção os cromossomas ou segmentos cromossómicos são dissecados e recolhidos. O método de “flow-sorting” tem vantagens em relação à microdissecção, uma vez que é um processo muito automatizado, permitindo coleccionar uma grande quantidade de cromossomas (300 a 500) e com elevado grau de pureza. O DNA cromossómico derivado do “sorting” é amplificado através da técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR), com um “primer” degenerado (“Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR” - DOP-PCR) (Henning *et al.*, 2008).

1.3.1.1.2.1. “Polymerase Chain Reaction” (PCR)

A amplificação de DNA pela técnica de PCR é uma reacção enzimática que utiliza uma DNA polimerase (a mais comum a Taq polimerase I). As DNA polimerases catalisam a ligação fosfodiéster entre o grupo 3'-OH da extremidade crescente da cadeia de DNA (“primer”) e o grupo 5'-PO do desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) que entra (Backx *et al.*, 2008).

A amplificação de DNA é obtida por repetidos ciclos de PCR (figura 3), cada um dos quais constituído por três etapas (Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000; Henning *et al.*, 2008):

- a) **Desnaturação** do DNA alvo, pelo aquecimento até 92°C a 96°C, ficando em cadeia simples;
- b) **“Annealling”** dos “primers”, os pares de “primers” com oligonucleotídeos específicos são ligados à cadeia simples de DNA, a temperaturas entre os 37°C e os 70°C, dependendo da composição do “primer”, extensão e homologia;
- c) **Extensão** dos “primers” pela DNA polimerase, normalmente entre os 70°C e os 74°C.

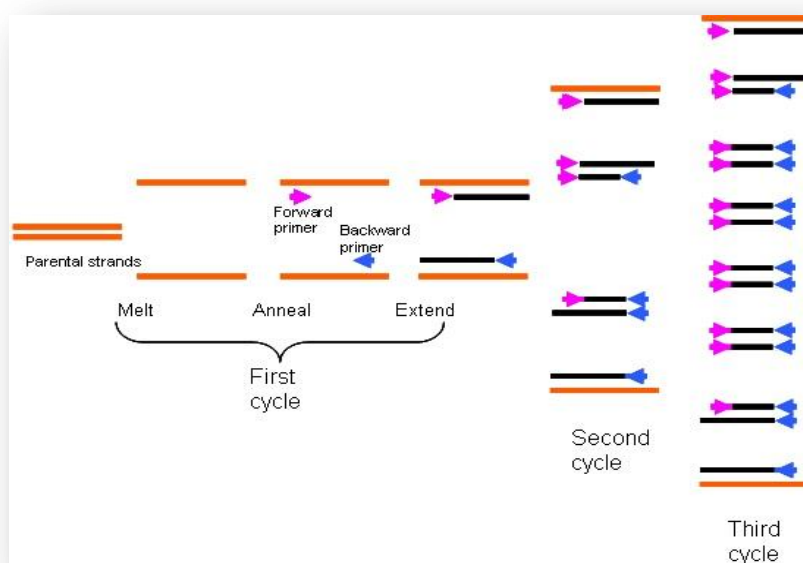


Figura 3 – Reacção de PCR (adaptado de Mohammed, 2009).

O produto da amplificação de PCR é linear, está em cadeia dupla e tem um comprimento e uma sequência definida. Para avaliar o tamanho e o grau de pureza do produto amplificado existem vários métodos, sendo o mais usado pelos laboratórios, a electroforese em gel de agarose. Normalmente, é adicionado ao gel brometo de etídeo (EtBr) que funciona como um corante fluorescente que se intercala entre as bases de DNA, emitindo fluorescência quando exposto a luz ultravioleta (Verma e Babu, 1995).

1.3.1.1.2.2. “Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR” (DOP-PCR)

O método DOP-PCR é uma técnica de PCR que consiste na utilização de um “primer” universal (6-MW), que é uma sequência parcialmente degenerada (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', onde N = A, C, G ou T). O programa de PCR para DOP-PCR utiliza uma baixa temperatura de “annealing” (Hughes *et al.*, 2005).

Teoricamente, as seis bases específicas da extremidade 3' do “primer” hibridam cada 4 Kb ao longo do DNA alvo, a uma temperatura baixa de “annealing” (30°C). Esta temperatura nos primeiros ciclos de amplificação permite que a parte degenerada do “primer” hibride com o DNA alvo. Depois de alguns ciclos, a baixa temperatura de “annealing”, os fragmentos gerados vão conter o “primer” numa das extremidades e a sequência complementar na outra. A temperatura de “annealing” é aumentada (62°C) de modo a permitir unicamente a hibridação do “primer” inteiro (Chaves, 2002).

Os “paints” gerados com o “primer” 6-MW apresentam o cromossoma todo marcado, à excepção do centrómero (Verma e Babu, 1995). Este PCR é designado de PCR primário e serve para gerar “paints”. Um PCR secundário é realizado para amplificar e marcar directa ou indirectamente as sondas obtidas (Hughes *et al.*, 2005).

1.3.1.2. Tipo de marcação da sonda

A marcação da sonda pode ser de dois tipos: directa ou indirecta. Em ambas os casos, um dos nucleotídeos que constitui a sonda está modificado, isto é, está associado directamente a um fluorocromo ou a um “hapten”. Geralmente, o nucleotídeo modificado é a uridina (Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000).

Na marcação directa, os nucleotídeos da sonda estão directamente conjugados com o fluorocromo, como por exemplo a fluoresceína (FITC) ou a rodamina (TRITC) (figura 4a). Deste modo, não é necessário realizar uma etapa de detecção, tornando este método mais rápido e simples que os métodos indirectos. Uma desvantagem em relação aos métodos indirectos é ter

uma sensibilidade mais limitada. A maioria das sondas comerciais está directamente marcada (Kearney e Buckle, 2001).

Na marcação indirecta, os nucleotídeos têm incorporado um “hapten” (figura 4b). Os dois “haptens” mais utilizados são a biotina (membro do complexo da vitamina B) e a digoxigenina (um esteróide da planta *Digitalis purpurea*). O “hapten” é, ulteriormente, detectado por anticorpos específicos ligados a fluorocromos. A imunodeteccção destes “haptens” pode ser directa ou indirecta. Na imunodeteccção directa, o anticorpo primário está directamente conjugado com o fluorocromo, como por exemplo antidigoxigenina – FITC. Já na imunodeteccção indirecta, ao anticorpo primário liga-se um segundo anticorpo conjugado com o fluorocromo (Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000; Chaves, 2002).

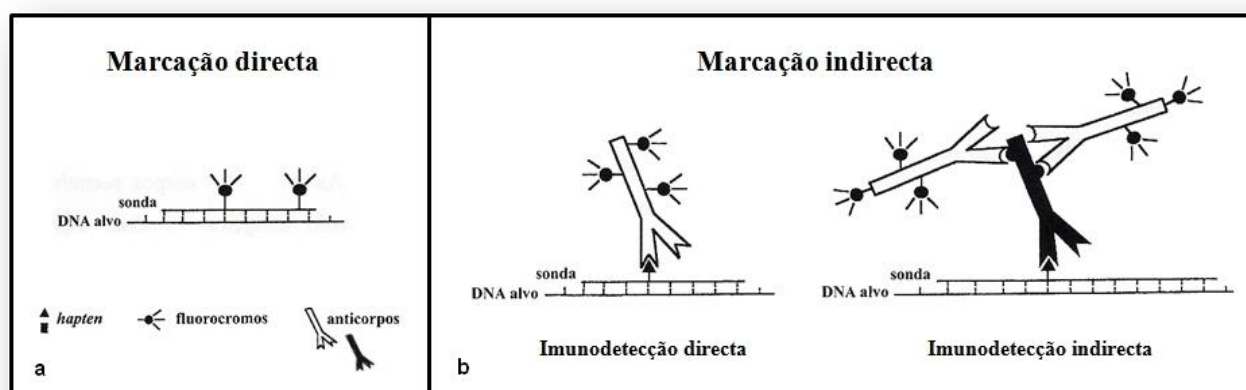


Figura 4 – A marcação da sonda pode ser de dois tipos, directa (a) ou indirecta (b) (adaptado de Chaves, 2002).

Há vários métodos de marcação da sonda, para incorporar os nucleotídeos modificados na sonda, como por exemplo, o “nick translation”, “oligonucleotide primed synthesis” ou PCR (Kearney e Buckle, 2001).

1.3.2. Genómica comparativa

A comparação de genomas tem adquirido um papel relevante em diversas áreas, como por exemplo na biologia da evolução (na compreensão da relação filogenética entre as espécies e nos mecanismos que levaram ao rearranjo dos cariótipos durante a evolução), no estudo da arquitectura nuclear, no diagnóstico pré-natal, pós-natal e oncológico (na identificação de alterações cromossómicas complexas) e na análise da funcionalidade do genoma (Stanyon *et al.*, 2008). Uma das metodologias utilizadas na genómica comparativa é a aplicação do “chromosome painting” à análise comparativa do genoma de espécies.

Uma grande limitação das sondas “painting” é a sua baixa sensibilidade para detectar rearranjos intra-cromossómicos, tais como inversões, duplicações e amplificações de genes. A identificação destes rearranjos só é possível através do bandeamento clássico dos cromossomas ou através de sondas regionais que seccionem os cromossomas em fragmentos (Muller *et al.*, 1998; Ried *et al.*, 1998). Esta última técnica foi introduzida por Lengauer e colaboradores (1993) e ficou conhecida por “chromosome bar coding” (Muller *et al.*, 2004).

1.3.2.1. “Chromosome bar coding”

Os métodos de bandeamento baseados no FISH foram recentemente definidos como qualquer técnica de citogenética molecular utilizada para identificar várias sub-regiões cromossómicas mais pequenas que um ramo de um cromossoma (Ried *et al.*, 1998; Langer *et al.*, 2004). Embora estes métodos tenham características e abordagens diferentes, têm a capacidade de formar bandas específicas nos cromossomas. Fazem parte destes métodos o “multicolor banding” baseado na microdissecção (MCB), “cross-species color banding”, entre outros (Weise *et al.*, 2008).

O “cross-species color banding” (ou RxFISH – “Rain-bow cross-species” FISH, nome comercial) utiliza sondas com origem em cromossomas de gibão que são obtidos por “flow-sorting” e estão marcados de forma diferencial. O genoma do Homem e do gibão (género *Hylobates*) tem uma grande homologia (98%) e os muitos rearranjos cromossómicos que ocorreram durante o processo evolutivo permitem criar um padrão de bandas específico para todos os cromossomas humanos. Uma vez que os cariótipos de gibão são muito fragmentados por translocações, sondas “painting” provenientes destas espécies permitem não só obter uma simples marcação de uma sub-região como também delinear todo o cariótipo humano em cerca de 90 segmentos num formato multicolor, designado por “cross-species colour segmenting” (Harrison *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2004). No total, o cariótipo humano pode ser diferenciado em cerca de 81 segmentos com sondas de *H. concolor* e 74 segmentos com sondas de *H. syndactylus* (figura 5) (Muller *et al.*, 1998).

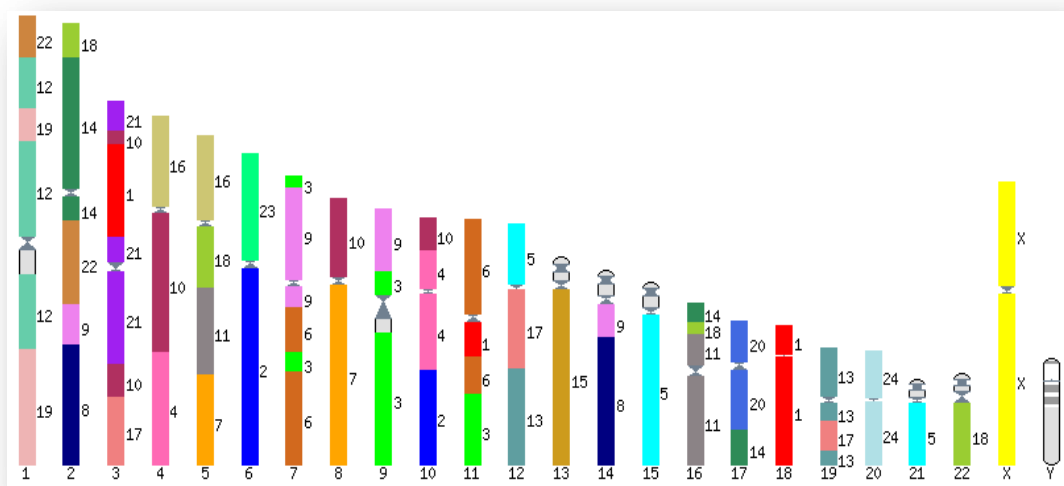


Figura 5 – Ideograma dos cromossomos humanos com as sondas “painting” de *H. syndactylus* (adaptado de Genomics, 2010).

Com o RxFISH é possível caracterizar anomalias inter e intra-cromossômicas, nem sempre possível através das bandas G (Teixeira *et al.*, 2000). Esta técnica é um importante complemento das técnicas de citogenética convencional.

A introdução de técnicas de hibridação *in situ* na citogenética trouxe desenvolvimentos significativos no estudo e análise dos cariótipos com a definição de regiões cromossômicas ao nível molecular.

1.4. Doenças hemato-oncológicas

As doenças hemato-oncológicas são um grupo de doenças oncológicas com grande incidência, constituindo cerca de 10 a 15% de todos os câncers. Nas últimas décadas, este tipo de neoplasia tem vindo a crescer dado o aumento da esperança de vida, sendo designada por doença do idoso, uma vez que a população abrangida tem, em média, uma idade superior a 60 anos (Altekruse *et al.*, 2009).

1.4.1. Sistema hematopoiético: princípios gerais

O mecanismo pelo qual ocorre a produção de células sanguíneas é designado por hematopoiese. O sistema hematopoiético é formado pelo sangue e pelos órgãos promotores de células sanguíneas, tais como medula óssea e o tecido linfático (gânglios linfáticos, baço e timo) (Seeley *et al.*, 1997).

É na medula óssea vermelha que se formam todos os constituintes do sangue. Eles derivam de uma única população de células indiferenciadas, as células estaminais hematopoiéticas

pluripotentes, que se podem diferenciar numa célula precursora mielóide ou linfóide (figura 6) (Roitt *et al.*, 2001).

As células estaminais mielóides dão origem aos proeritroblastos (células precursoras dos eritrócitos), aos mieloblastos (produzem os granulócitos), aos monoblastos (dão origem aos monócitos) e aos megacariócitos (originam as plaquetas) (Roitt *et al.*, 2001).

A célula precursora linfóide origina os linfoblastos, que se desenvolvem em linfócitos T, B e “natural killer” (NK) e em algumas células dendríticas. A diferenciação dos linfócitos T ocorre no timo. Células pré-T migram pelo sangue até ao timo onde se dividem e diferenciam. Nas células B, a diferenciação ocorre na medula óssea até à fase de células maduras, também designadas de células B “naive”, que ainda não tiveram contacto com o antígeno. A sua transformação está confinada aos centros germinativos dos nódulos linfáticos (Goldsby *et al.*, 2002).

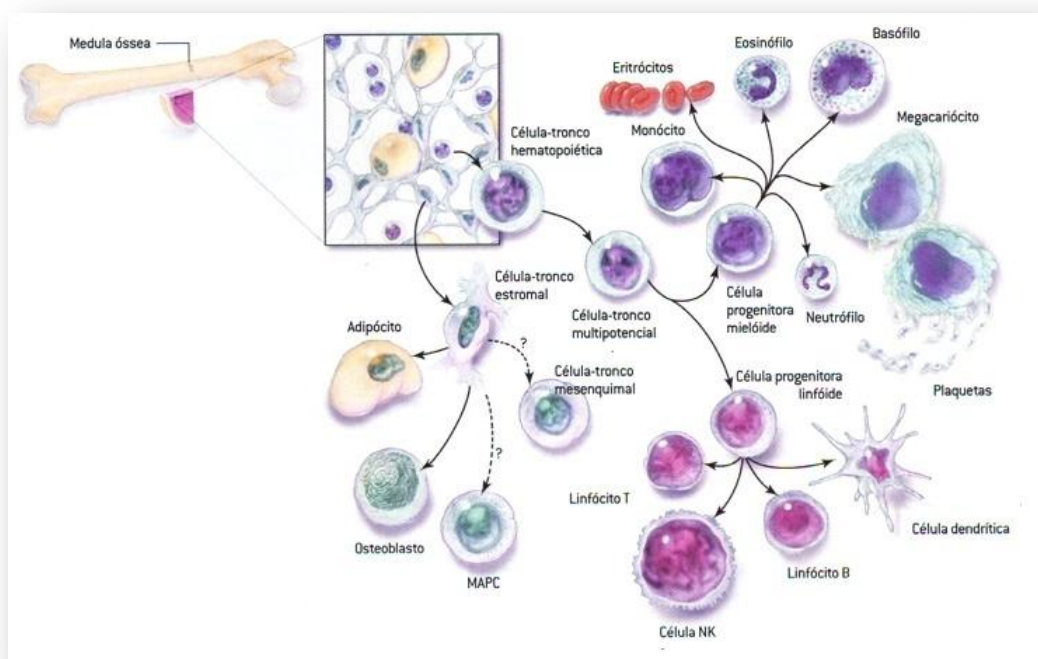


Figura 6 – Hematopoiese (adaptado de Vilela, 2006).

1.4.2. Classificação das doenças hemato-oncológicas

As doenças hemato-oncológicas são um grupo heterogéneo de doenças, cada uma com características específicas. O desenvolvimento de novas tecnologias e metodologias no diagnóstico destas doenças permitiram um conhecimento mais alargado sobre a sua génese, evolução e comportamento (Coleman *et al.*, 2005). Devido a esta evolução houve a necessidade de as organizar e classificar. Ao longo dos anos foram várias as classificações, sendo

periodicamente revistas e actualizadas à medida que novas informações, técnicas de diagnóstico e diferenciação foram sendo desenvolvidas e disponibilizadas. A última classificação dos tumores hematopoiéticos e tecidos linfóides foi proposta pela “World Health Organization Classification of Tumours”, em 2008, e ficou conhecida por classificação WHO (Swerdlow *et al.*, 2008).

A classificação WHO tem por base a combinação de vários parâmetros, nomeadamente, morfologia, imunofenotipagem, citoquímica, genética e características clínicas (Harris *et al.*, 2008). Ela divide as neoplasias de acordo com a linhagem da célula envolvida, neoplasia mielóide e neoplasia linfóide (figura 7). As neoplasias mielóides dividem-se de acordo com o grau de maturação das células, proliferação celular normal ou displásica, e quantidade de leucócitos e de células blásticas (células imaturas) (Vardiman *et al.*, 2008). Estas neoplasias são constituídas por quatro grupos: doenças mieloproliferativas (DMP), doenças mieloproliferativas / mielodisplásicas (DMP / SMD), síndromes mielodisplásicas (SMD) e leucemias mielóides agudas (LMA). A divisão das neoplasias linfóides baseia-se principalmente, nas características morfológicas e imunofenotípicas (Jaffe *et al.*, 2008). Estas neoplasias são constituídas por três grupos: neoplasias das células B (NCB), neoplasias das células T e NK (NCT) e linfoma Hodgkin (LH). Nas neoplasias das células B, o perfil imunofenotípico é de extrema importância para o diagnóstico, no entanto esta característica não é muito útil na classificação das neoplasias das células T e NK e linfoma de Hodgkin (Swerdlow *et al.*, 2008).

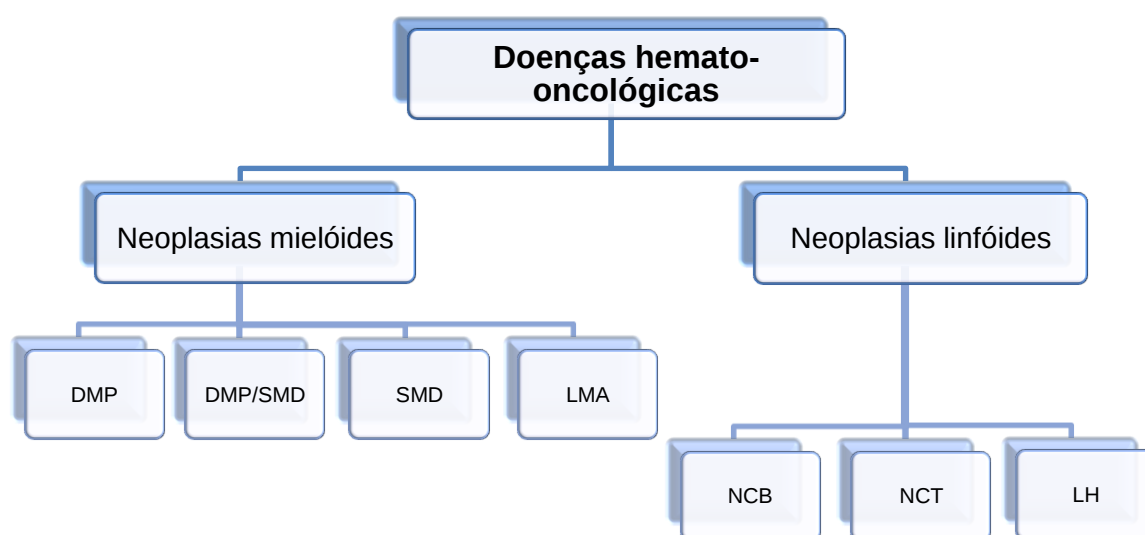


Figura 7 – Organigrama das doenças hemato-oncológicas, segundo a classificação WHO.

A genética tem adquirido, ao longo das últimas décadas, um papel importante na investigação oncológica e no direccionamento clínico de pacientes com cancro. A relação entre malignidade e alterações cromossómicas tem feito do estudo citogenético um critério primordial na classificação das doenças hemato-oncológicas, com novas alterações cromossómicas a serem identificadas e associadas às neoplasias (Fadl-Elmula, 2001).

Geralmente, as alterações cromossómicas estão associadas a factores de prognóstico (favorável, intermédio e desfavorável), facultando informação sobre a evolução e progressão da doença, importante para uma orientação clínica / terapêutica mais adequada (Steensma e List, 2005).

Nas doenças hemato-oncológicas, a detecção de anomalias cromossómicas recorrentes e o desenvolvimento de técnicas moleculares tem permitido conhecer e compreender melhor os mecanismos subjacentes à sua origem. As alterações estruturais têm possibilitado a identificação dos responsáveis pela activação de proto-oncogenes e perda de função de certos genes supressores tumorais, envolvidos no processo neoplásico (VinSheth *et al.*, 2002; Teixeira e Heim, 2005).

1.4.3. Neoplasias mielóides

As neoplasias mielóides incluem as linhagens que dão origem aos monócitos, eritrócitos, megacariócitos e granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). As características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas são utilizadas para estabelecer a linhagem e grau de maturação das células neoplásicas e para verificar se a proliferação celular é citologicamente normal ou displásica, eficaz ou ineficaz (Vardiman, Thiele, *et al.*, 2009). A percentagem de células blásticas (células imaturas) presentes no sangue periférico, medula óssea, ou outros tecidos envolvidos é de extrema importância para caracterizar a neoplasia mielóide e verificar a sua progressão (Vardiman, Brunning, *et al.*, 2008).

A caracterização das células neoplásicas bem como o estudo citogenético deve ser realizada ao diagnóstico, para estabelecer um padrão e, posteriormente, se poder monitorizar a doença (Swerdlow *et al.*, 2008). São quatro os tipos de neoplasias mielóides: DMP, DMP / SMD, SMD e LMA.

1.4.3.1. Doenças mieloproliferativas (DMP)

As DMP são doenças que envolvem as células estaminais hematopoiéticas e caracterizam-se pela proliferação de uma ou mais linhagens mielóides (Monte-Mór e Costa, 2008). Estas doenças têm uma incidência de 6-10 / 100.000 casos por ano e afectam principalmente os adultos entre os 50

e 70 anos (Swerdlow *et al.*, 2008). Em termos clínicos observa-se uma hipercelularidade da medula óssea e uma hematopoiese extra-medular, com a produção excessiva de células sanguíneas diferenciadas (granulócitos, eritrócitos e / ou plaquetas) (Kralovics, 2008).

A variabilidade fenotípica destes doentes é grande, com heterogeneidade genética e clonal, devido à variabilidade de mutações somáticas e de alterações cromossómicas presentes (Kralovics, 2008). Estas mutações / alterações envolvem genes que codificam os receptores de membrana ou citoplasmáticos do tipo tirosina cinase, pelo que são activadas vias de transdução de sinal e, por conseguinte, uma proliferação celular anormal (Monte-Mór e Costa, 2008). Um exemplo destas alterações clonais é a mutação no gene *JAK2* (Kilpivaara e Levine, 2008). Esta mutação foi descrita em 2005 e é frequente em pacientes com DMP, negativo para *BCR/ABL1* (Millecker *et al.*, 2010).

Dos vários tipos de DMP, representados na figura 8, uma das mais comuns é a leucemia mielóide crónica (Swerdlow *et al.*, 2008).

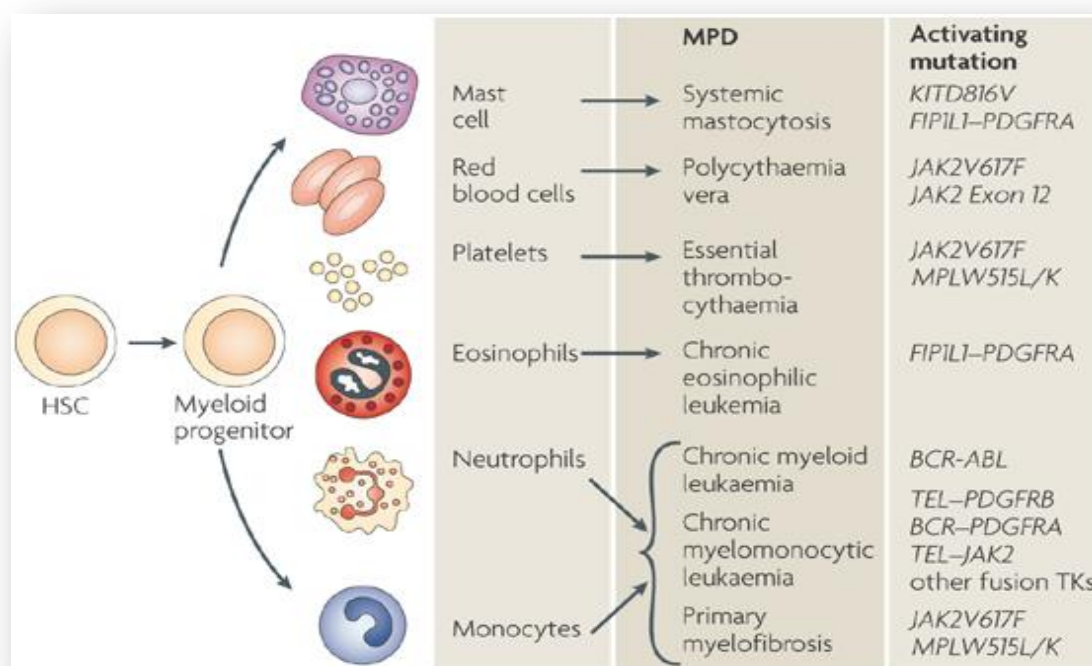


Figura 8 – Tipo de célula mielóide e alterações genéticas envolvidas nas diferentes DMP (adaptado de Levine *et al.*, 2007).

1.4.3.1.1. Leucemia mielóide crónica (LMC)

A LMC é uma doença mieloproliferativa com origem numa célula estaminal pluripotente que se caracteriza pela proliferação e acumulação de células mielóides maduras e seus progenitores (Bortolheiro e Chiattonne, 2008). Esta doença representa cerca de 7 a 20% de todas as leucemias

(Bayraktar e Goodman, 2010). Tem uma incidência de 1-2 / 100.000 casos por ano e afecta principalmente adultos, sendo a idade média ao diagnóstico de 55 anos (von Bubnoff e Duyster, 2010). É uma doença com características clínicas e evolutivas heterogéneas, constituída por três fases: crónica, acelerada e blástica. Na **fase crónica** ocorre a proliferação das células mielóides, que conservam a sua capacidade de diferenciação. Numa fase posterior, o clone neoplásico pode perder a capacidade de diferenciação e a doença passa a ser de difícil controlo – **fase acelerada**, e progredir para uma leucemia aguda ou **fase blástica** (Bergantini *et al.*, 2005; Bortolheiro e Chiattonne, 2008).

O “hallmark” desta doença é a presença do cromossoma “Philadelphia” (Ph), resultante de uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 (banda q34) e 22 (banda q11), e envolve, respectivamente, os genes *ABL1* e *BCR*. Desta translocação resulta um gene de fusão *BCR/ABL1*, com elevada actividade tirosina cinase, induzindo a desregulação de várias vias de sinalização, e consequente proliferação excessiva, resistência à apoptose e defeitos na adesão, factores responsáveis pela oncogénese na LMC (Bergantini *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006; Richebourg *et al.*, 2008).

Inicialmente, pensava-se que esta translocação era equilibrada, mas com a introdução das técnicas moleculares, verificou-se que cerca de 15% dos casos com a translocação t(9;22) apresentam uma deleção parcial no cromossoma 9 ou 22 (Richebourg *et al.*, 2008). Este dado é de extrema importância pois as deleções no derivativo do cromossoma 9 além de serem mais frequentes (10-15%), têm implicações prognósticas, com um tempo de vida mais curto e uma resposta terapêutica menos eficaz (Chaubey *et al.*, 2009).

Verificou-se também que 5 a 10% dos casos, ao diagnóstico, apresentam variantes da translocação. Estas podem resultar do envolvimento de um ou mais cromossomas além do 9 e 22, ou resultar de rearranjos crípticos, pelo que não se observa o cromossoma Ph, pela citogenética convencional. Neste último caso, o gene de fusão *BCR/ABL1* resulta uma inserção ou translocação críptica, detectado apenas por técnicas de FISH ou PCR (Gorusu *et al.*, 2007; Chauffaille, 2008).

Quando a doença evolui para uma fase acelerada ou blástica, 50 a 80% dos casos apresenta anomalias cromossómicas adicionais, nomeadamente, trissomia do cromossoma 8 ou 19, um cromossoma Ph extra, isocromossoma do ramo longo do cromossoma 17, perda do cromossoma Y e monossomia do cromossoma 7 ou 17 (Lee *et al.*, 2003).

1.4.3.2. Doenças mieloproliferativas / mielodisplásicas (DMP / SMD)

As DMP / SMD incluem neoplasias mielóides que ao diagnóstico apresentam características proliferativas (DMP) e características displásicas (SMD). As DMP caracterizam-se pela proliferação de células sanguíneas maduras, do qual resulta o aumento do número de células no sangue periférico. Os SMD caracterizam-se por citopenias, isto é diminuição do número de eritrócitos, leucócitos ou plaquetas no sangue periférico (Malcovati e Cazzola, 2008; Swerdlow *et al.*, 2008).

Alguns exemplos de DMP / SMD são a leucemia mielomonocítica crónica, a leucemia mielóide crónica atípica– negativa para *BCR/ABL1* e a leucemia mielomonocítica juvenil.

1.4.3.2.1. Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)

A LMMC é uma doença com origem nas células estaminais hematopoiéticas e caracteriza-se por um aumento do número de mielócitos / monócitos, na medula óssea e no sangue periférico (características mieloproliferativas) e por vários graus de displasia na medula óssea (características mielodisplásicas) (Onida *et al.*, 2002; McGrattan *et al.*, 2007). Não existe uma incidência real dos casos de LMMC, uma vez que em alguns levantamentos epidemiológicos este tipo de leucemia está agrupada com as DMP e em outros com os SMD (Swerdlow *et al.*, 2008).

A idade média ao diagnóstico é de 65 a 75 anos, com maior prevalência no sexo masculino (Orazi *et al.*, 2008). As anomalias citogenéticas estão presentes em 20 a 40% dos casos, sendo as mais frequentes a trissomia do cromossoma 8, monossomia do cromossoma 7, deleção do ramo longo do cromossoma 7 e alterações estruturais no ramo curto do cromossoma 12 (Zamora *et al.*, 2002; Orazi *et al.*, 2008). Ainda não foi possível estratificar as alterações cromossómicas pelo seu valor prognóstico, mas verifica-se que os casos com anomalias cromossómicas têm um tempo de vida mais curto comparativamente aos que têm um cariótipo normal (McGrattan *et al.*, 2007).

1.4.3.3. Síndromes mielodisplásicas (SMD)

Os SMD são um grupo heterogéneo de doenças que se caracteriza por displasia e hematopoiese ineficaz da linhagem mielóide (Borze *et al.*, 2010). Um dos “hallmarks” esta doença é a presença de citopenia(s), isto é diminuição do número de eritrócitos, leucócitos ou plaquetas no sangue periférico. O mecanismo que induz a citopenia é uma hematopoiese ineficaz, resultante de uma apoptose excessiva dos precursores hematopoiéticos na medula óssea (figura 9) (Steensma e List,

2005; Malcovati e Cazzola, 2008). Estes doentes têm um risco aumentado para desenvolver leucemia mielóide aguda, devido à instabilidade genómica e modificações epigenéticas (Hamblin e Killick, 2004; Varma e Varma, 2008).

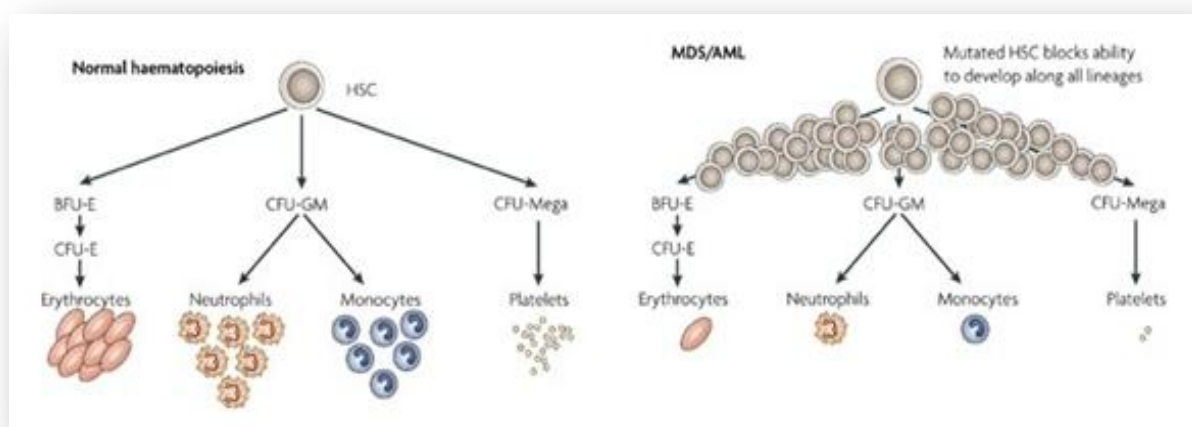


Figura 9 – Comparação entre a hematopoiese normal e a de pacientes com SMD (adaptado de Corey *et al.*, 2007).

Tem uma incidência de 3-5 / 100.000 casos por ano, progride muito lentamente e afecta, principalmente, pessoas de idade avançada; ao diagnóstico a idade média é de 70 anos (Brunnering *et al.*, 2008).

Os SMD podem ser *de novo* ou associados a tratamentos imunossupresivos ou anti-neoplásicos, denominados, respectivamente, por SMD primários e SMD-t (Germining *et al.*, 2008; Borze *et al.*, 2010). As alterações cromossómicas estão presentes em 30 a 50% dos casos de SMD primários e em 80% dos casos de SMD-t (Wang *et al.*, 2010). As alterações cromossómicas estão associadas a factores de prognóstico, que podem ser de três tipos, favorável, intermédio e desfavorável. Na tabela 2 estão representadas algumas das alterações cromossómicas observadas nos SMD e respectivo valor prognóstico.

Tabela 2 – Alterações citogenéticas nos SMD e seu valor prognóstico (Gmidène *et al.*, 2008; Haase, 2008).

Prognóstico	Alterações citogenéticas
Favorável	Cariótipo normal, - Y, del(5q), del(12p), del(11q), del(20q)
Intermédio	+8, rearranjos no 3q21q26, translocações envolvendo o 11q, +18, +19;
Desfavorável	Cariótipos complexos, -7, del(7q), del(17p), i(17q)

1.4.3.4. Leucemia mielóide aguda (LMA)

A LMA tem origem nas células estaminais hematopoiéticas, podendo envolver uma ou todas as linhagens mielóides (Vardiman *et al.*, 2008), na qual a não diferenciação e hiper-proliferação celular resultam na acumulação de células não funcionais designadas por mieloblastos (Stone, 2004). É mais comum em países como a Austrália, Estados Unidos da América e nos países da Europa Ocidental, e tem uma incidência de 2.5-3 / 100.000 casos por ano (Vardiman *et al.*, 2008). A idade média ao diagnóstico é de 65 anos, mas 5 a 15% dos pacientes tem uma idade inferior a 5 anos (Farag *et al.*, 2006).

O estudo citogenético das células neoplásicas é o principal factor de prognóstico nos casos de LMA (Mardis *et al.*, 2010). As anomalias cromossômicas estão presentes em 55% dos casos (Dohner e Dohner, 2008) e dependendo do tipo de alteração encontrada podem ser divididas em três grupos (tabela 3).

Tabela 3 – Alterações citogenéticas nas LMA e seu valor prognóstico (Appelbaum *et al.*, 2001).

Prognóstico	Alterações citogenéticas
Favorável	t(15;17) isolada; t(8;21) isolada inv(16)/t(16;16)/del(16q)
Intermédio	+8, -Y, +6, del(12p) Cariótipo normal
Desfavorável	-5/del(5q), -7/del(7q), inv(3q), del(9q), t(6;9), t(9;22), cariótipos complexos Anomalias no 11q23, 20q, 21q, 17p

Num trabalho publicado recentemente, Gross e colaboradores (2009) estudaram as regiões subteloméricas para os cromossomas 5, 9, 11, 12 e 13, em casos de LMA com cariótipo normal, e verificaram que 50% dos casos apresentavam deleções ou duplicações nestas regiões. Estes autores propõem a pesquisa das regiões subteloméricas nos casos com cariótipo normal.

1.4.4. Neoplasias linfóides

As neoplasias linfóides são o sexto grupo de doenças malignas mais comum no Mundo (Morton *et al.*, 2007). A sua classificação baseia-se principalmente na morfologia e na imunofenotipagem (Jaffe *et al.*, 2008). Com base na transformação das células linfóides em diferentes estados de diferenciação, as neoplasias dividem-se em três grupos, neoplasias das células B (NCB), neoplasias das células T e NK (NCT) e linfoma Hodgkin (LH) (Swerdlow *et al.*, 2008).

Actualmente, é nas NCB que o perfil das características genéticas começa a ter um papel preponderante na sua classificação (Morton *et al.*, 2007).

Antes da classificação WHO (2008), os linfomas estavam divididos em dois grupos, linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não-Hodgkin (LNH), diferenciando entre si na forma como se desenvolviam, progrediam e quanto ao tratamento (Alexander *et al.*, 2007). Com a classificação WHO e dado que os LNH constituem um grupo heterogéneo de doenças, com diferentes características clínicas e histológicas, os diferentes tipos de LNH foram inseridos nas NCB e NCT (Evans e Hancock, 2003; Swerdlow *et al.*, 2008).

Neste trabalho, os linfomas serão divididos em dois grupos, linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não-Hodgkin (LNH).

1.4.4.1. Neoplasias das células B (NCB)

As NCB resultam da acumulação de células B normais em diferentes estados de diferenciação, o que constitui a base de classificação e nomenclatura das NCB. A diferenciação das células B envolve várias etapas (células B “naive”, antes do contacto com o antigénio, diferenciação em centroblastos e centrócitos, no centro germinativo, células de memória e células plasmáticas) em cada uma das etapas, as células adquirem características morfológicas e imunofenotípicas específicas (Kuppers, 2003; Jaffe *et al.*, 2008). A sua determinação permite identificar em que fase da diferenciação surgiram as células neoplásicas. Em muitos casos, as características morfológicas e imunofenotípicas sobrepõem-se e o diagnóstico diferencial é ditado pelas anomalias cromossómicas (Morton *et al.*, 2007).

Dos vários tipos de neoplasias das células B destacam-se a leucemia linfática crónica (LLC) e o mieloma múltiplo (MM).

1.4.4.1.1. Leucemia linfática crónica (LLC)

A LLC é uma doença linfoproliferativa que afecta as células B da zona do manto dos folículos linfóides e caracteriza-se pela acumulação de linfócitos B no sangue, na medula e nos órgãos linfóides (Palanduz *et al.*, 2000). Alguns autores referem que o termo linfoproliferativo não é o mais correcto para caracterizar esta doença uma vez que mais do que uma proliferação celular há uma acumulação celular, devido a uma super-expressão do gene *BCL2* (anti-apoptótico) e a uma desregulação dos genes que regulam o ciclo celular, pelo que as células escapam à morte programada (apoptose) e, por conseguinte, acumulam-se (Dighiero, 2005).

É a leucemia mais frequente nos países ocidentais e tem uma incidência de 3 / 100.000 casos por ano (Lu *et al.*, 2010). Ocorre, principalmente, em adultos, sendo a idade média ao diagnóstico de 65 anos (Muller-Hermelink *et al.*, 2008). É uma doença heterogénea, em que 70-80% dos doentes são assintomáticos e tem um curso clínico muito variável, desde casos que não necessitam de tratamento até formas agressivas (Dighiero, 2005; Dicker *et al.*, 2009).

As anomalias cromossómicas constituem cerca de 40 a 50% dos casos, valor que aumenta para os 80% quando se aplicam técnicas moleculares, nomeadamente o FISH (Quintero-Rivera *et al.*, 2009; Moreno e Montserrat, 2010). As anomalias mais comuns são a trissomia 12 e as deleções no ramo curto do cromossoma 17 ou deleções no ramo longo do cromossoma 6, 11 e 13 (Lu *et al.*, 2010). Estas e outras anomalias estão associadas a factores de prognóstico e estão divididas em três grupos, como está representado na tabela 4.

Tabela 4 – Alterações citogenéticas nas LLC e seu valor prognóstico (Wiktor e Dyke, 2004; Quintero-Rivera *et al.*, 2009).

Prognóstico	Alterações citogenéticas
Favorável	Cariótipo normal, del(13q)
Intermédio	+12, del(6q)
Desfavorável	del(17p), del(11q), +14q, cariótipo complexo

1.4.4.1.2. Mieloma múltiplo (MM)

O MM é uma neoplasia das células plasmáticas ou plasmócitos, que são células B na fase final de diferenciação, pós-centro germinativo (Jaffe *et al.*, 2008). Este tipo de doença caracteriza-se pela proliferação de plasmócitos monoclonais, que transportam um tipo específico de imunoglobulina (Kumar *et al.*, 2004; McKenna *et al.*, 2008). Estas imunoglobulinas não são funcionais e são designadas por paraproteína, proteína monoclonal ou proteína M (Chauffaille *et al.*, 2007).

É uma neoplasia com um vasto espectro clínico desde a forma assintomática a muito agressiva (Malpas *et al.*, 2004). Cerca de 30 a 50% dos MM derivam de uma neoplasia benigna das células plasmáticas, a gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) (McKenna *et al.*, 2008). O MGUS é um estado pré-maligno e caracteriza-se pela expansão discreta de uma população de plasmócitos monoclonais e consequente produção e segregação de proteína M

(Faria e Silva, 2007; Martinez, 2007). A progressão para MM ocorre devido a um aumento da concentração de proteína monoclonal (Kyle e Rajkumar, 2009).

Os MM constituem cerca de 1% dos tumores malignos e representam 10 a 15% das neoplasias hematológicas, com uma incidência de 4 / 100.000 casos por ano (McKenna *et al.*, 2008). A idade média ao diagnóstico é de 70 anos, sendo muito raro o seu diagnóstico em adultos com menos de 30 anos e até à data não se observou em crianças (Faria e Silva, 2007).

Os plasmócitos malignos têm um baixo índice mitótico pelo que a citogenética convencional só detecta 20 a 30% de casos com alterações cromossómicas (Martinez, 2007). A técnica de FISH teve um contributo importante no estudo citogenético, aumentando a taxa de detecção para os 90% (Kyle e Rajkumar, 2009).

As aneuploidias são muito frequentes e a sua prevalência é independente do estado da doença; são comuns trissomias dos cromossomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21, e monossomias dos cromossomas 13, 14, 16 e 22 (Fonseca *et al.*, 2004; Chauffaille *et al.*, 2007).

Nos MM, ao contrário do que acontece nas LLC, as translocações são frequentes (55 a 70%) e envolvem o *locus* da cadeia pesada da imunoglobulina (14q32), com outras regiões como o 11q13 (*CCND1*), 4p16.3 (*FGFR3*), 16q23 (*C-MAF*), 6p21 (*CCND3*) e 20q11 (*MAFB*). As mais comuns são a translocação t(11;14) e t(4;14), com uma frequência de 18% e 15%, respectivamente (Keats *et al.*, 2003; McKenna *et al.*, 2008)

A monossomia ou deleção parcial do cromossoma 13 (13q14), detectada por FISH em cerca de 50% dos casos, é um evento precoce na patogénese (Trakhtenbrot *et al.*, 2010). Outras anomalias recorrentes estão associadas à progressão da doença e incluem a deleção do ramo curto do cromossoma 1 e 17, translocações envolvendo o gene *MYC* (8q24) e ganhos no ramo longo do cromossoma 1 (Martinez, 2007). Na tabela 5 estão representadas algumas alterações cromossómicas e respectivo valor prognóstico.

Tabela 5 – Alterações citogenéticas nos MM e seu valor prognóstico (Kyle e Rajkumar, 2009).

Prognóstico	Alterações citogenéticas
Favorável	Cariótipo normal, t(11;14), t(6;14)
Desfavorável	t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(13q), del(17p), cariótipo complexo

1.4.4.2. Neoplasias das células T e NK (NCT)

Os linfócitos T derivam de um precursor da medula óssea cuja maturação e aquisição de função tem lugar no timo (Roitt *et al.*, 1998). A maioria das neoplasias das células T e NK é observada em crianças e em jovens adultos e derivam de células do sistema imunitário inato. Os mecanismos subjacentes às neoplasias das células T encontram-se ainda em estudo (Swerdlow *et al.*, 2008).

1.4.4.3. Linfoma Hodgkin (LH)

O LH é um dos linfomas mais frequente no mundo ocidental, representam cerca de 30% de todos os linfomas e têm uma incidência de 3 / 100.000 casos por ano (Stein, 2008). Nos LH ainda não estão associadas alterações cromossómicas específicas e recorrentes (Martin-Subero *et al.*, 2006).

1.4.4.4. Linfoma não-Hodgkin (LNH)

LNH é uma designação não específica e inclui várias doenças malignas linfoproliferativas com apresentação clínica e histológica diferente (Alexander *et al.*, 2007). A maioria destas doenças deriva das células B em diferentes fases de diferenciação. Os linfomas do manto e folicular são alguns dos exemplos de LNH das células B (Evans e Hancock, 2003; Alexander *et al.*, 2007).

As translocações são uma característica dos LNH e representam o principal mecanismo de activação de proto-oncogenes, embora possam apresentar outras alterações cromossómicas (Jaffe *et al.*, 2008).

1.4.4.4.1. Linfoma do manto (LM)

O LM é uma neoplasia das células B maduras, com origem nas células B do centro pré-germinativo, na zona do manto (Au *et al.*, 2002). É um linfoma com características agressivas e representa 5 a 10% de todos os linfomas das células B (Espinete *et al.*, 2010). A idade média ao diagnóstico é de 60 anos, predominando o sexo masculino, numa razão de 2:1 (Swerdlow *et al.*, 2008).

O “hallmark” desta doença é a translocação t(11;14)(q13;q32), da qual resulta a justaposição do genes *CCND1* e *IGH* e, por conseguinte, a super-expressão da ciclina D1 (Swerdlow *et al.*, 2008). Neste tipo de linfoma são comuns anomalias cromossómicas secundárias, nomeadamente, deleções no ramo curto do cromossoma 1, 9, 10 e 17 ou no ramo longo do cromossoma 6, 11 e 13; e ganhos no ramo longo do cromossoma 3 e 8. As deleções no 13q e no 17p bem como

ganhos no 3q estão associadas a um prognóstico desfavorável, com um tempo de vida mais curto (Espinete *et al.*, 2010).

1.4.4.4.2. *Linfoma folicular (LF)*

O LF é uma neoplasia das células B do centro germinativo, envolvendo geralmente os centrócitos e os centroblastos (Schwaenen *et al.*, 2009). Representam cerca de 20% de todos os linfomas, com maior prevalência nos Estados Unidos da América e na Europa Ocidental (Alexander *et al.*, 2007). A idade média ao diagnóstico é de 65 anos, sendo mais comum no sexo feminino (1.7:1) (Harris *et al.*, 2008). É uma doença heterogénea, com um curso clínico variável, desde uma forma indolente a uma rápida progressão (Schwaenen *et al.*, 2009).

Em termos genéticos caracteriza-se pela translocação t(14;18), presente em mais de 90% dos casos. Esta translocação envolve as regiões 14q32 e 18q21, do qual resulta a justaposição dos genes *IGH* e *BCL2* (Harris *et al.*, 2008). Neste tipo de linfoma são comuns alterações secundárias, como as deleções no ramo curto do cromossoma 1 e 17 ou deleções no ramo longo do cromossoma 6 e 10; e ganhos do cromossoma 1, 7, 8 e X ou do ramo curto do cromossoma 12 e 18, normalmente relacionadas com a progressão da doença (Hoglund *et al.*, 2004; Schwaenen *et al.*, 2009).

1.5. Objectivos

A presente dissertação teve como objectivo a caracterização citogenética de 50 casos de doenças hemato-oncológicas. O estudo foi realizado em várias etapas:

1. Aplicação de protocolos de cultura celular específicos para cada tipo de doença hemato-oncológica;
2. Observação e identificação dos cromossomas ao microscópio, e consequente montagem dos kariogramas num sistema de análise de imagem computadorizado;
3. Aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas para as anomalias mais comuns, nomeadamente nos casos com leucemia mielóide crónica, com leucemia linfática crónica, com mieloma múltiplo e nos casos com linfoma não-Hodgkin;
4. Nos casos com rearranjos cromossómicos estruturais aplicação da técnica de FISH com sondas subteloméricas e sondas “painting” (comerciais e desenvolvidas no Laboratório de Genómica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB, CGB - UTAD);
5. Comparação das anomalias cromossómicas detectadas com as documentadas na literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

No segundo capítulo serão descritos o material e os métodos utilizados na realização deste trabalho. Cada procedimento é precedido de uma breve introdução referente aos mecanismos subjacentes a essas metodologias.

2.1. Material Biológico

No decorrer deste trabalho realizaram-se culturas celulares em 50 amostras com doenças hemato-oncológicas, cedidas pelo Laboratório de Citogenética do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (LC-CHTMAD). Este laboratório dá apoio à Unidade de Hemato-oncologia do CHTMAD, uma unidade que abrange toda a região de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Foram utilizados dois tipos de material biológico: medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), consoante o tipo de doença hemato-oncológica e a fase da doença (ao diagnóstico ou avaliação do tratamento).

2.2. Citogenética Convencional

A citogenética convencional compreende várias etapas: Cultura celular (2.2.1.); Manipulação das células até à obtenção de cromossomas (2.2.2.); Bandeamento das lâminas (2.2.3.) e Análise das metáfases (2.2.4.).

2.2.1. Cultura celular

As culturas celulares requerem determinadas condições e cuidados específicos, tais como: **a)** o **transporte** rápido da amostra até ao laboratório é um factor importante na obtenção de bons resultados, principalmente, nas culturas directas em que é necessário obter metáfases a partir de células em divisão espontânea; **b)** a **esterilidade** das culturas, pois podem ser facilmente contaminadas por microrganismos que produzem toxinas, nocivas para as células. A ubiquidade dos microrganismos pode obscurecer a visualização dos cromossomas ou impedir a divisão das células. As fontes de infecção podem partir do operador, do material ou reagentes não esterilizados; **c)** os **tubos**, onde se realizam as culturas são importantes para o seu sucesso, devendo-se utilizar material próprio e de qualidade; **d)** os **meios de cultura** utilizados devem suprir todos os nutrientes necessários às células: substratos para o metabolismo energético, vitaminas e minerais cuja função é catalítica e iões inorgânicos cuja função é tanto catalítica como fisiológica; **e)** o **pH** recomendado é de 7.4 e está relacionado com os sistemas de tampão

que são aplicados aos meios de cultura; **f)** a **temperatura** óptima requerida para o crescimento das células é de 37 °C; **g)** o O_2 / CO_2 , algumas culturas requerem quer oxigénio como dióxido de carbono para o seu crescimento e são, normalmente expostas a uma mistura de 95% de ar / 5% de dióxido de carbono (Lawce e Brown, 1997; Rooney, 2001).

O tipo de cultura celular realizado variou consoante o tipo de doença hemato-oncológica e está intimamente relacionado com o tipo de células que se pretende analisar. As culturas foram divididas em:

- a) Cultura de curta duração** (directas ou ~24 horas), nos casos em que as células estão em divisão espontânea;
- b) Cultura de longa duração** em que foi necessário adicionar estimuladores para se obter células em divisão. Os estimuladores utilizados foram o: 1,2-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e Pokeweed, para estimular os linfócitos B (Melchers *et al.*, 2006).

Em todas as amostras foi realizada uma cultura com fitohemaglutinina (PHA-M) com o intuito de determinar se o rearranjo cromossómico estrutural detectado, era constitucional ou adquirido.

Protocolo 1 - Cultura celular

As culturas realizadas diferem entre si na quantidade de amostra utilizada, na adição ou não de estimulador, no tempo de incubação e na necessidade de CO_2 . A tabela 6 representa os diferentes tipos de doenças hemato-oncológicas (DHO) estudadas e os respectivos parâmetros da cultura celular.

Tabela 6 – Diferentes tipos de cultura utilizadas nas 50 amostras e suas características consoante o tipo de DHO.

Tipo de DHO	Amostra	Cultura	Sementeira			
			Quantidade de amostra	Quantidade de estimulador	Tempo de incubação	CO_2
LMC, LMMC,	MO ou SP	Directa	3 – 4 gotas	-----	1 hora	sim
SMD,		~24 horas		-----	1 a 5 horas	sim
LMA,		PHA-M		100 ul	72 horas	não
MM		TPA		50 ul	71 horas	não
LLC,	SP	Pokeweed	5 gotas	100 ul	72 horas	sim
LNH		PHA-M		100 ul	72 horas	não

1. A amostra foi colhida em tubos de gel com heparina lítio. A quantidade variou de ≈ 3 gotas a 1 ml no caso de medula óssea e de 2 a 5 ml no sangue periférico;
2. Em cada tubo com 5 ml de meio completo (Biological Industries), previamente aquecido a 37°C, foi cultivada a amostra, seguido de homogeneização suave;
3. Os tubos foram incubados numa estufa a 37°C, mantendo-se os tubos com uma inclinação de 30°, para aumentar a área de superfície de cultura.

2.2.2. Manipulação das células até à obtenção de cromossomas

A manipulação das culturas até à obtenção de cromossomas está dividida em quatro etapas: Inibidor mitótico (2.2.2.1.); Solução hipotónica (2.2.2.2.); Fixador (2.2.2.3.) e Espalhamento (2.2.2.4.).

2.2.2.1. Inibidor mitótico

O inibidor mitótico utilizado foi o colcemide, um análogo sintético da colchicina. Quando adicionado às culturas interrompe o complexo centríolo/fibras do fuso acromático interferindo com a formação dos microtúbulos. Este processo induz a interrupção mitótica e, por conseguinte, a acumulação das células na metáfase (Morton, 1994; Barch *et al.*, 1997). Nas diferentes culturas, o tempo de exposição ao colcemide variou entre 15 minutos (culturas directas), 1 hora (culturas com estimuladores) e 17 horas (culturas de ~ 24 horas).

2.2.2.2. Solução hipotónica

O segundo passo da manipulação é o tratamento com uma solução salina que é inferior à do citoplasma das células, o que induz a movimentação da água por osmose da solução hipotónica para o interior das células através da membrana citoplasmática. As células ficam túrgidas, o que facilita a dispersão dos cromossomas no espalhamento (Barch *et al.*, 1997). O tratamento com a solução hipotónica, devido ao seu efeito nas células é uma fase crítica, o que requer um tempo exacto, normalmente de 15 minutos. Tempo em demasia pode fragilizar as células levando à ruptura das membranas da célula e, consequentemente, perda dos cromossomas.

Das várias soluções hipotónicas, a solução de cloreto de potássio (KCl) a 0,075 M é a mais utilizada nas culturas por ser a que provoca menos danos na subestrutura dos cromossomas e permite um bandejamento adequado (Rooney, 2001).

2.2.2.3. Fixador

A fixação é um passo muito importante, tendo como principal função remover a água celular, preservando as células, uma vez que endurece as membranas e a cromatina. O fixador prepara, igualmente, os cromossomas para o processo de bandeamento, ao extrair proteínas, entre as quais histonas, facilitando o contacto do material genético com o corante (Lawce e Brown, 1997).

O fixador utilizado é constituído por uma mistura de 3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético glacial. O primeiro fixador deve ser adicionado lentamente, sob uma agitação suave, para evitar a ruptura da membrana celular e evitar a formação de uma massa sólida informe e castanha, que origina preparações sujas e com baixo índice mitótico (Barch *et al.*, 1997). Nesta primeira adição do fixador verifica-se, também, a hemólise dos eritrócitos, e observa-se a mudança de cor da suspensão de vermelho vivo para castanho, devido à conversão da hemoglobina em hematina (Clouston, 2001).

O fixador frio (4 °C) pode aperfeiçoar a morfologia dos cromossomas e, em muitos protocolos, as células permanecem no primeiro fixador, entre 15 minutos a 24 horas, no frigorífico ou no congelador (Lawce e Brown, 1997). A baixas temperaturas, a deterioração do fixador é menor e as células podem ser preservadas por longos períodos de tempo (várias semanas ou anos).

2.2.2.4. Espalhamento

É um passo de extrema importância e a sua qualidade depende de uma vasta gama de factores, nomeadamente a temperatura e humidade do ambiente, as condições de cultura e manipulação, o factor de diluição, o tipo de lâmina e sua lavagem, entre outras (Rooney, 2001).

Para facilitar a análise citogenética, preparam-se lâminas com a melhor qualidade possível: densidade celular regular e uniforme, cromossomas suficientemente espalhados para evitar demasiadas sobreposições e com coloração cinzenta a cinzenta escura, sem citoplasma.

Protocolo 2 - Manipulação das células

1. Adicionou-se 150 µl de colcemide (Biological Industries, concentração 10 µg / ml) a cada tubo, homogeneizou-se e incubou-se numa estufa a 37°C, mantendo-se o tubo com uma inclinação de 30°, durante:
 - a) Culturas directas – 15 minutos;
 - b) Culturas de ~24 horas – 17 horas;
 - c) Culturas com estimuladores – 1 hora.

2. Após o colcemide os tubos foram centrifugados a 1000 rpm, durante 10 minutos;
3. Rejeitou-se o sobrenadante e homogeneizou-se o “pellet” no vortex a baixa rotação;
4. Adicionou-se, lentamente a cada tubo e sob agitação no vortex, 10 ml de solução hipotónica (0,075 M KCl), previamente aquecida a 37°C. Os tubos foram incubados no banho-maria a 37°C, durante 15 minutos;
5. Os tubos foram centrifugados a 1000 rpm durante 10 minutos;
6. O sobrenadante foi rejeitado e o “pellet” homogeneizado no vortex a baixa rotação;
7. O fixador 3:1 (metanol: ácido acético, ambos da Panreac), previamente refrigerado, foi adicionado lentamente e sob agitação no vortex. Na primeira adição de fixador, os tubos foram colocados na arca (-20°C) durante pelo menos 15 minutos;
8. Os tubos foram, posteriormente, centrifugados a 1000 rpm, durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se, novamente, fixador. Este processo foi repetido duas a três vezes até a suspensão ficar clara;
9. Na última lavagem e após centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado na totalidade e o “pellet” ressuspensionado consoante a concentração da suspensão celular, seguindo-se o espalhamento;
10. O espalhamento decorreu num compartimento com humidade entre os 80 a 90% e com uma temperatura média de 28°C. Em cada lâmina foram colocadas duas gotas de suspensão celular, uma em cada extremidade. As lâminas foram observadas ao microscópio em contraste de fase (Zeiss Axostat), com a objectiva de 10X, com o intuito de avaliar o índice mitótico, a densidade celular e o espalhamento das metáfases;
11. As lâminas foram envelhecidas sobre uma placa térmica a 60°C, durante 1 hora e colocadas à temperatura ambiente, “overnight”.

2.2.3. Técnicas de bandeamento cromossómica

As técnicas de bandeamento permitem a identificação dos cromossomas e de regiões específicas dos mesmos, possibilitando o reconhecimento de rearranjos cromossómicos. Como referido anteriormente existem vários tipos de bandeamento que dão origem a diferentes padrões de bandas. O tipo de bandas utilizado como rotina na análise cromossómica, no LC-CHTMAD, foi o GTL.

2.2.3.1. Bandeamento GTL

O bandeamento GTL é a técnica mais usada nos laboratórios de citogenética devido à estabilidade das bandas produzidas e à facilidade com que as imagens podem ser captadas

(Gustashaw, 1997). É um tipo de bandas **G** que combina um pré-tratamento com uma enzima proteolítica, a **Tripsina**, que desnatura as proteínas cromossômicas, e um passo de coloração, uma mistura de corante eosina - azure, como por exemplo o corente **Leishman** (Morton, 1994). Este método de bandeamento produz uma série de bandas claras e escuras ao longo do comprimento dos cromossomas, permitindo a sua identificação e a de regiões específicas. O padrão de bandas obtidas reflecte não só a estrutura mas também a composição funcional do cromossoma. As bandas escuras contêm DNA rico em adenina – timina, com poucos genes activos e são de replicação tardia, enquanto que as bandas claras são ricas em guanina – citosina, e tendem a ser zonas de eucromatina (Gustashaw, 1997; Benn e Tantravahi, 2001).

Quando se inicia o processo de bandeamento, deve-se proceder a uma experiência relativamente ao tempo de exposição à tripsina, uma vez que está dependente da qualidade (estrutura e morfologia) dos cromossomas. Cromossomas com pouco tempo de tripsina apresentam bandas confusas e com pouco contraste, enquanto com tempo a mais, os cromossomas apresentam bandas ponteadas e extremidades desgastadas. Os cromossomas 2, 4 e 6, devido ao seu conjunto de bandas, são boas referências para avaliar o tempo de tripsina.

Protocolo 3 - Método de bandeamento GTL

1. Colocaram-se as lâminas numa solução de tripsina a 1,6% (Difco Laboratories) em solução salina 0,9% KCl (Panreac), à temperatura ambiente, durante 1 a 10 segundos;
2. Lavaram-se as lâminas em solução salina a 0,9%, e de seguida em tampão Gurr (Gibco, Life Technologies), à temperatura ambiente, para parar a acção da enzima;
3. Transferiram-se as lâminas para a solução de corante Leishman a 20% (Merck) em tampão Gurr, durante 3 minutos, à temperatura ambiente;
4. Para remover o excesso de corante, lavaram-se as lâminas em tampão Gurr e, posteriormente em água destilada, ambas à temperatura ambiente;
5. Secaram-se, cuidadosamente, as lâminas num papel absorvente;
6. Observaram-se as lâminas ao microscópio óptico de campo claro.

2.2.4. Microscopia e análise cromossómica

As metáfases foram observadas num microscópio óptico composto (Zeiss Axioskop 40) e as imagens captadas por um sistema de imagem digital “CytoVision” (Apply Image) no qual se procedeu à montagem dos kariogramas. Segundo normas internacionais, para cada amostra devem ser analisadas 20 metáfases de pelo menos duas culturas diferentes. Os kariótipos foram descritos de acordo com a nomenclatura ISCN (2009).

2.3. Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

A técnica de FISH teve grandes desenvolvimentos nas últimas décadas, tornando-se uma técnica rápida e de fácil execução, nomeadamente com o aparecimento de “kits” comerciais; sendo utilizada como rotina nos laboratórios de citogenética, como complemento da citogenética convencional. Esta técnica envolve seis passos essenciais: Preparação da lâmina (2.3.1.); Preparação da sonda (2.3.2.); Desnaturação da sonda e da amostra (2.3.3.); Hibridação da sonda com o *locus* em estudo (2.3.4.); Lavagem pós-hibridação (2.3.5.); Detecção (2.3.6.) e Contraste (2.3.7.).

2.3.1. Preparação das lâminas

É uma etapa importante para o sucesso da técnica de FISH, pelo que é importante investir na qualidade das lâminas, de modo a se obter um espalhamento adequado, ausência de citoplasma e resíduos celulares que possam interferir com a hibridação. As lâminas devem ser usadas até 24 horas após serem preparadas (Montgomery *et al.*, 1997; Kearney e Buckle, 2001).

As lâminas são, posteriormente, envelhecidas para remover impurezas, estabilizar o pH (eliminando vestígios de ácido acético do fixador) ou permitir que os cromossomas resistam à desnaturação em excesso. Vários procedimentos podem ser empregues para o envelhecimento, desde a simples colocação das lâminas numa placa de aquecimento, à desidratação numa série de álcoois de concentração crescente ou incubação em soluções como SSC (citrato de sódio) ou PBS (tampão fosfato salino) (Fan, 2002).

2.3.2. Preparação da sonda

Depende do tipo de sonda a utilizar, e se a sonda é ou não comercial. No caso de sondas comerciais seguem-se as indicações descritas no folheto informativo da sonda. Nas sondas não comerciais, a preparação é de acordo com os protocolos estabelecidos no laboratório.

2.3.3. Desnaturação da sonda e da amostra

Uma vez que tanto a sonda como o material genético em estudo são constituídos por uma cadeia dupla de DNA é necessário desnaturá-los, em separado ou em conjunto, de modo a visualizar a hibridação em ambos. A sonda é normalmente desnaturada pelo calor; já o DNA-alvo pode ser pelo calor ou sujeito a um tratamento com solução de formamida e SSC a elevada temperatura (65° a 85°C) (Rooney, 2001).

2.3.4. Hibridação da sonda com o *locus* em estudo

Consiste no emparelhamento específico entre as cadeias simples da sonda e do DNA-alvo, com base na sua complementaridade (Schwarzacher e Heslop-Harrison, 2000). A lâmina com a sonda é colocada numa câmara húmida e escura, na estufa a 37°C, durante algumas horas ou “overnight” conforme o tipo de sonda e o protocolo realizado.

2.3.5. Lavagem pós-hibridação

Tem como função remover a sonda em excesso, que não se ligou ao *locus* em estudo ou se ligou inespecificamente a outros cromossomas ou restos celulares (Montgomery *et al.*, 1997; Rooney, 2001).

Na lavagem pode ser utilizada uma mistura de formamida e SSC ou uma solução de SSC, com temperatura e concentração adequadas para a adstringência necessária. Quanto maior é a temperatura e menor a concentração de SSC, maior é a adstringência (Rooney, 2001).

2.3.6. Detecção

Esta etapa é apenas realizada para sondas marcadas de forma indirecta. Os tipos de detecção foram descritos na secção 1.3.1.

2.3.7. Contraste

O contraste consiste em corar os núcleos e / ou metáfases, com corantes fluorescentes, de modo a criar um contraste e permitir a sua visualização ao microscópio (Montgomery *et al.*, 1997). O DAPI, contrastante azul, é o mais utilizado, podendo também ser empregue o iodeto de propídeo (vermelho) (Kearney e Buckle, 2001).

2.3.8. Tipo de sondas

Neste trabalho, a maioria das sondas utilizadas foram de sequência de cópia única, com o objectivo de pesquisar deleções de genes ou de regiões de cromossomas e determinar a presença de translocações, com a formação de genes de fusão (Fan, 2002). As sondas “painting” e subteloméricas foram utilizadas para esclarecer rearranjos estruturais.

Na técnica de FISH utilizaram-se sondas comerciais e sondas “painting” específicas para cromossomas humanos desenvolvidas no Laboratório de Genómica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB, CGB - UTAD, ambas especificadas em separado.

2.3.8.1. Sondas comerciais

As sondas comerciais vêm, normalmente num formato de “kit” constituído pela sonda e pela solução de hibridação. A sonda está, normalmente em cadeia dupla e as mais recentes estão já directamente marcadas. Os tipos de sondas utilizadas foram:

- a) **Sondas de sequência de cópia única (VYSIS)** para determinar a deleção dos seguintes genes: *MYB* (6q23), *ATM* (11q23), *RB* (13q14) e *TP53* (17p13), e para pesquisar as translocações: t(4;14), t(9;22), t(11;14) e t(14;18);
- b) **Sonda α -satélite** para o cromossoma 12 (VYSIS);
- c) **Sondas subteloméricas** (VYSIS);
- d) **Sondas “painting”** (CAMBIO), estas sondas são marcadas de forma indirecta.

Protocolo 4 - Sonda de sequência única / α -satélite (VYSIS)

1. Procedeu-se ao espalhamento das lâminas, sob as condições referidas no protocolo 2 no ponto 10, em que cada gota tinha 3 μ l de suspensão celular;

Envelhecimento das lâminas

2. Envelheceram-se as lâminas numa placa a 60°C, durante 1 hora;
3. Ao fim de uma hora as lâminas foram retiradas da placa e deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente;
4. Observaram-se as lâminas ao microscópio em contraste de fase e assinalou-se a área pretendida;

Preparação da sonda

5. Retirou-se da arca a -20°C, a sonda e a respectiva solução de hibridação e colocou-se à temperatura ambiente;
6. Num “eppendorf” procedeu-se à preparação da sonda, adicionando-se 1,75 μ l de solução de hibridação, 0,5 μ l de água destilada e 0,25 μ l de sonda. Homogeneizou-se e centrifugou-se a solução da sonda;

Co-desnaturação da amostra / sonda

7. Na área pretendida aplicaram-se os 2,5 μ l da solução da sonda, colocou-se uma lamela de 12 mm de diâmetro e selou-se com cola;
8. O conjunto lâmina / lamela foi desnaturado numa placa a 75°C durante 5 minutos;

Hibridação

9. O conjunto foi transferido para uma câmara húmida, previamente aquecida a 37°C, e incubou durante ~16 horas;

Lavagem pós-hibridação

10. Removeram-se as lamelas e mergulharam-se as lâminas em 0,4xSSC (pH=7) / 0,3% NP-40 (Sigma), a 73°C, durante 2 minutos;
11. As lâminas foram transferidas para uma solução 2xSSC (pH=7) / 0,1% NP-40, à temperatura ambiente, protegida da luz, durante 1 minuto;
12. Deixaram-se secar as lâminas ao ar, na vertical e protegidas da luz;

Contraste

13. Aplicaram-se 4 µl de contrastante, Vectashield DAPI (Vector Laboratories), colocou-se uma lamela e removeu-se o excesso pressionando o conjunto lâmina / lamela num toalhete;
14. As lâminas foram guardadas numa caixa escura, no frigorífico até serem observadas ao microscópio de epi-fluorescência.

Protocolo 5 - Sonda subtelomérica (VYSIS)

O protocolo é muito semelhante ao anterior, variando:

- a) No **envelhecimento**, neste caso as lâminas foram colocadas em 2xSSC (pH=7), a 37°C, durante 10 minutos e de seguida foram desidratadas em etanol a 70%, 85% e 90%, à temperatura ambiente, durante 2 minutos cada;
- b) Na **preparação da sonda**, neste caso já vêm preparadas, mas tal como nas anteriores é necessário deixá-las aquecer à temperatura ambiente;

Protocolo 6 - Sonda “painting” (CAMBIO)

1. As lâminas foram espalhadas de acordo com o descrito no protocolo 2 no ponto 10, em que cada gota tinha 3 µl de suspensão celular;

Envelhecimento das lâminas

2. Envelheceram-se as lâminas numa placa a 60°C, durante 1 hora e 30 minutos;
3. Desidrataram-se as lâminas em etanol a 70%, 80%, 90% e 96%, à temperatura ambiente, durante 1 minuto e 30 segundos em cada. As lâminas secaram ao ar;

Preparação da sonda

4. Retirou-se a sonda da arca a -20°C, e colocou-se no banho a 37°C, durante 5 minutos;
5. Homogeneizou-se a sonda e transferiu-se 3 µl da sonda para um “eppendorf”, para ulteriormente ser desnaturada;

Desnaturação da sonda

6. A sonda foi desnaturada a 67°C, durante 9 minutos;
7. Transferiu-se a sonda para um banho-maria, a 37°C, durante 1 hora e 30 minutos;

Desnaturação da amostra

8. As lâminas foram desnaturadas numa solução de 70% formamida (Applygene) / 2xSSC (pH=7), a 65°C, durante 1 minuto e 45 segundos;
9. Desidrataram-se as lâminas em etanol a 70% (a -20°C), etanol 80% e 96%, ambos à temperatura ambiente, durante 1 minuto e 30 segundos em cada. As lâminas secaram ao ar;
10. Observaram-se as lâminas ao microscópio em contraste de fase e assinalou-se a área pretendida;

Hibridação

11. Na área pretendida aplicaram-se os 3 µl da sonda e colocou-se uma lamela de 12 mm de diâmetro;
12. O conjunto lâmina / lamela foi transferido para uma câmara húmida previamente aquecida e incubou a 42°C, durante ~16 horas;

Lavagem pós-hibridação

13. Mergulharam-se as lâminas em 2xSSC, a 45°C, para remover a lamela;
14. As lâminas foram lavadas 2x [solução 50% formamida / 2xSSC (pH=7)], a 45°C, durante 5 minutos cada;
15. Lavaram-se as lâminas 2x [solução 0,1xSSC (pH=7)], a 45°C, durante 5 minutos cada;
16. Transferiram-se as lâminas para 1xPBD (Applygene), à temperatura ambiente, durante 2 minutos;

Deteção e contraste

17. Retiraram-se as lâminas e sem deixar secar aplicou-se a cada lâmina 5 µl da solução de detecção (Oncor) e cobriu-se com parafilme;
18. As lâminas incubaram numa caixa húmida, protegidas da luz, a 37°C, durante 20 minutos;

19. Lavaram-se as lâminas três vezes em 1xPBD, à temperatura ambiente, durante 2 minutos cada;
20. Retiraram-se as lâminas e sem deixar secar adicionou-se 5 µl de contrastante, Vectashield DAPI (Vector Laboratories), colocou-se uma lamela e removeu-se o excesso pressionando o conjunto lâmina / lamela num papel absorvente;
21. As lâminas foram guardadas numa caixa escura, no frigorífico até serem observadas ao microscópio de epi-fluorescência.

2.3.8.2. Sondas “painting” específicas para cromossomas humanos desenvolvidas no Laboratório de Genómica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB, CGB - UTAD

As sondas “painting” foram obtidas por “flow-sorting”, realizado por R. Chaves no “National Cancer Institute”, Frederick, Estados Unidos da América. Os “paints” utilizados foram também preparados no “National Cancer Institute”, Frederick, Estados Unidos da América.

A partir do produto do PCR primário procedeu-se a um DOP-PCR secundário quer para a amplificação dos “paints” quer para a sua marcação. A amplificação e a marcação foram realizadas por R. Chaves no Laboratório de Genómica Comparativa Funcional e Tecnológica do IBB, CGB-UTAD.

Protocolo 7 - Amplificação das sondas “painting” de humano por DOP-PCR

Os “paints” foram amplificados por DOP-PCR e no final obtiveram-se fragmentos na ordem dos 200 a 2000 bp.

1. Preparou-se a seguinte mistura de reacção para o PCR secundário:

Reagentes	Quantidade (µl)
Produto de PCR primário	5
Tampão 10xTAPS ⁽¹⁾	5
Detergente W-1 a 0.1% (p/v) (Sigma)	2,5
Mistura dNTP's (2.5 mM) (Gibco, Life Technologies)	4
“Primer” universal 6-MW ⁽²⁾ a 140 µM	1
Água ultra pura	31,5
Homogeneizou-se e centrifugou-se a solução	
Taq DNA polimerase (Perkin Elmer)	1
TOTAL	50

(1) 10xTAPS = 250 mM TAPS (Sigma), 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 28.8 µM beta-mercaptoetanol, pH 9.3.

(2) “primer” universal 6-MW-5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', onde N = A, C, G ou T.

2. O termociclador utilizado foi o UNO II (Biometra) com tampa aquecida. O programa realizado foi:

Temperatura	Tempo	Processo
94°C	9 min	Desnaturação inicial
94°C	1 min	Desnaturação
62°C	1.5 min	“Annealing”
72°C	3 min	Síntese de DNA
72°C	10 min	Síntese final de DNA

3. No final da reacção foi realizada uma electroforese em gel de agarose para verificar a amplificação e o “smear” obtido.

Protocolo 8 - Electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose é uma técnica que permite avaliar o peso molecular do DNA, contaminações por RNA, a fragmentação do DNA obtido, etc. Na preparação de sondas “painting”, a electroforese permite verificar se na amplificação de cromossomas por DOP-PCR, se obtiveram vários fragmentos amplificados, que no total cobrem todo o cromossoma, o que corresponde no gel a um “smear”. O princípio da electroforese é a migração do DNA para o pólo positivo, através dos poros do gel de agarose. O tamanho dos poros está relacionado com a concentração de agarose. Para se visualizar o DNA, adiciona-se ao gel brometo de etídeo (EtBr), que se intercala no DNA, e que emite fluorescência quando iluminado por uma luz ultravioleta.

1. Preparou-se, numa superfície plana, um tabuleiro com um pente;
2. Num erlenmeyer, colocou-se 1,5g de agarose (Invitrogen, Life Technologies) e adicionou-se 100 ml de tampão 1xTBE;

3. Aqueceu-se a solução de agarose no micro-ondas até ficar completamente translúcida e sem partículas em suspensão;
4. Adicionou-se 5 µl EtBr (Sigma, concentração 10 mg / ml) e homogeneizou-se;
5. Transferiu-se a solução de agarose para o tabuleiro, previamente preparado, e esperou-se cerca de 40 minutos para o gel solidificar;
6. Retirou-se cuidadosamente o pente e o tabuleiro;
7. Colocou-se o gel na tina de electroforese, com os poços no lado do pólo negativo, coberto com tampão 1xTBE;
8. Prepararam-se as amostras para colocar no gel: a 4 µl do produto de DOP-PCR adicionou-se 1,5 µl de solução de deposição (constituído por azul de bromofenol e glicerol) e homogeneizou-se;
9. Depositaram-se as amostras e o marcador molecular aos poços do gel de agarose;
10. Ligou-se a tina de electroforese, a 80 volts;
11. No final da electroforese, o gel foi visualizado e fotografado num sistema de aquisição de imagem (Uvidoc).

Protocolo 9 - Marcação das sondas por DOP-PCR

As sondas “painting” foram marcadas indirectamente com digoxigenina-11-dUTP e / ou biotina-16-dUTP (Roche Molecular Biochemicals).

1. Preparou-se a seguinte mistura de reacção para marcação por PCR:

Reagentes	Quantidade (µl)
Produto do PCR	5
Tampão 10xTAPS ⁽¹⁾	5
Detergente W-1 a 0.1% (p/v) (Sigma)	2,5
Mistura dNTP's de marcação ⁽²⁾	5
“Primer” universal 6-MW ⁽³⁾ a 140 µM	1
Biotina-16-dUTP ou Digoxigeneina-11-dUTP (1mM)	1,5
Água ultra pura	29
Homogeneizou-se e centrifugou-se a solução	
Taq DNA polimerase (Perkin Elmer)	1
TOTAL	50

(1) 10xTAPS = 250 mM TAPS (Sigma), 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 28.8 µM beta-mercaptoetanol, pH 9.3.

(2) A mistura de nucleotídeos contém os nucleotídeos dATP, dCTP e dGTP a 2.0 mM e dTTP a 1.5 mM.

(3) “primer” universal 6-MW-5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', onde N = A, C, G ou T.

- O termociclador utilizado foi o UNO II (Biometra) com tampa aquecida. O programa realizado foi:

Temperatura	Tempo	Processo
94°C	9 min	Desnaturação inicial
94°C	1 min	Desnaturação
62°C	1.5 min	“Annealing”
72°C	3 min	Síntese de DNA
72°C	10 min	Síntese final de DNA

Protocolo 10 - Precipitação das sondas

As sondas “painting” foram precipitadas com outros componentes que permitem reduzir ligações não específicas da sonda.

- Num “eppendorf” colocaram-se os seguintes reagentes:

Reagentes	Quantidade (µl)
Produto do PCR secundário	6
Cot-1-DNA Humano (Gibco, Life Technologies)	3
DNA Esperma de salmão (Gibco, Life Technologies)	2
TOTAL	11

A Cot HSA e o esperma de salmão têm como função bloquear as sequências repetitivas.

- Para precipitar as sondas adicionaram-se 3 volumes (33 µl) de etanol absoluto, a -20°C;
- As sondas foram incubadas na arca a -80°C, durante 1 hora e 30 minutos;
- Centrifugaram-se as sondas a 14 000 rpm, durante 30 minutos, numa microcentrifuga refrigerada a 0°C;
- Removeu-se o sobrenadante, com auxílio de uma micropipeta, e colocaram-se as sondas numa estufa a 65°C, durante 5 minutos;
- Adicionou-se a cada “eppendorf” 7,5 µl de solução de hibridação (solução com 50% formamida em 2xSSC), previamente aquecida a 37°C, homogeneizou-se e centrifugou-se;
- Os “eppendorf” foram colocados a 37°C e com agitação, durante 4 horas.

Protocolo 11 - Hibridação das sondas “painting” obtidas por DOP-PCR

- O espalhamento decorreu à temperatura e humidade ambiente. Em cada lâmina foi colocada uma gota de 3 µl de suspensão celular. As lâminas foram observadas ao

microscópio em contraste de fase (Zeiss Axostat), com a objectiva de 10X, com o intuito de avaliar o índice mitótico, a densidade celular e o espalhamento das metáfases;

Envelhecimento das lâminas

2. As lâminas foram envelhecidas numa estufa a 65°C, durante cerca de 21 horas;
3. Lavaram-se as lâminas duas vezes em 1xPBS, à temperatura ambiente, durante 5 minutos cada;
4. Transferiram-se as lâminas para uma solução de 1% formaldeído / 2xSSC, à temperatura ambiente, durante 20 minutos;
5. As lâminas foram lavadas duas vezes em 1xPBS, à temperatura ambiente, durante 5 minutos cada;
6. Desidrataram-se as lâminas em etanol a 70%, 90% e 100%, todos a -20°C, durante 5 minutos em cada. As lâminas secaram ao ar;

Desnaturação da sonda

7. A sonda foi desnaturada a 80°C, durante 10 min, seguido de um “pré-annealling” a 37°C, de 1 a 4 horas;

Desnaturação da amostra

8. As lâminas foram desnaturadas numa solução de 70% formamida (Sigma) / 2xSSC (pH=7), a 65°C, durante 50 segundos;
9. Desidratação das lâminas em etanol a 70%, 90% e 100%, refrigerados a -20°C, durante 5 minutos cada. As lâminas secaram ao ar;
10. Observaram-se as lâminas ao microscópio em contraste de fase e assinalou-se a área pretendida;

Hibridação

11. Na área pretendida aplicaram-se os 7 µl da sonda e colocou-se uma lamela de 22x22 mm;
12. O conjunto lâmina / lamela foi transferido para uma câmara húmida, previamente aquecida, e incubou a 37°C, durante 2 dias;

Lavagem pós-hibridação

13. Mergulharam-se as lâminas em 2xSSC, a 37°C, durante 5 minutos;
14. As lâminas foram lavadas 2x [50% formamida (Sigma) / 2xSSC (pH=7)], a 37°C, durante 5 minutos;
15. Colocaram-se as lâminas em 2xSSC, a 37°C, durante 5 minutos;

16. Transferiram-se as lâminas para 4xSSC / 0.05% Tween 20 (Applygene), à temperatura ambiente;

Deteção e contraste

Para as sondas marcadas com biotina-16-dUTP utilizou-se a Fluoresceína Avidina DCS (Vector). Para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP utilizou-se a anti-digoxigenina-5TAMRA fragmentos Fab (Boehringer Mannheim). Bloquearam-se os locais inespecíficos, aos quais se poderia ligar inespecificamente este anticorpo, com uma solução bloqueante.

17. Retiraram-se as lâminas e sem deixar secar aplicou-se a cada lâmina 100 µl de solução bloqueante [3% (p/v) de BSA (“Bovine Serum Albumin”) (Sigma) em 4xSSC], colocou-se uma lamela e incubou 10 minutos, à temperatura ambiente;
18. Preparou-se a solução de detecção para sondas de: **a)** marcação simples: 1 µl de anticorpo para 200 µl de 4xSSC; e **b)** marcação dupla: 1 µl de cada anticorpo para 200 µl de 4xSSC;
19. A solução de detecção foi centrifugada a 13 000 rpm, durante 10 minutos;
20. Retiraram-se as lâminas e sem deixar secar adicionou-se a cada lâmina 80 µl da solução de detecção e cobriu-se com uma lamela;
21. As lâminas incubaram numa caixa húmida, protegidas da luz, a 37°C, durante 1 hora;
22. Lavaram-se as lâminas 3x [4xSSC / 0.05% Tween 20 (Appligene)], à temperatura ambiente, durante 5 minutos cada;
23. Retiraram-se as lâminas e sem deixar secar adicionou-se 5 µl de contrastante, Vectashield DAPI (Vector Laboratories), colocou-se uma lamela e removeu-se o excesso pressionando o conjunto lâmina / lamela num toalhete;
24. As lâminas foram guardadas numa caixa escura, no frigorífico até serem observadas ao microscópio de epi-fluorescência.

2.3.9. Microscopia e análise

As lâminas foram observadas ao microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse E400) equipado com quatro filtros com diferentes comprimentos de onda: DAPI (365-400 nm), FITC (450-520 nm), Texas Red (510-590 nm) e Aqua (433-480 nm). Os resultados obtidos foram registados num sistema computadorizado de análise de imagem Leica CW4000 FISH. Para as sondas de sequência única e α -satélite foram analisados entre 150 a 210 células (núcleos / metáfases). Nas sondas subteloméricas e “painting” apenas se analisaram metáfases, pelo que o número variou consoante a preparação.

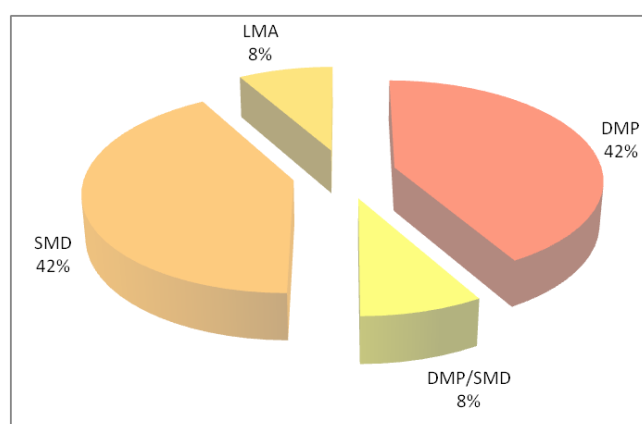
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho foram estudados 50 casos de doenças hemato-oncológicas. Na distribuição dos casos pelos diferentes tipos de doença oncológica teve-se em consideração a classificação da “World Health Organization Classification of Tumours” (WHO) (Swerdlow *et al.*, 2008). Numa primeira etapa, a divisão faz-se tendo em conta o tipo de linhagem envolvida (mielóide ou linfóide). Assim, 24 casos pertenciam às neoplasias mielóides e os restantes 26 às neoplasias linfóides.

Os 24 casos de neoplasias mielóides estudados distribuem-se da seguinte forma: 10 casos de doenças mieloproliferativas (DMP), 2 casos de doenças mieloproliferativas / mielodisplásicas (DMP/SMD), 10 casos de síndromes mielodisplásicas (SMD) e por último 2 casos de leucemia mielóide aguda (LMA). A frequência de cada grupo está representada no gráfico 1.

Gráfico 1 – Frequência dos 24 casos de neoplasias mielóides pelos quatro grupos.

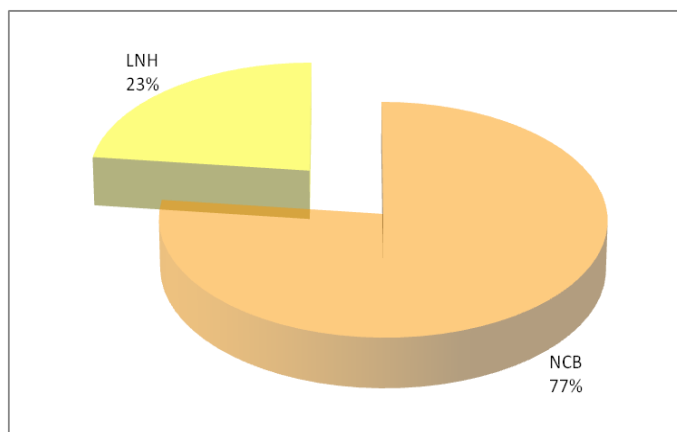


As DMP e os SMD foram os grupos com maior percentagem de casos, perfazendo 84% das neoplasias mielóides estudadas. A percentagem de LMA e DMP/SMD é baixa (8%), o que pode ser explicado pelo facto de as situações agudas serem direccionadas para o Instituto Português de Oncologia (IPO) e porque, muitas vezes, as

características clínicas do grupo DMP/SMD sobrepõem-se de uma forma mais evidente ou com as características das DMP ou com as características dos SMD.

Dos 26 casos de neoplasias linfóides, 20 correspondem às neoplasias das células B (NCB) e 6 casos aos linfomas não-Hodgkin (LNH). Não existiram neste trabalho casos relativos aos outros dois grupos porque são observadas essencialmente em crianças e jovens adultos e a Oncologia Infantil é direccionada para centros da especialidade. A frequência de cada grupo está representada no gráfico 2.

Gráfico 2 – Frequência dos 26 casos de neoplasias linfóides pelos diferentes grupos.



A grande representatividade das NCB face aos LNH deve-se ao facto de pertencerem às neoplasias das células B, a leucemia linfática crónica que é a leucemia mais frequente nos países ocidentais e estar também incluído neste grupo os mielomas múltiplos que constituem cerca de 15% das neoplasias hematológicas.

As amostras compreenderam 33 medulas ósseas (MO) e 17 amostras de sangue periférico (SP). Para todas elas foram realizadas duas culturas celulares. O tipo de cultura foi diferente (directas ou com estimuladores) consoante o tipo de patologia e o tipo de células que se pretendia estudar.

Nas neoplasias mielóides, as células pretendidas são as que estão em divisão espontânea, têm origem na medula óssea mas dado a fase da doença podem entrar na circulação sanguínea. Assim, o tipo de amostra foi medula óssea ou sangue periférico e o tipo de culturas realizadas foram as culturas directas e de ~24 horas.

Nas neoplasias linfóides, no caso das leucemias linfáticas crónicas (LLC) e dos LNH, as células pretendidas são os linfócitos B em diferentes estados de diferenciação. Neste caso foi necessário utilizar estimuladores específicos para este tipo de células, como por exemplo o 1,2-O-tetradecanoilforbol-1,3-acetato (TPA) e o Pokeweed. Em todos os casos analisados, o tipo de amostra foi sangue periférico. Já nos mielomas múltiplos (MM), as células-alvo são os plasmócitos que se encontram na medula óssea. As células neoplásicas encontram-se em divisão espontânea pelo que o tipo de culturas realizadas foram as directas e de ~24 horas.

Em todas as culturas realizadas obtiveram-se metáfases. O número de metáfases obtidas variou nos diferentes casos, o que poderá estar relacionado com o tipo de patologia e a fase em que esta se encontra. Na maioria dos casos (98%) foi possível analisar 20 metáfases, o que está de acordo com as normas internacionais, segundo as quais na análise citogenética de doenças hematológicas devem ser analisadas pelo menos 20 metáfases, de duas culturas diferentes (Barch *et al.*, 1997).

A qualidade das metáfases analisadas no estudo citogenético, variou entre as 150 bandas (baixa resolução) e as 400 bandas, havendo sempre o cuidado de analisar metáfases de baixa resolução. É importante analisar metáfases com diferentes resoluções de bandas e incluir sempre metáfases de baixa resolução, caso contrário o clone anómalo pode não ser detectado. Nos últimos anos, com a crescente análise citogenética deste tipo de doenças tem-se verificado que a maioria das células malignas apresenta cromossomas com baixa resolução (Barch *et al.*, 1997; Fadl-Elmula, 2001).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em 43 casos. Diferentes tipos de sondas foram aplicadas consoante o que se pretendia estudar. Utilizaram-se sondas de:

- a) Sequência de cópia única para verificar a deleção de um determinado gene ou a presença de genes de fusão e calcular a sua incidência;
- b) α -satélite para aferir a presença de um cromossoma 12 extra, no caso das LLC, e determinar a percentagem de células com trissomia;
- c) Subteloméricas e “whole chromosome painting” (WCP) com o intuito de esclarecer ou confirmar os rearranjos cromossómicos encontrados na citogenética convencional.

Para os dois primeiros tipos de sondas foram analisadas entre 150 a 210 células (entre núcleos e metáfases), enquanto para o grupo c) foram analisadas entre 10 a 15 metáfases.

Dos 50 casos estudados, 72% apresentavam anomalias cromossómicas, detectadas pela citogenética convencional e pela técnica de FISH. Em 14% dos casos, as alterações foram apenas detectadas pelo FISH. Este facto pode ser explicado tendo em conta dois factores:

- a) Uma das anomalias, a translocação t(4;14), apenas é detectada por técnicas moleculares;
- b) As restantes alterações foram deleções no cromossoma 13 e no cromossoma 17, cujas incidências estavam próximo do “cutoff” ($\geq 10\%$); e pela citogenética convencional, a sua detecção só é possível quando os cromossomas apresentam uma boa resolução.

A citogenética convencional tem um papel importante não só na detecção de novas alterações como também na monitorização da doença permitindo verificar a eficácia da terapêutica e constatar a progressão / evolução clonal. A citogenética mostrou-se, igualmente, determinante na detecção de rearranjos não descritos e / ou raros, com valor prognóstico, que permitiram um melhor conhecimento da doença.

Dos 36 casos com alterações, 17 foram detectados nas neoplasias mielóides e os restantes 19 casos nas neoplasias linfóides, a percentagem de anomalias em cada uma das linhagens foi, respectivamente, 47% e 53%.

3.1. Neoplasias mielóides

3.1.1. Doenças mieloproliferativas (DMP)

Neste grupo foram estudados dez casos com leucemia mielóide crónica (LMC), seis com suspeita e quatro em tratamento. A idade média dos pacientes foi de 66.5 anos (entre os 57 e os 76 anos), sendo três do sexo feminino e sete do sexo masculino. Em todos os casos, a amostra estudada foi medula óssea.

Para cada caso realizaram-se duas culturas, uma directa e outra de ~24 horas, tendo-se obtido metáfases em todas elas. O número médio de metáfases analisadas foi de 21 (entre 20 e 24).

A técnica de FISH, com a sonda de sequência de cópia única para os genes *ABL1* (9q34) e *BCR* (22q11), foi aplicada a todos os casos, com o objectivo de detectar a fusão dos genes *BCR/ABL1*; alteração genética característica deste tipo de leucemia. O número médio de células analisadas foi de 184.5 e sempre que possível foram observadas metáfases. Os resultados obtidos na citogenética convencional e por FISH encontram-se discriminados na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de LMC.

N.º caso	Idade	Tipo amst.	Susp./ Trat.	N.º met. anal.	Resultado citogenético	FISH t(9;22)
1	58	MO	T	23	46, XX, t(9;22)(q34;q11) [3] / 46, XX [20]	21,7%
2	70	MO	T	20	47, XY, +8, t(9;22)(q34;q11) [8] / 46, XY, t(9;22)(q34;q11) [12]	98,3%
3	62	MO	S	24	46, XY [24]	negativo
4	57	MO	S	20	46, XX, t(9;22)(q34;q11) [20]	97%
5	74	MO	T	20	46, XX, t(9;22)(q34;q11) [4] / 46, XX [16]	29,7%
6	68	MO	S	20	46, XY [20]	negativo
7	69	MO	S	22	46, XY [22]	negativo
8	58	MO	S	21	46, XY, t(9;22)(q34;q11) [21]	98,1%
9	76	MO	S	20	46, XY, t(8;22)(p11.2;q11.2) [20]	negativo*
10	73	MO	T	23	46, XY, t(9;22)(q34;q11) [2] / 46, XX [21]	17,4%

Tipo amst. – tipo de amostra; Susp. / Trat. – suspeita (S) / tratamento (T); N.º met. anal. – número de metáfases analisadas; MO – medula óssea;

* com 3 sinais para o gene *BCR* (# 22)

Dos dez casos estudados com LMC, três apresentavam um cariótipo normal (caso n.º 3, 6 e 7). Nestes casos, o FISH foi realizado para detectar um eventual mosaicismo em baixa percentagem, que não se confirmou.

Dos sete casos com anomalias, seis (n.º 1, 2, 4, 5, 8 e 10) apresentavam uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, envolvendo, respectivamente, as regiões q34 (*ABL1*) e q11 (*BCR*), como se pode observar na figura 10. Esta translocação é característica deste tipo de leucemia e segundo Achkar *et al.* (2010), ela ocorre em 90% dos casos de LMC. Neste grupo de dez casos de LMC, a incidência da translocação t(9;22) é inferior ao descrito, o que se pode ficar a dever ao número reduzido de casos estudados.



Figura 10 – a) Cariograma, em bandas GTL, do sexo feminino com a translocação t(9;22) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 9 e 22 assinalando os pontos de quebra.

Nos casos n.º 2, 4 e 8, a translocação foi observada em todas as metáfases analisadas. Nos dois últimos casos, a translocação foi detectada ao diagnóstico; dado as características proliferativas deste tipo de leucemia, é normal que todas as células analisadas apresentem o rearranjo.

O caso n.º 2 tem uma particularidade, embora todas as metáfases apresentem a translocação t(9;22), em oito delas foi, também, observada uma trissomia 8 (figura 11). A presença de anomalias cromossómicas secundárias, nomeadamente a trissomia 8, i(17q), +Ph, são indicadores da progressão da LMC de uma fase crónica para uma fase blástica (Bortolheiro e Chiattonne, 2008). Este paciente encontrava-se em tratamento, a citogenética permitiu constatar que a terapêutica não foi eficaz e confirmar a evolução da doença.

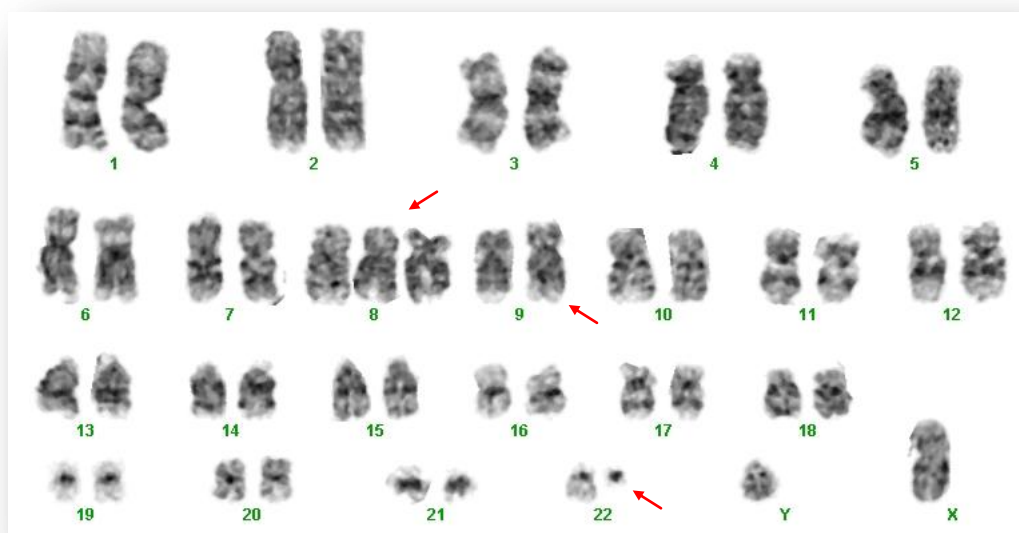


Figura 11 - Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(9;22) e uma trissomia 8 (assinalado com setas).

Nos casos n.º 1, 5 e 10, todos eles em tratamento, a translocação foi observada em, respectivamente, 13%, 20% e 8.7% das metáfases. A percentagem de células com a t(9;22) foi inferior ao obtido em análises anteriores, o que significa que a terapia está a ser eficaz. A análise citogenética nos casos em tratamento, tem como objectivo monitorizar a doença, verificar se se atingiu uma resposta citogenética completa ou “major”, isto é quando a percentagem de células com a translocação desce para os 0 - 15% (von Bubnoff e Duyster, 2010).

Nos seis casos acima mencionados com a translocação t(9;22), os resultados da técnica de FISH confirmaram a presença da translocação, isto é a formação dos genes de fusão. As incidências obtidas foram superiores às obtidas na citogenética convencional. Este facto está relacionado com a quantidade de células analisadas pela técnica de FISH (em média 184.5) comparativamente à citogenética convencional (média 21 metáfases).

As sondas para detectar a fusão dos genes *BCR/ABL1*, resultante da translocação t(9;22), são constituídas por várias sequências de DNA que hibridam com a região 9q34 (*ABL1*) e 22q11 (*BCR*); e que marcam a região do gene *ABL1* a vermelho e a região do gene *BCR* a verde, como está representado na figura 12a (Fan 2002; Richebourg *et al.*, 2008). Quando se formam os genes de fusão há a justaposição do sinal verde com o sinal vermelho, do qual resultam dois sinais amarelos, nos cromossomas 9 e 22 envolvidos na translocação, representado na figura 12a e b.

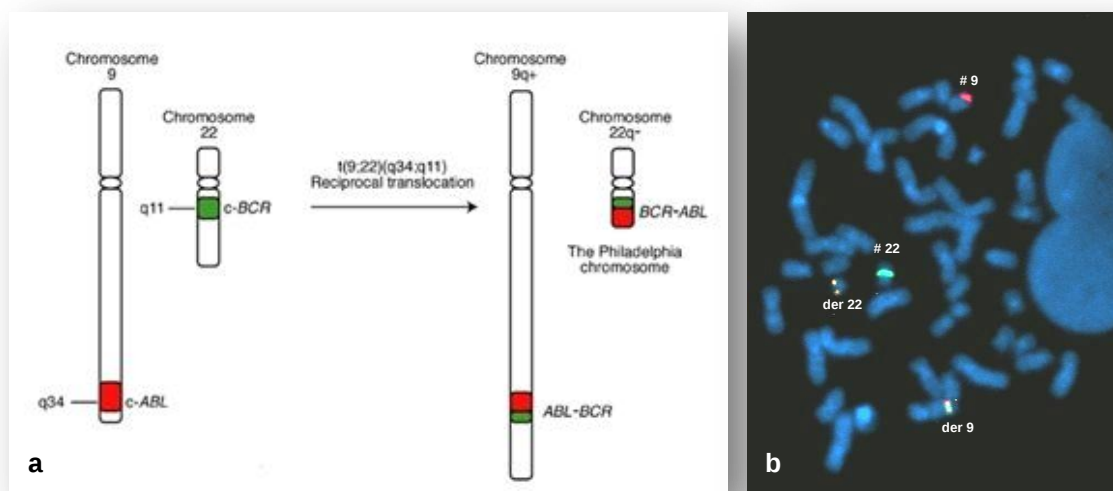


Figura 12 – a) Esquema da sonda para os genes *BCR* - *ABL1* (adaptado Smith *et al.*, 2003); b) a sonda aplicada numa metáfase com a *t*(9;22), observa-se um sinal vermelho no cromossoma (#) 9 normal, um sinal verde no # 22 normal e dois sinais amarelos nos # 9 e 22 envolvidos na translocação.

Uma exceção a este padrão, um sinal vermelho, um sinal verde e dois sinais amarelos, característicos da *t*(9;22), foi observado no caso n.º 8. Na citogenética convencional todas as metáfases apresentavam a translocação *t*(9;22), como está representado na figura 13a. Mas quando se realizou o FISH, os núcleos apresentavam um sinal vermelho, dois sinais verdes e um sinal amarelo (figura 13b); ao analisar metáfases foi possível verificar que o derivativo do cromossoma 9 não marcava com a sonda para o *ABL1* (vermelho), apenas com a sonda para o *BCR* (verde), o que implica a deleção da região *ABL1* no derivativo do cromossoma 9. Assim, o sinal vermelho corresponde ao cromossoma 9 normal, os sinais verdes ao cromossoma 22 normal e ao derivativo do cromossoma 9 (der(9)) e o sinal amarelo corresponde ao derivativo do cromossoma 22 (der(22)), como se pode observar na figura 13b.

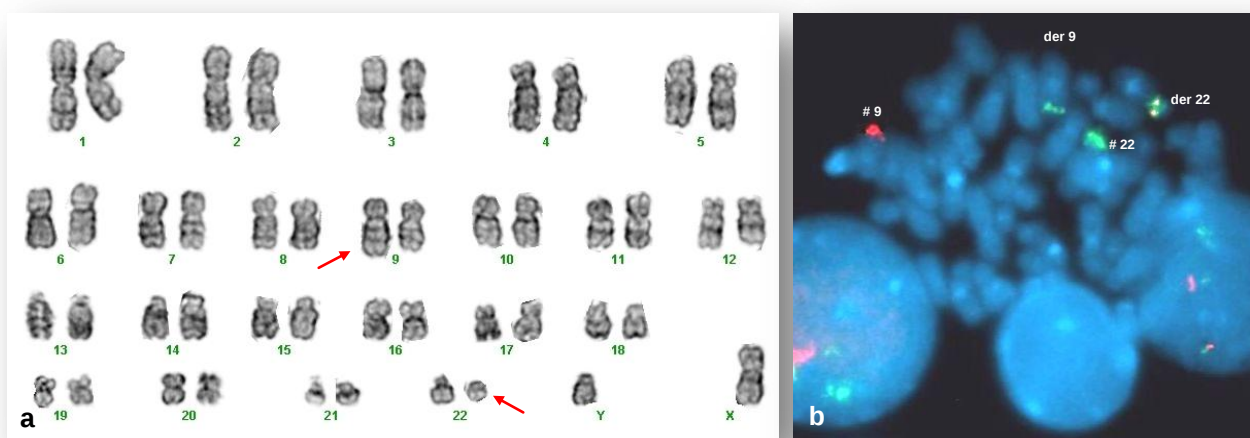


Figura 13 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação *t*(9;22)(q34;q11) (assinalado com setas); b) na técnica de FISH observa-se apenas um sinal de fusão no derivativo do # 22, com deleção do gene *ABL1* no derivativo # 9, que marca apenas a verde.

Neste caso, a técnica de FISH foi muito importante para detectar a deleção da região *ABL1* no der(9), uma vez que em termos de cariótipo não é possível a sua detecção (figura 13a). Estas deleções são relativamente frequentes na LMC, com uma incidência de 10 a 15%, estando associadas a um prognóstico desfavorável, com um tempo de vida mais curto e uma resposta menos eficaz à terapêutica (Gorusu *et al.*, 2007; Richebourg *et al.*, 2008).

No caso n.º 9 detectou-se um rearranjo raro. Todas as metáfases analisadas apresentavam uma translocação entre o ramo curto do cromossoma 8 (p11.2) e o ramo longo do cromossoma 22 (q11.2) (figura 14).

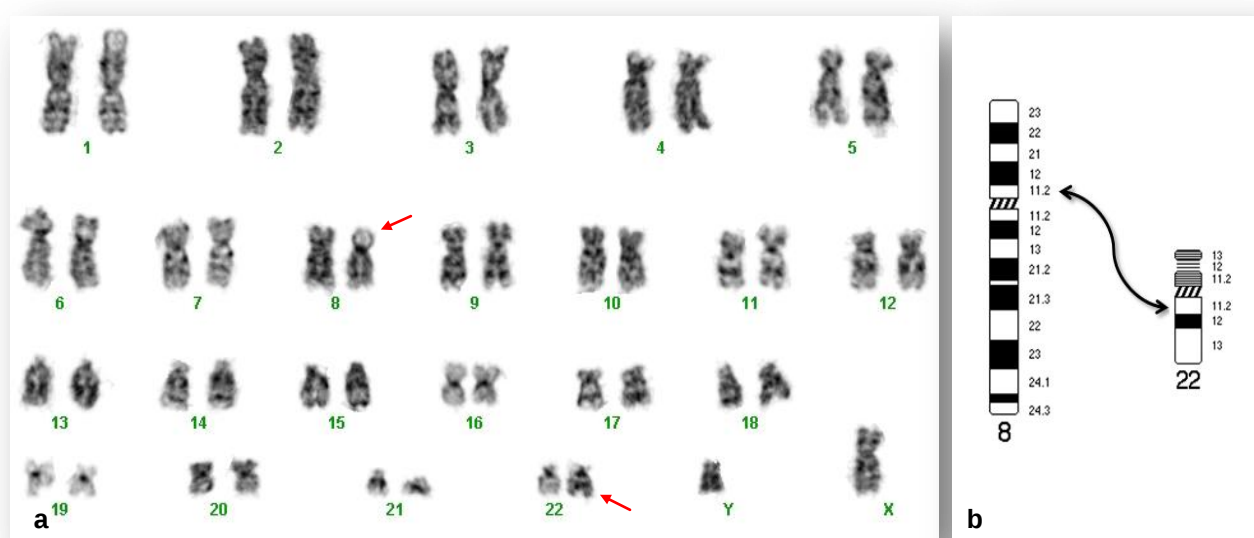


Figura 14 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(8;22) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 8 e 22 assinalando os pontos de quebra.

Quando se aplicou a sonda para os genes *BCR-ABL1*, confirmou-se o envolvimento do gene *BCR* e a ausência do gene de fusão *BCR/ABL1*, como se pode constatar na figura 15; em que se observam dois sinais vermelhos nos dois cromossomas 9 normais e três sinais verdes que marcam os dois cromossomas 22 e o ramo curto do cromossoma 8, confirmando-se a translocação entre os cromossomas 8 e 22.

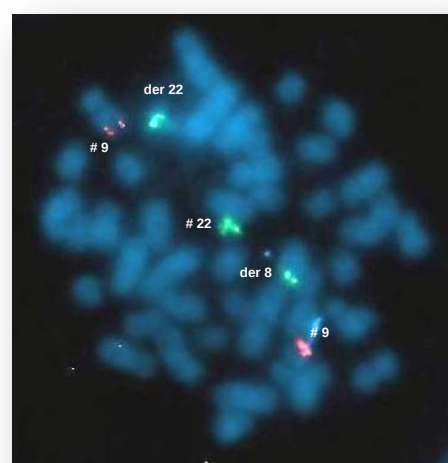


Figura 15 – FISH com a sonda para os genes *BCR-ABL1*, observam-se 3 sinais verdes (*BCR*) e 2 vermelhos (*ABL1*).

Nesta situação, a citogenética convencional foi determinante, detectando uma situação rara. Tratava-se de um caso com características clínicas de LMC mas sem apresentar a translocação t(9;22) nem o gene de fusão *BCR/ABL1*, características desta doença, era um caso atípico de LMC.

Na literatura apenas estão descritos sete casos com a t(8;22)(p11.2;q11.2) e todos com características de “LMC atípica” semelhante ao caso apresentado (Richebourg, Plantier *et al.*, 2008). Não há a formação do gene de fusão *BCR/ABL1* mas a presença de um outro gene de fusão *BCR/FGFR1*. O gene *FGFR1* é uma tirosina cinase com envolvimento no processo hematológico que se localiza na região 8p11 e que foi descrito pela primeira vez em 2001 (Fioretos *et al.*, 2001). As translocações envolvendo esta região estão associadas a características morfológicas e clínicas específicas, referidas muitas vezes como “síndrome mieloproliferativo 8p11” (Lee *et al.*, 2008). Segundo a classificação WHO, este caso pertence ao grupo das DMP/SMD, uma vez que é uma LMC atípica, negativa para o *BCR/ABL1*.

Em suma, nos dez casos estudados com LMC, 70% apresentavam alterações cromossómicas, destes 85.7% apresentavam a translocação t(9;22), com igual incidência no sexo masculino e feminino. Embora a amostragem seja reduzida, a incidência desta anomalia é muito próxima do descrito; segundo Achkar *et al.* (2010), a t(9;22) está presente em 90% dos casos, com maior prevalência no sexo masculino (Swerdlow *et al.*, 2008).

Um dos casos apresentava uma anomalia secundária, uma trissomia 8, que está associado à transformação blástica e progressão da doença; num outro caso foi detectada uma deleção na região *ABL1* no derivativo do cromossoma 9, ambos com prognóstico desfavorável.

Uma situação rara foi detectada no caso n.º 9, em que a citogenética teve um papel importante na sua detecção, permitindo um melhor conhecimento da doença, prognóstico e evolução, e por conseguinte, uma abordagem clínica e terapêutica mais direccionada.

3.1.2. Doenças mieloproliferativas / mielodisplásicas (DMP / SMD)

Foram estudados dois casos de DMP / SMD, com suspeita de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). A idade dos pacientes foi de 61 e 73 anos, ambos do sexo masculino.

Nos dois casos, o estudo citogenético foi realizado a partir de medula óssea. Para cada um dos casos realizaram-se duas culturas, uma directa e uma de ~24 horas. Em ambos obtiveram-se

metáfases embora em um dos casos, o seu número fosse diminuto, pelo que só foi possível analisar dez metáfases. Neste tipo de leucemia são várias as anomalias cromossômicas observadas mas não existem sondas pré-definidas a aplicar como acontece na LMC. A técnica de FISH foi realizada em um dos casos com o intuito de confirmar o resultado citogenético encontrado. Na tabela 8 estão descritos os resultados citogenéticos obtidos nos dois casos.

Tabela 8 – Resultados da análise citogenética obtidos nos dois casos de LMMC.

N.º caso	Idade	Tipo de amostra	N.º metaf. analisadas	Resultado citogenético
1	61	MO	20	46, XY [20]
2	73	MO	10	46, XY, der(5)t(1;5)(q44;q31)del(5)(q14q31),t(15;22)(q13;q11) [10]

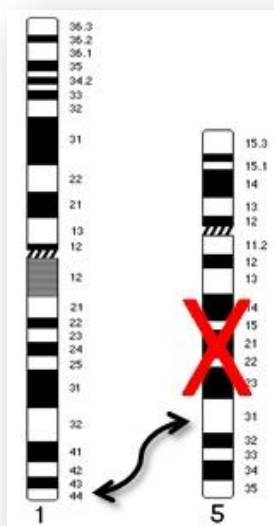
N.º metaf. analisadas – número de metáfases analisadas; MO – medula óssea;

O primeiro caso apresentava um cariótipo normal nas 20 metáfases analisadas.

No segundo caso apenas foi possível analisar dez metáfases e todas elas apresentavam a mesma alteração cromossômica, um rearranjo complexo constituído por uma translocação desequilibrada entre os cromossomas 1 e 5, com deleção intersticial no ramo longo do cromossoma 5, e uma translocação aparentemente equilibrada entre os cromossomas 15 e 22, como está representado na figura 16.



Figura 16 – Cariograma, em bandas GTL, com uma translocação entre os # 1 e 5, com deleção intersticial do ramo longo do # 5 e uma translocação t(15;22) (assinalado com setas).



O derivativo do cromossoma 5 resulta de uma translocação entre a região q44 do cromossoma 1 e a região q31 do cromossoma 5, com perda de parte do ramo longo do cromossoma 5, nas bandas q14 a q31, representado no esquema da figura 17.

Figura 17 – Representação, com idiogramas, da translocação desequilibrada entre os # 1 e 5 e da deleção intersticial no # 5, desde a banda q14 até à banda q31.

A translocação $t(1;5)$ foi confirmada com sondas subteloméricas para os cromossomas 1 e 5.

A mistura da sonda subtelomérica para o cromossoma 1 inclui também as sondas subteloméricas para o ramo curto dos cromossomas X e Y. As sondas marcam o 1p a verde; o 1q a vermelho; o centrómero do cromossoma X a azul-claro; e o Xp e Yp a amarelo. Na metáfase da figura 18a observam-se: dois sinais amarelos relativos ao Xp e Yp; um sinal azul-claro no centrómero do cromossoma X; dois sinais verdes no ramo curto do cromossoma 1 normal e no derivativo do cromossoma 1; e dois sinais vermelhos um no cromossoma 1 normal e outro no derivativo do cromossoma 5.

A sonda subtelomérica para o cromossoma 5 está isolada e marca o 5p a verde e o 5q a vermelho. Na figura 18b observa-se uma metáfase com dois sinais verdes, no ramo curto do cromossoma 5 normal e no derivativo do cromossoma 5, e dois sinais vermelhos, um no 5 normal e outro no derivativo do cromossoma 1.

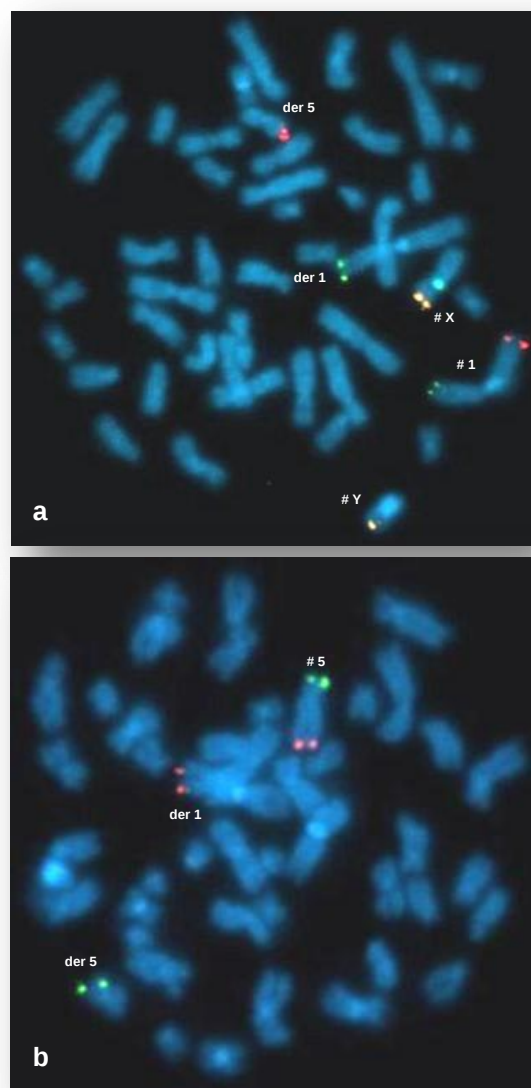


Figura 18 - Metáfase com sondas subteloméricas para os: a) # 1 (p-verde; q-vermelho), # Xp e Yp a amarelo; b) # 5 (p-verde; q-vermelho). Em que se confirma a $t(1;5)$.

Após pesquisa bibliográfica apenas se encontraram cinco casos com uma translocação t(1;5), a envolver os pontos de quebra 1q22 e 5q33; quatro deles estavam associados a doença mieloproliferativa (DMP) (Huret, 2006). No caso apresentado, os pontos de quebra eram diferentes, 1q44 e 5q31. Na região 5q31-q33 localiza-se o gene *PDGFR*, um receptor com actividade tirosina cinase. Genes de fusão envolvendo este gene são raros mas estão descritos em alguns casos de DMP, DMP / SMD e LMA (Vizmanos, 2005).

A deleção do ramo longo do cromossoma 5 é uma deleção intersticial com perda da banda q14 a q31, como está representado no esquema da figura 17. As bandas q31 a q35 encontram-se no derivativo do cromossoma 1. As deleções no ramo longo do cromossoma 5, entre as bandas q14 a q33, são típicas dos SMD, e são responsáveis pela displasia de uma ou mais linhagens da medula óssea (Haase, 2008).

A segunda translocação observada é um rearranjo equilibrado entre os cromossomas 15 e 22, nas bandas 15q13 e 22q11 (figura 19). O cromossoma 15 envolvido na translocação fica mais

pequeno, praticamente do tamanho de um cromossoma do grupo G, enquanto o derivativo do 22 fica do tamanho de um cromossoma do grupo D (figura 16).

Esta translocação, tal como a anterior, foi confirmada com sondas subteloméricas para os cromossomas 15 e 22.

A mistura da sonda subtelomérica para o cromossoma 15 inclui também a sonda subtelomérica para o cromossoma 10. No cromossoma 15, a sonda subtelomérica marca apenas o ramo longo, a amarelo, e tem uma região controlo no 15q22, a azul-claro. Já a sonda para o cromossoma 10 marca o ramo curto a verde e o ramo longo a vermelho.

A sonda subtelomérica para o cromossoma 22 também está inserida numa mistura com a sonda subtelomérica para o cromossoma 3. No cromossoma 22 existe uma sonda controlo que marca o 22q11 (*BCR*) a azul-claro e a região subtelomérica no ramo longo é observada a amarelo. No cromossoma 3, o ramo curto marca a verde e o ramo longo a vermelho.

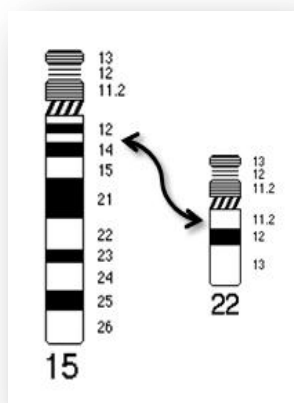


Figura 19 - Idiograma dos # 15 e 22 assinalando os pontos de quebra.

Na figura 20a está representada uma metáfase com a mistura da sonda subtelomérica para os cromossomas 10 e 15, em que se observam dois sinais verdes e dois sinais vermelhos, correspondentes aos dois cromossomas 10 normais, e dois cromossomas, cada um com um sinal amarelo e um sinal azul-claro; embora sejam do mesmo tamanho e pareçam dois cromossomas 15, um corresponde ao cromossoma 15 normal e outro ao derivativo do 22, como se pode confirmar pela metáfase da figura 20b. Nesta metáfase observam-se dois sinais azul-claros, no cromossoma 22 normal e no derivativo do 22; dois sinais amarelos, no cromossoma 22 normal e no derivativo do cromossoma 15; observam-se igualmente, dois sinais verdes e dois vermelhos relativos aos dois cromossomas 3 normais.

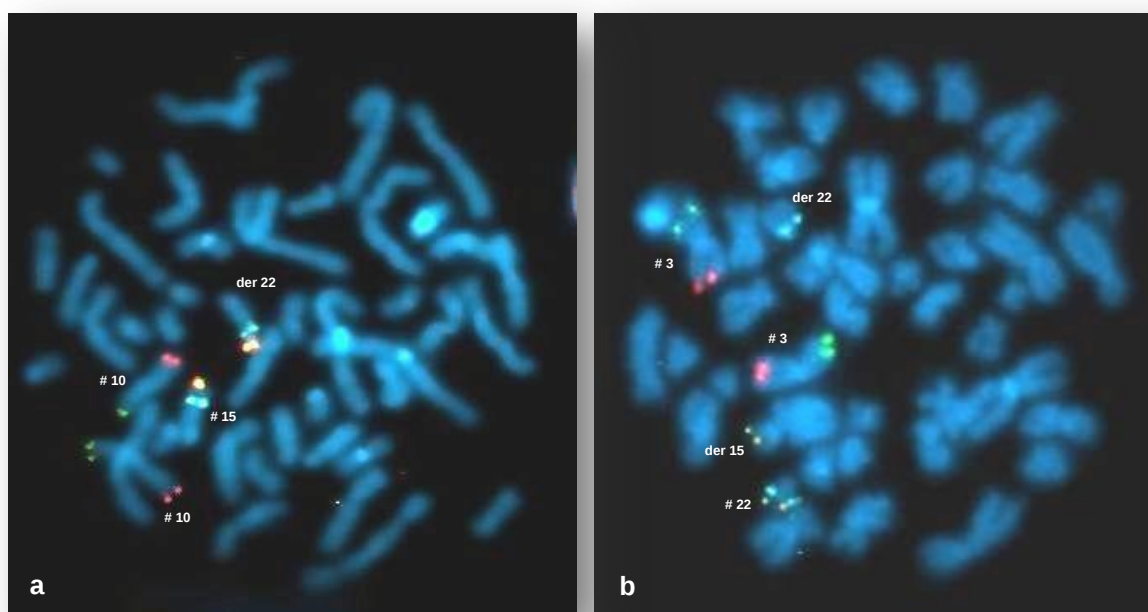


Figura 20 - Metáfase com sondas subteloméricas para o: a) # 15q (amarelo), com uma região controlo no 15q22 (azul-claro), e # 10 (p-verde; q-vermelho); b) # 22q (amarelo), com uma região controlo no 22q11 (azul-claro) e # 3 (p-verde; q-vermelho).

Esta translocação $t(15;22)$ não está descrita na literatura. Os rearranjos que envolvem a região 15q13-q15 são raros e estão, normalmente, associados a translocações equilibradas, descritas em alguns casos de LMC, como uma anomalia secundária ou como parte de um rearranjo complexo envolvendo o cromossoma “Philadelphia” (Heerema, 2003). No caso apresentado a região 15q13 está associada a uma translocação equilibrada, e embora não envolvido na translocação $t(9;22)$ está associada à região 22q11 (*BCR*).

Dois dos rearranjos detectados não estão descritos na literatura, não sendo possível prever o seu valor prognóstico, mas dado o número de alterações cromossómicas, poder-se-á inferir que existe uma instabilidade genética, o que por si só é de prognóstico desfavorável.

Em suma, o número de casos estudados não permite fazer qualquer tipo de extrapolações. Segundo McGrattan *et al.* (2007), 20 a 40% dos casos com LMMC apresentam anomalias. As duas translocações encontradas não estão descritas na literatura, mas alguns dos pontos de quebra estão envolvidas nos processos mieloproliferativos. Numa análise global do caso verificou-se que as alterações detectadas são responsáveis pelas características mieloproliferativas e pela mielodisplasia que caracterizam este tipo de leucemia.

3.1.3. Síndromes mielodisplásicas (SMD)

Dentro das neoplasias mielóides, o grupo dos SMD é o segundo mais estudado a par com as DMP. Procedeu-se à análise citogenética de dez casos com suspeita de SMD. A idade média dos pacientes foi de 72.3 anos (entre os 63 e os 81 anos). Com igual número de indivíduos do sexo masculino e feminino.

Nos dez casos, a amostra foi medula óssea, e tal como nos casos anteriores realizaram-se dois tipos de cultura, directa e ~24 horas. Em todas as culturas obtiveram-se metáfases, tendo-se analisado em média 20.6 metáfases por caso.

Nos SMD, as anomalias são várias, na sua maioria aneuploidias ou grandes deleções, pelo que normalmente não se aplica a técnica de FISH. Esta técnica foi aplicada, em cinco casos, com diferentes tipos de sonda consoante as alterações cromossómicas encontradas:

- a) Sequência de cópia única para a região 5q31, em três casos, com o objectivo de determinar a percentagem de células com deleção. O número médio de células analisadas foi de 187.3 (173 a 202 células);
- b) Subteloméricas e / ou WCP (três casos) para esclarecer e / ou confirmar o resultado citogenético. Em ambas as sondas, o número de metáfases analisadas variou entre as 10 e as 15.

Os resultados citogenéticos e por FISH para a sonda 5q31 estão representados na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de SMD.

N.º caso	Id.	Tipo amt.	N.º met. analis.	Resultado citogenético	FISH del(5q)
1	74	MO	21	46, XY [21]	—
2	68	MO	20	46, XX, t(3;21)(p21;q22.3), del(5)(q14q33) [6] / 46, XX, t(3;21)(p21;q22.3) [14]	44,6%
3	78	MO	20	47, XY, +8 [6] / 46, XY [14]	—
4	63	MO	20	46, XX, i(17)(q10) [17] / 45, XX, -7, i(17)(q10) [3]	—
5	66	MO	21	46, XX, -4, der(11)dup(11?), del(7)(q32), del(12)(p11), +mar [7] / 46, XX, del(7)(q32), del(12)(p11) [10] / 46, XX [4]	—
6	72	MO	22	46, XY [22]	—
7	81	MO	21	46, XX, del(5)(q31q33) [10] / 46, XX [11]	58,9%
8	75	MO	20	47, XY, +8, del(20)(q11.2) [12] / 46, XY [8]	—
9	67	MO	21	46, XY [21]	—
10	79	MO	20	45, XX, del(5)(q15), der(6)der(12)t(6;12) [12] / 46, XX [8]	57,5%

Id. – idade; Tipo amt. – tipo de amostra; N.º met. analis. – número de metáfases analisadas; MO – medula óssea;

Dos dez casos, três apresentavam um cariótipo normal, todos eles do sexo masculino. Um clone normal foi também observado em cinco dos sete casos com anomalias cromossômicas, caso n.º 3 (em 70%), n.º 5 (19%), n.º 7 (52.4%), n.º 8 (30%) e n.º 10 (40%).

Dos sete casos com anomalias cromossômicas, 85.7% apresentavam anomalias cromossômicas comuns nos SMD, representado na figura 21: **a)** trissomia 8 isolada (caso n.º 3); **b)** trissomia 8 e deleção do ramo longo do cromossoma 20 (caso n.º 8); **c)** monossomia do cromossoma 7 e um isocromossoma do ramo longo do cromossoma 17, com perda do ramo curto (caso n.º 4); e **d)** deleção do ramo longo do cromossoma 5 (casos n.º 2, 7 e 10).

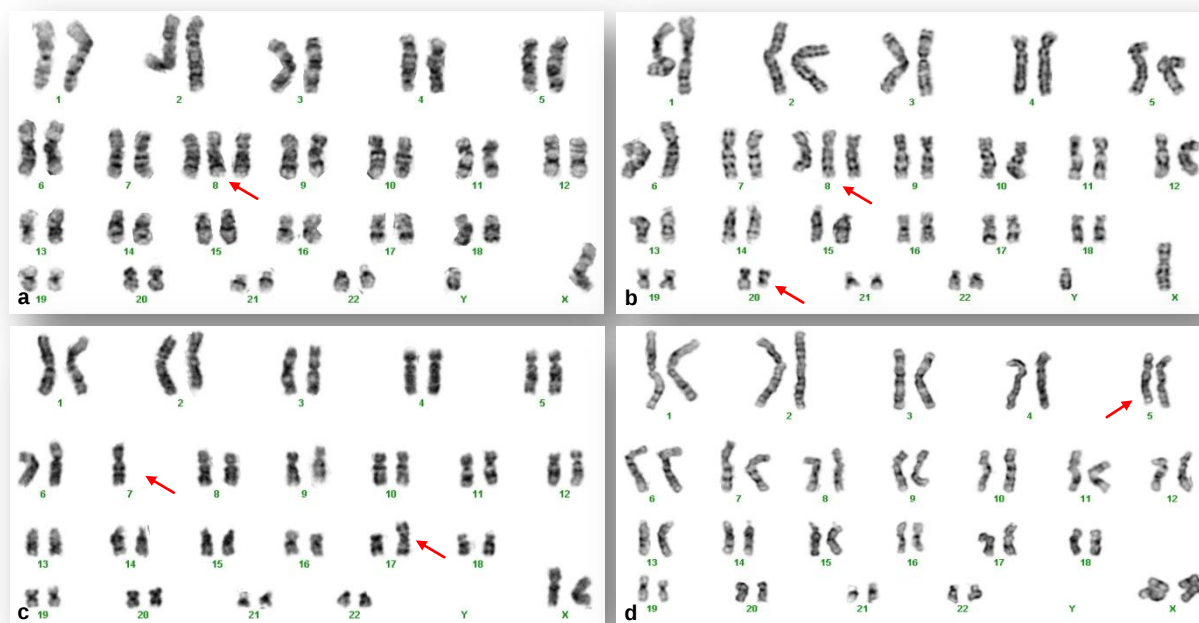


Figura 21 – Cariogramas, em bandas GTL, com: a) trissomia 8; b) trissomia 8 e deleção do 20q; c) monossomia do # 7 e um isocromossoma do 17q; e d) deleção do 5q (as alterações estão assinaladas com uma seta).

Estudos recentes (Gmidène *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010) referem as deleções no ramo longo dos cromossomas 5 e 20 como rearranjos de prognóstico favorável, quando estas anomalias se encontram isoladas. Já a monossomia 7 e o isocromossoma do ramo longo do cromossoma 17 são consideradas de prognóstico desfavorável. Por seu lado, a trissomia 8 tem um significado intermédio se é a única anomalia presente, sendo que a combinação de anomalias influencia negativamente o prognóstico. Estes achados citogenéticos são importantes para a orientação clínica, uma vez que permitem direccionar o tratamento e prever a evolução da doença.

A deleção do ramo longo do cromossoma 5 foi a anomalia mais frequente (42.8%), estando presente em três casos (caso n.º 2, 7 e 10). No que diz respeito a esta anomalia, ela pode apresentar-se sob duas formas, deleção parcial ou deleção intersticial.

Na deleção parcial há perda de parte do ramo incluindo a região terminal (qter), como acontece no caso n.º 10, da banda q15 até qter (figura 22a).

Na deleção intersticial há a perda de segmentos na região intermédia do ramo longo, como no caso n.º 2 e 7;

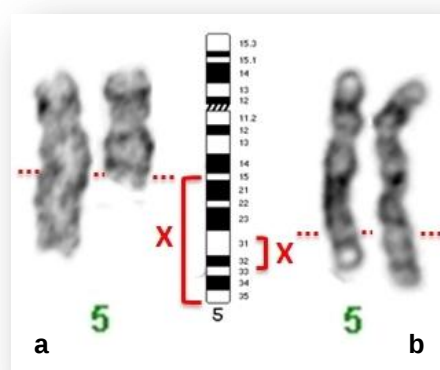


Figura 22 – Representação do idiograma e o par do cromossoma 5 com deleção: a) parcial, caso n.º 10 e b) intersticial, caso n.º 7.

no primeiro há deleção da banda q14 até q33; no segundo a deleção vai desde a banda q31 a q33 (figura 22b). No caso n.º 2 observou-se também uma translocação entre os cromossomas 3 e 21. Mas tratava-se de um rearranjo de origem constitucional, uma vez que quando se realizou a cultura com fitohemaglutinina, que estimula os linfócitos T, estes também apresentavam a translocação.

Vários autores (Olney e Le Beau, 2006; Nimer, 2008; Swerdlow *et al.*, 2008) referem a deleção intersticial do cromossoma 5, entre as bandas q31 e q33 como um subgrupo dos SMD, sendo mesmo designando por “Síndrome do 5q-”; com características clínicas e morfológicas específicas, e com maior incidência no sexo feminino. Os dois casos apresentados com deleção intersticial eram do sexo feminino, o que está de acordo com o descrito.

Nos três casos com deleção do 5q foi realizada a técnica de FISH com a sonda para a região 5q31, com o objectivo de confirmar e determinar a percentagem de células delectadas. As incidências obtidas foram ligeiramente superiores às obtidas na citogenética convencional, na ordem dos 6 a 10 pontos percentuais, facto que se explica pelo maior número de células analisadas na técnica de FISH.

A sonda para o 5q31 inclui uma região controlo na banda 5p11. A região 5q31 marca a vermelho e o controlo a verde. Na figura 23 está representada uma metáfase em que foi aplicada a técnica de FISH com a sonda acima referida; observam-se dois sinais verdes relativos à região controlo para o cromossoma 5 (permite identificar o par de cromossomas), e apenas um sinal vermelho referente à região 5q31, no cromossoma 5 normal, verificando-se a perda / deleção dessa região no outro cromossoma 5.

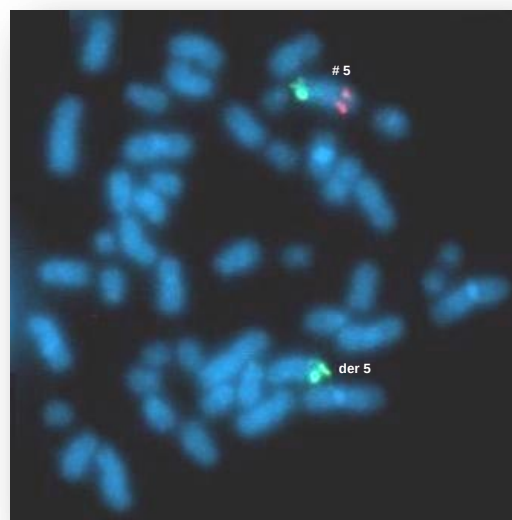


Figura 23 - FISH com a sonda para a região 5q31, observam-se dois sinais verdes, relativos à região controlo (5p) e apenas um sinal vermelho para a região 5q31, no # 5 normal.

No caso n.º 10 observou-se uma situação rara, além da deleção no 5q, apresentava também um cromossoma derivativo envolvendo os cromossomas 6 e 12. Este resulta de uma translocação desequilibrada entre o ramo longo do cromossoma 6 e o ramo curto do cromossoma 12, com perda de ambos os ramos curtos, pelo que o cariótipo apresentava 45 cromossomas (figura 24).

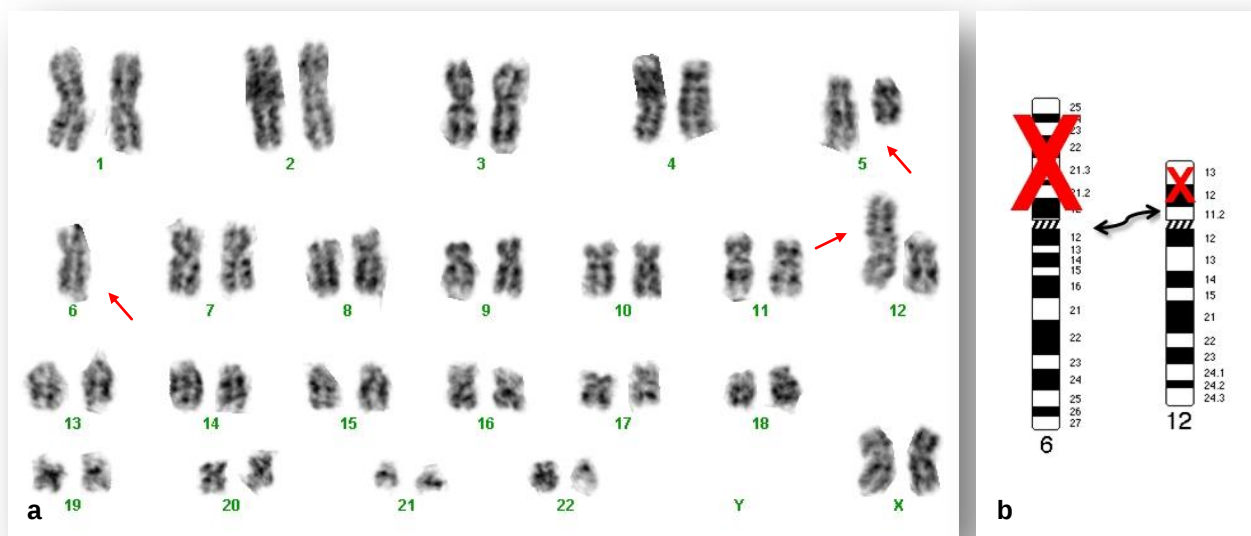


Figura 24 - a) Cariograma, em bandas GTL, com deleção no 5q e uma translocação desequilibrada entre os cromossomas 6 e 12 (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 6 e 12 assinalando os pontos de quebra e a perda dos ramos curtos.

Apesar da qualidade das metáfases ser diminuta, a citogenética convencional detectou um rearranjo entre os cromossomas 6 e 12, mas a perda total dos ramos curtos apenas foi aferida recorrendo à técnica de FISH com sondas WCP específicas para ambos os cromossomas (figura 25). Na figura 25a está representada uma metáfase com a sonda para o cromossoma 6 (a verde), em que se observa marcação em dois cromossomas, no 6 normal e no derivativo do 6, que não marca a região centromérica (assinalada com uma seta). Na metáfase da figura 25b, a sonda para o cromossoma 12 (verde) marca dois cromossomas, o 12 normal e o cromossoma derivativo, neste caso observa-se marcação na região centromérica, o que significa que o cromossoma derivativo tem centrómero de 12. As sondas WCP permitiram verificar / confirmar a perda dos ramos curtos dos cromossomas envolvidos na translocação, e a que cromossoma pertencia o centrómero.

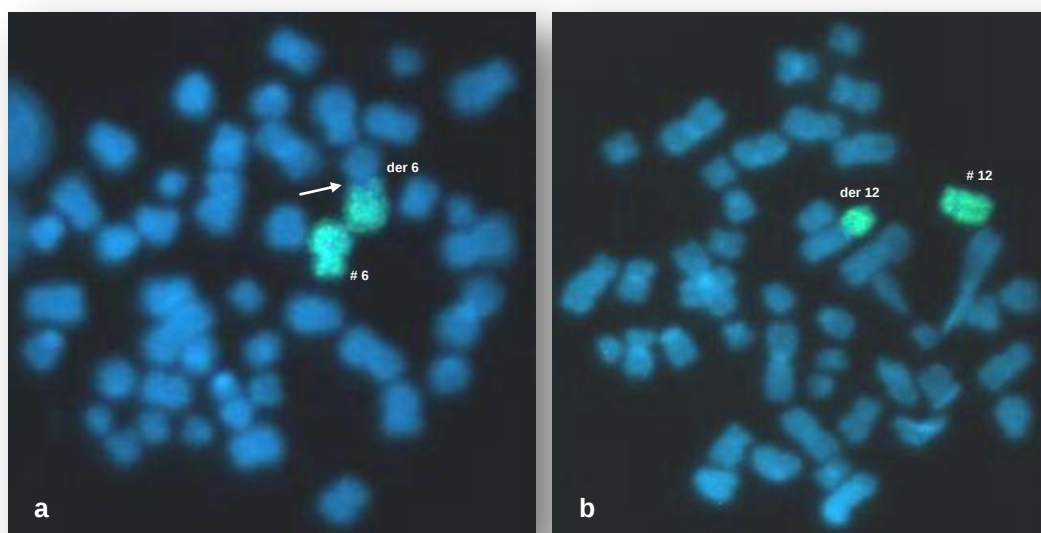


Figura 25 – FISH com sondas WCP para os: a) # 6 (verde), marca o # 6 normal e parte do derivativo; b) # 12 (verde), com marcação no #12 normal e no # derivativo.

Na pesquisa bibliográfica efectuada e consultando bases de dados específicas para técnicas direccionadas não foi encontrado nenhum caso com este rearranjo. A deleção do ramo curto do cromossoma 12 é uma anomalia comum nas neoplasias mielóides, e está normalmente associada a prognóstico desfavorável, contudo são descritos diferentes evoluções clínicas consoante a magnitude da deleção (Bacher *et al.*, 2005). No ramo curto do cromossoma 12 localizam-se genes com um papel importante na regulação da transcrição e na hematopoiese da medula óssea, como por exemplo o *ETV6* (Bilhou-Nabera, 1998).

Já as deleções no ramo curto do cromossoma 6 são raras nas doenças hematológicas. Existem apenas 41 casos descritos com rearranjos no 6p: cinco casos de deleção como única anomalia (dois mielóides e três linfóides) e nos restantes trinta e seis casos em combinação com outras alterações (Iqbal *et al.*, 2006). No ramo curto do cromossoma 6 localizam-se vários genes com importantes funções na regulação do ciclo celular (Pratibha *et al.*, 2007).

A citogenética foi determinante na avaliação clínica e no tratamento a realizar. Este caso apresentava uma deleção do 5q, que é considerada de bom prognóstico quando isolada, mas também se observou um rearranjo entre os cromossomas 6 e 12, com perda de ambos os ramos curtos, o que no cromossoma 12 está associado a um prognóstico desfavorável. Uma vez que a deleção do 5q é uma anomalia comum nos SMD, poder-se-á inferir que o rearranjo entre o 6 e o 12 é uma alteração secundária.

No caso n.º 5 observou-se uma situação muito complexa, com três clones, um normal e dois com alterações cromossômicas:

- a) 46, XX [4]
- b) 46, XX, del(7)(q32), del(12)(p11) [10]
- c) 46, XX, -4, der(11)dup(11?), del(7)(q32), del(12)(p11),+mar [7]

No clone b) e c) havia em comum uma delecção no ramo longo do cromossoma 7 e uma delecção do ramo curto do cromossoma 12, como se pode observar na figura 26.

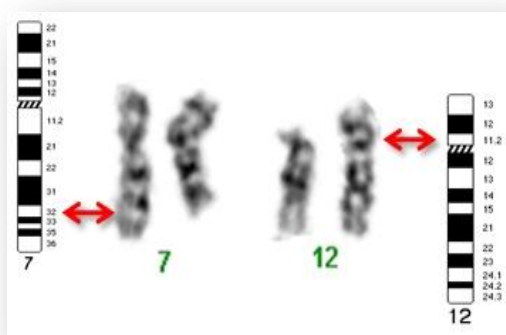


Figura 26 – Esquema com o par de # 7 e 12, em bandas GTL e respectivos idiogramas, com a região delectada assinalada.

A delecção do 7q está associada a um prognóstico desfavorável, muitas vezes envolvida em cariótipos complexos (Haase, 2008). A delecção do 12p, como referido anteriormente, é de prognóstico desfavorável (Bacher *et al.*, 2005).

O clone c) apresentava, igualmente, dois cromossomas de origem desconhecida, um de pequenas dimensões, denominado por “marker”, e um outro de tamanho grande que se assemelhava a um anel e parecia englobar o cromossoma 11 (assinalados na figura 27, com um círculo).



Figura 27 – Cariograma, em bandas GTL, representativa do clone c). A delecção do 7q e do 12p estão assinaladas com uma seta. Os # de origem desconhecida estão assinalados com um círculo.

Dadas as suspeitas acima mencionadas, realizou-se a técnica de FISH com a sonda WCP específica para o cromossoma 11; a sonda para o cromossoma 7 foi utilizada em simultâneo, para confirmar a delecção e, por conseguinte, excluir um possível envolvimento das bandas q32 a qter nesse cromossoma de grande dimensão.

Na figura 28 está representada uma metáfase na qual foram aplicadas as sondas WCP para o cromossoma 7 (a verde) e para o cromossoma 11 (a amarelo); observam-se dois cromossomas com marcação a verde, que correspondem ao cromossoma 7 normal e ao cromossoma 7 delectado, mais pequeno; e dois cromossomas com marcação a amarelo, o cromossoma 11 normal e o cromossoma de grande dimensão de origem desconhecida. Deste modo, confirmou-se a suspeita inicial (envolvimento do cromossoma 11), mas marca em toda a sua extensão de amarelo, o que significa que não existe mais nenhum cromossoma envolvido. Uma vez que este cromossoma é maior que um cromossoma 11 normal, pode-se concluir que existe uma duplicação, mas desconhecem-se quais os segmentos duplicados. Devido à escassez de amostra foi impossível a realização de técnicas adicionais que pudessem clarificar a(s) zona(s) duplicadas.

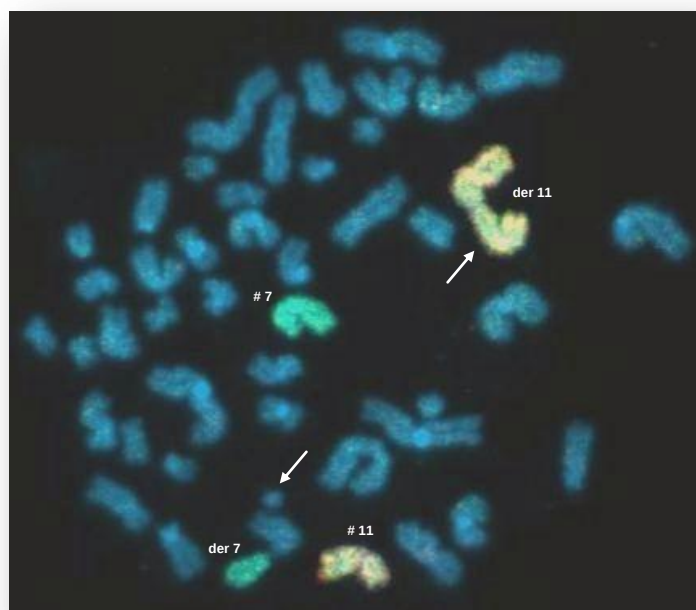


Figura 28 – Metáfase com sondas WCP para os # 7 (verde) e # 11 (amarelo). As setas assinalam os # de origem desconhecida. A técnica de FISH permitiu identificar o cromossoma de maior dimensão (a amarelo) como pertencente ao # 11.

A identificação da duplicação do cromossoma 11 foi importante como factor prognóstico. A trissomia 11 é uma aneuploidia característica dos SMD, com características clínicas únicas, e associada a uma forma agressiva da doença (Wang *et al.*, 2010). Embora se tratasse de um

cariótipo complexo, que por si só já é um factor de mau prognóstico, era constituído por três alterações cromossómicas que isoladamente estão associadas a desenvolvimentos desfavoráveis (Gmidène *et al.*, 2008; Haase, 2008; Swerdlow *et al.*, 2008).

Em suma, a incidência de anomalias cromossómicas foi de 70%, destas 85.7% eram desequilibradas, resultantes da perda de parte ou de todo o cromossoma. O que está de acordo com o descrito por Olney e Le Beau (2006), em que as anomalias cromossómicas são recorrentes, ao diagnóstico, podendo atingir os 40 a 70%, e são constituídas, na sua maioria, por deleções ou perda de um cromossoma.

Nos sete casos com anomalias cromossómicas foi detectada pelo menos uma alteração comum aos SMD, como por exemplo a trissomia 8, as deleções no ramo longo dos cromossomas 5, 7, 20 e a monossomia 7, que no seu conjunto representam cerca de 80% das anomalias cromossómicas nos SMD. A deleção do 5q foi a anomalia mais frequente, presente em 42.8% dos casos.

3.1.4. Leucemia mielóide aguda (LMA)

Como as situações agudas são direccionadas para centros de especialidades, é pouco frequente o estudo citogenético deste tipo de leucemia no LC-CHTMAD. Neste trabalho foram incluídos dois casos de LMA, um do sexo feminino e outro do sexo masculino, com idades entre os 66 e 76 anos.

As amostras estudadas foram sangue periférico e medula óssea, nas quais se realizaram as culturas directa e de ~24 horas, tendo-se obtido metáfases em todas elas. Para cada caso foram analisadas 20 metáfases. A técnica de FISH foi aplicada com sondas subteloméricas, para confirmar os rearranjos identificados pela citogenética convencional. Os resultados citogenéticos dos dois casos estudados estão representados na tabela 10.

Tabela 10 – Resultados da análise citogenética obtidos nos dois casos de LMA.

N.º caso	Idade	Tipo de amostra	N.º metáfases analisadas	Resultado citogenético
1	66	SP	20	46, XX, t(8;16)(p11.2;p13.3) [17] / 46, XX [3]
2	76	MO	20	45, X, t(8;19)(q24.1;q13.1) [20]

SP – sangue periférico; MO – medula óssea;

Ambos os casos apresentavam anomalias cromossómicas, uma translocação equilibrada.

No primeiro caso, em 85% das células analisadas observou-se uma translocação entre os ramos curtos dos cromossomas 8 e 16. No cromossoma 8, o ponto de quebra foi logo a seguir ao centrómero, na região p11.2, enquanto no cromossoma 16 envolvia a última banda, p13.3, como está representado na figura 29.

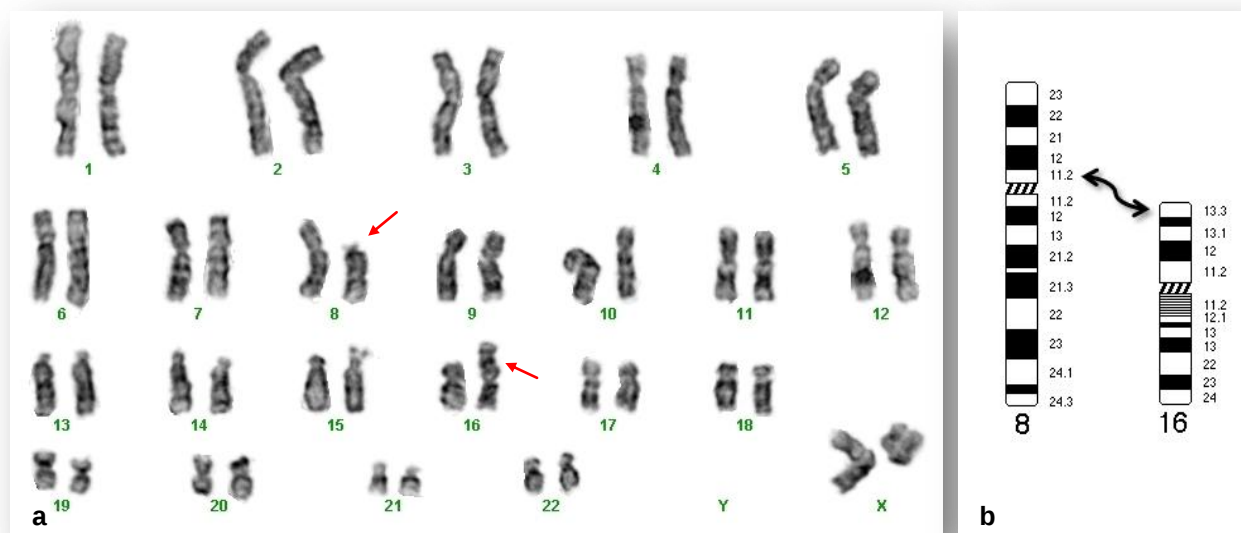


Figura 29 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(8;16) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 8 e 16 assinalando os pontos de quebra.

O resultado foi confirmado recorrendo a sondas subteloméricas para o cromossoma 8 (figura 30) e para o cromossoma 16 (figura 31).

A mistura da sonda subtelomérica para o cromossoma 8 inclui também a sonda subtelomérica para o ramo curto do cromossoma 17. As sondas marcam o 8p a verde; o 8q a vermelho; e o 17p a amarelo. Assim, na metáfase da figura 30 observam-se dois sinais verdes, um no cromossoma 8 normal e outro no ramo curto do derivativo do cromossoma 16; dois sinais vermelhos, no cromossoma 8 normal e no derivativo do 8; e dois sinais amarelos que marcam o ramo curto do cromossoma 17.

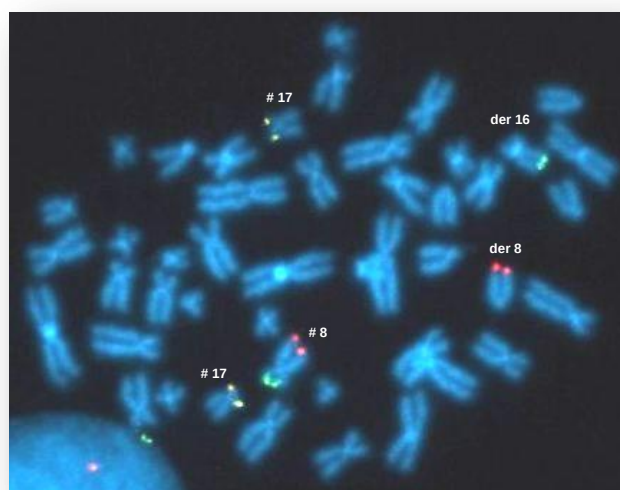


Figura 30 – Metáfase com sondas subteloméricas para o # 8p (verde), # 8q (vermelho) e # 17p (amarelo).

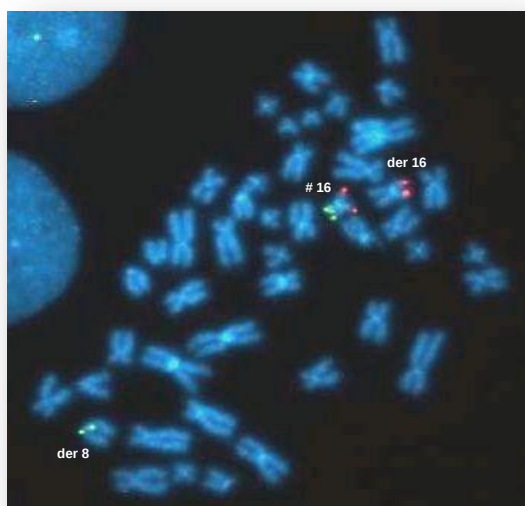


Figura 31 - FISH com sondas subteloméricas para o ramo curto (verde) e ramo longo (vermelho) do # 16.

A mistura da sonda subtelomérica para o cromossoma 16 marca o ramo curto a verde e o ramo longo a vermelho. Na metáfase da figura 31 observam-se dois sinais vermelhos no ramo longo do cromossoma 16 e no derivativo do 16; e dois sinais verdes, um no cromossoma 16 normal e outro no derivativo do cromossoma 8.

Esta translocação $t(8;16)(p11;p13)$ é pouco frequente nas leucemias agudas. Deste rearranjo resulta a fusão dos genes *MYST3* (16p13) e *CREBBP* (8p11), com um perfil de expressão particular (Camos *et al.*, 2004). Haferlach *et al.* (2009) estudaram 13 casos de LMA com a $t(8;16)$, num universo de 6124 casos, e consideraram que se tratava de um subgrupo específico de LMA; com características únicas em termos morfológicos, citogenéticos, moleculares e de prognóstico, tendo mesmo proposto a criação de um novo subgrupo nas LMA. Estas características permitiram, neste caso, um melhor acompanhamento clínico / terapêutico.

No segundo caso, todas as metáfases analisadas apresentavam uma monossomia do cromossoma X, com perda do cromossoma Y e uma translocação entre os ramos longos dos cromossomas 8 e 19, a envolver as bandas q24.1 e q13.1, respectivamente (figura 32).

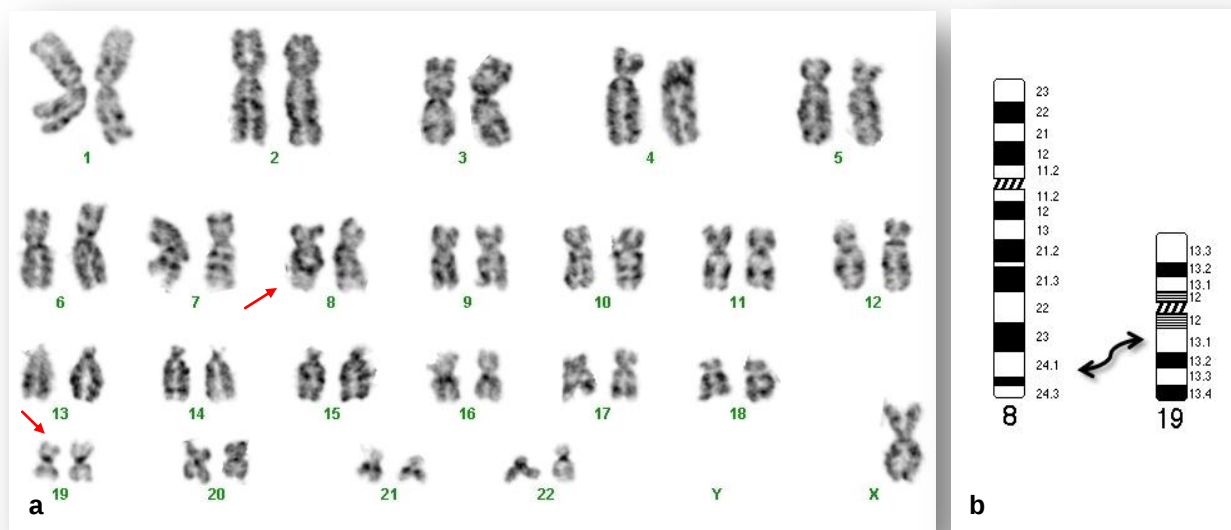


Figura 32 - a) Cariograma, em bandas GTL, com monossomia do cromossoma X e uma translocação t(8;19)(q24.1;q13.1) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 8 e 19 assinalando os pontos de quebra.

Neste caso, também, se aplicou a técnica de FISH com as sondas subteloméricas para os cromossomas 8 e 19, que confirmaram a translocação. Como referido anteriormente, a mistura da sonda subtelomérica para o cromossoma 8, inclui a sonda subtelomérica para o ramo curto do cromossoma 17. As sondas marcam o 8p a verde; o 8q a vermelho; e o 17p a amarelo. Nas metáfases analisadas observaram-se dois sinais verdes, no cromossoma 8 normal e no derivativo do 8 e dois sinais vermelhos, no cromossoma 8 normal e no derivativo do cromossoma 19, observaram-se também dois sinais amarelos correspondentes ao ramo curto do cromossoma 17.

A sonda subtelomérica para o cromossoma 19 está representada na metáfase da figura 33. O ramo curto marca a verde e o ramo longo a vermelho, na metáfase observam-se dois sinais verdes, no cromossoma 19 normal e no derivativo do 19 e dois sinais vermelhos no cromossoma 19 normal e no derivativo do 8.

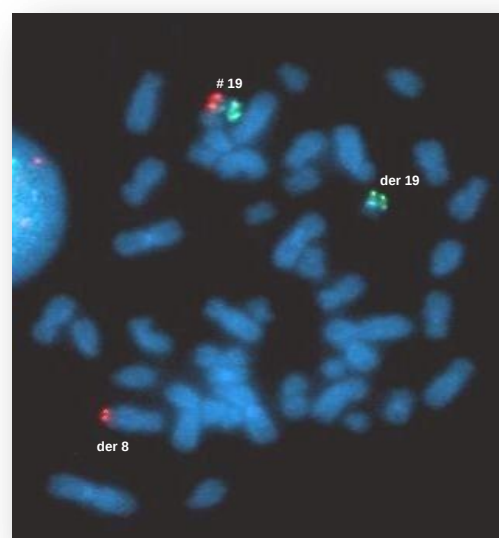


Figura 33 – FISH com sondas subteloméricas para o ramo curto (verde) e ramo longo (vermelho) do # 19.

Na literatura estão descritas duas translocações t(8;19) mas os pontos de quebra no cromossoma 8 são diferentes (8p11 e 8p13) do caso acima apresentado (8q24) (Boyer, 2003; Huret, 2008). Na região 8q24 localiza-se, entre outros genes, um importante oncogene (*MYC*), envolvido em vários tipos de tumores, nomeadamente, hemato-oncológicos, e cuja activação resulta de translocações ou duplicações cromossómicas (Atkin 2000; Fett-Conte *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). Na região 19q13 situa-se o gene *BCL3* com um importante papel no desenvolvimento das células B, e que está, normalmente, associado a translocações envolvendo o gene da imunoglobulina, em casos de LLC ou LNH (Martin-Subero *et al.*, 2006; Huret 2008).

A perda do cromossoma Y está associada à idade (van Dyke, 2001). Alguns autores referem que, no estudo citogenético de neoplasias, quando se observa um rearranjo e, simultaneamente, perda do cromossoma Y, este pode ser considerado de bom prognóstico, mas de um modo geral o seu significado no processo oncológico não é conhecido (Olney e Le Beau 2006; Deininger *et al.*, 2007; Gmidène *et al.*, 2008).

Dado o número de casos estudados de LMA (dois) não é possível inferir qualquer tipo de comparação. Ambos apresentavam translocações equilibradas, o primeiro é uma situação rara mas já descrita, no segundo caso é uma situação não descrita. A LMA caracteriza-se por anomalias cromossómicas recorrentes, nomeadamente, translocações recíprocas (Swerdlow *et al.*, 2008). Estes rearranjos estão associados à formação de genes de fusão, que codificam proteínas envolvidas na génese do processo tumoral (Fett-Conte *et al.*, 2007). Estudos recentes (Mardis *et al.*, 2009) continuam a considerar o cariótipo como o factor de prognóstico mais importante nos pacientes com LMA.

3.2. Neoplasias linfóides

3.2.1. Neoplasias das células B (NCB)

Dos vários grupos que constituem as neoplasias mielóides e linfóides, este foi o grupo com o maior número de casos estudados (20 no total). Foi o único grupo em que se estudaram dois tipos de doenças, as leucemias linfáticas crónicas (LLC) e os mielomas múltiplos (MM).

3.2.1.1. Leucemia linfática crônica (LLC)

Foram estudados dez casos de LLC sem qualquer tratamento. Dos quais seis eram do sexo masculino e quatro do feminino, sendo a idade média dos pacientes de 74.3 anos (entre 69 e 84 anos).

Em todos os casos, a amostra estudada foi sangue periférico. As células neoplásicas são os linfócitos B, pelo que nas culturas se utilizaram estimuladores apropriados para este tipo de células, como o 1,2-O-tetradecanoilforbol-1,3-acetato (TPA) e o Pokeweed. Uma vez que se tratavam de culturas estimuladas, o número de metáfases e a resolução dos cromossomas foi, de um modo geral, superior ao obtido nas culturas directas e de ~24 horas. Para a análise citogenética analisaram-se metáfases das duas culturas, tendo-se analisado em média 20.4 metáfases por caso.

Neste tipo de leucemia é, normalmente, aplicado um painel de sondas relativo às anomalias mais comuns. O painel utilizado incluiu as sondas de sequência de cópia única para as regiões 6q23 (*MYB*), 11q23 (*ATM*), 13q14 (*RB*) e 17p13 (*TP53*), bem como a sonda α -satélite para o cromossoma 12. Para cada sonda foram analisados em média, respectivamente, 189.3, 193.5, 202.4, 200.6 e 197.4 células e sempre que possível foram analisadas metáfases.

Os resultados citogenéticos e por FISH, para cada um dos dez casos, estão representados na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de LLC.

N.º caso	Id	Tipo amt	N.º met. anal	Resultado citogenético	FISH				
					del(6q)	del(11q)	+12	del(13q)	del(17p)
1	70	SP	21	46, XY [21]	neg	neg	neg	10,6%	neg
2	82	SP	20	47, XX, t(7;14)(q22;q22),t(13;17)(p10;q10),+12[2] / 46, XX, t(7;14)(q22;q22), del(17)(p13.1)[6] / 46,XX, t(7;14)(q22;q22) [12]	neg	neg	51,6%	neg	81%
3	75	SP	20	46, XY, del(17)(p13) [4] / 46, XY [16]	neg	neg	neg	neg	43,4%
4	84	SP	20	48, XX, +12,+18 [12] / 46, XX [8]	neg	neg	72,1%	neg	neg
5	69	SP	21	46, XY, del(17)(p13) [1] / 46, XY [20]	neg	neg	neg	neg	8,9%
6	76	SP	20	46, XY, del(13)(q14) [4] / 46, XY [16]	neg	neg	neg	78,2%	neg
7	74	SP	20	47, XY, +12 [8] / 46, XY [12]	neg	neg	77%	neg	neg
8	73	SP	20	46, XX, del(11)(q22q23) [7] / 46, XX [13]	neg	60,2%	neg	neg	neg
9	69	SP	22	46, XX [22]	neg	neg	neg	neg	neg
10	71	SP	20	46, XY [20]	neg	neg	neg	neg	neg

Id. – idade; Tipo amt. – tipo de amostra; N.º met. analis. – número de metáfases analisadas; SP – sangue periférico;

Nos dez casos estudados, três casos apresentavam um cariótipo normal (caso n.º 1, 9 e 10). De notar que no caso n.º 1, embora o cariótipo fosse normal, detectou-se pela técnica de FISH uma deleção da região 13q14, próxima do “cutoff” ($\geq 10\%$).

Um clone normal foi, também, observado em seis casos com alterações cromossômicas, caso n.º 3 a 8, cujas incidências foram, respectivamente, 60%, 40%, 95.2%, 80%, 60% e 65%.

Dos casos estudados, 80% apresentavam alterações cromossômicas, sendo as mais recorrentes a trissomia 12 e a deleção do 17p13, com 37.5% cada, seguido da deleção do 13q14 com 25%.

Neste estudo, a percentagem de casos com alterações cromossômicas (80%) coincide com a literatura mais recente (Quitero-Rivera *et al.*, 2009; Moreno e Montserrat, 2010). Mas a incidência da trissomia 12 e da deleção do 17p é superior ao descrito no artigo de Moreno e Montserrat (2010), em que a frequência da trissomia 12 varia entre os 11 e 18% e a da deleção do 17p situa-se entre os 3 e 27%; o que pode ser explicado pelo número reduzido de casos estudados.

A trissomia 12 foi observada em três casos, n.º 2, 4 e 7, com uma incidência de 10%, 60% e 40%, respectivamente. Na figura 34a está representada uma metáfase com três cópias do cromossoma 12. Este resultado foi confirmado pela técnica de FISH com a sonda α -satélite para o cromossoma 12, que marca os centrómeros a vermelho. Na figura 34b pode-se observar uma metáfase parcial com os centrómeros dos três cromossomas 12 marcados a vermelho.

Nos três casos com trissomia 12 (n.º 2, 4 e 7), a taxa de detecção pela técnica de FISH foi superior à obtida na citogenética convencional com, respectivamente, 51.6%, 72% e 77%. A técnica de FISH permite analisar um maior número de células, neste caso foram analisadas em média 197.4 células por caso, o que contrasta com as cerca de 20 metáfases analisadas por caso.



Figura 34 – a) Cariograma, em bandas GTL, com uma trissomia 12 (assinalada com uma seta); b) Metáfase parcial, com a sonda α -satélite para o cromossoma 12, com marcação a vermelho em três cromossomas.

No caso n.º 7, a trissomia 12 era a única anomalia cromossômica. Nos restantes casos, a trissomia estava associada a outras alterações. A trissomia 12 isolada está, normalmente, associada a um prognóstico intermédio mas é também frequente a combinação com outras anomalias (Méhes, 2005; Moreno e Montserrat, 2010).

No caso n.º 4, em doze das vinte metáfases analisadas, observou-se simultaneamente uma trissomia 12 e uma trissomia 18 (figura 35).

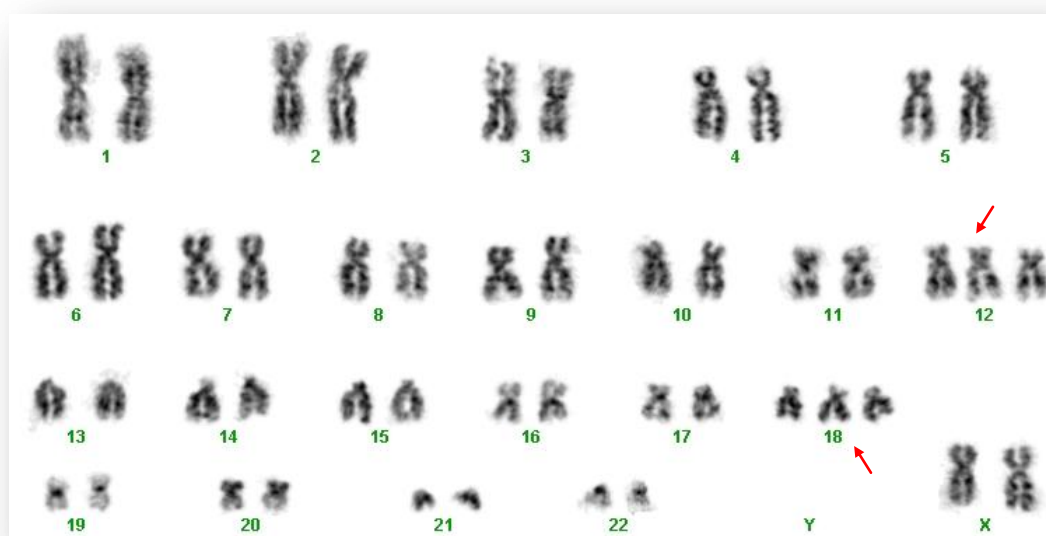


Figura 35 – Cariograma, em bandas GTL, com uma trissomia 12 e 18 (assinalado com setas).

A trissomia 18 quando associada a outras anomalias não é específica de uma patologia, embora seja mais descrita em doenças linfoproliferativas. Esta aneuploidia não é muito comum em casos de LLC, mas quando detectada está normalmente associada à trissomia 12 (Dicker *et al.*, 2006). O que está de acordo com o caso descrito.

O terceiro caso com trissomia 12 (n.º 2) apresentava-se em associação com duas translocações: uma entre os cromossomas 7 e 14 e a outra translocação entre os cromossomas 13 e 17. A metáfase da figura 36 representa o cariótipo observado, com setas a assinalar os rearranjos.

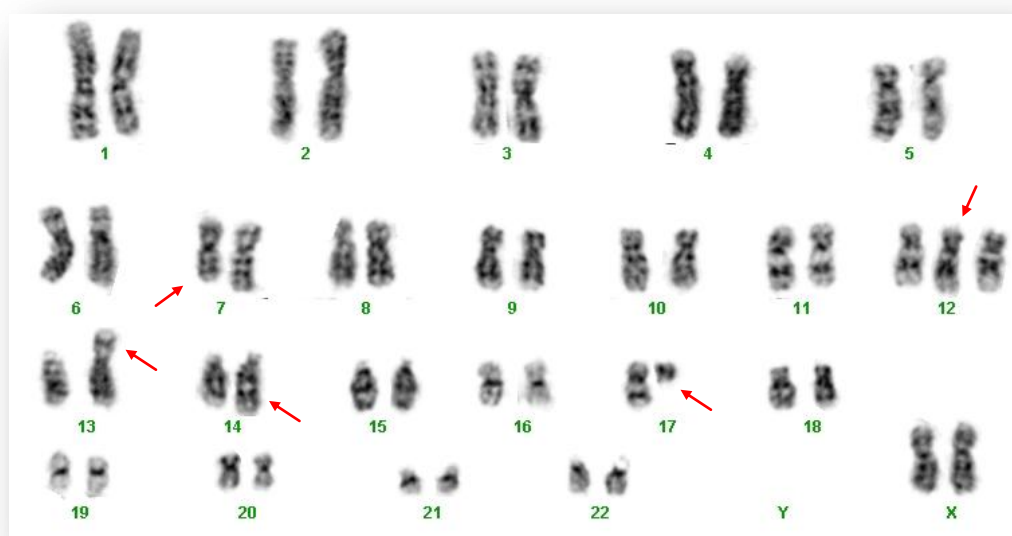


Figura 36 – Cariograma, em bandas GTL, com trissomia 12 e duas translocações: t(7;14) e t(13;17) (assinalado com setas).

A translocação t(7;14) envolvia os ramos longos de ambos os cromossomas, nas bandas 7q22 e 14q32, como está representado na figura 37.

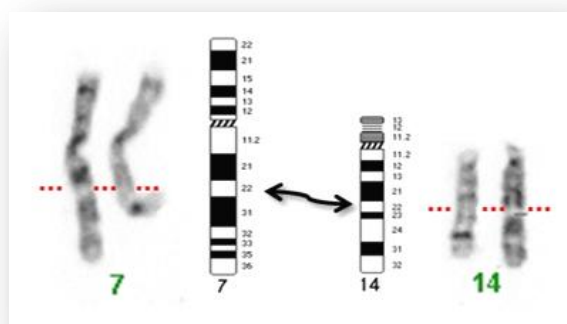


Figura 37 - Esquema com o par de cromossomas 7 e 14, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados.

Os rearranjos no ramo longo do cromossoma 7 são raros nas doenças linfoproliferativas, sendo mais comuns nas doenças mielóides. Num estudo realizado por Hayette *et al.* (2003), os rearranjos no 7q constituem 1.5% dos casos de doenças linfoproliferativas das células B. As translocações envolvendo a região 7q21 a 7q22 podem levar a uma

super-expressão do gene *CDK6*, e pensa-se que este gene contribui para o processo de transformação maligna, através da proliferação celular (Oscier *et al.*, 1996). Há na literatura uma referência à t(7;14) mas envolve o gene da imunoglobulina, na região 14q32 (Huret, 2009).

A segunda translocação observada, também ela equilibrada, envolvia os cromossomas 13 e 17, ao nível das regiões centroméricas, como está representado na figura 38.

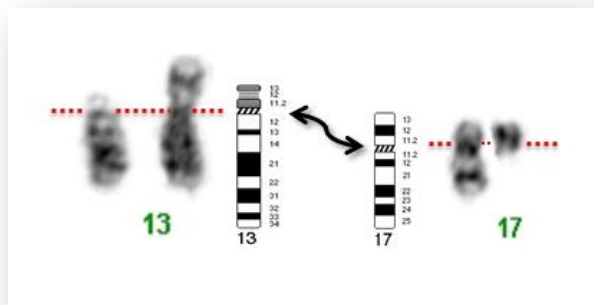


Figura 38 - Esquema com o par de cromossomas 13 e 17, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados.

Na literatura não se encontrou nenhum registo de uma translocação com os pontos de quebra acima descritos.

O cariótipo representado na figura 36, com um cromossoma 12 extra e duas translocações, foi observado em duas das vinte metáfases analisadas, e constitui um rearranjo complexo. Os cariótipos complexos estão associados a prognóstico desfavorável e representam 10 a 15% dos casos de LLC (Nascimento *et al.*, 2006).

Este caso apresentava mais dois clones: **a)** um com a translocação t(7;14) acima referida e uma deleção do ramo curto do cromossoma 17, estes rearranjos foram observados em seis metáfases; e **b)** outro apenas com a translocação t(7;14), em doze metáfases.

Podemos inferir que existe uma evolução clonal, em que a primeira alteração terá sido a t(7;14), e depois uma evolução provavelmente em simultâneo, com o aparecimento da deleção do 17p, e a trissomia 12 com a translocação t(13;17).

A trissomia 12 e a deleção do cromossoma 17 foram confirmadas pela técnica de FISH, com uma incidência, respectivamente, de 51.6% e 81% (figura 39), muito superior ao detectado pela citogenética convencional. O grande número de células analisadas no FISH poderá explicar esta discrepância dos resultados. A sonda para o cromossoma 12, como referido anteriormente, marca a região centromérica a vermelho. Na figura 39a estão representados três núcleos cada um com três sinais, o que significa que cada um tem três cópias do cromossoma 12. A sonda para a região 17p13 (*TP53*) é uma sonda de sequência de cópia única, com marcação a vermelho e que não

tem associada nenhuma região controlo (para identificar o cromossoma), como acontece com a sonda para detectar a deleção do 5q, referida anteriormente, na secção 3.1.3. Na figura 39b estão representados núcleos com apenas um sinal vermelho, sinónimo de deleção de uma das duas cópias da região 17p13.

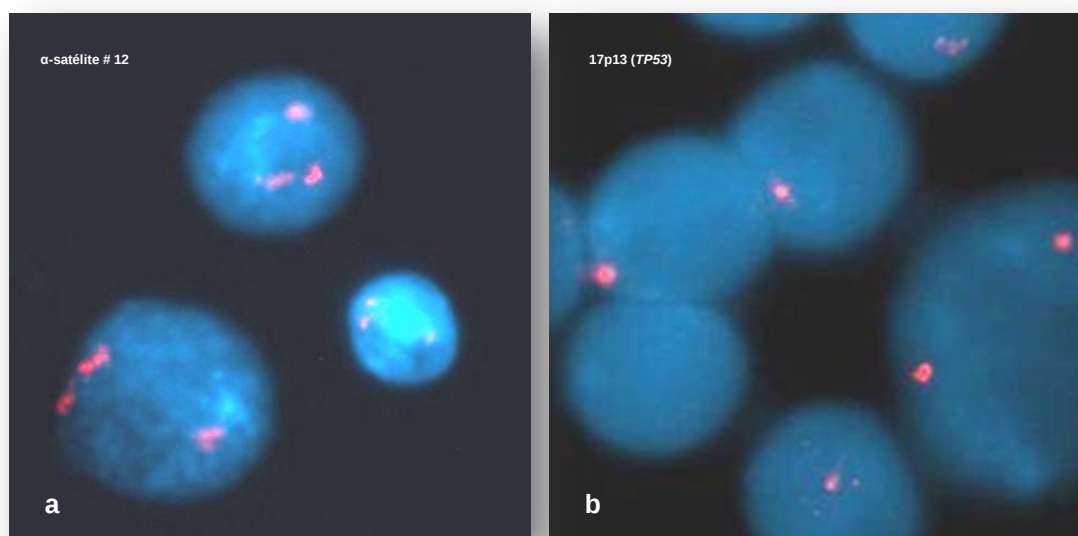


Figura 39 – FISH, em núcleos, com a sonda: a) α -satélite para o # 12 (vermelho), em que se observam três sinais; b) sequência única para a região 17p13 (vermelho), observando-se apenas um sinal.

Mais uma vez, a citogenética convencional foi importante na detecção de outras anomalias, que não as recorrentes, como a trissomia 12 e a deleção do 17p, e que permitiram verificar uma evolução clonal, com grande instabilidade genética, importante para a abordagem terapêutica.

A deleção da região 17p13 é uma situação interessante neste estudo. Foram detectados três casos com esta anomalia (caso n.º 2, 3 e 5). O caso n.º 2 já foi referido anteriormente. No caso n.º 3, observou-se a deleção do cromossoma 17 isolada, com uma frequência de 20%, resultado que foi confirmado pela técnica de FISH, com uma incidência de 43.4%. Destaca-se o caso n.º 5, em que pela técnica de FISH foram detectadas 8.9% de células com a deleção, muito próximo do “cutoff”, e que segundo as normas, o resultado do FISH só deve ser considerado quando igual ou superior a 10%. Na análise citogenética detectou-se apenas uma metáfase com a deleção do 17p, o resultado do cariótipo permitiu validar o resultado obtido no FISH. Esta alteração estrutural, del(17p), é considerada de prognóstico desfavorável, com progressão da doença e resistência à terapêutica (Nascimento *et al.*, 2006; Moreno e Montserrat, 2010). Em termos clínicos, o resultado estava de acordo com o estado evolutivo da doença. Neste caso, a citogenética foi determinante na avaliação do paciente. Se só se realizasse a técnica de FISH,

este resultado teria sido normal. A detecção de uma metáfase com a delecção permitiu dar relevância ao resultado obtido pela técnica de FISH.

A delecção da região q14 no cromossoma 13 foi detectada em dois casos, n.º 1 e 6. No caso n.º 1, apenas foi detectada por FISH, com uma incidência de 10.6%. O facto de a percentagem de células detectadas ter sido no limiar do “cutoff” e de neste caso, a qualidade das metáfases ter sido baixa pode explicar a não detecção da delecção pela citogenética convencional.

O caso n.º 6 apresentava a delecção em 20% das metáfases analisadas (figura 40). A delecção do 13q14 é a anomalia cromossómica mais frequente nas LLC (Swerdlow *et al.*, 2008) e está associada a um bom prognóstico (Nascimento *et al.*, 2006). Quando a delecção do 13q é a única anomalia, os pacientes ou não necessitam de tratamento ou respondem bem à terapia (Moreno e Montserrat, 2010).



Figura 40 – Cariograma, em bandas GTL, com delecção da banda q14 no cromossoma 13.

A técnica de FISH confirmou o resultado obtido pela citogenética e a incidência foi superior, na ordem dos 78%. A sonda para a região 13q14 (vermelho), tal como acontece na sonda do 17p13, não tem controlo, pelo que numa célula com delecção apenas se observa um sinal vermelho. Na figura 41 está representada uma metáfase e alguns núcleos onde se observa apenas um sinal vermelho, indicativo da delecção de uma das regiões 13q14.

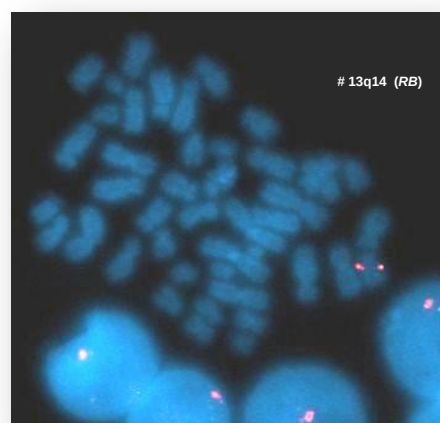


Figura 41 – FISH com a sonda para o # 13q14 (vermelho), na metáfase e nos núcleos observa-se apenas um sinal.

O último caso com anomalias (n.º 8) apresentava uma deleção do ramo longo do cromossoma 11, na banda q22 a q23 (figura 43). Esta anomalia estrutural foi observada em sete das vinte metáfases analisadas.



Figura 42 - Cariograma, em bandas GTL, com deleção das bandas q22 a q23 no cromossoma 11.

A deleção do cromossoma 11 é, também ela, uma das anomalias cromossómicas mais comuns nas LLC, com uma incidência de 10 a 32% (Moreno e Montserrat, 2010). As deleções na região 11q22 a 11q23 estão associadas a uma rápida progressão da doença, e por conseguinte, têm um prognóstico desfavorável (Méhes, 2005; Nascimento *et al.*, 2006).

Esta deleção foi confirmada pela técnica de FISH com a sonda de sequência de cópia única para a região 11q23, cuja incidência foi de 60.2%. A região 11q23 marca a vermelho, e tal como, nas

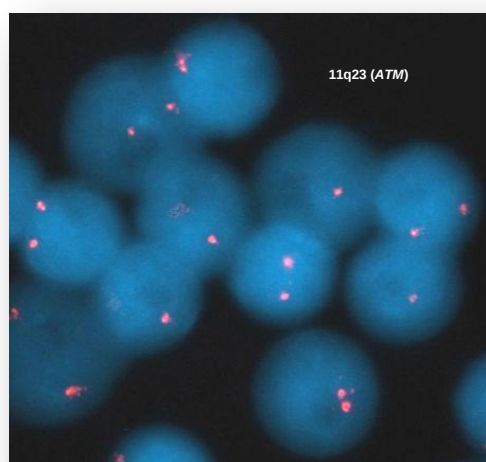


Figura 43 – FISH com a sonda para a região 11q23 (vermelho), observam-se núcleos com um e dois sinais.

para o 13q14 e 17p13 não tem uma região controlo, assim num núcleo ou metáfase com deleção desta região apenas se observa um sinal. Na figura 43 estão representados vários núcleos, alguns com dois sinais vermelhos, e outros com apenas um sinal, indicativo de deleção da região 11q23.

Em suma, 80% dos casos estudados apresentavam alterações cromossómicas, o que está de acordo com o descrito (Moreno e Montserrat, 2010). Estes casos apresentavam pelo menos uma das anomalias mais comuns deste tipo de leucemia, como por exemplo a trissomia 12 ou a deleção do 13q, 17p e 11q. No presente estudo, a trissomia 12 e a deleção do 17p foram as anomalias mais frequentes, com uma incidência de 37.5% cada.

Segundo alguns autores (Nascimento *et al.*, 2006; Swerdlow *et al.*, 2008; Moreno e Montserrat, 2010), ao diagnóstico, é muito difícil distinguir os pacientes que vão permanecer estáveis daqueles cuja doença vai progredir e necessitar de tratamento. Novos factores de prognóstico, como as alterações citogenéticas e moleculares, têm sido extremamente úteis, uma vez que têm permitido identificar com maior clareza os pacientes com maior risco. A deleção do 13q e o cariótipo normal são de bom prognóstico, já a deleção do 11q e 17p estão associadas a um prognóstico desfavorável, rápida progressão e um tempo de vida mais curto (Swerdlow *et al.*, 2008).

Dos oito casos com alterações cromossómicas, sete foram detectados pela citogenética convencional, o que significa que a taxa de detecção foi de 70%. Uma taxa em muito semelhante à obtida pela técnica de FISH (80%). Vários artigos referem que a citogenética convencional apenas permite detectar 40 a 50% das alterações, e que este valor aumenta para os 80% quando se aplica a técnica de FISH, com sondas para as anomalias mais frequentes (Nascimento *et al.*, 2006; Swerdlow *et al.*, 2008; Quitero-Rivera *et al.*, 2009). O facto de neste estudo a taxa de detecção pela citogenética convencional ser tão elevada deve-se a um trabalho prévio, no LC-CHTMAD, de optimização dos protocolos para as LLC, com estimuladores específicos para as células B, permitindo a obtenção de um grande número de metáfases e cromossomas de boa resolução.

A citogenética convencional foi importante na detecção de outras alterações, como por exemplo no caso n.º 2 e 4, bem como na validação do resultado obtido por FISH (no caso n.º 5).

Muitos laboratórios, dado o baixo índice mitótico deste tipo de leucemias e a baixa resolução dos cromossomas obtidos, optam por uma análise só por FISH com um painel de sondas para as anomalias mais comuns. A detecção de deleções por citogenética convencional é muito difícil, requer experiência na análise cromossómica e cromossomas com boa resolução, e a técnica de FISH é sem dúvida um grande complemento, mas não pode ser utilizada como a única ferramenta de análise, caso contrário vários casos com outras alterações ficam por elucidar como foi demonstrado neste estudo.

3.2.1.2. Mieloma múltiplo (MM)

Neste trabalho foram estudados dez casos com a indicação de mieloma múltiplo (MM), sendo três do sexo feminino e os restantes sete do sexo masculino. A idade média dos pacientes foi de 76.8 anos (entre os 72 e 87).

Nos MM, as células que se pretendem estudar são os plasmócitos, que se encontram na medula óssea. Assim, nos dez casos a amostra foi medula, e para cada um realizaram-se dois tipos de cultura, directa e de ~24 horas. Em todas elas obtiveram-se metáfases, mas a sua qualidade foi baixa. O número médio de metáfases analisadas foi de 21.3 (entre 20 e 23).

Tal como nas LLC, também nos MM existem painéis de sondas para as anomalias mais frequentes. O painel utilizado incluiu as sondas de sequência de cópia única para as regiões 13q14 (*RB*) e 17p13 (*TP53*), e para as translocações envolvendo o gene da imunoglobulina – t(4;14) e t(11;14). O número médio de células analisadas para cada uma das sondas foi, respectivamente, 176.3, 181.4, 180.5 e 186.7, e sempre que possível foram analisadas metáfases.

Os resultados citogenéticos e por FISH estão descritos na tabela 12.

Tabela 12 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos dez casos de MM.

N.º caso	Id.	Tipo amt.	N.º met. anal.	Resultado citogenético	FISH			
					del(13q)	del(17p)	t(4;14)	t(11;14)
1	72	MO	20	46, XY [20]	neg	neg	neg	neg
2	87	MO	22	46, XY, t(11;14)(q13;q32) [6] / 46, XY [16]	neg	neg	neg	60%
3	74	MO	23	46, XX [23]	neg	neg	48%	neg
4	81	MO	20	46, XX, del(13)(q14) [7] / 46, XX [13]	87,4%	neg	neg	neg
5	80	MO	23	46, XY [23]	neg	neg	neg	neg
6	73	MO	20	46, XY [20]	neg	neg	neg	neg
7	77	MO	21	46, XX [21]	11,7%	neg	neg	neg
8	72	MO	22	46, XY [22]	neg	neg	66,3%	neg
9	79	MO	20	46, XY [20]	neg	10,9%	neg	neg
10	73	MO	22	47, XY, +8, t(6;19)(p21.3;p13.3), t(11;14)(q13;q32) [16] / 46, XY [6]	neg	neg	neg	87,8%

Id. – idade; Tipo amt. – tipo de amostra; N.º met. analis. – número de metáfases analisadas; MO – medula óssea;

Dos dez casos analisados: **a)** em três (n.º 1, 5 e 6), a análise citogenética e por FISH foi normal;
b) em quatro casos (n.º 3, 7, 8 e 9), o cariótipo foi normal mas foram detectadas alterações pela técnica de FISH;

c) nos restantes casos, o cariótipo apresentava alterações cromossómicas.

A incidência das anomalias detectada pela citogenética convencional foi de 30%, este valor aumentou para os 70% quando se aplicou a técnica de FISH. Estes valores estão de acordo com o descrito (Martinez, 2007; Kyle e Rajkumar, 2009), a taxa de detecção de anomalias, pela citogenética convencional ronda os 30 a 40%, e aumenta para os 80 a 90% quando se aplica a técnica de FISH.

Nos MM, a taxa de cariótipos normais é elevada, o que está relacionado com um baixo índice mitótico das células neoplásicas, e uma vez que estas células se encontram na medula óssea, o mais provável é estar-se a analisar células dos vários elementos mielóides que estão em divisão espontânea na medula óssea (Chauffaille *et al.*, 2007; Trakhtenbrot *et al.*, 2010).

Nos casos cujas alterações foram apenas detectadas por FISH (caso n.º 3, 7, 8 e 9), existem outros factores que podem ter interferido com a sua detecção pela citogenética convencional. Nos quatro casos acima mencionados, as anomalias eram, respectivamente, a translocação t(4;14), a deleção do 13q, novamente a t(4;14) e a deleção do 17p. No que diz respeito às duas deleções, a baixa resolução dos cromossomas e a percentagem de células detectada por FISH próxima dos 10% (“cutoff”), pode explicar a não detecção destas anomalias. Quanto à translocação t(4;14), a sua detecção só é possível recorrendo à técnica de FISH, como se ilustra na figura 44 através dos idiogramas para o cromossoma 4 e 14. A translocação envolve a troca recíproca dos segmentos terminais do ramo curto do cromossoma 4 (p16) e do ramo longo do cromossoma 14 (q32), em ambos os casos as bandas são claras, não sendo possível distingui-las na citogenética convencional, e por conseguinte identificar a translocação.

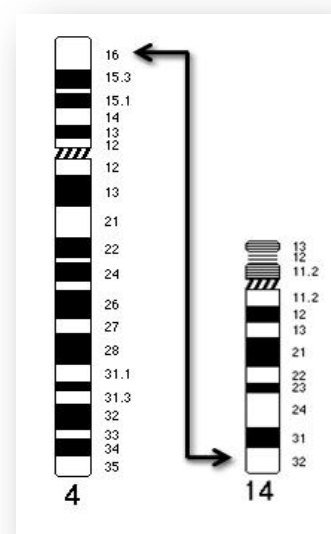


Figura 44 - Idiograma dos # 4 e 14 assinalando os pontos de quebra envolvidos na translocação.

Das anomalias cromossómicas identificadas, as mais frequentes foram as translocações t(4;14) e t(11;14), e a deleção do 13q, com uma frequência de 25% cada. Estes valores são ligeiramente superiores ao descritos na literatura, segundo Swerdlow *et al.* (2008), as anomalias mais comuns são as translocações envolvendo o gene da imunoglobulina, presentes em cerca de 40% dos

casos de MM, sendo as mais frequentes a t(11;14) e a t(4;14), com respectivamente, 18% e 15%. A deleção do cromossoma 13q é detectada em 10 a 20% dos casos (Fonseca *et al.*, 2004).

A translocação t(4;14) só é detectada pela técnica de FISH, como referido anteriormente. A figura 45 ilustra o cromossoma 4 e 14, do caso n.º 8, cujo FISH detectou 66.8% de células com a translocação, e não se verifica nenhuma diferença entre as bandas terminais dos ramos curtos dos cromossomas 4 e dos ramos longos dos cromossomas 14.

A sonda para detectar a fusão dos genes *IGH/FGFR3*, resultante da translocação t(4;14), marca a região do gene *FGFR3* a vermelho e a região do gene *IGH* a verde, como está representado na figura 46a. Quando se formam os genes de fusão há a justaposição do sinal verde com o sinal vermelho, do qual resultam dois sinais amarelos, nos cromossomas 4 e 14 envolvidos na translocação.



Figura 45 – Par de # 4 e 14, em bandas GTL, de um caso com a translocação t(4;14)(p16;q32), em que não se observa nenhuma diferença entre os cromossomas.

Na figura 46b está representado um núcleo positivo para a translocação, assinalado com uma seta, em que se observa um sinal verde relativo ao gene *FGFR3*, no cromossoma 4 normal, um sinal vermelho para o gene *IGH*, no cromossoma 14 normal e dois sinais amarelos, resultantes da justaposição das sondas para o gene *IGH* e *FGFR3*, nos cromossomas envolvidos na translocação. Esta translocação está associada a um prognóstico desfavorável, com características mais agressivas (Viguié, 2005; Martinez, 2007).

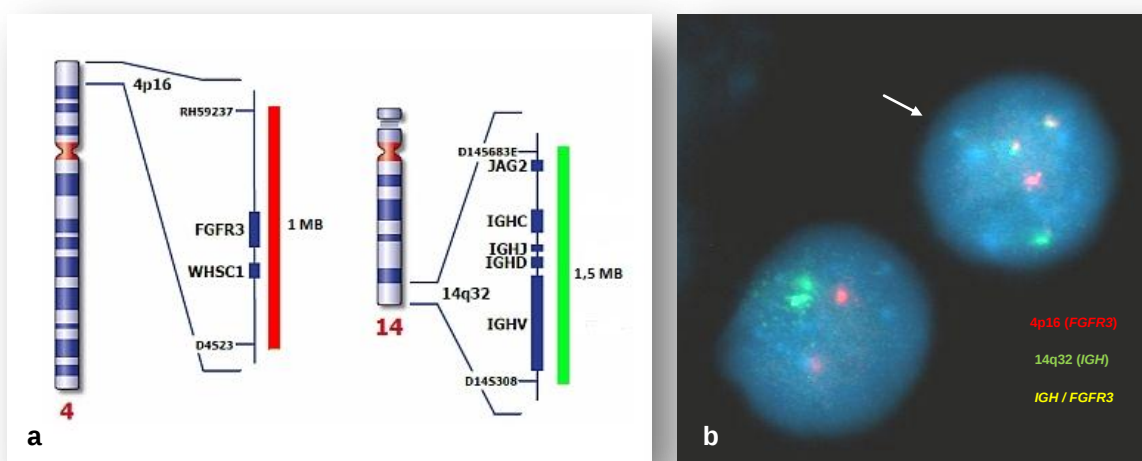


Figura 46 - a) Esquema da sonda para os genes *IGH - FGFR3* (adaptado Heidelberg); b) a sonda aplicada em núcleos, um núcleo é positivo para a translocação t(4;14) (assinalado com uma seta).

A translocação t(11;14) foi observada nos casos, n.º 2 e 10. Este rearranjo envolve a região 11q13 e a região 14q32, resultando num gene de fusão *IGH/CCND1*. No primeiro caso, a translocação era uma anomalia isolada (figura 47) e foi detectada em 27% das metáfases analisadas. Esta translocação quando isolada está associada a um prognóstico favorável (Swerdlow *et al.*, 2008).



Figura 47 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(11;14) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 11 e 14 assinalando os pontos de quebra.

Aplicou-se a técnica de FISH com as sondas de sequência de cópia única para os genes *IGH* (14q32) e *CCND1* (11q13), confirmando-se o resultado. Também neste caso a incidência (60%) foi superior ao obtido na citogenética convencional. Cada uma das sondas é constituída por um conjunto de sondas que marcam a região do gene e regiões adjacentes, como se pode observar no esquema da figura 48a. A região 14q32 marca a verde enquanto a região 11q13 é identificada a vermelho. Tal como acontece com as outras sondas, quando se formam os genes de fusão verifica-se a justaposição das sondas (verde e vermelho), adquirindo a cor amarela. Assim, numa célula com a translocação observa-se um sinal verde, que corresponde ao cromossoma 14 normal, um sinal vermelho relativo ao cromossoma 11 normal e dois sinais amarelos, um em cada cromossoma translocado, como se pode observar na figura 48b.

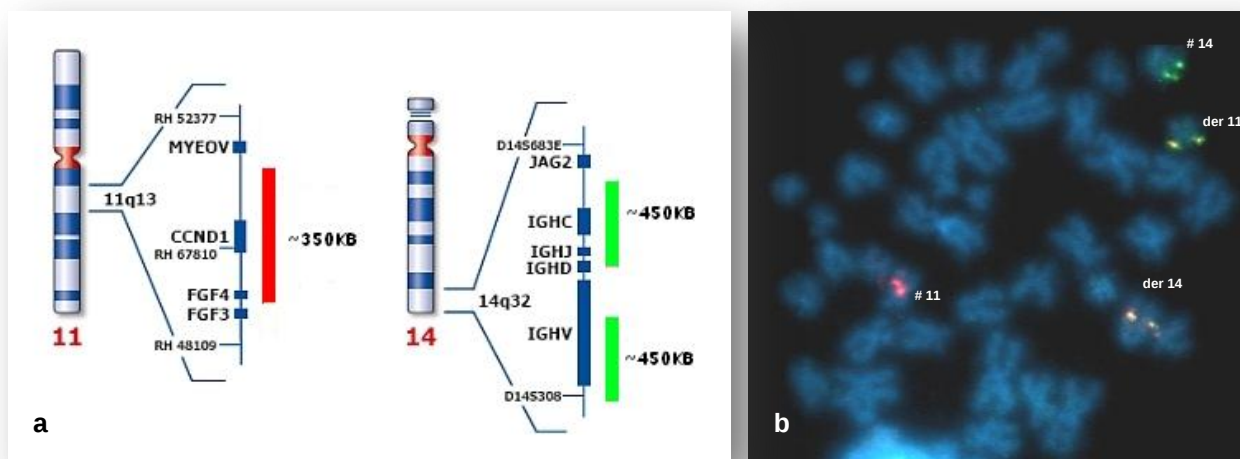


Figura 48 - a) Esquema da sonda para os genes *IGH - CCND1* (adaptado Heidelberg); b) a sonda aplicada numa metáfase com a t(11;14), observa-se um sinal vermelho no # 11 normal, um sinal verde no # 14 normal e dois sinais amarelos nos # 11 e 14 envolvidos na translocação.

No caso n.º 10, além da translocação observou-se também uma trissomia 8 e uma translocação entre os cromossomas 6 e 19 (figura 49). Este rearranjo complexo foi observado em 80% das metáfases analisadas.



Figura 49 - Cariograma, em bandas GTL, com uma trissomia 8 e duas translocações: t(6;19) e t(11;14) (assinalado com setas).

A trissomia 8 é uma anomalia muito rara nas doenças linfóides, ocorrendo em cerca de 90% das doenças mielóides e 5% das LLA. Na sua maioria está associado a cariótipos complexos com anomalias estruturais (Huret, 2007). No caso apresentado, a trissomia 8 foi observada num cariótipo complexo, com dois rearranjos estruturais, o que está de acordo com o descrito.

A translocação t(6;19) envolvia os ramos curtos de ambos os cromossomas, nas bandas 6p21.3 e 19p13.3, como está representado na figura 50.

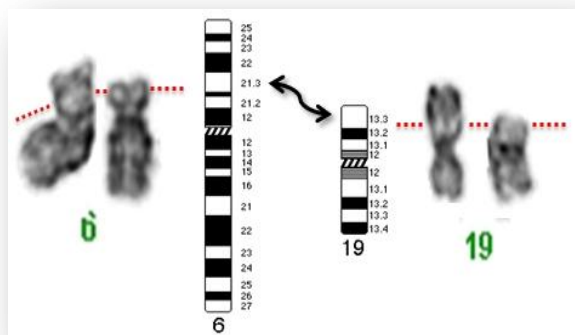


Figura 50 - Esquema com o par de cromossomas 6 e 19, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados.

Quanto à translocação t(6;19) não foi encontrada nenhuma referência na literatura. Os rearranjos no ramo curto do cromossoma 6 são raros, como referido anteriormente (na secção 3.1.3, num caso de SMD), e a região 19p13.3 está pouco descrita. Nimura *et al.* (2003) descreve cinco casos de MM com anomalias no 19p13.3, mas a sua função no desenvolvimento da patologia não é conhecida.

Mais uma vez, a citogenética foi de extrema importância no diagnóstico / prognóstico, neste caso permitiu detectar um rearranjo complexo, com uma trissomia 8 e duas translocações, uma comum nos MM, como é o caso da t(11;14) e uma outra não descrita. Os cariótipos complexos são comuns nos MM, e estão associados a um prognóstico desfavorável, com um tempo de vida mais curto (Swerdlow *et al.*, 2008).

A terceira anomalia mais observada, a deleção do ramo longo do cromossoma 13, foi detectada nos casos n.º 4 e 7. No último caso apenas por FISH, já referido anteriormente. No caso n.º 4, a deleção foi detectada em 35% das metáfases analisadas. Na figura 51 está representado um cariograma do sexo feminino com deleção da banda q14 do cromossoma 13. Ao contrário do que acontece nas LLC, nos MM, a deleção do 13q está associado a um prognóstico desfavorável, com um tempo de vida mais curto e resposta à terapia menos eficaz (Chauffaille *et al.*, 2007; Kyle e Rajkumar, 2009).



Figura 51 - Cariograma, em bandas GTL, com deleção da banda q14 no cromossoma 13.

Este resultado foi confirmado pela técnica de FISH, com a sonda de sequência de cópia única para a região 13q14, que marca a vermelho como já foi referido nas LLC, secção 3.2.1.1. Na figura 52 estão representados quatro núcleos com apenas um sinal para a região 13q14, o que significa a presença de apenas uma cópia desta região.

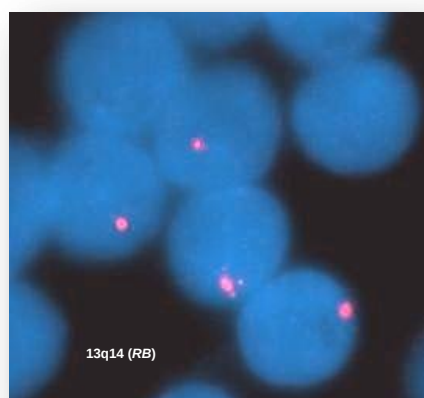


Figura 52 – FISH, em núcleos, com a sonda para a região 13q14, observam-se quatro núcleos com um único sinal.

Em suma, 70% dos casos estudados apresentavam alterações cromossómicas, apenas 30% foram detectados pela citogenética convencional, o que está de acordo com o descrito (Kyle e Rajkumar, 2009). A taxa de detecção de anomalias pela citogenética convencional é baixa, o que está relacionado com o baixo índice mitótico das células neoplásicas, e uma vez que estas células se encontram na medula óssea, o mais provável é analisar-se células dos vários elementos mielóides que estão em divisão espontânea, na medula óssea.

As anomalias mais frequentes foram as translocações envolvendo o *locus* do gene da imunoglobulina [t(4;14) e t(11;14)] e a deleção do 13q com, respectivamente 50% e 25% cada.

Neste estudo, a incidência das translocações envolvendo o *locus* do gene da imunoglobulina é próximo do descrito, já a deleção do 13q foi inferior. Segundo Swerdlow *et al.* (2008), 55 a 70% dos MM apresentam translocações envolvendo essa região e a taxa de detecção da deleção do cromossoma 13q é de 50%, pela técnica de FISH.

3.2.2. Linfomas não-Hodgkin (LNH)

Este grupo engloba uma série de doenças linfoproliferativas com características distintas, cada uma com alterações cromossômicas específicas. O estudo citogenético é importante uma vez que permite identificar / classificar o tipo de linfoma não-Hodgkin (LNH), prever a evolução da doença e adequar a terapêutica. Foram estudados seis casos com suspeita de LNH das células B, em igual número do sexo masculino e feminino. A idade média dos pacientes foi de 69.2 anos, variando entre os 58 e os 78 anos.

Em todos os casos, a amostra foi sangue periférico. As células neoplásicas são os linfócitos B, pelo que nas culturas se utilizaram estimuladores, 1,2-O-tetradecanoilforbol-1,3-acetato (TPA) e Pokeweed, tendo-se obtido metáfases em todas as culturas. O número médio de metáfases analisadas foi de 22.5 (entre 20 e 23).

A técnica de FISH foi realizada em todos os casos, com uma ou duas sondas, relativas às translocações mais comuns nos LNH, a translocação t(11;14) ou t(14;18). Em dois casos apenas foi aplicada uma das sondas, dado o resultado obtido na citogenética convencional. O número médio de células analisadas, para cada sonda, foi respectivamente, 183.6 e 176.5.

Os resultados citogenéticos e por FISH obtidos nos seis casos estudados estão representados na tabela 13.

Tabela 13 – Resultados da análise citogenética e por FISH obtidos nos seis casos de LNH.

N.º caso	Idade	Tipo de amostra	N.º met. analisadas	Resultado citogenético	FISH	
					t(11;14)	t(14;18)
1	63	SP	22	46, XX [22]	neg	neg
2	78	SP	23	46, XX, t(11;14)(q13;q32) [5] / 46, XX [18]	57,3%	—
3	77	SP	22	46, XY, t(14;18)(q32;q21) [8] / 46, XY [14]	—	62,4%
4	73	SP	20	46, XY [20]	neg	neg
5	58	SP	25	45-47, XY, der(1)?, der(14)?, der(19)?, inc [8] / 46, XY [17]	neg*	neg*
6	66	SP	23	46, XX, t(11;14)(q13;q32), i(17)(q10) [4] / 46, XX [19]	76,8%	—

N.º met. analisadas – número de metáfases analisadas; SP – sangue periférico;

* com 3 sinais para o gene *IGH* (# 14)

Dos seis casos estudados, dois apresentavam um cariótipo normal (n.º 1 e 4) e o resultado do FISH para a detecção das translocações, t(11;14) e t(14;18) foi negativo.

Nos restantes casos (66.7%) observaram-se alterações cromossômicas. Em três casos (n.º 2, 3 e 6), as alterações encontradas permitiram especificar o tipo de linfoma.

No caso n.º 2, das vinte e três metáfases analisadas, cinco apresentavam uma translocação entre os cromossomas 11 e 14, nas regiões 11q13 e 14q32, como se pode observar na figura 53. Nos LNH, este rearranjo é característico dos linfomas do manto (LM), ocorrendo em cerca de 70% dos casos, do qual resulta a justaposição dos genes *CCND1* (11q13) e *IGH* (14q32) (Swerdlow *et al.*, 2008). Os LM são um tipo de LNH com características agressivas e constituem cerca de 5-10% de todos os linfomas das células B (Espinete *et al.*, 2010). Este rearranjo também pode ser observado nas LLC, como referido na secção 3.2.1.1.

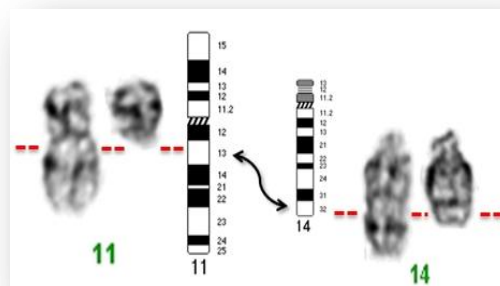


Figura 53 - Esquema com o par # 11 e 14, em bandas GTL, e respectivos idiogramas, com os pontos de quebra assinalados.

Neste caso, a técnica de FISH foi realizada apenas com a sonda para a translocação t(11;14), tendo-se observado o rearranjo em 57.3% das células analisadas. Na figura 54 está representada uma metáfase em que foi aplicada a técnica de FISH com a sonda para os genes *IGH-CCND1*. A sonda marca a região 11q13 a vermelho e a região 14q32 a verde. Na imagem observa-se um sinal vermelho, no cromossoma 11 normal, um sinal verde no cromossoma 14 normal e dois sinais amarelos, resultante da justaposição das sondas, nos cromossomas 11 e 14 envolvidos na translocação.

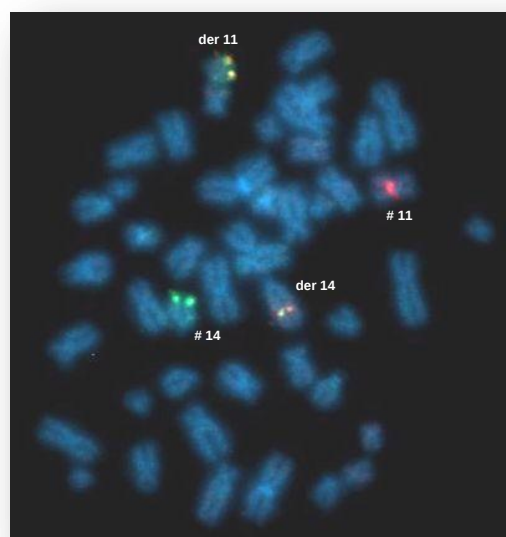


Figura 54 - FISH com a sonda para a t(11;14), observa-se um sinal vermelho no # 11 normal, um sinal verde no # 14 normal e dois sinais amarelos nos # envolvidos na translocação.

No caso n.º 6, também, se observou a translocação t(11;14), o que significa que se tratava de um linfoma do manto. Mas as cinco metáfases com a translocação apresentavam igualmente um isocromossoma do ramo longo do cromossoma 17, como se pode observar na figura 55.

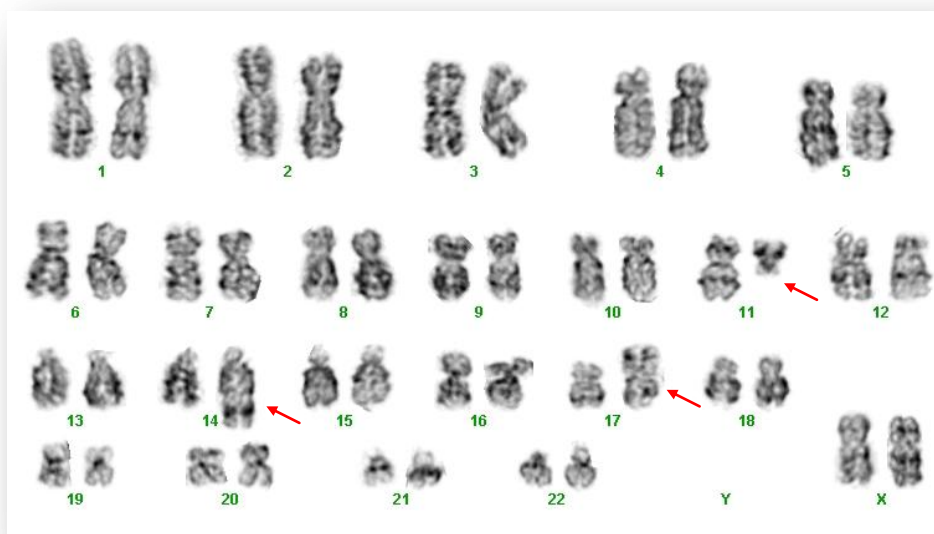


Figura 55 – Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(11;14)(q13;q32) e um isocromossoma do ramo longo do cromossoma 17 (assinalado com setas).

Do isocromossoma resulta a perda do ramo curto e, por conseguinte, perda do gene *TP53* que se localiza na região 17p13. Este rearranjo foi confirmado utilizando sondas subteloméricas para o ramo curto e o ramo longo do cromossoma 17 (figura 56). As sondas subteloméricas para o ramo curto (p) e ramo longo (q) são misturas independentes:

- a) Mistura da sonda subtelomérica para o 17p inclui também a sonda subtelomérica para o cromossoma 8; em que o centrómero do cromossoma 17 marca a azul-claro, o 17p a amarelo, o 8p a verde e o 8q a vermelho.
- b) Mistura da sonda subtelomérica para o 17q engloba a sonda subtelomérica para o cromossoma 9; com o centrómero do cromossoma 17 a azul-claro, o 17q a amarelo, o 9p a verde e o 9q a vermelho.

Na figura 56a está representada uma metáfase, na qual foi aplicada a mistura da sonda subtelomérica para o 17p, em que se observam: dois sinais azuis-claros, nos centrómeros do cromossoma 17 normal e do isocromossoma 17; um sinal amarelo no ramo curto do cromossoma 17 normal - o isocromossoma não apresenta sinal amarelo relativo ao 17p; observam-se igualmente, dois sinais verdes e dois vermelhos que correspondem aos dois cromossomas 8 normais. Na metáfase da figura 56b foi aplicada a sonda subtelomérica para o 17q, observam-se

dois sinais azuis-claros nos centrómeros do cromossoma 17 normal e no isocromossoma; três sinais amarelos, um no 17 normal e os outros dois no isocromossoma, confirmando-se o isocromossoma do ramo longo do cromossoma 17; dois sinais verdes e dois vermelhos, em ambos os ramos, no par de cromossomas 9.

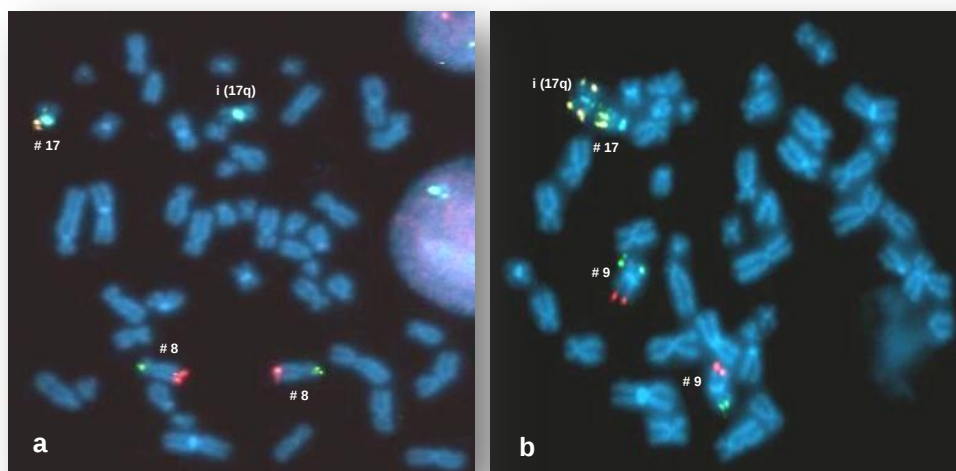


Figura 56 – FISH, em metáfase, com a sonda subtelomérica para o: a) # 17p, a amarelo, apenas se observa sinal no # 17 normal, e para ambos os ramos do # 8 (p-verde e q-vermelho); b) # 17q (amarelo) observam-se três sinais, um no # 17 normal e dois no isocromossoma do 17, e ramo curto (verde) e longo (vermelho) do # 9.

Uma vez que se verificou a perda do ramo curto do cromossoma 17 e, consequentemente, deleção da região p13.1 (*TP53*), procedeu-se à técnica de FISH com a sonda para o gene *TP53*, com o intuito de determinar a percentagem de células com a deleção, que foi de 42%. Este rearranjo é uma anomalia cromossómica secundária e está associada a uma forma mais agressiva da doença (Espinete *et al.*, 2010). Num estudo realizado, por este autor, a deleção do 17p é uma das anomalias secundárias mais frequentes.

A citogenética permitiu não só identificar o tipo de LNH como também identificar outras alterações cromossómicas, com importante valor prognóstico.

No caso n.º 3 observou-se uma translocação entre os cromossomas 14 e 18, envolvendo as bandas 14q32 e 18q21, em 36% das metáfases analisadas, como está representado na figura 57. Este rearranjo permitiu identificar o LNH como sendo um linfoma folicular (LF). Segundo Harris *et al.* (2008), a t(14;18) é detectada em 90% dos casos de LF.

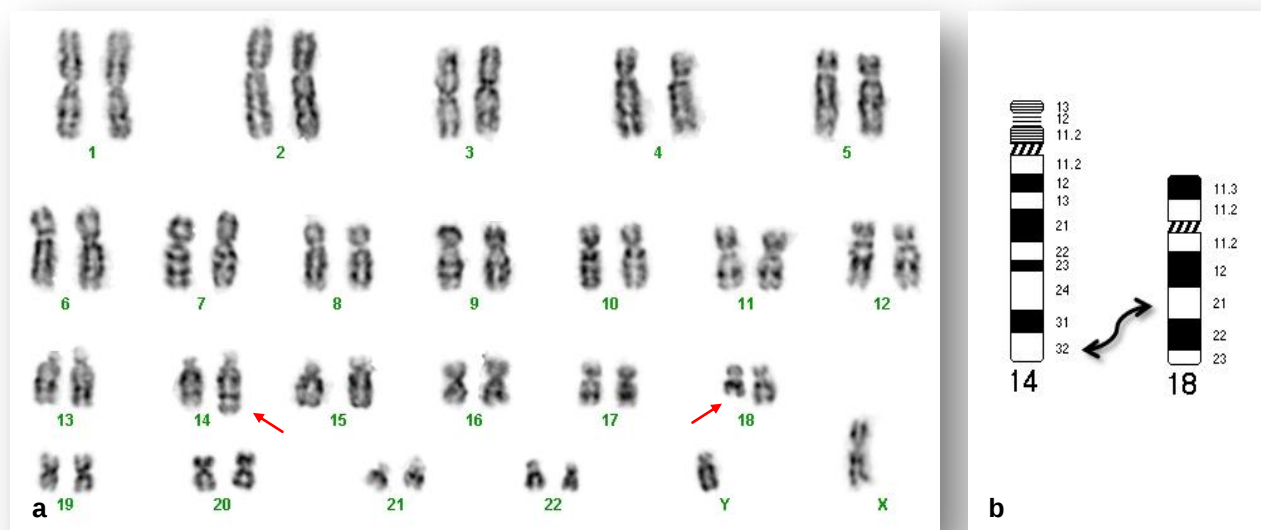


Figura 57 - a) Cariograma, em bandas GTL, com a translocação t(14;18) (assinalado com setas); b) Idiograma dos cromossomas 14 e 18 assinalando os pontos de quebra.

A técnica de FISH foi aplicada com a sonda para a translocação t(14;18), cuja taxa de detecção foi de 62.4%. Na figura 58a está representado um esquema da sonda para os genes *IGH* e *BCL2*, que se localizam respectivamente no cromossoma 14 e 18. A região 14q32 marca a verde e a região 18q21 a vermelho. Quando ocorre a translocação verifica-se uma justaposição das sondas, observando-se um sinal amarelo nos cromossomas envolvidos na translocação. Na figura 58b observam-se quatro núcleos, em dois foi identificada a translocação t(14;18), em que se observa um sinal vermelho para o cromossoma 18 normal, um sinal verde no cromossoma 14 normal e dois sinais amarelos nos dois cromossomas envolvidos na translocação, devido à justaposição dos genes *IGH/BCL2*.

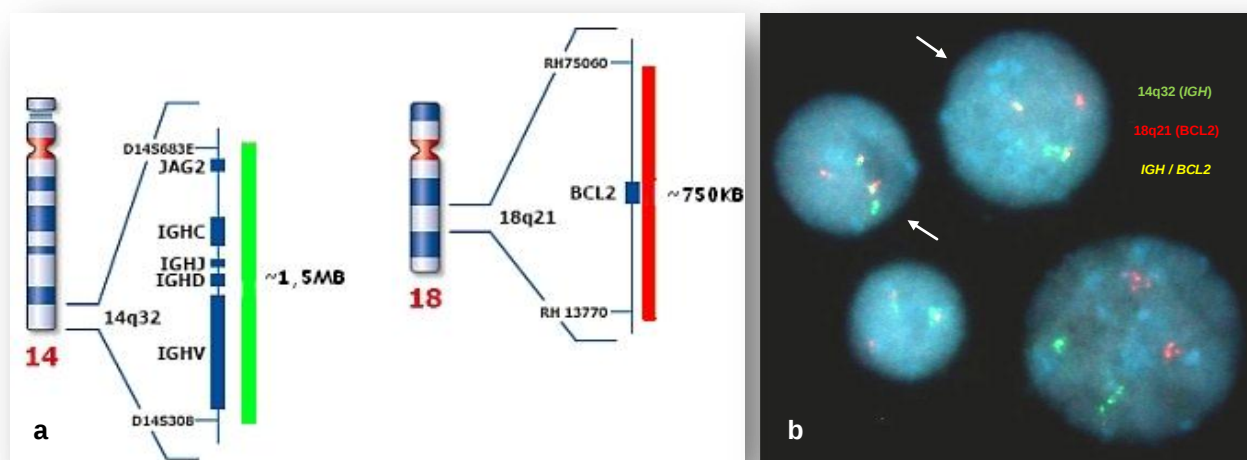


Figura 58 - a) Esquema da sonda para os genes *BCL2* - *IGH* (adaptado Heidelberg); b) a sonda aplicada em núcleos, dois núcleos são positivos para a t(14;18) (assinalados).

Também neste caso, a citogenética foi importante para identificar / classificar o tipo de LNH, dando uma indicação da evolução da doença. De notar que, os LF são a forma mais indolente dos LNH.

No quarto caso com alterações (caso n.º5) observou-se um rearranjo complexo, em oito das vinte e cinco metáfases analisadas. O número de cromossomas variou entre os 45 e 47, resultado de se observar em algumas metáfases monossomia do cromossoma X, cromossoma 21 e / ou 22 e, simultaneamente, apresentar um cromossoma extra de origem desconhecida, semelhante, em tamanho aos cromossomas do grupo C. Na figura 59 estão representadas as anomalias detectadas na generalidade das metáfases:

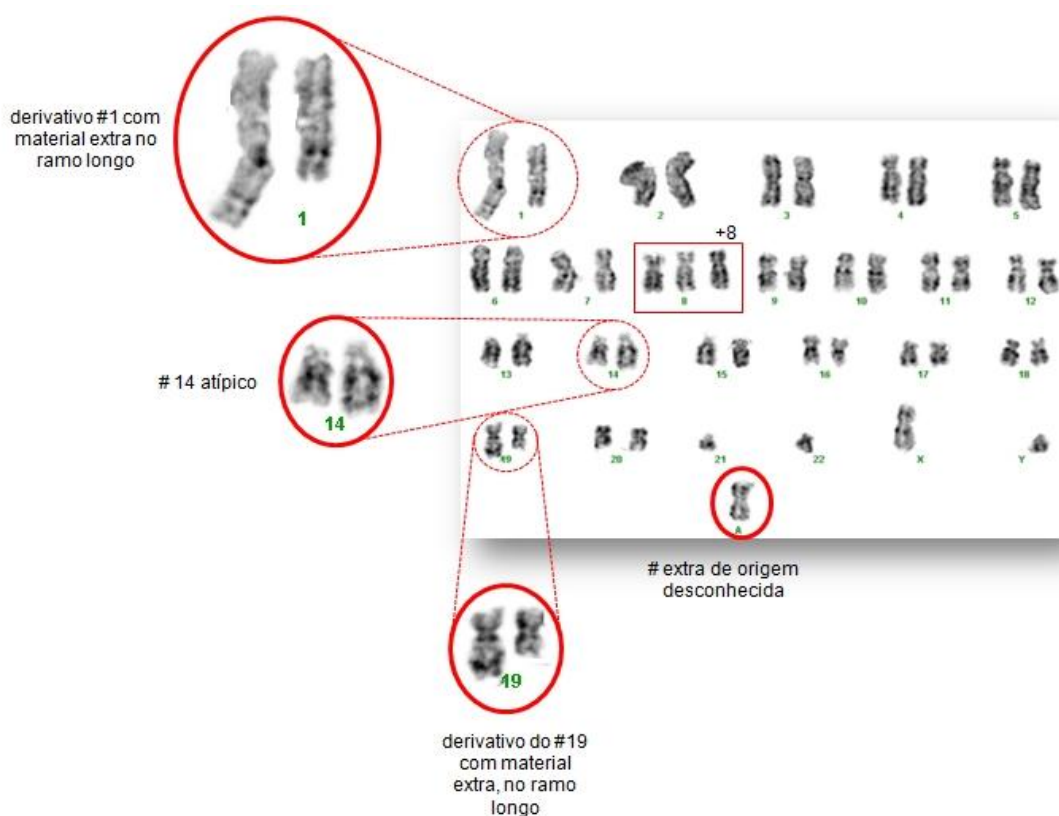


Figura 59 – Cariograma, em bandas GTL, em que se observam vários rearranjos assinalados a vermelho.

Tratava-se de um LNH e, apesar das várias anomalias cromossômicas, não se observou a translocação t(11;14) ou a t(14;18). A técnica de FISH, com as sondas para a t(11;14) e t(14;18), foi realizada para descartar a presença, a nível molecular, dos genes de fusão *IGH/CCND1* ou *IGH/BCL2*, respectivamente. O resultado foi negativo para ambas as sondas, mas foi interessante verificar que a maioria dos núcleos apresentava três sinais para a região 14q32 (a verde), como está representado na figura 60a. Ao analisar as metáfases verificou-se que os três sinais verdes correspondiam a três cromossomas (figura 60b): num cromossoma 14 normal, num cromossoma metacêntrico e num outro cromossoma. O que parecia inicialmente um cromossoma 14 atípico (figura 59) provavelmente não o era.

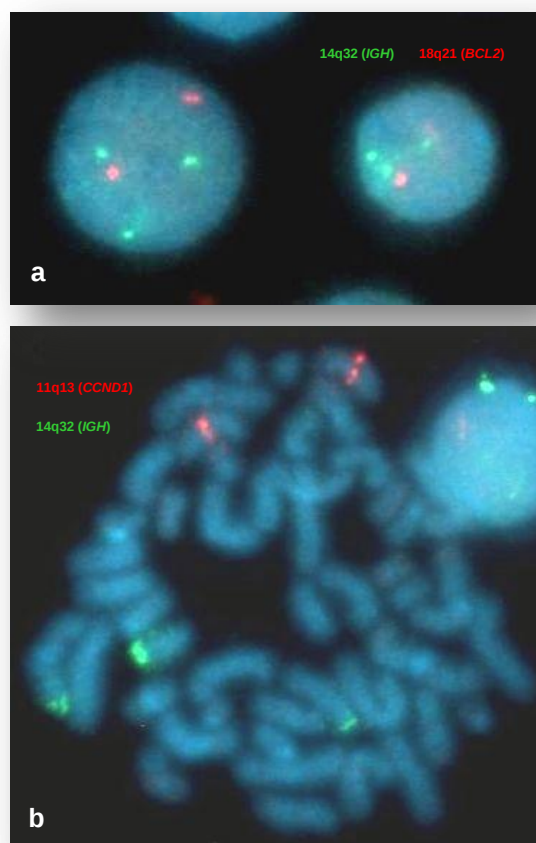


Figura 60 – Técnica de FISH com a sonda para a translocação: a) t(14;18), nos núcleos observam-se três sinais verdes (14q32); b) t(11;14) observam-se três # com marcação a verde (14q32), um # acrocêntrico (# 14 normal), e dois # de origem desconhecida.

Utilizaram-se sondas WCP específicas para o cromossoma 14 e 19, com o intuito de esclarecer os rearranjos envolvendo esses cromossomas. Foi também englobada a sonda WCP para o cromossoma 17, uma vez que rearranjos neste cromossoma estão associados a um prognóstico desfavorável.

A sonda para o cromossoma 14 tem marcação a vermelho, a verde corresponde o cromossoma 19, e o cromossoma 17 tem marcação a verde e vermelho, cuja justaposição resulta num sinal amarelo. Na figura 61 está representada uma metáfase, com as três sondas, a sonda para o 19 hibrida com dois cromossomas: um na totalidade (o 19 normal) e no outro a marcação é parcial (derivativo do 19). A sonda para o 17 marca na totalidade e apenas o par de cromossomas 17. A sonda para o cromossoma 14 hibrida apenas com dois cromossomas: um cromossoma acrocêntrico (o 14 normal), e um cromossoma metacêntrico, o que está, em parte, de acordo com o observado na figura anterior. O facto de não se ter observado uma terceira marcação pode estar relacionado com o envolvimento da região 14q32 numa translocação / inserção críptica.

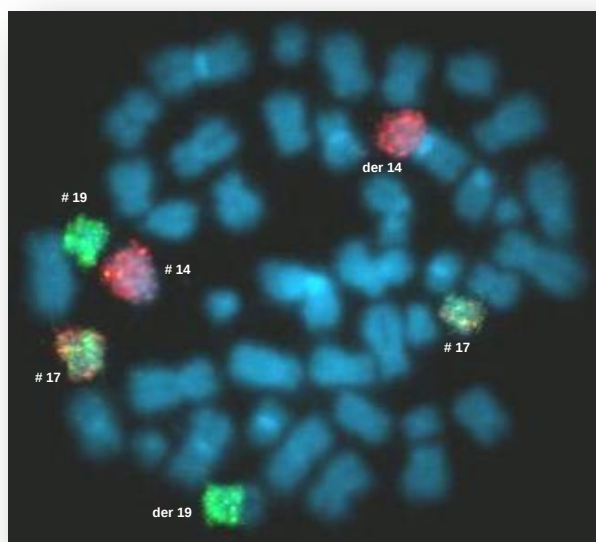


Figura 61 - FISH com sondas WCP para os # 14 (vermelho), # 19 (verde) e # 17 (amarelo). A amarelo observam-se dois # 17 normais; a verde, o # 19 normal e o derivativo, em que a marcação é parcial; e a vermelho, o # 14 normal e parte de um # metacêntrico.

O cromossoma metacêntrico que marca com as sondas para o cromossoma 14, figuras 60b e 61, parece ser o cromossoma extra de origem desconhecida, representado na figura 59. Seria necessária a aplicação da técnica de FISH com outras sondas para se clarificar os vários rearranjos, mas dada a quantidade *versus* qualidade da amostra não foi possível a sua realização.

Embora não tenha sido possível esclarecer os rearranjos observados na citogenética convencional, verificou-se uma grande instabilidade genética, com as metáfases a apresentarem vários rearranjos quer estruturais quer de número. Os cariótipos complexos estão associados a um prognóstico desfavorável, com tempo de vida mais curto e uma reposta ineficaz à terapia. O que estava de acordo com o estado clínico / evolutivo deste paciente.

Em suma, 66.7% dos casos estudados apresentavam alterações cromossómicas. A citogenética permitiu especificar / classificar o tipo de LNH, em 75% dos casos: dois apresentavam a translocação t(11;14) e foram classificados de linfomas do manto, e no outro caso foi detectada a translocação t(14;18), um linfoma folicular.

A análise citogenética foi também importante, ao detectar rearranjos associados à evolução clonal, com prognóstico desfavorável e, por conseguinte, relacionados com a progressão da doença.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Nas doenças hemato-oncológicas são várias as alterações genéticas envolvidas no processo maligno, muitas delas passíveis de serem identificadas no estudo citogenético. Ao longo das últimas décadas, a análise citogenética tem adquirido um papel crucial na compreensão/conhecimento destas doenças, uma vez que permitem: **a)** classificar/identificar o tipo de doença hemato-oncológica, em casos ambíguos; **b)** prever a evolução/progressão da doença; **c)** direccionar a terapêutica a aplicar; e **d)** monitorizar a doença, verificando a eficácia ou não do tratamento (Swerdlow *et al.*, 2008).

No estudo citogenético das doenças hemato-oncológicas, a obtenção de metáfases não é um processo fácil e, muitos laboratórios, dada essa dificuldade, optam apenas por uma análise por técnicas moleculares, nomeadamente, a hibridação *in situ* fluorescente (FISH). A boa colaboração entre o Laboratório de Citogenética e o Serviço de Hematologia do CHTMAD, com a entrega célere das amostras, bem como uma optimização prévia dos protocolos que melhor se adequam ao tipo de células neoplásicas que se pretende estudar, permitem uma taxa de sucesso nas culturas celulares na ordem dos 99%. Neste trabalho obtiveram-se metáfases em todas as culturas realizadas, o que permitiu a análise citogenética, a partir de duas culturas independentes, de acordo com as normas internacionais (Barch *et al.*, 1997).

A análise de metáfases permitiu detectar não só as anomalias cromossómicas típicas de cada uma das neoplasias estudadas, como também a detecção de outras não descritas na literatura. Deste modo, salienta-se a importância dos métodos convencionais no estudo destas neoplasias, tendo em conta que permitem uma visualização generalizada da constituição genética de cada indivíduo, detectando alterações que, não estando associadas à patologia, podem dar indicação sobre a orientação terapêutica mais adequada.

A técnica de FISH teve um contributo importante não só no esclarecimento e / ou confirmação de rearranjos detectados, como também no despiste das anomalias mais comuns em algumas doenças hemato-oncológicas de difícil detecção pela citogenética convencional.

Actualmente, a abordagem citogenética ao estudo destas patologias deve abranger estas duas técnicas, uma vez que ambas têm vantagens e limitações. A citogenética convencional é uma técnica morosa, a classificação dos cromossomas é difícil, requer técnicos qualificados, mas permite a detecção de novas alterações cromossómicas. Já a técnica de FISH tem como grande limitação ser uma técnica dirigida, embora seja uma técnica rápida, com maior especificidade e resolução do que a citogenética convencional, permitindo a detecção de rearranjos

cromossômicos subtis ou crípticos [exemplo a $t(4;14)$], sendo sem dúvida um importante complemento da citogenética convencional.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Nos últimos anos têm surgido novas técnicas moleculares, nomeadamente a hibridação genómica comparativa (CGH) e mais recentemente o “array” CGH, que têm possibilitado a detecção e identificação de deleções e amplificações do genoma, quer em casos com alterações cromossómicas aparentemente equilibradas, quer em casos com cariótipo normal, definindo novas regiões do genoma envolvidas na patogénese da doença (Kearney e Horsley, 2005; Speicher e Carter, 2005; Bejjani e Shaffer, 2008).

As técnicas de “microarrays” são uma oportunidade para melhor compreender a origem da doença, e proporcionar pistas sobre as alterações genéticas e alterações nas vias celulares. Compreender esses “defeitos” nas vias celulares levará consequentemente à descoberta/delineamento de fármacos específicos para o tratamento de cada doença (Nolte e Hofmann, 2008; Haferlach *et al.*, 2010). É de ressaltar que todas estas metodologias têm vantagens e limitações.

O futuro passará por combinar a citogenética convencional com técnicas moleculares, nomeadamente, CGH e “microarrays”, que melhor se adequem ao que se pretende estudar/esclarecer. Deste modo, ter-se-á um diagnóstico completo e um conhecimento aprofundado sobre a patogénese de cada uma das doenças hemato-oncológicas.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Achkar, W., Wafa, A., Mkrtchyan, H., Moassass, F., & Liehr, T. (2010). A rare case of chronic myeloid leukemia with secondary chromosomal changes including partial trisomy 17q21 to 17qter and partial monosomy of 16p13.3. *Molecular Cytogenetics* , 3(6), 1-4.

Albertson, D., & Pinkel, D. (2003). Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human Molecular Genetics* , 12(2), 145-152.

Alexander, D., Mink, P., Adami, H., Chang, E., Cole, P., Mandel, J., et al. (2007). The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int. J. Cancer* , 120, 1-39.

Almeida, V. M. (1981). *Regiões Organizadoras do Nucléolo nos Cromossomas Humanos - Introdução ao seu estudo*. Lisboa: Brotéria - Genética.

Altekruse, S., Kosary, C., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., et al. (2009). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute*. Obtido em 2010, de http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/

Appelbaum, F., Gundacker, H., Head, D., Slovak, M., Wilman, C., Godwin, J., et al. (2006). Age and acute myeloid leukemia. *Blood* , 107, 3481-3485.

Appelbaum, F., Rowe, J., Radich, J., & Dick, J. (2001). Current standard therapy of adult acute myeloid leukemia. *Hematology* , 62-65.

Atkin, N. (August de 2000). *MYC v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*. Obtido em 2010, de Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MYCID27.html>

Au, W., Gascoyne, R., Viswanatha, D., Connors, J., Klasa, R., & Horsman, D. (2002). Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: a review of 214 cases. *Leukemia and Lymphoma* , 43(4), 783-791.

Bacher, U., Haferlach, T., Kern, W., Hiddemann, W., Schnittger, S., & Schoch, C. (2005). Conventional cytogenetics of myeloproliferative diseases other than CML contribute valid information. *Ann. Hematol.* , 84, 250-257.

Backx, L., Thoelen, R., Esch, H., & Vermeesch, J. (2008). Direct fluorescent labelling of clones by DOP-PCR. *Molecular Cytogenetics* , 1(3), 1-4.

- Barch, M. J., Knutsen, T., Spurbeck, J., & . (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers.
- Bartlett, J. (2007). Fluorescence in situ hybridization. In J. Roulston, & J. Bartlett, *Methods in molecular medicine, vol 97: molecular diagnosis of cancer* (p. 77). Totowa: Human Press.
- Bayraktar, S., & Goodman, M. (2010). Detection of BCR-ABL positive cells in an asymptomatic patient: a case report and literature review. *Case Reports in Medicine* , 1-3.
- Bejjani, B., & Shaffer, L. (2008). Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* , 9, pp. 71-86.
- Benn, P. A., & Tantravahi, U. (2001). Chromosome staining and banding techniques. In D. E. Rooney, *Human Cytogenetics (3rd Edition)*. Oxford: Oxford University Press.
- Bergantini, A., Castro, F., Souza, A., & Fett-Conte, A. (2005). Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , 27(2), 120-125.
- Bilhou-Nabera, C. (May de 1998). *12p abnormalities in myeloid malignancies*. Obtido em 2010, de Atlas Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/12pmyelo.html>
- Boerma, E., Siebert, R., Kluin, P., & Baudis, M. (2009). Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia* , 23, 225-234.
- Bortolheiro, T., & Chiatton, C. (2008). Leucemia mielóide crônica: história natural e classificação. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , 30(1), 3-7.
- Borze, I., Juvonen, E., Ninomiya, S., Lee, K., Elonen, E., & Knuutila, S. (2010). High-resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization study and methylation status of the RPS14 gene in de novo myelodysplastic syndromes. *Cancer, Genetics and Cytogenetics* , 197, 166-173.
- Boyer, J. (December de 2003). *t(8;19) (p11;q13)*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0819p11q13ID1315.html>

Brunning, R., Orazi, A., Germing, U., Le Beau, M., Porwit, A., Baumann, I., et al. (2008). Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 88-107). Lyon: IARC.

Bryan. (2009). Obtido em 2010, de <http://www.bio.davidson.edu/.../Stonestreet/fish.gif>

Camos, M., Esteve, J., Jares, P., Rozman, M., Colomer, D., Villamor, N., et al. (2004). Gene Expression Profile of Acute Myeloid Leukemia (AML) with t(8;16)(p11;p13) and MYST3/CREBBP Rearrangement. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* , 104.

Carneiro, M., Fonseca, J., Graça, L., Luís, A., Santos, B., Santos, P., et al. (2009). *Conhecer a imunologia*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Imunologia.

Chaubey, A., Karanti, S., Rai, D., Oh, T., Adhvaryu, S., & Aguiar, R. (2009). MicroRNAs and deletion of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* , 23, 186-188.

Chauffaille. (2008). Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosina quinase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , 30(1), 13-19.

Chauffaille, M., Ribeiro, A., Yamamoto, M., Rodrigues, M., Almeida, M., Ribas, C., et al. (2007). Elevada incidência de anormalidades cromossômicas numéricas detectadas por FISH multicentromérico em pacientes com mieloma múltiplo. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* , 43(1), 17-23.

Chauffaille. (2008). Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosina cinase. *Rev. bras. hematol. hemoter.* , 30 (1), 13-19.

Chauffaille., M. (2006). Alterações cromossômicas em síndrome mielodisplásica. *Rev Bras Hematol Hemoter* , 28 (3), 1-5.

Chaves, R. (2002). *Organização e evolução do genoma na família Bovidae*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro: Vila Real.

Chiorazzi, N., Rai, K., Ferrarini, M., & . (2005). Chronic lymphocytic leukemia: mechanisms of disease. *N. Engl. J. Med.* , 352, 804-815.

Clouston, H. J. (2001). Lymphocyte culture. In D. E. Rooney, *Human Cytogenetics (3rd Edition)*. Oxford: Oxford University Press.

- Connor, J., & Ferguson-Smith, M. (1984). *Essential Medical Genetics*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Corey, S., Minden, M., Barber, D., Kantarjian, H., Wang, J., & Schimmer, A. (2007). MDS constitute a complex range of stem-cell diseases. *Nature Reviews Cancer* , 7, 118-129.
- Costa, D., Carrió, A., Madrigal, I., Arias, A., Valera, A., Colomer, D., et al. (2006). Studies of complex Ph translocations in cases with chronic myelogenous leukemia and one with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 166, 89-93.
- Cuneo, A., & Cavazzini, F. (Março de 2008). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. Obtido em Abril de 2008, de <http://AtlasGeneticOncology.org/Anomalies/ET.html>
- Debernardi, S., Lillington, D., Young, B., & . (2004). Understanding cancer at the chromosome level: 40 years of progress. *European Journal of Cancer* , 40, 1960-1967.
- Deininger, M., Cortes, J., Paquette, R., Park, B., Hochhaus, A., Baccarani, M., et al. (2007). The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. *Cancer* , 110(7), 1509-1519.
- Deininger, M., Goldman, J., & Melo, J. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* , 96, 335-343.
- Dicker, F., Schnittger, S., Haferlach, T., Kern, W., & Schoch, C. (2006). Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVh status, and CD38 expression. *Blood* , 108, 3152-3160.
- Dighiero, G. (2005). CLL biology and prognosis. *Hematology* , 278-284.
- Dobigny, G., & Yang, F. (2008). Comparative cytogenetics in the genomics era: cytogenomics comes of age. *Chromosome research* , 16, pp. 1-4.
- Dohner, K., & Dohner, H. (2008). Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* , 93(7), 976-982.

- Doneda, L., Castorina, P., Tedeschi, A., Intropido, L., Morra, E., Montillo, M., et al. (2001). Multicolor FISH in chronic lymphocytic leukemia. An interphase study of patients with early-onset disease. *Cancer Genet Cytogenet* , 125, 63-69.
- Eclache, V., Benzacken, B., Kettaneh, A., & Fain, O. (2002). A constitutional translocation t(1;4)(p21;p15) in a case of chronic lymphocytic leukemia. *Annales de Génétique* , 45, 169-171.
- Espinet, B., Salaverria, I., Beà, S., Ruiz-Xivillé, N., Balagué, O., Salido, M., et al. (2010). Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 49, 439-451.
- Evans, L., & Hancock, B. (2003). Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet* , 362, 139-146.
- Fabris, S., Agnelli, L., Mattioli, M., Baldini, L., Ronchetti, D., Morabito, F., et al. (2005). Characterization of oncogene dysregulation in multiple myeloma by combined FISH and DNA microarray analyses. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 42, 117-127.
- Fadl-Elmula, I. (2001). *Cytogenetic and molecular cytogenetic studies of uroepithelial carcinomas*. Lund, Sweden: Lund University.
- Fan, Y.-S. (2002). *Molecular Cytogenetics - Protocols and Applications*. Totowa, New Jersey: Human Press.
- Farag, S., Archer, K., Mrózek, K., Ruppert, A., Carroll, A., Vardiman, J., et al. (2006). Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* , 108, 63-73.
- Faria, R., & Silva, R. (2007). Gamopatas monoclonais - critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , 29(1), 17-22.
- Fett-Conte, A., Estrela, R., Vendrame-Goloni, C., Carvalho-Salles, A., Ricci-Júnior, O., & Varella-Garcia, M. (2007). Atypical chromosome abnormalities in acute myeloid leukemia type M4. *Genetics and Molecular Biology* , 30(1), 6-9.
- Fink, S., Paternoster, S., Smoley, S., Flynn, H., Geyer, S., Shanafelt, T., et al. (2005). Fluorescent-labeled DNA probes applied to novel biological aspects of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* , 29, 253-262.

Fioretos, T., Panagopoulos, I., Lassen, C., Swedin, A., Billstrom, R., Isaksson, M., et al. (2001). Fusion of the BCR and the fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) genes as a result of t(8;22)(p11;q11) in a myeloproliferative disorder: the first fusion gene involving BCR but not ABL. *Genes, Chromosomes and Cancer* (32), 302-310.

Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P., Chesi, M., et al. (2004). Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Research* , 64, 1546-1558.

Genomics, C. R. (2010). *Chromhome*. Obtido de <http://www.chromhome.org>

Germing, U., Aul, C., Niemeyer, C., Haas, R., & Bennett, J. (2008). Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* , 87, 691-699.

Gmidène, A., Sennana, H., Fenaux, P., Laatiri, A., Zarrouk, M., Bouaziz, H., et al. (2008). Cytogenetic abnormalities in Tunisian de novo myelodysplastic syndrome: A comparison with other populations. *Leukemia Research* , 32, 1824-1829.

Gorusu, M., Benn, P., Li, Z., & Fang, M. (2007). On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 173, 97-106.

Gross, M., Mkrtchyan, H., Glaser, M., Fricke, H., Hoffken, K., Heller, A., et al. (2009). Delineation of yet unknown cryptic subtelomere aberrations in 50% of acute myeloid leukemia with normal GTG-banding karyotype. *Int. J. Oncol.* , 34(2), 417-423.

Gustashaw, K. M. (1997). Chromosome stains. In M. J. Barch, T. Knutsen, & J. Spurbeck, *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers.

Haase, D. (2008). Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* , 87, 515-526.

Haferlach, C., Rieder, H., Lillington, D., Dastugue, N., Hagemeijer, A., Harbott, J., et al. (2007). Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 46, 494-499.

Haferlach, Kohlmann, A., Wieczorek, L., Basso, G., Kronnie, G., Hofmann, W., et al. (2010). Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and

subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol.* , 28(15), 2529-2537.

Haferlach, T., Kohlmann, A., Klein, H., Ruckert, C., Dugas, M., Williams, P., et al. (2009). AML with translocation t(8;16)(p11;p13) demonstrates unique cytomorphological, cytogenetic, molecular and prognostic features. *Leukemia* , 23, 934-943.

Hamblin, T., & Killick, S. (2004). Myelodysplastic disorders. *Marrow Disorders* , 1, 61-64.

Harris, N., Campo, E., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Swerdlow, S., et al. (2008). Introduction to the WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 14-15). Lyon: IARC.

Harris, N., Swerdlow, S., Jaffe, E., Ott, G., Nathwani, B., de Jong, D., et al. (2008). Follicular lymphoma. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 220-226). Lyon: IARS.

Harrison, C., Gibbons, B., Yang, F., Butler, T., Cheug, K., Kearney, L., et al. (2000). Multiplex fluorescence in situ hybridization and cross species color banding of a case of chronic myeloid leukemia in blastic crisis with a complex philadelphia translocation. *Cancer Genet Cytogenet* , 116, 105-110.

Hayette, S., Tigaud, I., Callet-Bauchu, E., French, M., Gazzo, S., Wahbi, K., et al. (2003). In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene. *Blood* , 102(4), 1549-1550.

Heerema, N. (September de 2003). *15q13-15 Rearrangements*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/15q13rearID1257.html>

Heidelberg, J. (s.d.). *Kreatech Diagnosis*. Obtido em 2010, de <http://www.kreatech.com/>

Henning, F., Trifonov, V., Toledo, L., & . (2008). Use of chromosome microdissection in FISH molecular cytogenetics. *Genetics and Molecular Biology* , 31 (1), 279-283.

Hoglund, M., Sehn, L., Connors, J., Gascoyne, R., Siebert, R., Sall, T., et al. (2004). Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 195-204.

Hughes, S., Arneson, N., Done, S., & Squire, J. (2005). The use of whole genome amplification in the study of human disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88, 173-189.

Huret. (December de 2007). +8 or trisomy 8. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/tri8ID1017.html>

Huret, J. (April de 2006). *t(1;5)(q22;q33)*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://atlasgeneticsoncology.org>

Huret, J. (June de 2008). *t(2;19)(p12;q13) IGK/BCL3; t(14;19)(q32;q13) IGH/BCL3; t(19;22)(q13;q11) BCL3/IGL*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t1419ID2050.html>

Huret, J. (February de 2009). *t(2;7)(p11;q21); t(7;14)(q21;q32) CDK6/IgH; t(7;22)(q21;q11)*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0714q21q32ID1361.html>

Huret, J. (January de 2008). *t(8;19)(p12;q13)*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0819p12q13ID1203.html>

Iqbal, M., Al-Omar, H., Owaidah, T., Al-Humaidan, H., Bhuiyan, Z., & Sahovic, E. (2006). *del(6)(p23)* in two cases of de novo AML - a new recurrent primary chromosome abnormality. *Eur. J. Haematol.*, 77, 245-250.

ISCN. (2009). *An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. Basel: Karger.

Jaffe, E., Harris, N., Stein, H., Campo, E., Pileri, S., & Swerdlow, S. (2008). Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 158-166). Lyon: IARC.

Jorde, B., Carey, J., White, R., & . (1995). *Medical Genetics*. St. Louis: Mosby International Limited.

Kearney, L. (2001). Molecular cytogenetics. *Best practice and research clinical haematology*, 14 (3), pp. 645-668.

Kearney, L., & Buckle, V. (2001). The application of fluorescence in situ hybridization to chromosome analysis. In D. Rooney, *Human Cytogenetics: constitutional analysis. A practical approach* (pp. 175-210). Oxford: Oxford University Press.

Kearney, L., & Buckle, V. (2001). The application of fluorescence in situ hybridization to chromosome analysis. In D. Rooney, *Human Cytogenetics - constitutional analysis* (pp. 175-207). Oxford: Oxford University Press.

Kearney, L., & Horsley, S. (2005). Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* , 114, 286-294.

Keats, J., Reiman, T., Maxwell, C., Taylor, B., Larratt, L., Mant, M., et al. (2003). In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* , 101(4), 1520-1529.

Kelly, R., Wright, D., Patil, K., Chapple, M., Jalihal, S., Barrans, S., et al. (2008). t(14;19)(q32;q13) incidence and significance in B-cell lymphoproliferative disorders. *British Journal Haematology* , 141, 561-562.

Kilpivaara, O., & Levine, R. (2008). JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia* , 22, 1813-1817.

Kralovics, R. (2008). Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* , 22, 1841-1848.

Kuehl, W., & Bergsagel, P. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer* , 2, 175-187.

Kumar, S., Rajkumar, S., Greipp, P., & Witzig, T. (2004). Cell proliferation of myeloma plasma cells: comparison of the blood and marrow compartments. *American Journal of Hematology* , 77, 7-11.

Kuppers. (2003). B-cell developmental pathways. *Nature Reviews Immunology* , 3, 801-812.

Kuppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat. Rev. Cancer* , 9(1), 15-27.

Kyle, R., & Rajkumar, S. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* , 23, 3-9.

- Langer, S., Kraus, J., Jentsch, I., & Speicher, M. (2004). Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications. *Chromosome Research* , 12, 15-23.
- Lawce, H. J., & Brown, M. G. (1997). Cytogenetics: an overview. In M. J. Barch, T. Knutsen, & J. Spurbeck, *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (pp. 19 - 73). Philadelphia: Lippincott Ravn Publishers.
- Lee, D., Lee, Y., Yun, Y., Kim, Y., Jeong, S., Lee, Y., et al. (2003). A study on the incidence of ABL gene deletion on derivative chromosome 9 in chronic myelogenous leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization and its association with disease progression. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 37, 291-299.
- Lee, S., Kim, M., Lim, J., Kim, Y., & Han, K. (2009). Acute myeloid leukemia with MYC amplification in the homogeneous staining regions and double minutes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 192, 96-98.
- Lee, S., Lee, S., Lee, K.-A., Song, J., Kim, J., Suh, B., et al. (2008). Rare translocations involving chromosome band 8p11 in myeloid neoplasms. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 186, 127-129.
- Levine, R., Pardanani, A., Tefferi, A., & Gilliland, D. (2007). Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature Reviews Cancer* , 7, 673-683.
- Lewis, R. (2005). *Human genetics: concepts and applications* (6th Edition ed.). New York: McGraw-Hill.
- Li, M. (2002). Book review. In Y.-S. Fan, *Molecular cytogenetics: protocols and applications* (p. 411). Totowa: Human Press.
- Lichter, P., & Ward, D. (1990). Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature* , 345, 93-94.
- Lichter, P., & Cremer, T. (1992). Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization. In *Human Cytogenetics: a practical approach*. Oxford: IRL Oxford.
- Lin, P., & Medeiros, J. (2005). Molecular Genetic Abnormalities in Acute and Chronic Leukemias. In W. Coleman, & G. Tsongalis, *Molecular Genetic Abnormalities in Acute and Chronic Leukemias in Molecular Diagnosis: for the Clinical Laboratorian* (2nd Edition ed., pp. 10-22). New Jersey: Humana Press.

Lorentz, C., Wienben, E., Tefferi, A., Whiteman, D., & Dewald, G. (2002). History of Genetics and Sequencing of the Human Genome. *Mayo Clin. Proc.* , 77, 773-782.

Lu, G., Kong, Y., Yue, C., & . (2010). Genetic and immunophenotypic profile of IGH@ rearrangement detected by fluorescence in situ hybridization in 149 cases of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 196, 56-63.

Malcovati, L., & Cazzola, M. (2008). Myelodysplastic/myeloproliferative disorders. *Haematologica* , 93 (1), 4-6.

Malpas, J., Bergsagel, D., Kyle, R., & Anderson, K. (2004). *Myeloma: biology and management*. Philadelphia: Saunders.

Mardis, E., Ding, L., Dooling, D., Larson, D., McLellan, M., Chen, K., et al. (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia group. *N. Engl. J. Med.* , 361, 1058-1066.

Martinez, G. (2007). Fatores prognósticos no mieloma múltiplo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , 29(1), 27-30.

Martin-Subero, J., Klapper, W., Sotnikova, A., Callet-Bauchu, E., Harder, L., Bastard, C., et al. (2006). Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* , 66(21), 10332-10338.

Mayr, C., Speicher, M., Kofler, D., Buhmann, R., Strehl, J., Busch, R., et al. (2006). Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* , 107(2), 742-751.

McGrattan, P., Humphreys, M., Hull, D., & McMullin, M. (2007). Transformation of cytogenetically normal chronic myelomonocytic leukaemia to an acute myeloid leukaemia and the emergence of a novel +13, +15 double trisomy resulting in an adverse outcome. *The Ulster Medical Society* , 76(3), 131-135.

McKenna, R., Kyle, R., Kuehl, W., Grogan, T., Harris, N., & Coupland, R. (2008). Plasma cell neoplasms. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 200-207). Lyon: IARC.

Méhes, G. (2005). Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathology Oncology Research* , 11(4), 205-210.

- Melchers, F., Coutinho, A., Heinrich, G., & Andersson, J. (2006). Continuous Growth of Mitogen-Reactive B Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* , 4, 853-858.
- Mikkelsen, M., & Nielsen, K. B. (1992). Karyotype analysis and chromosome disorders. In D. J. Brock, C. H. Radeck, & M. A. Fergunson-Smith, *Prenatal diagnosis and screening*. Edinburg: Churchill Livingstone.
- Millecker, L., Lennon, P., Verstovsek, S., Barkoh, B., Galbincea, J., Hu, P., et al. (2010). Distinct patterns of cytogenetic and clinical progression in chronic myeloproliferative neoplasms with or without JAK2 or MPL mutations. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 197, 1-7.
- Miller, D. A., Dev, V. G., Tantravahi, R., & Miller, O. J. (1976). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.* , 101: 235-243.
- Mohammed, A. (2009). *Obgynacademy*. Obtido em 2010, de <http://obgynacademy.com>
- Monte-Mór, B., & Costa, F. (2008). A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , 30 (3), 241-248.
- Montgomery, K., Keitges, E., & Meyne, J. (1997). Molecular Cytogenetics: definitions, clinical aspects and protocols. In M. Barch, T. Knutsen, & J. Spurbeck, *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (3rd Edition ed., pp. 557-590). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Moreno, C., & Montserrat, E. (2010). Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: what's ready for prime time use? *Haematologica* , 95(1), 12-15.
- Morton. (1994). *Current protocols in Human Genetics*. Current Protocols.
- Morton, L., Turner, J., Cerhan, J., Linet, M., Treseler, P., Clarke, C., et al. (2007). Proposed classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research from the Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood* , 110, 695-708.
- Muhlmann, M. (2002). Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. Application in tissue sections and cell suspensions. *Genetics and Molecular Research* , 1(2), 117-127.
- Muller, Eder, V., Wienberg, J., & . (2004). A nonredundant multicolor bar code as a screening tool for rearrangements in neoplasia. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 39, 59-70.

- Muller, S., O'Brien, P., Ferguson-Smith, M., & Wienberg, J. (1998). Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* , 33, 445-452.
- Muller., Rocchi, M., Ferguson-Smith, M., & . (1997). Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* , 100, 271-278.
- Muller-Hermelink, H., Monteserrat, E., Catovsky, D., Campo, E., Harris, N., & Stein, H. (2008). Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 180-182). Lyon: IARC.
- Nagel, I., Akasaka, T., Klapper, W., Gesk, S., Bottcher, S., Ritgen, M., et al. (2009). Identification of the gene encoding cyclin E1 (CCNE1) as a novel IGH translocation partner in t(14;19)(q32;q12) in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologia* , 94(7), 1020-1023.
- Nascimento, M., Yamamoto, M., Rodrigues, M., Franco, L., Kimura, E., Vasconcelos, Y., et al. (2006). CLL: chromosomal abnormalities (FISH) and their relation with clinical stage, CD38 and ZAP-70. *Rev Bras Hematol Hemoter* , 28(1), 5-10.
- Nasedkina, T., Domer, P., Zharinov, V., Hoberg, J., Lysov, Y., & Mirzabekov, A. (2002). Identification of chromosomal translocations in leukemias by hibridization with oligonucleotide microarrays. *Haematologica* , 87, 363-372.
- Nimer, S. (2008). Myelodysplastic syndromes. *Blood* , 111(10), 4841-4851.
- Nimura, T., Miura, I., Kobayashi, Y., Yoshioka, T., Kume, M., Takahashi, N., et al. (2003). Cytogenetic study of 48 patients with multiple myeloma and related disorders. *J. Clin. Exp. Hematopathol.* , 43(2), 53-59.
- Nolte, F., & Hofmann, W. (2008). Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol* , 87, 777-795.
- Oliveira, F., Tone, L., Simões, B., Falcão, R., Brassesco, M., Sakamoto-Hojo, E., et al. (2007). Acute myeloid leukemia (AML-M2) with t(5;11)(q35;q13) and normal expression of cyclin D1. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 172, 154-157.

Olney, H., & Le Beau, M. (2006). Cytogenetic Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes. In H. Deeg, D. Bowen, S. Gore, T. Haferlach, M. Le Beau, & C. Niemeyer, *Hematologic Malignancies: Myelodysplastic Syndromes* (pp. 55-80). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.

Onida, F., Kantarjian, H., Smith, T., Ball, G., Keating, M., Estey, E., et al. (2002). Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood*, 99(3), 840-849.

Orazi, A., Bennett, J., Germing, U., Brunning, R., Bain, B., & Thiele, J. (2008). Chronic myelomonocytic leukemia. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 76-79). Lyon: IARC.

Oscier, D., Gardiner, A., Mould, S., & . (1996). Structural abnormalities of chromosome 7q in chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer Genetic and Cytogenetic*, 92, 24-27.

Palanduz, S., Çefle, K., Aktan, M., Tutkan, G., Ozturk, S., & Pekçelen, Y. (2000). A case of Chronic Lymphocytic Leukemia with constitutional pericentric inversion of chromosome 1. *Cancer Genet Cytogenet*, 118, 62-64.

Pérot, C., & Huret, J. (December de 1998). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. Obtido em 2010, de <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0816.html>

Pratibha, K., Hemani, J., Purvish, P., Tapan, S., Sandhya, A., & Indu, A. (2007). Emergence of an unrelated highly aberrant clone in an AML patient at relapse four months after peripheral blood stem cell transplantation. *Indian Journal of Human Genetics*, 13(3), 114-118.

Quitero-Rivera, F., Nooraie, F., Rao, P., & . (2009). Frequency of 5'IGH deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 190, 33-39.

Rice, L., & Popat, U. (2005). Every case of essential thrombocythemia should be tested for the Philadelphia chromosome. *American Journal Hematology*, 78, 71-73.

Richebourg, S., Eclache, V., Perot, C., Portnoi, M., Van den Akker, J., Terré, C., et al. (2008). Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 182, 95-102.

- Richebourg, S., Plantier, I., Soenen-Cornu, V., Renneville, A., & Lai, J. (2008). Chronic myeloproliferative disorder with t(8;22)(p11;q11) can mime clonal cytogenetic evolution of authentic chronic myelogenous leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 47, 915-918.
- Ried, T., Schrock, E., Ning, Y., & Wienberg, J. (1998). Chromosome painting: a useful art. *Human Molecular Genetics* , 7 (10), 1619-1626.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., & . (1998). *Immunology*. London: International Limited.
- Rooney, D. E. (2001). *Human Cytogenetics: constitutional analysis*. Oxford: Oxford University Press.
- Roulston, D., & Le Beau, M. (1997). Cytogenetics analysis of hematologic malignant diseases. In M. Barch, T. Knutsen, & J. Spurbeck, *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (3rd Edition ed., pp. 325-374). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Sagrillo, M., Cardoso, S., Silva, L., Graça, C., Ferreira, E., Hamerschlak, N., et al. (2005). Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* , 27(2), 94-101.
- Schwaenen, C., Viardot, A., Berger, H., Barth, T., Bentink, S., Dohner, H., et al. (2009). Microarray based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with patient survival and gene expression status. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 48, 39-54.
- Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, P. (2000). *Practical in situ Hybridization*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Seeley, R., Stephens, T., & Tate, P. (1997). *Anatomia e Fisiologia*. Lisboa: Lusodidacta.
- Serakinci, N., & Kolvraa, S. (2009). Molecular cytogenetic applications in diagnosis and research: an overview. In T. Liehr, *Fluorescence in situ hybridization (FISH) - application guide* (p. 3). Berlin: Springer.
- Shaffer, L. G., & Tommerup, N. (2005). *ISCN 2005 - An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: S. Karger.
- Smeets, D. (2004). Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical biochemistry* , 37, pp. 439-446.

Smith, D., Burthem, J., & Whetton, A. (25 de November de 2003). *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Obtido em 2010, de Journals Cambridge: <http://www.expertreviews.org>

Speicher, M., & Carter, N. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews* , 6, pp. 782-792.

Stanyon, R., Rocchi, M., Capozzi, O., Roberto, R., Misceo, D., Ventura, M., et al. (2008). Primate chromosome evolution: ancestral karyotypes, marker order and neocentromeres. *Chromosome Research* , 16, 17-39.

Steensma, D., & List, A. (2005). Genetic testing in the myelodysplastic syndromes: molecular insights into hematologic diversity. *Mayo Clin Proc* , 80(5), 681-698.

Stein, H. (2008). Hodgkin lymphoma. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (p. 322). Lyon: IARC.

Stone, R. (2004). AML: current landscape and future directions. *Hematology* , 98-101.

Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S. H., Thiele, J., et al. (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC.

Swerdlow, S., Campo, E., Seto, M., & Muller-Hermelink, H. (2008). Mantle cell lymphoma. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. H. Pileri, J. Thiele, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 229-232). Lyon: IARC.

Tefferi, A., & O'Brien, S. (2007). Chronic lymphocytic leukemia in 2007: prognostic factors and therapeutic approaches. *Community Oncology* , 4(12), 11-16.

Teixeira, & Heim, S. (2005). Multiple numerical chromosome aberrations in cancer: what are their causes and what are their consequences? *Seminars in Cancer Biology* , 15, 3-12.

Teixeira, M., Micci, F., Dietrich, C., & Heim, S. (2000). Detailed genome-wide screening for inter- and intrachromosomal abnormalities by sequential g-banding and RxFISH color banding of the same metaphase cells. *Cancer Genet Cytogenet* , 119, 94-101.

Teixeira, M. (2002). Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *European Journal of Cancer* , 38, 1580-1584.

Tonnies, H. (2002). Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnosis. *TRENDS in Molecular Medicine*, 8 (6), pp. 246 - 250.

Trakhtenbrot, L., Hardan, I., Koren-Michowitz, M., Oren, S., Yshoev, G., Rechavi, G., et al. (2010). Correlation between losses of IGH or its segments and deletions of 13q14 in t(11;14)(q13;q32) multiple myeloma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 49, 17-27.

van Dyke, D. (September de 2003). *+18 or trisomy 18 in lymphoproliferative disorders*. Obtido em 2010, de Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/Tri18ID2030.html>

van Roy, N., Mangelschots, K., & Speleman, F. (2010). *Invitrogen*. Obtido de <http://www.invitrogen.com>

vanDyke, D. (January de 2001). *Y loss in leukemia*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/YlossID1089.html>

Vardiman, J., Brunning, R., Arber, D., Le Beau, M., Porwit, A., Tefferi, A., et al. (2008). Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. Pileri, H. Stein, et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (pp. 17-31). Lyon: IARC.

Vardiman, J., Thiele, J., Arber, D., Brunning, R., Borowitz, M., Porwit, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114, 937-951.

Varma, N., & Varma, S. (2008). Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 51 (1), 97-100.

Verma, R., & Babu, A. (1995). *Human Chromosomes: principles and techniques*. EUA: McGraw-Hill.

Viguié, F. (May de 2005). *t(4;14)(p16;q32)*. . Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t04142059.html>

- VinSheth, F., Sheth, J., Patel, A., Shah, A., & verhest, A. (2002). Usefulness of cytogenetics in leukemias. *Indian Journal of Cancer* , 39(4), 139-142.
- Vizmanos, J. (July de 2005). *PDGFRB (platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide)*. Obtido em 2010, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PDGFRBID21ch5q32.html>
- Vogel, & Motulsky. (1997). *Human Genetics - problems and approaches*. Berlin: Springer.
- Volpi, E., & Bridger, J. (2008). FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques* , 45 (4), pp. 385-409.
- von Bubnoff, N., & Duyster, J. (2010). Chronic Myelogenous Leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int* , 107(7), 114-121.
- Vorsanova, S., Yurov, Y., Iourov, I., & . (2010). Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Molecular Cytogenetics* , 3(1).
- Wang, H., Wang, X.-Q., Xu, X.-P., & Lin, G.-W. (2010). Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 196, 159-166.
- Wang, S., Jabbar, K., Chen, S., Galili, N., Vega, F., Jones, D., et al. (2010). Trisomy in myelodysplastic syndromes defines a unique group of disease with aggressive clinicopathologic features. *Leukemia* , 24, 740-747.
- Wang, Y., Bagg, A., Pear, W., Nowell, P., & Hess, J. (2001). Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes, Chromosomes and Cancer* , 32, 97-111.
- Watt, J. L., & Stephen, G. S. (1986). Lymphocyte culture for chromosome analysis. In D. E. Rooney, & B. H. Czepulkowski, *Human Cytogenetics*. Oxford: Oxford University Press.
- Weh, H., Seeger, D., Junge, I., & Hossfeld, D. (1996). Trisomy 8 preceding diagnosis of acute nonlymphocytic leukemia by 2 years in a patient with multiple myeloma without cytological evidence of myelodysplasia. *Ann. Hematol.* , 72, 81-82.
- Weise, A., Mrasek, K., Fickelscher, I., Claussen, U., Cheung, S., Cai, W., et al. (2008). Molecular definition of high-resolution multicolor banding probes: first within the human DNA sequence anchored FISH banding probe set. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* , 56 (5), 487-493.

Wiktor, A., & Dyke, D. (2004). Combined cytogenetic testing and fluorescence in situ hybridization analysis in the study of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* , 153, 73-76.

Yamamoto, K., Okamura, A., Minagawa, K., Yakushijin, K., Urahama, N., Gomyo, H., et al. (2003). A novel t(2;6)(p12;q23) appearing during transformation of follicular lymphoma with t(18;22)(q21;q11) to diffuse large cell lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 147, 128-133.

Zamecnikova, A. (February de 2010). t(2;14)(p13-16;q32). Obtido em 2010, de Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0214p13q32ID1231.html>

Zamora, L., Espinet, B., Salido, M., Florensa, L., Woessner, S., Pedro, C., et al. (2002). Monosomy 15 in chronic myelomonocytic leukemia: description of a case and review of the literature. *Cancer, Genetics and Cytogenetics* , 134, 165-167.