

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

GIOVANA DE OLIVEIRA KOLLER

CITOGENÉTICA DE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS DERIVADAS DE  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BAURU

2019

GIOVANA DE OLIVEIRA KOLLER

CITOGENÉTICA DE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS DERIVADAS DE  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
para obtenção do título de bacharel em  
Biomedicina - Universidade do Sagrado  
Coração.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> Daniela Barbosa  
Nicolielo.

BAURU

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo  
com ISBD

K814c	<p>Koller, Giovana de Oliveira</p> <p>Citogenética de linhagens de células tumorais derivadas de carcinoma epidermóide de boca: Revisão bibliográfica / Giovana de Oliveira Koller. -- 2019. 30f.</p> <p>Orientadora: Prof.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Daniela Barbosa Nicolielo</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Análise citogenética. 2. Carcinoma epidermóide de boca. 3. Linhagens de células tumorais. 4. Alterações cromossômicas. I. Nicolielo, Daniela Barbosa. II. Título.</p>
-------	---

GIOVANA DE OLIVEIRA KOLLER

CITOGENÉTICA DE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS DERIVADAS DE  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como parte dos requisitos  
para obtenção do título de bacharel em  
Biomedicina - Universidade do Sagrado  
Coração.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> Daniela Barbosa Nicolielo.  
(Orientadora)  
Universidade do Sagrado Coração

---

Ma. Nathália Martins Lopes  
Faculdade de Odontologia de Bauru

Dedico aos meus pais, por  
serem os meus  
maiores incentivadores.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me permitido estar onde estou hoje. Por me sustentar nos períodos mais difíceis e complicados da graduação, me dando forças pra continuar e conquistar meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, João e Keila que me apoiaram em todos os momentos durante esses quatro anos, me mantendo emocional e financeiramente para que pudesse ter a oportunidade de cursar um curso superior. Sei de todas as dificuldades que passaram para que eu chegasse até aqui, sou extremamente grata pelo exemplo de vida que são para mim.

A equipe do Laboratório Genos, onde fiz estágio durante 3 anos da minha faculdade e tive a oportunidade de me inserir no mercado de trabalho adquirindo experiência profissional e de vida. Principalmente a Lívia por todo suporte, amizade e por acreditar no meu potencial, a Nathália por ter me dado uma grande oportunidade de crescimento acadêmico e ser mais que uma coorientadora, mas também uma amiga e ao Vinicius meu colega de bancada que se tornou um grande amigo.

Aos meus amigos de caminhada: Alícia, Gabriella, Geovana, Kaena, Lucas e Lucas Matheus principalmente, que estiveram junto comigo em todos os momentos durante esses anos, tanto nas horas ruins quanto nas horas boas, agradeço imensamente pelo privilégio de ter conhecido e convivido com vocês e pelos ensinamentos e lembranças que levarei comigo.

Ao meu querido namorado Renan, que tem me aguentado durante essa loucura que tem sido o último ano de faculdade, me sustentando e me ajudando em tudo que era possível.

E por fim, agradeço pela amizade e carinho de tantos outros que estiveram comigo durante esses 4 anos, incluindo professores que foram muito além dos ensinamentos dados em sala de aula, mas nos prepararam para enfrentar novos desafios nessa loucura que chamamos de vida.

“Sonho que se sonha só é apenas um sonho, mas sonho que se sonha junto é realidade” (Raul Seixas)

## RESUMO

A análise citogenética é considerada uma ferramenta importante na caracterização de linhagens celulares possuindo critérios que possibilitam sua identificação, relacionando-as com a espécie e o sexo do qual foram derivadas. Através dessa técnica é possível distinguir entre células normais e transformadas, pelo número de cromossomos que é mais estável em células humanas normais. Em linhagens de células tumorais, a análise citogenética é um método rápido e barato de classificar as células tumorais com base em seus padrões distintos de rearranjos cromossômicos recorrentes. O presente estudo pretende realizar uma revisão de literatura sobre a caracterização citogenética de linhagens de células tumorais, a fim de abordar a técnica de citogenética e sua aplicação na caracterização de linhagens de células tumorais geradas a partir de amostras de carcinoma epidermóide de boca (CEB). Este trabalho foi elaborado adotando a estratégia metodológica revisão de literatura sobre o tema proposto, visto que tal revisão possibilita sintetizar as pesquisas e obter uma análise aprofundada a partir do tema de interesse. Ao revisar a caracterização citogenética das linhagens de células derivadas de CEB, observou-se em todos os artigos utilizados a descrição de cariótipos complexos com múltiplos rearranjos estruturais e alterações numéricas resultando em desequilíbrios genômicos. As principais alterações apresentadas incluem perda dos braços cromossômicos, ganho de material nos braços cromossômicos, presença de isocromossomos, translocações de braços inteiros envolvendo ponto de quebras e a presença de aneuploidias que são alterações cromossômicas numéricas que se caracterizam pela adição ou deleção de cromossomos, que são frequentemente encontradas em linhagens celulares de CEB.

Palavras-chave: Análise citogenética. Carcinoma epidermóide de boca. Linhagem de células tumorais. Alterações cromossômicas.



## **ABSTRACT**

Cytogenetic analysis is considered an important tool in the characterization of cell lines with criteria that allow their identification, relating them to the species and sex which they were derived. Through this technique it is possible distinguish a normal and transformed cells by the number of chromosomes that are more stable in normal human cells. In tumor cells line, the cytogenetic analysis is a fast and cheap method of classifying the tumor cells based on their distinct patterns of recurrent chromosomal rearrangements. The present study intends to conduct a literature review about the cytogenetic characterization of tumor cell lines, in order to approach the cytogenetic technique and their application in the characterization of tumor cell strains generated from oral squamous cell carcinoma (OSCC) sample. This task was elaborated adopting the methodologic strategy review of literature on the propose theme, whereas this review makes it possible to synthesize researches and have a deeper analysis by the interest topic. Reviewing the cytogenetic characterization of cell lines derived by OSSC, it was observed in all used articles the complex karyotypes description with multiple structural rearrangement and numerical changes, resulting in genomic imbalances. The main changes presented include loss of chromosome arms, material gain on chromosomal arms, isochromosome presence, translocation of entire arms involving breaking point and aneuploidy presence that are chromosome numbers alteration, featured by addition or deletion of chromosomes which are found in OSCC cell lines.

Keywords: Cytogenetic Analysis. Oral squamous cell carcinoma. Tumor cell. Lines. Chromosomal changes

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEB	Carcinoma epidermóide de boca
CECP	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
CGH	Hibridação genômica comparativa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FISH	Hibridação in situ por fluorescência
GTG	Bandamento G
HPV	Papilomavírus Humano
SKY	Cariotipagem espectral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>11</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	11
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	11
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>12</b>
3.1	LEVANTAMENTO DE DADOS.....	12
3.2	ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE DADOS .....	13
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
4.1	ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	14
4.2	CORRELAÇÃO ENTRE GENÉTICA E O CÂNCER.....	16
4.3	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA.....	17
4.4	CITOGENÉTICA DE LINHAGENS CELULARES.....	18
4.5	CITOGENÉTICA DE CEB .....	19
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer oral está entre as principais neoplasias do mundo, atingindo milhares de novos casos por ano (BRAY et al., 2018), o que reforça a importância do estudo sobre os fatores que implicam em sua propagação nos tecidos comprometidos (GASPAROTTO et al., 2011). O carcinoma epidermóide de boca (CEB), é uma neoplasia maligna muito comum com baixa estimativa de sobrevivência global (SILVA et al., 2012), e seu fator prognóstico de maior evidência é o surgimento de metástases em linfonodos cervicais, presentes em 50% dos diagnósticos (VAN DER WAAL, 2009). A carcinogênese é um processo de muitas etapas que envolvem diversas alterações genéticas que iniciam as mudanças fenotípicas (CHIESA et al., 1999). A exposição da mucosa bucal ao tabaco e álcool é considerado o principal fator de risco para o CEB (JIN e JIN, 2007). Outro fator de risco independente é a infecção oral por HPV sendo um fator significativo para o surgimento e progressão da neoplasia (FELLER et al., 2010; D'SOUZA e DEMPSEY, 2011).

De modo geral, a pesquisa científica sobre o desenvolvimento, progressão e tratamento do câncer utiliza-se de muitos modelos *in vitro* baseados em culturas de linhagens de células tumorais.

A análise citogenética é considerada uma ferramenta importante na caracterização de linhagens celulares. O cariótipo possui critérios que possibilitam a identificação das linhagens celulares, relacionando-as com a espécie e o sexo do qual foram derivadas (FRESHNEY, 2010; CREE, 2011). A análise cromossômica é capaz de distinguir entre células normais e transformadas, porque o número de cromossomos é mais estável em células humanas normais (FRESHNEY, 2010). Em linhagens de células tumorais, a análise citogenética é um método rápido e barato de classificar as células tumorais com base em seus padrões distintos de rearranjos cromossômicos recorrentes. Além disso, os dados citogenéticos permitem a detecção de subpopulações distintas dentro das linhagens tumorais e a monitorização da estabilidade das mesmas (CREE, 2011).

O presente estudo realizou uma revisão de literatura sobre a citogenética aplicada a caracterização das linhagens de células tumorais derivadas de CEB, considerando seu potencial como ferramenta para o diagnóstico do câncer.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar uma revisão de literatura sobre a citogenética de linhagens de células tumorais derivadas de CEB.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Propôs-se a:

- a. Revisar a literatura sobre a técnica de citogenética em linhagens de células;
- b. Correlacionar a citogenética e o câncer;
- c. Revisar a literatura sobre o CEB;
- d. Relacionar as linhagens de células derivadas de CEB caracterizadas citogeneticamente.

### 3 METODOLOGIA

Os artigos de revisão de literatura são um modelo de pesquisa realizadas a partir de fontes de informações bibliográficas ou eletrônicas para obtenção e compilação de resultados de pesquisas de outros autores, a fim de fundamentar teoricamente um determinado trabalho (ROTHER, 2007).

A pesquisa bibliográfica busca compreender um tema com base em referências teóricas publicadas por outros autores em livros, revistas, periódicos e outros, analisando conteúdos científicos sobre o tema de escolha (MARTINS, 2001), propiciando a elaboração de um novo trabalho baseado em diversas publicações apresentando uma nova perspectiva ou abordagem, podendo chegar a novas conclusões.

Este trabalho foi elaborado anotando a estratégia metodológica revisão de literatura sobre o tema proposto: citogenética de linhagens de células tumorais derivadas de CEB, visto que tal revisão possibilita sintetizar as pesquisas e obter uma análise aprofundada a partir do tema de interesse.

#### 3.1 LEVANTAMENTO DE DADOS

O levantamento de dados foi realizado através de consulta a publicações de autores de destaque na área e posterior leitura dos títulos e dos resumos.

Como critérios de inclusão das referências bibliográficas, foram utilizados trabalhos publicados no idioma inglês nas bases de dados PUBMED, idioma português na base de dados Scielo e Google acadêmico, utilização de livros, atlas, revistas científicas e conteúdos disponíveis em teses de mestrado.

Foram definidos os seguintes descritores para a busca bibliográfica: Carcinoma epidermóide de boca, Análise citogenética, Linhagens de células tumorais e Alterações cromossômicas.

Os títulos foram selecionados a partir de leitura dos artigos, livros, teses e dissertações encontradas nas bases de dados e ademais fontes. A pesquisa foi realizada em um total de 52 artigos científicos sobre a temática, sendo acessados 17 artigos na base de dados PUBMED; 13 artigos acessados na base de dados Google acadêmico; 2 artigo acessado na base de dados Scielo; 6 revistas científicas, 2 teses disponíveis digitalmente; 9 livros que abordam a temática, 2 jornais científicos e 1 atlas disponível digitalmente.

### 3.2 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE DADOS

Nesta etapa foi realizada uma leitura prévia analisando as publicações obtidas com a finalidade de compilar as informações contidas nas fontes, de forma que estas possibilitassem a obtenção de maior elucidação sobre a temática do trabalho.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA

A citogenética é o ramo da genética que estuda, principalmente a função, estrutura e hereditariedade dos cromossomos sendo constituída pela citogenética clássica, que envolve a cultura de células, e molecular que independe de divisão celular, baseando-se na análise do DNA, compreendendo as técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), hibridação genômica comparativa (CGH) e cariotipagem espectral (SKY), dentre outras (CHAUFFAILLE, 2005).

O genoma humano possui um número específico de cromossomos, que são estruturas formadas por uma molécula de DNA associada a proteínas. O conjunto de 23 pares é composto por 22 pares de autossomos ou cromossomos somáticos e 1 par de cromossomos sexuais (NUSSBAUM; WILLARD, 2004).

A citogenética clássica realiza a análise dos cromossomos durante a fase de metáfase da mitose (HASSOLD; HUNT, 2000).

Os cromossomos metafásicos são os mais adequados para a realização da análise citogenética, já que apresentam alto grau de condensação, facilitando identificação, diferenciação e contagem dos cromossomos (GUERRA e SOUZA, 2002). São constituídos por duas cromátides irmãs ligadas por uma região denominada centrômero. Este divide o cromossomo em braço curto (p) e braço longo (q) podendo estar localizado no meio do cromossomo (metacêntrico), deslocado do centro (submetacêntrico) ou localizado na região terminal do cromossomo (acrocêntrico) (LEVAN et al., 1964).

Além das anomalias cromossômicas hereditárias, podem ocorrer irregularidades durante as divisões celulares na embriogênese, anormalidades cromossômicas que levam a alterações no fenótipo do indivíduo (CARAKUSHANSKY, 2001).

As alterações cromossômicas podem afetar tanto cromossomos autossomos quanto sexuais e são classificadas em duas categorias: as alterações numéricas e estruturais. As alterações numéricas podem ser euploidias, aumento ou diminuição de todo um conjunto cromossômico ou as aneuploidias caracterizadas pela adição ou deleção de cromossomos ao genoma do indivíduo (NUSSBAUM; WILLARD, 2004).



Já as alterações estruturais afetam a estrutura molecular do DNA devido a quebras nos cromossomos que podem ocorrer em vários pontos. Esse evento resultará em um rearranjo estrutural equilibrado, quando não modificar o material genético ou em um rearranjo não-equilibrado quando houver perda ou adição de material genético. Os principais tipos de alterações cromossômicas estruturais são: deleção, adição, inversão, duplicação, translocações e isocromossomos (NUSSBAUM; WILLARD, 2004).

O cariótipo é a representação total dos cromossomos de um indivíduo presentes em uma célula, ordenados em pares homólogos (NUSSBAUM, et al., 2002). Ele pode ser realizado a partir de diversos tipos de tecidos, sendo os mais comumente utilizados: sangue periférico, medula óssea, líquido amniótico, pele, tumores sólidos e tecidos fetais (GUERRA, 1988).

A metodologia utilizada para a análise de um cariótipo é iniciada pelo cultivo celular visando a obtenção das células em divisão celular por meio do uso de reagentes específicos. O fuso mitótico é rompido para interromper a divisão celular em metáfase, fase de interesse para a citogenética. Às células em suspensão é adicionado uma solução hipotônica que permite a entrada de água nas células por osmose deixando-as túrgidas, induzindo a ruptura da membrana plasmática celular durante a preparação das lâminas após a etapa de fixação.

O bandamento GTG (ou bandamento G) é realizado para possibilitar a análise dos cromossomos segundo seu padrão de bandas (claras e escuras), identificando-os de acordo com seu número e grupo, permitindo a observação de alterações em seu tamanho, estrutura, e posição do centrômero (SEABRIGTH, 1970).

Os cromossomos humanos são classificados em 7 grupos, sendo que cada par apresenta seu próprio padrão de bandas. O grupo A é composto por 3 pares de cromossomos, sendo dois deles metacêntricos (cromossomo 1 e cromossomo 3) e um submetacêntrico (cromossomos 2); o grupo B é formado por 2 pares de cromossomos submetacêntricos (cromossomo 4 e cromossomo 5); o grupo C composto por 7 pares de cromossomos submetacêntricos (cromossomos 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) e o cromossomo X sexual que se apresenta em par em um cariótipo feminino e individual em um cariótipo masculino, o grupo D é composto por 3 pares de cromossomos acrocêntricos (cromossomos 13, 14 e 15); o grupo E é composto por 3 pares de cromossomos submetacêntricos (cromossomos 16, 17 e 18); o grupo F é formado por 2 pares de cromossomos metacêntricos (cromossomos 19 e 20); o

grupo G é formado por 2 pares de cromossomos acrocêntricos denominados 21 e 22 e, em cariótipos masculinos o cromossomo Y sexual.

#### 4.2 CORRELAÇÃO ENTRE GENÉTICA E O CÂNCER

O surgimento do câncer não pode ser considerado um fator isolado, já que deve ocorrer um conjunto de eventos para que haja o desenvolvimento, com constantes alterações genéticas para que ocorra o estabelecimento de células malignas (SOLOMON et al., 1991).

A carcinogênese é definida pela alteração de uma célula normal em uma célula neoplásica. É considerada um processo de muitas etapas, as quais envolvem múltiplas alterações genéticas que iniciam as mudanças fenotípicas. Fatores clínicos, histomorfológicos e moleculares fornecem informações sobre o desenvolvimento neoplásico, podendo ser considerados como indicadores biológicos de agressividade do tumor (CHIESA et al., 1999).

O processo de carcinogênese é caracterizado pela fase de iniciação com dano irreversível no DNA provocados por diversos fatores incluindo os genéticos (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989), a fase de promoção com proliferação celular exacerbada das células alteradas decorrente de um estímulo (PITOT; DRAGAN, 1991) e fase de progressão caracterizada pela irreversibilidade que essas alterações genéticas conferem às células, com alto poder proliferativo e capacidade invasiva e metastática (SOLOMON et al., 1991).

Há três categorias de genes envolvidos na carcinogênese os proto-oncogenes que são promotores de crescimento, os anti-oncogenes que são supressores tumorais e os genes reguladores de apoptose (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989).

A maioria dos eventos genéticos causadores de câncer, ocorre nos tecidos somáticos durante a vida, podendo sofrer alteração por conta da exposição a carcinógenos. Como estes eventos genéticos ocorrem nas células somáticas, não são transmitidos para futuras gerações (JORDE et al., 2000).

Quando as mutações ocorrem em células germinativas, os genes causadores são transmitidos de uma geração para outra, predispondo-as ao câncer. Em geral, as mutações de genes específicos se acumulam em células somáticas e com o passar dos anos perdem um número essencial de mecanismos de controle de crescimento, iniciando a formação do tumor (JORDE et al., 2000).

A frequência das mutações pode ser alterada ainda por fatores ambientais, sendo que vários deles foram identificados com propriedades carcinogênicas (JORDE et al 2000). Os mais relevantes são o uso do tabaco e ingestão de bebidas alcoólicas (JIN e JIN, 2007).

A análise citogenética das células malignas representou o início de um dos maiores avanços sobre a natureza biológica das neoplasias, com sua implicação prognóstica tornando possível a determinação segura e confiável dos pares de cromossomos e a detecção da natureza das aberrações cromossômicas de diversas formas neoplásicas (GRIFFITH et al., 2008).

Segundo Wan, (2014) o cariótipo de uma única célula ainda é a maneira mais fácil de entender a relação entre evolução clonal e progressão da doença (WAN, 2014).

Nas últimas décadas, a acumulação de dados genéticos demonstrou estar intimamente associado ao diagnóstico de neoplasias, movendo assim a citogenética do câncer em laboratórios de pesquisa e na prática clínica (WAN, 2014).

O cariótipo de medula óssea é um dos métodos bastante utilizado quando se refere a neoplasias. Pelas alterações cromossômicas apresentarem papel fundamental na patogênese, a citogenética é realizada para investigar casos de neoplasias hematológicas, já que possuem valor diagnóstico e, prognóstico além de auxiliar a definir o tratamento de muitos distúrbios (PELLOSO, 2003).

#### 4.3 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

O câncer oral classifica-se como um dos dez principais tipos de câncer no mundo com ampla distribuição geográfica representando aproximadamente 5% dos cânceres em homens e 2% em mulheres (JIN et al., 2007).

O CEB representa 90% das neoplasias bucais malignas e afeta principalmente homens em uma faixa etária acima de 40 anos e fumantes (HECHT, 2003; HUANG et al. 2007; RIVERA, 2015). É um subgrupo do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) sendo a neoplasia maligna mais comum nesta região, apresenta baixa estimativa de sobrevida global em cinco anos, que varia de 44 a 55% (SILVA et al., 2012). É considerada uma neoplasia agressiva e responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade (PETERSEN, 2009), com baixa taxa de sobrevida global em cinco anos, menor que 60% (NG et al., 2016).

Surge através de diversas alterações genéticas, geralmente como resultado da exposição a agentes ambientais, como o uso do tabaco, bebidas alcoólicas e vírus, incluindo papilomavírus (FORASTIERE et al., 2001).

É um tumor maligno do epitélio pavimentoso da cavidade oral, apresentando diferentes graus de diferenciação escamosa surgindo lesões brancas, eritroplásicas ou ulcerações na mucosa, particularmente nos tecidos moles orais incluindo mucosa gengival e alveolar, assoalho da boca, língua, palato mole e duro, amígdalas e orofaringe (JIN et al., 2007). Segundo o Ministério da Saúde, a neoplasia geralmente se caracteriza pelo rompimento do epitélio, com formação de uma úlcera de consistência e base endurecida, e raramente apresenta consistência mole, que mais comumente ocorre nas lesões herpéticas e traumáticas, assim como as aftas. O carcinoma exhibe normalmente um fundo granuloso e grosseiro, com bordas elevadas circundando a lesão.

Sabe-se que pacientes com neoplasias orais possuem propensão a ter um segundo tumor no trato digestivo superior, relatado em até 35% dos casos e metástases linfonodais precoces e extensas que estão relacionados com falhas de tratamento (JIN et al., 2005). Tal fator prognóstico está presente no diagnóstico em 50% dos casos (RHODUS et al., 2014).

A grande maioria das neoplasias relacionadas ao CECP, o que inclui o CEB, é caracterizada por apresentar cariótipos complexos, com padrão claramente não aleatório de perdas e ganhos cromossômicos, as quais se desenvolvem pelo acúmulo de múltiplas aberrações genéticas (JIN et al., 2006).

#### 4.4 CITOGENÉTICA DE LINHAGENS CELULARES

A cultura de células animais (cultura de tecidos ou de células sanguíneas/hematopoiéticas ou outras) inicia-se pela dispersão das células obtidas a partir de um fragmento de tecido em um meio nutritivo apropriado, colocado em frasco ou placa de cultura, após o que se verifica que a maioria das células adere à superfície sólida e cresce em monocamada ou em suspensão (CRUZ, 2009).

Segundo Ross Harrison a metodologia de cultura de tecidos foi iniciada de modo a estudar o comportamento das células animais quando livres das restrições impostas pelo ambiente em que naturalmente existem em condições de homeostasia, mas também sob o stress de uma experiência laboratorial. Estas técnicas, inicialmente aplicadas a fragmentos de tecidos sólidos, sofreram avanços

significativas impulsionadas pelas pesquisas iniciadas em oncologia, dada a crescente necessidade de um conhecimento mais profundo nesta área (LINDEE, 2007).

Experimentos com células representam uma importante ferramenta para caracterizar os eventos que possibilitam as células superar o controle normal que estão envolvidos na transformação celular e comparar o comportamento coletivo de linhagens celulares normais e tumorais. As propriedades de transformação e da imortalização de células em cultura proporcionam um modelo para o estudo da formação de tumores em animais e no homem (VILELA, 2003).

A análise citogenética é uma ferramenta utilizada na caracterização de linhagens celulares possuindo critérios bem definidos para identificá-las (FRESHNEY, 2010; CREE, 2011). O método fornece um meio rápido de verificar e classificar as células tumorais com base nos padrões distintos de rearranjos cromossômicos recorrentes (CREE, 2011).

É muito utilizado para a pesquisa relacionada a neoplasias, especialmente por conta da mistura significativa de células normais com células tumorais em amostras primárias (GRIFFIN et al., 2007). Mostram-se ferramentas confiáveis em estudos genéticos, indicando bons modelos para estudar os mecanismos biológicos (LOUZADA et al., 2012).

A tendência das células de produzir mutações neoplásicas via mecanismos cromossômicos, como é o caso das translocações, duplicações e deleções, viabiliza que essas alterações sejam visíveis em microscopia (CREE, 2011).

Ao contrário dos tecidos normais, as células tumorais e suas linhagens celulares derivadas não possuem um padrão, exibindo enormes variações nas origens e estados de desenvolvimento sendo extremamente sensíveis ao microambiente de cultura (MACLEOD et al., 2007).

#### 4.5 CITOGENÉTICA DE CEB

O câncer, de uma forma geral, apresenta inúmeras alterações cromossômicas observadas a partir de um cariótipo complexo decorrente de diversas mutações genéticas (SCULLY et al., 2000). Tais aberrações cromossômicas apresentam inúmeros rearranjos estruturais e alterações numéricas que resultam em um desequilíbrio genômico (JIN et al., 2005).

As aneuploidias são alterações cromossômicas numéricas que se caracterizam pela adição ou deleção de cromossomos. São frequentemente encontradas em linhagens celulares de CECP, o que inclui o CEB, que apresentam inúmeros rearranjos cromossômicos com níveis de ploidia variando de diploide a pentaploide (MARTIN et al., 2009).

Segundo Martin, et al. (2009), de 29 linhagens celulares derivadas de amostras de CEB analisadas, mais de um terço apresentou cariótipos com anormalidades estruturais, incluindo translocações não-balaceadas, translocações Robertsonianas, deleções, isocromossomos e regiões de coloração homogênea. Foram detectadas perdas nas regiões 3p, 4p, 8p, 11q e 18q, além de ganhos nas regiões 3q, 5p, 7p/q, 8q, 9q, 11q, 14q, 19q, e 20q, sendo a amplificação de 11q13 a anormalidade mais frequentemente observada nesses casos (MARTIN et al., 2009).

Jin, et al. (2006), após avaliar 106 culturas de células derivadas de CEB relataram alterações cariotípicas simples em 38 casos e 68 casos apresentaram cariótipos complexos (JIN, et al., 2006).

As alterações numéricas demonstraram que houve maior frequência de deleções, comparadas com às adições cromossômicas. Os rearranjos estruturais frequentemente (43% das quebras) afetaram as regiões centroméricas, resultando na formação de isocromossomos e translocações de braço inteiro. Com exceção da banda cromossômica 11q13, envolvida em 25 tumores, apenas bandas centroméricas ou quase centroméricas foram comumente envolvidas (JIN, et al., 2006).

Os autores sugerem que não há grande diferença no cariótipo entre o CEB e o carcinoma epidermóide de laringe, indicando que a genética está envolvida no início e progressão do carcinoma epidermóide independentemente do local de origem (JIN, et al., 2006).

Segundo Bockmühl, et al. (2002), o prognóstico de pacientes com CECP é determinado pela recorrência e o desenvolvimento de metástases. A inserção de 3q é considerado um importante marcador genético para invasão e metástase (BOCKMÜHL et al., 2002) e a adição de região proximal de 8q e 11q também estão relacionados com esse prognóstico (BÉRGAMO et al., 2005).

Portanto, as alterações genéticas mais frequentes incluem de forma geral mutações pontuais incluindo amplificações, rearranjos e exclusões que se tornam

marcadores do desenvolvimento e progressão da neoplasia (SCULLY et al., 2000; JIN et al., 2005).

Esses estudos validam a relação entre linhagens celulares e os tumores dos quais elas derivam, enfatizando a utilidade dessas linhagens celulares como modelos experimentais *in vitro* no estudo do CEB (MARTIN et al., 2009).

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao revisar a citogenética das linhagens de células derivadas de CEB, observou-se nos artigos utilizados a descrição de cariótipos complexos com múltiplos rearranjos estruturais e alterações numéricas resultando em desequilíbrios genômicos.

Os estudos que relacionam linhagens celulares com as neoplasias validam sua utilização como modelos experimentais no estudo de CEB. E unido ao cariótipo, fornece um meio rápido de verificar e classificar as células tumorais com base nos padrões distintos de rearranjos cromossômicos recorrentes.

Mesmo com os avanços relacionados a análise genética, a citogenética é considerado um método capaz de fornecer uma visão de todas as alterações cromossômicas em uma única célula tumoral, sendo o cariótipo uma das formas mais simples de entender a relação entre a evolução e progressão das neoplasias.



## REFERÊNCIAS

BIDDLE, A.; MACKENZIE, I. C. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. **Cancer Metastasis Ver**, Feb 2012. ISSN 1573-7233.

BOCKMÜHL, U. et al. Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 33, n. 1, p. 29-35, Jan 2002. ISSN 1045-2257.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018. ISSN 1542-4863.

BÉRGAMO, N. A. et al. Classic and Molecular Cytogenetic Analyses Reveal Chromosomal Gains and Losses Correlated with Survival in Head and Neck Cancer Patients. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 2 Pt 1, p. 621-31, Jan 2005. ISSN 1078-0432.

CARAKUSHANSKY, G. **Doenças genéticas em pediatria**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

CHAUFFAILLE, M.L. Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crônica. **Rev bras hematol hemoter**, 2005; 27(4): 247-252.

CHIESA, F. et al. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium. **Oral Oncol**, v. 35, n. 6, p. 590-6, Nov 1999. ISSN 1368-8375.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins pathologic basis of disease. Neoplasia**, ed. Philadelphia, 1989.

CREE, I. A. **Cancer cell culture : methods and protocols**. 2nd ed. / edited by Ian A. Cree. New York: Humana, 2011. ISBN 9781617790799 (cased) 9781617790805 (ebook).

CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M. et al. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Rev Port de Pneumol**, v. 15, n. 4, Ago 2009.

D'SOUZA, G.; DEMPSEY, A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. **Prev Med**, v. 53 Suppl 1, p. S5-S11, Oct 2011. ISSN 1096-0260.

FELLER, L. et al. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. **Head Face Med**, v. 6, p. 14, Jul 2010. ISSN 1746-160X.

FORASTIERE, A.; KOCH, W.; TROTTI, A. et al. Head and neck cancer. **N Engl J of Med**, p. 345(26): 1890-900, Dec 2001.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications**. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell ; Chichester : John Wiley [distributor], 2010. ISBN 9780470528129 (hbk.).

GASPAROTTO, D. et al. Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 1165-75, Dec 2011. ISSN 1949-2553.

GRIFFIN, C.; MORSBERGER, L.; HAWKINGS, A. L. et al. Molecular cytogenetic characterization of pancreas cancer cell lines reveals high complexity chromosomal alterations. **Cytogenet Genome Res**, 118(2-4):148-56, 2007.

GRIFFITH, A.J.F, et al. **Introdução à genética**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro – RJ, p.142. 1988.

GUERRA M., SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

HASSOLD T., SHEMERMAN S., HUNT P. Counting crossovers: characterizing meiotic recombination in mammals. **Hum Mol Genet**, 2000.

HECHT, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. **Nat Ver Cancer**, v. 3, n. 10, p. 733-44, Oct 2003. ISSN 1600-0714.

HUANG, C. H. et al. Clinicopathologic evaluation of prognostic factors for squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. **J Chin Med Assoc**, v. 70, n. 4, p. 164-70, Apr 2007. ISSN 1726-4901.

JIN, C. et al. Cytogenetic abnormalities in 106 oral squamous cell carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 164, n. 1, p. 44-53, Jan 2006. ISSN 0165-4608.

JIN, Y.; JIN, C. Head and Neck: Oral squamous cell carcinoma. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**, v. 11, n. 1, p. 46-49, 2007.

JIN, Y. et al. Karyotypic evolution and tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 156, n. 1, p. 1-7, Jan 2005. ISSN 0165-4608.

JORDE, L. B., CAREY, J. C., BAMSHAD, M. J., WHITE, R. L. **Genética Médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 197 – 221.

LEVAN, A., FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220. 1964.

LIEBERTZ, D. J. et al. Establishment and characterization of a novel head and neck squamous cell carcinoma cell line USC-HN1. **Head Neck Oncol**, v. 2, p. 5, Feb 2010. ISSN 1758-3284.

LIMA, M. A. **Análise citogenética comparada em mastocitomas: enfoque especial na raça Boxer**. 2009. Dissertação (Mestrado em patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

LINDEE, S. M. The culture of cell culture. **Scienc**. 316(5831):1568-1569. 2007.

LOPES, N. M. **Estudo da frequência relativa e participação de subpopulações de células-tronco de câncer no processo de metástase em carcinoma**

**epidermóide de boca.** 2016. 124 (Mestrado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

LOUZADA, S. et al. Defining the Sister Rat Mammary Tumor Cell Lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an *In Vitro* Cell Model for Erbb2. **PLOS ONE.** v. 7, janeiro 2012.

MACLEOD, R. et al. Cytogenetic harvesting of commonly used tumor cell lines. **Nature protocols,** v. 2, n. 2, 2007.

MARTIN, C. L.; RESHMI, S. C.; RIED, T. et al. Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma. Examination of 31 cell lines and review of the literature. **Oral Oncol,** 44 (4):369-382, Apr 2009.

MARTINS, G. A. et al. Manual para elaboração de trabalhos acadêmicos. **Atlas,** São Paulo, 2001.

MONTENEGRO, V. et al. Análise citogenética na leucemia mieloide crônica. **Revista da Faculdade de ciências médicas,** Sorocaba, v. 10, n. 3, p. 5 – 12, 2008.

NG, J. H. et al. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. **Head Neck,** Oct 2016. ISSN 1097-0347.

NUSSBAUM, R. L, et al. **Thompson & Thompson, Genética Médica.** 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

NUSSBAUM M., MCLNNES R., WILLIARD R. **Thompson e Thompson. Genetics Medicine.** 6ª ed. Philadelphia: Saunders, 2004.

PELLOSO, L. A. F.; CHAUFFAILLE, M. L.; GHANAME, F. S. et al. Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. **Rev Assoc Med Bras.** Vol. 49, nº 2, São Paulo, 2003.

PETERSEN, P. E. Oral cancer prevention and control- the approach of the World Health Organization. **Oral Oncol,** v. 45, n. 4-5, p. 454-60, Apr-May 2009. ISSN 1368-8375.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **The FASES jornal**, v. 5, n. 9, 1991.

RESHMI, S. C.; SAUNDERS, W. S. KUDLA, D. M. et al. Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. **Genes, Chromosomes e Cancer**, 41(1): 38-46, Sep 2004.

RHODUS, N. L.; KERR, A. R.; PATEL, K. Oral cancer: leukoplakia, premalignancy, and squamous cell carcinoma. **Dent Clin North Am**, v. 58, n. 2, p. 315-40, Apr 2014. ISSN 1558-0512.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 9, p. 11884-94, 2015. ISSN 1936-2625.

ROTHER, E. T. Editorial: revisão sistemática x revisão narrativa. **Acta Paul enferm**, v. 20, n.2, São Paulo, Apr/June 2007.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. **Oral Oncol**, v. 36, n. 4, p. 311-27, Jul 2000. ISSN 1368-8375.

SEABRIGHT M. A rapid banding technique for human chromosome. **Lancet**, 2(7731):971-2, Oct 1971.

SILVA, B. S. et al. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 1, p. e29-34, Jan 2012. ISSN 1698-6946.

SOLOMON, E.; BARROW, J. GODDARD, A. D. Chromosome aberrations and câncer. **Cancer Genetic and Cytogenetic**, v. 8, n. 5035, Nov 1991.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 317-23, Apr-May 2009. ISSN 1368-8375.

VILELA, M. J.; MARTINS, M. L.; MESDES, R. L. et al. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, Rio de Janeiro, 2003.

WAN, T. S. Cancer cytogenetics: methodology revisited. **Ann Lab Med**, v. 34, n. 6, p. 413-25, Nov 2014. ISSN 2234-3814.