Andréa Borduchi Carvalho Franco de Salles

Estudo Citogenético em Lesões de Próstata

06

1910000722

ANDRÉA BORDUCHI CARVALHO FRANCO DE SALLES

ESTUDO CITOGENÉTICO EM LESÕES DE PRÓSTATA

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Area de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

722/96

São José do Rio Preto - SP

1994

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" com auxílio financeiro do CNPq, CAPES e FUNDUNESP.

ÍNDICE

I. Introdução.....1

I.1. Fatores humorais e câncer de próstata.....3

I.2. Oncogenes e fatores de crescimento.....6

I.3. Citogenética e câncer de próstata.....9

II. Objetivos.....13

III. Material e Métodos.....14

III.1. Material.....14

III.2. Métodos.....14

IV. Resultados.....20

IV.1. Ensaios preliminares sobre condições de cultivo.....20

IV.2. Análise citogenética.....26

V. Discussão.....48

VI. Resumo.....61

VII. Summary.....63

VIII. Referências Bibliográficas.....64

IX. Apêndice.....74

I. Introdução

A próstata é uma glândula de grande importância clínica porque é sede de várias afecções inflamatórias, congestivas, hiperplásicas e neoplásicas. Em condições normais, é um orgão firme, de consistência fibroelástica, que pesa cerca de 20 gramas e apresenta diâmetros máximos de 4,0 cm. Do ponto de vista anatômico, está localizada na base da bexiga urinária e pode ser dividida em lobos laterais, anterior, posterior e mediano. Essa divisão em lobos somente é nítida no período embrionário e, no orgão adulto, o limite entre os lobos é impreciso, não existindo feixes de tecido conjuntivo que os separem. O único lobo que pode ser relativamente bem delimitado é o posterior, que corresponde ao parênquima situado atrás do plano determinado pela trajetória dos ductos ejaculadores. Histológicamente, a próstata é uma glândula tubuloalveolar que apresenta nitidamente dois tipos glandulares: as glândulas externas ou prostáticas propriamente ditas e as internas ou periuretrais que que podem ser mucosas e submucosas. A secreção de tais glândulas contribuem com um volume substancial do ejaculado, embora sua função não tenha sido completamente esclarecida (Rodrigues Neto Jr., 1986).

O crescimento da próstata tem início logo após o nascimento e progride lentamente até a puberdade, mas pode aumentar sua velocidade na terceira década de vida e resultar em hiperplasias benignas, que afetam principalmente homens acima dos 40 anos de idade, ou em processos malignos típicos de idades mais avançadas (Rodrigues Neto Jr., 1986; Srougi, 1990).

O câncer prostático é uma das neoplasias não cutâneas mais frequentes em homens e, por ser de evolução lenta, é importante causa de óbito em pacientes acima de 55 anos de idade (Rodrigues Neto Jr., 1986; Srougi, 1990; Thompson, 1990; Boring **et al.**, 1993). O número de casos da doença varia geograficamente, com áreas de maior ou menor ocorrência. Na cidade de Shangai (China), por exemplo, a incidência de novos casos por ano é de 0,8 por 100.000 habitantes e em algumas cidades dos Estados Unidos, como Atlanta, a doença é identificada em 100 por 100.000 indivíduos no mesmo período, o que corresponde a uma incidência 120 vezes maior. No

Brasil, um estudo feito na cidade de São Paulo revelou que são diagnosticados 22 casos novos por 100.000 homens a cada ano. É interessante observar que os migrantes que se deslocam para áreas com prevalência maior que o local de origem passam a ter valores mais altos desse parâmetro já na primeira geração de descendentes (Lynch, 1989; Srougi, 1990).

As variações de incidência parecem ser função de condições sócioeconômicas, hábitos culturais e religiosos e de certos fatores ambientais. Por exemplo, existem algumas evidências, embora inconclusivas, de que a frequência do tumor de próstata é alta em protestantes, baixa em judeus e intermediária em católicos; é maior em pacientes casados, viúvos e divorciados, em áreas urbanas e em membros de uma mesma família (Wynder, 1971) ou fumantes (Hsing, 1990). Além disso, alguns grupos populacionais específicos são mais atingidos, como é o caso dos negros americanos que mostram frequências duas vezes maior que a dos brancos (Stearns & McGarvey, 1992). Esse fato não parece se repetir no Brasil e em outros países, onde costuma ser menos comum na raça negra (Srougi **et al.**, 1990).

A maioria das neoplasias malignas da próstata mostra arranjo histológico, grau de diferenciação e comportamento biológico variáveis. Mais de 95% delas são representadas pelos adenocarcinomas com origem acinar. Cerca de 5% correspodem aos adenocarcinomas de origem no ducto próstatico, aos carcinomas do epitélio de transição,aos carcinomas epidermóides e aos sarcomas (Rodrigues Neto Jr., 1986; Srougi **et al.**, 1990). Com relação aos tumores benignos, a hiperplasia da próstata é o tipo mais comum e resulta de uma proliferação nodular do estroma e do tecido glandular. Outros tumores benignos são raríssimos e representados por fibromas, encondromas, hemangiomas, leiomiomas, neurofibromas e cistos dermóides (Rodrigues Neto Jr., 1986).

Os carcinomas podem ser classificados na forma clínica, ou seja, naquela que apresenta manifestações clínicas; na forma oculta, que também tem manifestações clínicas, porém não consequentes do crescimento local, mas sim de metástases; e, por último, no carcinoma incidental ou latente, que não acarreta manifestações no seu portador. Esse último é um achado histológico encontrado

incidentalmente em material de patologia cirúrgica ou em material de necrópsia (Friedlander et al., 1984; Rodrigues Neto Jr., 1986; Srougi, 1990) e sua prevalência, uniformemente alta em diferentes países, contrasta com as taxas de mortalidade e de incidência clínica do câncer prostático. Esse achado sugere que os eventos que levam a uma lesão histologicamente identificada são comuns, mas os passos subsequentes necessários para a progressão a uma forma detectável que tem potencial maligno são mais raros e de certa forma evitáveis (Greene et al., 1991).

No Brasil, a frequência do carcinoma clínico de próstata é alta. E a mais frequente neoplasia do trato urogenital, com nítido predomínio de manifestações em pacientes com 70 a 80 anos de idade, ocupando o terceiro lugar em incidência, logo após as lesões malignas de pele e estômago. O carcinoma latente, por sua vez, é muito mais comum que o carcinoma clínico e já foi observado em 25% de pacientes necropsiados acima de 40 anos de idade e em 37,7% dos homens acima de 70 anos de idade (Rodrigues Neto Jr., 1986).

I.1. Fatores humorais e câncer de próstata

Embora o câncer de próstata, quando confinado à glândula, seja curável com terapia cirúrgica ou radioativa, a sobrevivência de pacientes com metástases é reduzida. O tratamento nesses casos envolve a alteração do meio hormonal endógeno dado que o crescimento da neoplasia é dependente da ação de andrógenos (Crawford, 1990).

Essa dependência hormonal foi estabelecida há cerca de 5 décadas por Huggins, Stevens e Hodges que, a partir de estudos experimentais, verificaram a estimulação da secreção e do crescimento da próstata após administração de testosterona, e efeito oposto com a castração ou com a administração de estrógenos (Srougi et al., 1990). Mais recentemente, experimentos in vitro também demonstraram que a suplementação do meio de cultura com andrógenos naturais aumenta significativamente o índice proliferativo (Olea et al., 1990b), embora isso não pareça ser uma regra geral para compostos sintéticos (Wolf et al., 1991; Langeler et al., 1993).

As influências hormonais, tanto na próstata normal quanto naquelas portadoras de neoplasias, dependem da presença de mecanismos sensíveis a andrógenos. O processo compreende a ação da enzima 5-alfa redutase sobre a testosterona, que é transformada no citoplasma das células prostáticas em diidrotestosterona (DHT). A DHT, por sua vez, se liga a um receptor específico e é transportada ao núcleo celular, onde estimula a síntese de DNA e RNA resultando no aumento da atividade e da proliferação celular (Srougi et al., 1990).

Dois tipos de células neoplásicas da próstata podem ser reconhecidas, aquelas que metabolizam testosterona (células andrógeno-sensíveis) e aquelas que não metabolizam esse hormônio (células andrógeno-resistentes). A proporção dessas duas populações celulares varia em cada tumor, o que torna imprevisível a resposta das lesões à ação do hormônio. Nos tumores com grande número de células andrógeno-sensíveis, pode ser obtido o bloqueio da atividade celular através de medidas que suprimem os níveis plasmáticos de testosterona, ao passo que esse efeito não é atingido quando a população de células andrógeno-sensíveis é escassa (Srougi et al., 1990). Existem evidências de que tais respostas são dependentes da presença ou da ausência de receptores de membrana específicos (Tilley et al., 1990).

A regressão da neoplasia após a supressão de andrógenos e a observação experimental de adenocarcinomas de próstata em ratos tratados cronicamente com testosterona sugerem a associação da malignização da glândula com alguns tipos de hormônios (testosterona, diidrotestosterona, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante e estradiol). Entretanto, ao que parece, os andrógenos não são carcinogênicos em relação à próstata mas apenas aceleram o crescimento da lesão, se essa já existir, da mesma forma que estimulam e mantêm as condições tróficas do tecido normal (Srougi et al., 1990). Na verdade, as relações entre hormônios e próstata são complexas e não apenas a presença dessas substâncias tem efeito sobre a glândula como também a sua ausência. Por exemplo, estudos realizados por Berges et al (1993) em ratos mostraram que a ausência de andrógenos pode induzir a morte programada das células

glândulares prostáticas hormônio-dependentes, em decorrência da fragmentação do DNA genômico e da ausência de reparo eficaz do DNA. Entre o segundo e o quinto dia após a castração dos animais, 20% das células da glândula morrem por dia, 1% entram na fase S do ciclo celular e, entre essas últimas, mais de 95% também sofrem morte celular. A apoptose descrita parece ser um processo que envolve a ativação de endonucleases dependentes de íons cálcio e magnésio, causada pela elevação de cálcio intracelular que segue a ablação androgênica (Martikainen et al., 1991).

Recentemente, alguns experimentos têm revelado que receptores de superfície e outros fatores também participam de respostas proliferativas. E o caso do trabalho desenvolvido por Langeler et al. (1993), que detectou um padrão bifásico de crescimento nas células de uma sublinhagem de tumor prostático (LNCaP-FGC) em consequência da administração de um andrógeno sintético (R1881) ao meio de cultura. O aumento do crescimento celular foi observado em baixas concentrações de andrógeno e efeito contrário em concentrações elevadas. O cultivo de outras duas sublinhagens em altas concentrações do andrógeno resultou no decréscimo inicial da taxa de crescimento, porém, com retorno de proliferação após três semanas. Tais achados sugerem que essas últimas linhagens perderam a sensibilidade ao andrógeno e o seu padrão bifásico, possivelmente em virtude da redução nos níveis de receptores para o andrógeno. Três semanas após a remoção do excesso de hormônio do meio de cultura, as células readquiriram o seu padrão bifásico.

Um outro fator que provavelmente está relacionado com a proliferação é a apoliproteina D (apo D), um componente da família das lipoproteínas de alta densidade (HDL) do plasma, que é sintetizado pelas células prostáticas em resposta à presença de concentrações elevadas de andrógenos. Entretanto, sua expressão está aparentemente associada mais com a inibição do crescimento e com a regressão tumoral do que com a sua estimulação (Simard et al., 1991).

As interações epiteliais-mesenquimais também parecem regular a divisão celular e a morfogênese da próstata e podem

contribuir para a conversão do fenótipo benigno em maligno. E o que sugerem os resultados obtidos por Kooistra **et al.** (1991) com linhagens derivadas de carcinoma da próstata, a LNCaP e a PC-3, que exibem inibição do crescimento na presença de fibroblastos ou do meio onde foram cultivados, provavelmente em consequência da difusão em cultura de um fator de inibição.

genes supressores de tumor

I.2. Oncogenes e fatores de crescimento

O conceito de câncer como doença genética é relativamente recente, e hoje são bem conhecidos muitos tipos de câncer que possuem um componente genético significativo responsável pela predisposição que certos indivíduos manifestam à doença. Já existem também muitas evidências de que todos os tipos de tumores, mesmo na ausência de qualquer fator de susceptibilidade aparente, resultam de mutações em células somáticas e que a sua progressão envolve a alteração na expressão de uma série de genes responsáveis pela proliferação e por outras atividades fundamentais das células (Thompson, 1991). Tais alterações se acumulam no material genético e compreendem os múltiplos passos da carcinogênese (Knudson, 1989).

Dois tipos de genes participam da transformação de uma célula normal em cancerígena, os oncogenes e os genes supressores de tumor. Os primeiros facilitam a transformação maligna enquanto os outros bloqueiam o desenvolvimento do tumor através da regulação do crescimento celular. Quase todos os oncogenes são formas modificadas de genes normais, os protoncogenes, que estão envolvidos nos processos de proliferação e diferenciação e cuja ativação tem efeito dominante no nível celular, ou seja, um único alelo mutante é suficiente para afetar o fenótipo de uma célula normal (Collins, 1991; Thompson, 1991).

Existem inúmeros exemplos da participação de oncogenes no processo maligno de diferentes neoplasias. Entre eles estão as mutações em ponto que dão origem ao oncogene RAS presentes em uma variedade de tumores sólidos, inclusive no adenocarcinoma do ducto prostático (Carter **et al.**, 1990). Em relação à expressão de outros oncogenes, como o ERBB2, em lesões de próstata, nenhum padrão

evidente tem sido observado, embora alguns dados sobre altos níveis de MYC e baixos níveis do receptor do fator de crescimento epidérmico (ERBB1) sejam promissores (Thompson, 1990; Mellon et al., 1992).

Enquanto os produtos dos oncogenes favorecem o crescimento, os produtos dos genes supressores de tumor normalmente bloqueiam o crescimento anormal e a transformação maligna, contribuindo para o câncer apenas quando a função de ambos os alelos é perdida. O TP53 é um gene supressor de tumor mapeado na banda p13 do cromossomo 17 que codifica uma proteína envolvida no controle do ciclo celular. Mutações nesse gene, geralmente nos exons 5 a 8, resultam na produção de um polipeptídeo alterado, que tem vida média longa e compete com o produto normal e está presente em uma variedade de tumores malignos (Mellon et al., 1992; Uchida et al., 1993). Alterações do TP53 podem conferir vantagem proliferativa às células e definir um pequeno subgrupo de neoplasias com comportamento agressivo (Solomon, 1991; Thompson, 1991; Visakorpi, 1992), como já foi observado no carcinoma prostático (Navone et al., 1993), embora resultados sem qualquer associação com características de importância prognóstica também já tenham sido verificados (Mellon et al., 1992).

Em um estudo recente que utilizou oito sondas polimórficas para o braço curto do cromossomo 8, BOVA et al., (1993) detectaram alta frequência de perda de heterozigosidade na banda 8p22 em câncer de próstata. Também verificaram uma deficiência em homozigose do gene "macrophage scavenger receptor" (MSR), uma glicoproteína de membrana mediadora da endocitose de um grupo heterogêneo de macromoléculas. Essa é a deficiência mais frequente do braço curto do cromossomo 8 nas neoplasias em geral e a primeira na de próstata, e sugere fortemente a presença de um gene supressor na região. Deve ser salientado, entretanto, que existem outros segmentos do genoma que também mostram perda alélica nesse grupo tumores, como o 7q, 10q, 13q, 16q22-24, 17p e o 18q (Sandberg, 1992; Godard & Solomon, 1993) embora com frequência menor. Por exemplo, Collins et al. (1991) verificaram que a perda da informação genética do cromossomo 8 é detectada em 60% dos casos informativos enquanto atinge cerca de

50% e 34% para os cromossomos 16 e 10, respectivamente.

Os estudos moleculares realizados por Tricoli et al. (1993) têm revelado a participação de outros genes no desenvolvimento do câncer de próstata. E o caso do SRY mapeado na banda p11.3 do cromossomo Y e expresso em tecidos prostáticos hipertróficos e malignos. Esse gene codifica um produto específico para o desenvolvimento testicular e contém sequências homólogas às de proteínas não histônicas de alta mobilidade capazes de se ligar ao DNA. Entre os genes que contêm elementos de resposta a estas sequências estão os oncogenes SIS, FOS e MYCN. Tais achados levantam a possibilidade de que a expressão do gene SRY pode resultar na ativação de protoncogenes com consequente proliferação celular e ser responsável, além do desenvolvimento testicular, por importantes funções na próstata do adulto.

E muito importante salientar nesse ponto que muitos oncogenes são responsáveis pela síntese de fatores de crescimento, cuja expressão está associada a diferentes processos e padrões de proliferação. De acordo com Thompson (1990), o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGFb) e o fator de crescimento transformante-beta2 (TGF-beta2) já foram detectados em níveis elavados na próstata adulta com hiperplasia, enquanto o fator ácido de crescimento de fibroblastos (FGFa) tem sua expressão aumentada no mesênquima prostático tumoral. Tais achados e o fato de que tanto o FGFa como o FGFb são mitogênicos para células do epitélio e para fibroblastos prostáticos indicam que esses fatores podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento hiperplásico da glândula e na sua malignização. De forma contrária, um outro fator, o TGF-beta1, parece estar associado com a inibição da divisão celular do epitélio, embora na presença de expressão elevada de determinados oncogenes, como o MYC e o RAS, revele uma ação biológica inadequada que resulta em diferenciação celular incorreta e consequente proliferação descontrolada.

Schwurmans et al. (1991) observaram índice mitótico elevado na linhagem LNCaP em presença dos fatores de crescimento epidérmico (EGF), transformante (TGF-alfa) ou de fibroblastos (FGF), especialmente quando também foi adicionado ao meio de cultura o

andrógeno sintético R1881. Esse resultado é provavelmente decorrente do aumento da expressão e da sensibilidade dos receptores para os fatores de crescimento. Outros estudos revelaram que a própria transcrição dos genes do EGF, do seu receptor e de TGF-alfa é elevada em células provenientes de carcinomas e aumenta após a indução com andrógeno (Morris & Dadd, 1990; Ching **et al.**, 1993). Tais achados sugerem que o controle da regulação da proliferação celular é realizado através de um modelo autócrino mediado por fatores de crescimento e seus receptores (Hofer **et al.**, 1991; Kim **et al.**, 1991; Ching **et al.**, 1993).

I.3. Citogenética e câncer de próstata

As aberrações cromossômicas observadas em células neoplásicas fornecem informações essenciais para o mapeamento de mutações que predispõem ou que levam ao câncer. A associação de uma alteração cariotípica ou de um número limitado delas com um tipo de tumor pode indicar a presença no local do rearranjo de um ou mais genes importantes para o processo neoplásico. Existem evidências de que mutações em alguns desses genes estão envolvidas no desenvolvimento tanto de tumores herdados como de formas esporádicas (Goddard & Solomon, 1993).

No caso do câncer de próstata, as informações citogenéticas são relativamente escassas quando comparadas com outros tipos de tumores comuns. Provavelmente, esse fato decorre das dificuldades referentes ao cultivo de suas células e consequentemente da obtenção de boas preparações cromossômicas. Apesar de diferentes metodologias terem sido propostas, os resultados nem sempre são satisfatórios. Alguns estudos, por exemplo, são feitos em preparações diretas, o que produz poucas metáfases, nem sempre de boa qualidade (Atkins e Baker, 1985; Babu **et al.**, 1990). Culturas de curta duração também são realizadas em diferentes meios de cultura e frascos, suplementados com agentes mitogênicos e hormonais diversos (Hallowes **et al.**, 1991; Navalainem **et al.**, 1993), após desagregação mecânica (Peehl **et al.**, 1991) ou enzimática, e técnicas para seleção de células neoplásicas

(Jellinghaus et al., 1976; Gibas et al., 1985; Limon et al., 1986a, 1986b, 1990; Lundgren et al., 1988; Babu et al. 1990; Brothman et al., 1991). Apesar das dificuldades, vários resultados já foram obtidos em linhagens celulares (Jellinghaus et al., 1976; Konig et al., 1988; Brothman & Patel, 1992) e em aproximadamente 200 culturas primárias de adenocarcinomas, leiomiossarcomas e adenomas. O criótipo normal foi o evento citogenético mais frequentemente encontrado (Jellinghaus et al., 1976; Brothman et al., 1989, 1990; Babu et al., 1990; Lundgren et al., 1992; Micale et al., 1992; Arps et al., 1993; Breitkrenz et al., 1993; Casalone et al., 1993) e pode ser explicado pela contaminação da amostra com o epitélio normal ou pela ausência de alterações cromossômicas visíveis nas células do parênquima tumoral. Além disso, a alta frequência desse evento pode estar relacionada com a dificuldade de induzir, in vitro, a proliferação de células neoplásicas (Lundgren et al., 1992)

A perda do cromossomo Y tem sido a alteração númerica mais frequente nas lesões benignas e malignas (Atkins e Baker, 1985; Brothman et al., 1989, 1990; Lundgren et al., 1989 e 1992; Micale et al., 1992; Arps et al., 1993; Casalone et al., 1993), e alguns autores acreditam que esse achado não está relacionado com o desenvolvimento do câncer prostático pois já foi observado nos fibroblastos normais da glândula e não nas células epiteliais que originam o tumor (Casalone et al., 1993). Entretanto, o assunto é controverso pois resultados opostos a esses já foram detectados (Micale et al., 1993).

Muitos rearranjos esporádicos foram também referidos e, em virtude do baixo índice mitótico quase sempre presente, podem refletir anomalias clonais do tecido neoplásico, dado que a distribuição dos pontos de quebra coincide com aquela encontrada nas anomalias recorrentes. Entre essas últimas, as mais comuns compreendem as deficiências parciais das regiões 7q, 8p e 10q e os rearranjos das bandas 7q22 e 10q24 (Gibas et al., 1985; Atkins e Baker, 1985; Limon et al., 1986, 1989; Konig et al., 1989; Lundgren et al., 1988, 1992; Babu et al., 1990; Brothman e Patel, 1992; Micale et al., 1992, 1993). Outras alterações também já foram descritas, como a trissomia 7 e 16, as alterações estruturais do

cromossomo 1 e as amplificações por **double minutes** (Atkins & Baker, 1985; Gibas **et al.**, 1985; Ahmann **et al.**, 1986; Pithman **et al.**, 1987; Konig **et al.**, 1988; Lundgren **et al.**, 1988, 1992; Brothman **et al.**, 1989, 1990; Limon **et al.**, 1989; Babu **et al.**, 1990; Micale **et al.**, 1992; Miyauchi **et al.**,1992; Arps **et al.**, 1993). De modo geral, os achados sugerem que tanto a perda de genes supressores de tumor quanto a ativação de oncogenes podem ser importantes eventos no desenvolvimento ou progressão do carcinoma prostático (Lundgren **et al.**, 1992).

Além da análise cromossômica, os estudos do conteúdo de DNA por citometria também têm sido realizados e, nesse caso, utilizados na avaliação da agressividade da lesão e do tempo de sobrevida do seu portador. Embora o número de casos seja reduzido, as hiperplasias de próstata já estudadas mostram conteúdos de DNA diplóides (Frauenhoffer **et al.**, 1991), mas aneuploidias já foram referidas nesse grupo e em tecidos prostáticos normais (Haugen **et al.**, 1990; MjOlnerOd, 1990). Em relação aos carcinomas, a presença de conteúdos de DNA aneuplóides tem sido considerada uma evidência de agressividade da lesão (Friedlander **et al.**, 1984; Fordham **et al.**, 1987; Stephenson **et al.**, 1987; Al-Abadi & Nagel, 1990; Adolfsson **et al.**, 1990; Miller **et al .**, 1991; Robertson & Paulson, 1991) e seu papel na progressão neoplásica pode ser explicada pelo efeito da dosagem gênica anormal (Frankfurt **et al.**, 1985). Apesar disso, deve ser salientado que tumores diplóides também podem ter um comportamento agressivo (Jones **et al.**, 1990) e que os tetraplóides parecem ser menos malignos que os aneuplóides (Montgomery **et al.**, 1990; Zetterberg & Forsslund, 1991). Os resultados de Tribukait (1991), por exemplo, reforçam o conceito de um desenvolvimento contínuo do carcinoma de próstata, do estágio inicial para um estágio mais avançado, associado à duplicação do genoma seguido de sucessivas perdas cromossômicas no tumor tetraplóide.

Um estudo recente realizado por Deitch **et al.** (1993) relacinou o conteúdo de DNA com o grau histológico e o volume de tumores benignos. Os resultados revelaram que tumores menores de 0.4 cm^3 e o seu tecido adjacente eram diplóides. Por outro lado, a maioria dos tumores com volume entre 0.4-1.0 cm^3 e todos os tumores

maiores que 1.0 cm^3 apresentavam ploidia anormal, do mesmo modo que o tecido adjacente. Com base nesses resultados, os autores propuseram que conteúdos anômalos de DNA podem estar presentes nas fases iniciais da progressão maligna e que, em virtude desses achados serem vistos nos tecidos vizinhos, o câncer prostático pode ter origem em múltiplos clones (Greene **et al.**, 1991; Stearns & McGarvey, 1992; Deitch **et al.**, 1993). Evidências para essa hipótese são fornecidas pelos dados obtidos por Lundberg **et al.** (1987) com citometria de fluxo, que revelam histogramas de DNA heterogêneos entre amostras de diferentes áreas do mesmo tumor.

De modo similar à citometria, a técnica de hibridização fluorescente **in situ** (FISH) em células interfásicas tem se mostrado valiosa no estudo do câncer de próstata. Recentemente, Konig **et al** (1993) compararam os resultados obtidos através das técnicas de citometria de fluxo, FISH e estudo citogenético convencional. Seus resultados mostraram que a maioria dos tumores investigados era claramente aneuplóide nas análises por técnicas que eram utilizadas previamente ao cultivo. O mesmo achado, entretanto, não foi detectado pelo estudo cromossômico, possivelmente porque, durante a cultura, as populações aneuplóides eram selecionadas negativamente em função da sua baixa proliferação **in vitro**. Tais resultados mostram as dificuldades enfrentadas na obtenção de dados cariotípicos no câncer de próstata e ressaltam a importância da análise combinada de diferentes metodologias na investigação e determinação das alterações genéticas nesse grupo de neoplasias.

II. Objetivos

Em vista do exposto e considerando a alta incidência de tumores de próstata na população, a escassez de dados citogenéticos dessa neoplasia e as dificuldades encontradas no cultivo de suas células, propôs-se o presente trabalho, que visou o estudo citogenético e de condições de cultura em uma amostra de tumores de próstata.

Com o estudo de tal grupo pretendeu-se atingir os seguintes objetivos:

a. Pesquisar as aberrações cromossômicas clonais e não clonais em tumores benignos e malignos de próstata.
b. Comparar os achados citogenéticos observados nos dois grupos de tumores, benignos e malignos, e avaliar, quando possível, os seus efeitos.
c. Fornecer subsídios para diagnóstico e prognóstico nos casos em que isso fosse possível.
d. Estudar as condições favoráveis para o cultivo de células de tumores de próstata que permitissem a obtenção de um número favorável de metáfases passíveis de análise.

III. Material e Métodos

III.1. Material

No presente trabalho foram estudadas dezessete amostras de lesões de próstata, quatorze benignas e três malignas, enviadas pelos departamentos de Cirurgia e Urologia da Faculdade Regional de Medicina, pelo Instituto de Urologia e Nefrologia e pela Clínica Urológica de São José do Rio Preto. Destas, dez foram utilizadas em ensaios sobre condições de cultivo e nove foram avaliadas citogeneticamente.

Os pacientes tinham idades variando de 48 a 83 anos, eram caucasóides, com exceto um negróide, de classe social baixa e média e pertenciam à população rural e urbana da região de São José do Rio Preto.

Com exceção de dois pacientes (casos 752 e 766), todos os demais foram investigados citogeneticamente antes da realização de tratamento rádio ou quimioterápico.

III.2. Métodos

A. Métodos utilizados para ensaios sobre condições de cultivo

Com a finalidade de investigar condições favoráveis ao crescimento das células estudadas, foram feitos ensaios sobre métodos de cultivo por explante primário e por suspensão celular obtida após desagregação enzimática. Além disso, foi avaliada a suplementação do meio de cultura com o hormônio hidrocortisona (concentração final 10^{-6} M) e com o fator de crescimento epidérmico (EGF) (concentração final 1ug/100ml). Tais substâncias foram adicionadas ao meio completo utilizado por ocasião da semeadura e em todas as trocas de meio realizadas durante o experimento.

Foram feitos também ensaios preliminares sobre a influência da densidade celular inicial do cultivo determinada por contagens em câmara de Neubauer (hemocitômetro). Para tanto, a

suspensão celular foi preparada em solução de Hanks sem Ca e Mg e corada com azul de tripano 0,4% em diluição 1:2. Após 5 minutos à temperatura ambiente, uma gota da mistura foi introduzida na câmara do hemocitômetro por capilaridade. A contagem das células coradas e não-coradas foi realizada ao microscópio, em objetiva com aumento 10x. O número de células viáveis por ml da suspensão original foi estimado mutiplicando-se o número médio de células não-coradas contadas nos diferentes quadrados da câmara pelo fator de conversão do hemocitômetro (10^{-4}) e pelo fator de diluição. O número total de células da amostra foi determinado multiplicando-se o número estimado de células por ml pelo volume original da amostra.

Com exceção dos testes feitos com EGF que utilizaram culturas por explante primário, a obtenção dos dados dos outros experimentos foi feita através da contagem de células aderidas ao frasco nas duas primeiras semanas de cultura, em campos de microscópio invertido (aumento de 63x) com mais de três células. Os campos do microscópio foram escolhidos em número de treze por réplica, e na proporção 4:5:4 nos três terços transversais do frasco. A pesquisa dos campos em cada uma dessas áreas foi sempre iniciada no canto direito inferior do recipiente, tendo como referência a tampa do frasco posicionada à esquerda, e prosseguiu no sentido inferior-superior, e da direita para a esquerda. Foram considerados os treze primeiros campos encontrados segundo a metodologia descrita acima.

O seguinte padrão foi utilizado para comparação das diferentes réplicas:

+ : campo com 3 a 9 células
++ : campo com 10 a 49 células
+++ : campo com 50 a 99 células
++++ : campo com mais de 100 células

Na presente análise, os campos com menos de três células não foram considerados porque, nas primeiras semanas de cultivo, as células em geral não se distribuem homogeneamente no fundo do frasco e, por isso, podem ser encontrados muitos locais sem crescimento, o que nem sempre reflete a situação real de toda a cultura.

B. Métodos utilizados para obtenção de preparações cromossômicas

As culturas de células foram desenvolvidas segundo técnicas propostas por Limon **et al.** (1986a, 1990) e Peehl **et al.** (1991) com modificações, descritas a seguir. As fórmulas para preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas estão detalhadas no Apêndice.

B.1. Colheita e transporte da biópsia

Uma amostra do tecido, cerca de 0,5-1 cm^3, foi obtida assepticamente, de preferência como parte do espécimen submetido à patologia. Após a colheita, a amostra foi imediatamente transferida para um recipiente estéril com meio de cultura, soro fisiológico ou solução salina de Hanks para transporte, e mantida a 5ºC ou à temperatura ambiente até ser enviada ao laboratório acompanhada de dados sobre o paciente. Afim de assegurar a viabilidade das células e melhores resultados em cultura, o intervalo entre a hora da colheita e o início do cultivo não foi superior a 24 horas.

B.2. Desagregação do tecido, cultivo celular e bloqueio de divisão celular

No laboratório, a amostra do tecido foi manipulada em câmara de fluxo laminar. Inicialmente, o espécimen foi retirado do frasco e lavado em três banhos consecutivos com solução de Hanks para lavagem. Em uma placa de Petri seca ou com algumas gotas de meio completo, o tecido foi cortado em pequenos fragmentos de 1-2 mm^3 com tesoura ou bisturi e pinça. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, alguns desses fragmentos foram explantados na superfície interna maior de um frasco de cultura (frasco I) que havia sido previamente umidecida com soro fetal bovino. O frasco foi colocado com essa face para cima, recebeu 2 ml de meio completo e permaneceu nessa posição por 24 horas a 37ºC. Vencido o tempo, o frasco foi cuidadosamente virado, de modo que a face com os explantes ficasse

para baixo, e reincubado por 4 a 5 dias. Decorrido esse prazo, e quando houve crescimento, o meio inicial foi descartado e 5 ml de meio novo foram adicionados à cultura, que foi mantida na estufa até que ocorresse proliferação celular satisfatória.

Parte do material que sofreu dissociação mecânica foi transferida para uma frasco plástico descartável (frasco II) com 0,5 ml ou 1 ml de colagenase (concentração de 2000 U/ml) acrescidos ou não de 4,5 ml de meio de cultura completo, e foi incubada a 37°C por 16 a 24 horas ou mantida à temperatura ambiente por 20 a 40 minutos. A placa de Petri utilizada para desagregação mecânica foi lavada com o próprio meio a ser adicionado à colagenase.

Uma outra parte dos fragmentos do tecido foi submetida a um processo seriado (Figura 1), que foi iniciado pela sua sedimentação passiva em 5 ml de meio de cultura completo, por um período de 5 a 15 minutos. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi transferido para um frasco de cultura (frasco III) e incubado a 37°C. O sedimento foi transferido para um outro frasco de cultura e recebeu tratamento com colagenase. Essa réplica, do mesmo modo que a outra réplica II já citada, foi mantida a 37°C por 16 a 24 horas. Depois desse período, o material sofreu algumas pipetagens para melhor separação das células e foi reincubado por mais uma ou duas horas. Foi, então, centrifugado durante 5 minutos a 1000-1200 rpm e, após a substituição do sobrenadante por 5 a 10 ml do meio, sofreu sedimentação passiva durante 15 minutos. O sobrenadante (IV) foi removido e incubado. O material restante, após nova sedimentação passiva, foi separado em um sobrenadante (V) e um sedimento (VI) que, depois de contagem em hemocitômetro do número de células viáveis, receberam quantidades adequadas de meio. Para aproximadamente 1 ml de sedimento foram utilizados 4 ml de meio que, depois de 24 a 48 horas a 37°C, foram removidos e substituídos por 5 ml de meio pré-aquecido. Os frascos, codificados para cada processamento com algarismos romanos e em alguns casos subdivididos em réplicas e marcados com números arábicos e letras, foram examinados diariamente em microscópio invertido para avaliação da atividade mitótica porque a confluência ou grande número de células não significa muitas metáfases.

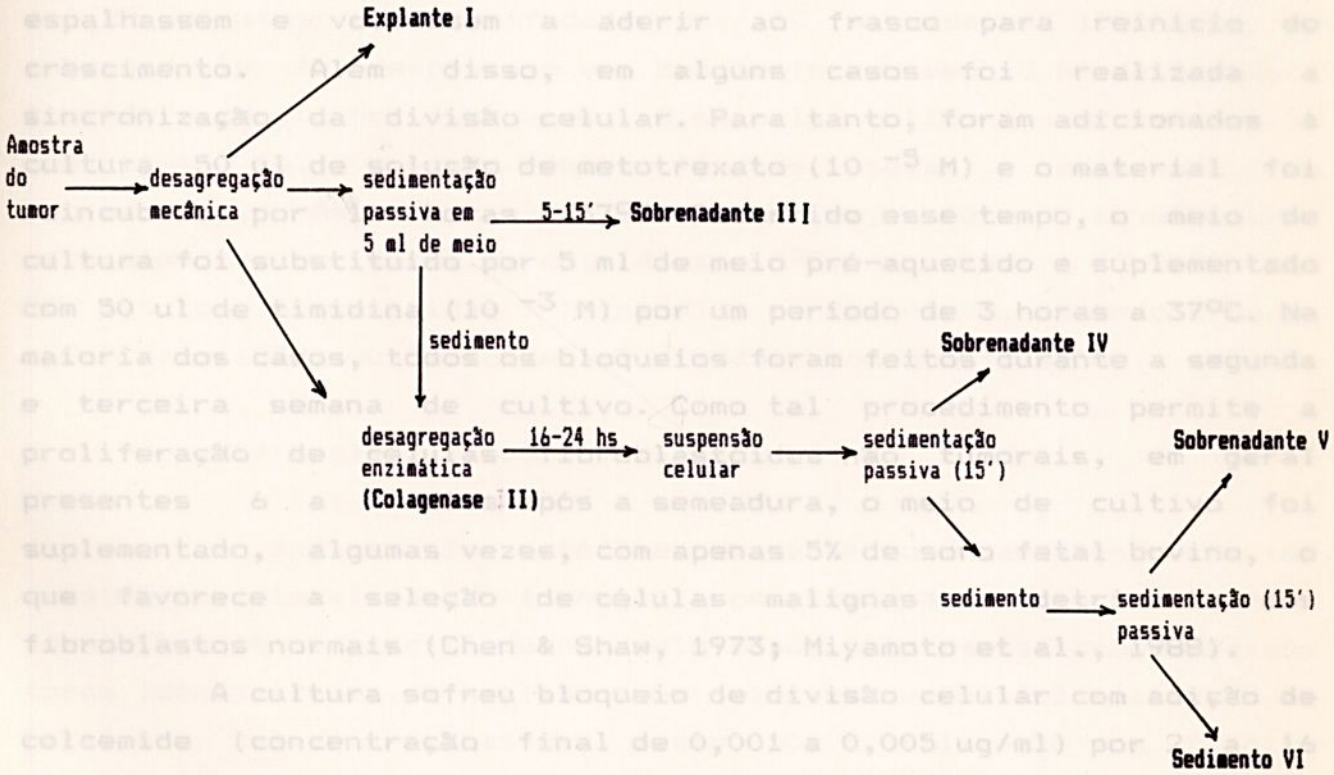


Figura 1. Esquema do processo seriado da amostra utilizado por Limon, **et al.** (1990).

O bloqueio das culturas foi individualizado para cada frasco e realizado por ocasião do pico mitótico. Para obtenção de maior número de metáfases, foi efetuada algumas vezes a troca do meio de cultura, 24 horas antes do bloqueio, ou a tripsinização do material com 2,0 ml de solução de tripsina/EDTA no tempo máximo de dois minutos, 48 horas antes do bloqueio. Essa última operação foi realizada para que as células se soltassem do substrato e, após inativação da solução enzimática com soro fetal bovino, se espalhassem e voltassem a aderir ao frasco para reinício do crescimento. Além disso, em alguns casos foi realizada a sincronização da divisão celular. Para tanto, foram adicionados à cultura 50 ul de solução de metotrexato (10^{-5} M) e o material foi reincubado por 16 horas a 37°C. Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 5 ml de meio pré-aquecido e suplementado com 50 ul de timidina (10^{-3} M) por um período de 3 horas a 37°C. Na maioria dos casos, todos os bloqueios foram feitos durante a segunda e terceira semana de cultivo. Como tal procedimento permite a proliferação de células fibroblastóides não tumorais, em geral presentes 6 a 7 dias após a semeadura, o meio de cultivo foi suplementado, algumas vezes, com apenas 5% de soro fetal bovino, o que favorece a seleção de células malignas em detrimento dos fibroblastos normais (Chen & Shaw, 1973; Miyamoto et al., 1988).

A cultura sofreu bloqueio de divisão celular com adição de colcemide (concentração final de 0,001 a 0,005 ug/ml) por 2 a 16 horas, ou ainda com a adição de colquicina (concentração final de 0,004 a 0,01 ug/ml) por 3 a 5 horas.

B.3 Hipotonização, fixação e coloração do material

Após o bloqueio de divisão, o meio dos frascos foi substituído por solução hipotônica pré-aquecida de citrato de sódio 1%, com aproximadamente o dobro do volume do meio usado, e a cultura foi novamente incubada por 30 a 40 minutos a 37°C. Depois desse período, as células aderidas foram removidas mecanicamente com o auxílio de um raspador ("scraper") e a suspensão foi centrifugada por 8 a 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o

sedimento recebeu lentamente 10 ml de fixador metanol/ácido acético 3:1. Após 20 minutos, o fixador foi trocado duas vezes e a suspensão estocada a -20°C por 10 a 12 horas.

Nos casos que sofreram sincronização da divisão celular, foi realizada, após o bloqueio, a tripsinização do material por aproximadamente cinco minutos. A suspensão celular obtida foi centrifugada e recebeu solução hipotônica pré-aquecida contendo meio de cultura e água 1:1. Em seguida, foi incubada a 37°C por 15 a 20 minutos e centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento recebeu 10 ml de fixador, trocado a seguir por duas vezes. O material obtido nos procedimentos descritos foi pingado sobre lâminas secas e observado ao microscópio. As lâminas, após secagem, foram envelhecidas naturalmente por cerca de sete dias a 5°C, ou então, a 90-96°C por 20 minutos, e submitidas à técnica de bandamento G, segundo Grouchy e Turleau (1977) ou Selden et al. (1975), com modificações.

B.4 Análise cromossômica

A análise de metáfases coradas com bandamento G foi considerada total quando todos os cromossomos da célula puderam ser identificados e parcial quando pelo menos sete pares cromossômicos foram identificados. A análise após coloração usual foi realizada em metáfases cujos cromossomos, mesmo após a utilização da técnica adequada, não apresentaram bandas.

A identificação e classificação dos eventos citogenéticos foi feita de acordo com a Conferencia de Paris de 1971 (Paris Conference, 1971; 1975) e com o ISCN (1985; 1991). Foi considerada clonal a alteração estrutural ou hiperdiploidia observada em pelo menos duas células provenientes de réplicas diferentes da mesma cultura. No caso das hipodiploidias, a clonalidade só foi considerada quando a alteração estava presente em três células de duas ou mais réplicas da cultura. As poliploidias e a endorreduplicação, mesmo obedecendo a esses critérios , não foram consideradas clonais (Mitelman, 1985; Sandberg, 1990).

IV. RESULTADOS

IV.1. Ensaios preliminares sobre condições de cultivo

No presente trabalho, foram realizados ensaios preliminares sobre a influência de diferentes técnicas de processamento inicial do tecido, da densidade celular por ocasião da semeadura, da adição do hormônio hidrocortisona e do fator de crescimento epidérmico (EGF) ao meio de cultura, com a finalidade de avaliar as condições favoráveis ao cultivo de células prostáticas. Como as amostras também eram utilizadas para estudo citogenético, a análise das condições de cultivo foram suspensas assim que o índice mitótico atingisse níveis satifatórios, para que o bloqueio da divisão celular pudesse ser efetuado.

Em relação aos diferentes tipos de processamento do tecido, realizados com amostras de três hiperplasias benignas (casos 785, 843 e 847), foi observado que o emprego da colagenase, sem utilização do método seriado, obteve resultados superiores àqueles das demais técnicas (Tabela 1). Entretanto, considerando as amostras analisadas citogeneticamente, não houve diferença aparente de proliferação entre aquelas iniciadas pela técnica de explante primário ou desagregação enzimática (Tabela 2). Quanto aos testes sobre o efeito da semeadura em diferentes densidades celulares, realizados em duas amostras de hiperplasias benignas (casos 785 e 796) e em um adenocarcinoma (caso 792), os resultados sugeriram que uma densidade maior favoreceu o crescimento celular, em especial quando essa densidade era superior a 5×10^4 (Tabela 3).

No caso da adição do hormônio hidrocortisona ao meio de cultivo, os dados referentes às amostras de quatro hiperplasias benignas (casos 785, 796, 843 e 847) não evidenciaram diferença na proliferação celular quando a droga estava presente na cultura (Tabela 4). Os mesmos resultados foram observados em relação ao emprego do EGF no cultivo de duas lesões inflamatórias (casos 1195 e 1196), duas hiperplasias benignas (casos 1220 e 1221) e um adenocarcinoma (caso 1202), embora para isso não tenham sido avaliados diferentas campos microscópicos do frasco (Tabela 5).

Tabela 1. Frequência dos tipos de campos microscópicos nos testes com diferentes tipos de processamento inicial do tecido.

Caso	Tipos de processamento	Réplica	Campos microscópicos				Dia da análise
			+	++	+++	++++	
785	colagenase (III)	1	4	0	2	2	5
		4	0	0	0	0	5
	colagenase com processamento seriado (VI)	6	0	0	0	0	5
	explante primário (I)	5	0	0	0	0	5
		2	0	0	0	0	5
		3	0	0	0	0	5
843	explante primário (I)	1a	13	0	0	0	3
		2	8	2	0	0	3
	colagenase (III)	3a	0	0	0	10	3
		4	0	0	0	9	3
		3b	4	1	1	0	3
847	colagenase com processamento seriado (IV)	1	0	0	0	0	3
		3	0	0	0	0	3
	colagenase com processamento seriado (V)	2	0	0	0	0	3
	suspensão celular (II)	4	3	0	0	0	3
		5	0	0	0	0	3
	colagenase (III)	6	12	0	0	0	3
		7	10	0	0	0	3
		8	12	0	0	0	3
		9	1	0	1	0	3
		10	12	0	0	0	3
		11	12	0	0	0	3
		12	11	0	0	0	3
		13	0	0	0	12	3
		14	6	2	0	0	3

Tabela 2. Tipo de processamento utilizado nas nove amostras de tumores de próstata analisadas citogeneticamente.

Caso	Tipo de tumor	Tipo de processamento	Número de réplicas iniciadas	Réplica com crescimento	Réplica sem crescimento
752	Adenocarcinoma	Seriado (VI)	5	2	2
766	Hiperplasia benigna	Explante (I)	2	2	1
843	Hiperplasia benigna	Explante (I)	2	1	0
		Colagenase (III)	4	4	3
896	Hiperplasia benigna	Colagenase (III)	3	3	3
962	Hiperplasia benigna	Explante (I)	2	1	1
		Colagenase (III)	2	0	0
1022	Adenocarcinoma	Explante (I)	2	2	0
		Colagenase (III)	3	2	1
1040	Adenocarcinoma	Explante (I)	3	3	3
		Colagenase (III)	5	4	4
1181	Hiperplasia benigna	Explante (I)	2	1	1
1247	Hiperplasia benigna	Explante (I)	2	0	0
		Colagenase (III)	2	1	1

Tabela 3. Frequência dos tipos de campos microscópicos nos testes com diferentes densidades celulares por ocasião da semeadura.

Caso	Réplica	Densidade celular	Campos microscópicos				Dia da análise
			+	++	+++	++++	
785	III-4	0,20 X 10^4	0	0	0	0	5
	III-1	5,16 X 10^4	4	0	2	2	5
792	III-1	11,80 X 10^4	0	0	0	5	13
	III-2	27,60 X 10^4	0	0	2	4	13
796	III-2	13,20 X 10^4	6	0	1	1	2
	III-1	19,40 X 10^4	9	0	3	0	2

Tabela 4. Frequência dos tipos de campos microscópicos nos testes com adição de hidrocortisona ao meio de cultura.

Caso	Condições	Réplica	Campos microscópicos				Dia da análise
			+	++	+++	++++	
785	teste	III-1	4	0	2	2	5
		I-2	0	0	0	0	5
		I-3	0	0	0	0	5
	controle	III-4	0	0	0	0	5
		I-5	0	0	0	0	5
796	teste	III-1	9	0	3	0	2
	controle	III-2	6	0	1	1	2
843	teste	III-4	0	0	0	9	3
	controle	III-3a	0	0	0	10	3
		III-3b	4	1	1	0	3
847	teste	III-9	1	0	1	0	3
		III-10	12	0	0	0	3
		III-11	12	0	0	0	3
		III-12	11	0	0	0	3
	controle	III-6	12	0	0	0	3
		III-7	10	0	0	0	3
		III-8	12	0	0	0	3
		III-13	0	0	0	12	3
		III-14	6	2	0	0	3

Tabela 5 . Resultados relativos ao crescimento celular de tumores de próstata nos testes com adição do fator de crescimento epidérmico ao meio de cultura.

Caso	Condição	Réplica	Com crescimento	Sem crescimento	Dias da análise
1195	teste	I-1		+	7-15
	controle	I-2		+	7-15
1196	teste	I-1	+		5
	controle	I-2	+		5
1202	teste	I-1		+	5-11
	controle	I-2	+		5
1220	teste	I-2	+		4
	controle	I-1		+	4-9
1121	teste	I-1		+	2-7
	controle	I-2		+	2-7

IV.2. Análise citogenética

No presente estudo foram processadas 76 amostras de lesões de próstata, sendo, quatro lesões inflamatórias, 49 tumores benignos e 18 malignos provenientes de indivíduos com 22 a 85 anos de idade, 58 deles caucasóides e seis negróides. Cinco, dos 76 tumores ainda não possuem resultado da análise histopatológica e, em 12 casos não foi possível saber a cor da pele do paciente. Quarenta e seis amostras não apresentaram crescimento celular, 12 provavelmente em virtude de contaminação bacteriana ocorrida nas fases iniciais do cultivo. As outras 30 mostraram crescimento celular, mas apenas nove resultaram em metáfases passíveis de análise (casos 752, 766, 843 , 896, 962, 1022, 1040, 1181 e 1247). Todas as amostras analisadas citogenéticamente foram provenientes de pacientes de cor branca, com idades variando de 58 a 77 anos. As lesões foram identificadas histopatológicamente como três adenocarcinomas prostáticos (casos 752, 1022 e 1040) e seis hiperplasias benignas de próstata (demais casos).

Algumas réplicas de sete amostras sofreram desagregação mecânica e enzimática, enquanto outras, também de sete amostras, foram submetidas à técnica de explante (Tabela 2). O bloqueio da divisão celular foi feito com adição de colquicina (caso 843 e 1247) por 3 a 5 horas ou com colcemide por um período variável de 2 a 16 horas, nos demais casos. O tempo de cultivo atingiu de 5 a 31 dias e o crescimento celular foi observado 24 horas após a semeadura nos casos 752 e 1247; 48 horas nos casos 1040 e 1181; 72 horas no caso 896 e 5 a 6 dias nos casos 766, 843, 962 e 1022. As células de todas as culturas apresentaram morfologia epitelióide (Figura 2).

Os dados relativos a idade dos pacientes, tipo de tumor, período de cultivo, período e concentração de colcemide ou colquicina são apresentados na Tabela 6. Os dados clínicos e citogenéticos serão detalhados a seguir.

Tabela 6. Dados relativos a idade dos pacientes, tipo de tumor, período de cultivo e condições de bloqueio de divisão celular de nove amostras de lesões de próstata analisadas citogeneticamente.

Caso	Idade	Tipo de tumor	Período de cultivo (dias)	Bloqueio de divisão celular		
				Agente	Tempo (horas)	Concentração final [ug/ml]
752	73	Adenocarcinoma	22	Colcemide	16	0,002
766	61	Hiperplasia benigna	28	Colcemide	8-16	0,001
843	66	Hiperplasia benigna	13-31	Colquicina	5	0,004
896	62	Hiperplasia benigna	10-14	Colcemide	2	0,005
962	65	Hiperplasia benigna	30	Colcemide	3	0,005
1022	77	Adenocarcinoma	18	Colcemide	2	0,005
1040	66	Adenocarcinoma	6-27	Colcemide	2	0,005
1181	70	Hiperplasia benigna	22	Colcemide	2	0,005
1247	58	Hiperplasia benigna	5	Colquicina	3	0,01

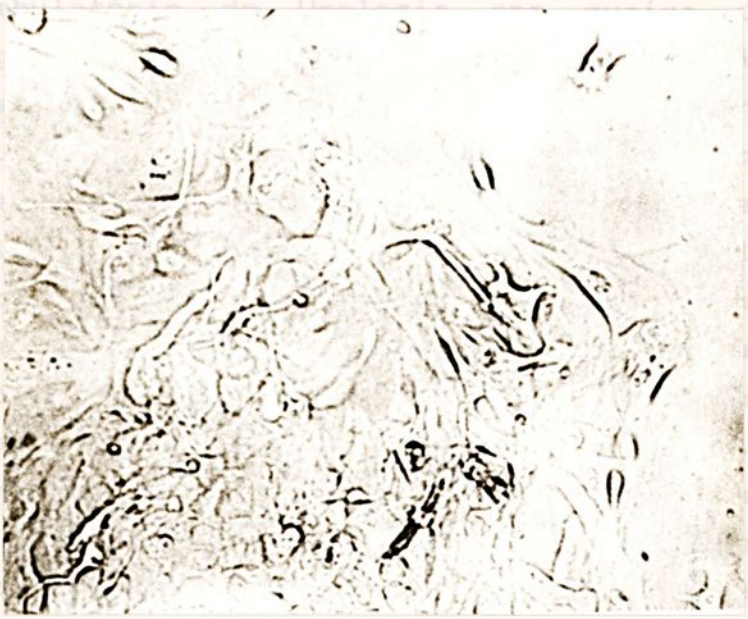


Figura 2. Fotomicrografia obtida da cultura 766 mostrando células com morfologia epitelióide.

A. Adenocarcinomas

Os achados citogenéticos relativos aos tumores malignos estudados estão resumidos na Tabela 7.

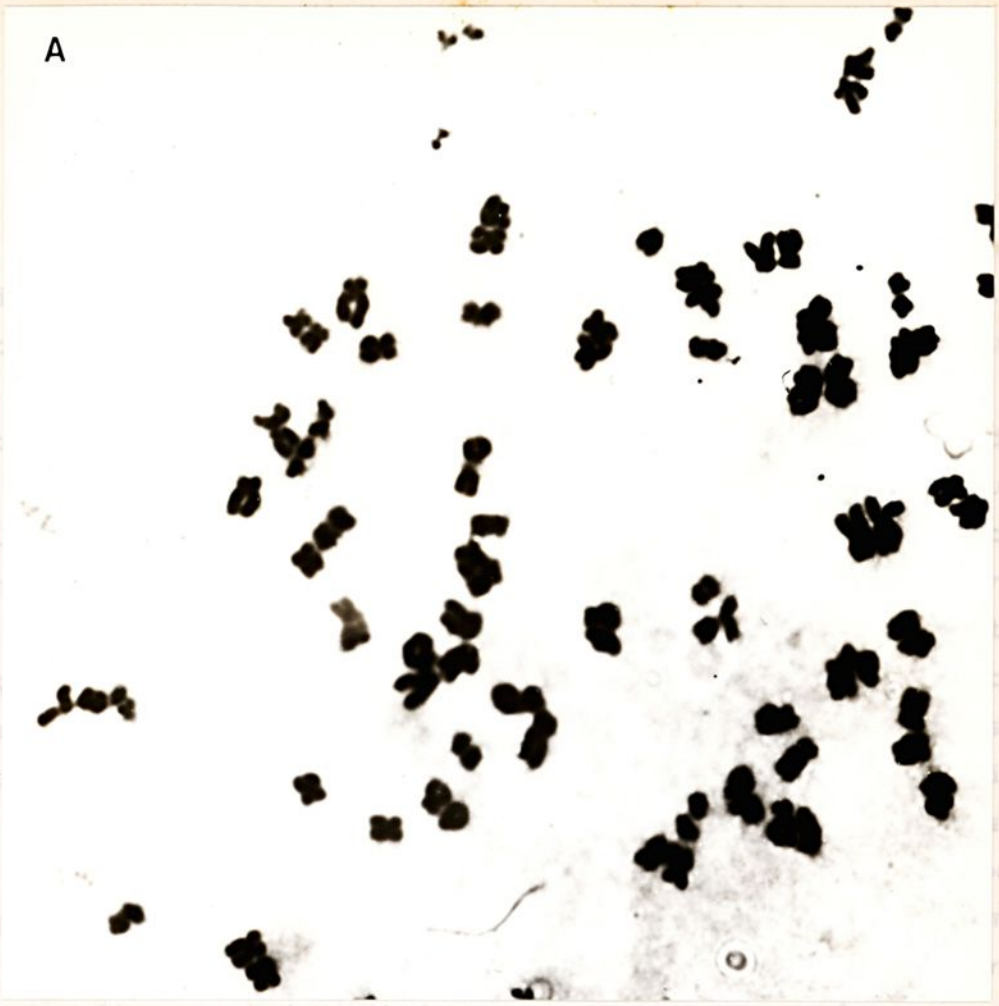
CASO 752

O paciente, com 73 anos, cor branca e não fumante, procurou o Ambulatório de Urologia com queixa de dificuldade miccional progressiva e dor lombar óssea. Foi submetido a exame de toque retal e apresentou próstata endurecida com tamanho duas a três vezes maior que o normal. Após o exame, o paciente sofreu ressecção transuretal da glândula e os fragmentos obtidos, de consistência firme e elástica, mostraram superfície externa granulosa e amarela. Ao corte, os espécimens exibiram o mesmo aspecto e foram histopatologicamente diagnosticados como adenocarcinoma bem diferenciado da próstata. Em decorrência da dor lombar óssea, o paciente havia sido submetido a Raio X de coluna, que mostrou alterações compatíveis com a presença de metástases.

Uma amostra da glândula obtida na ressecção foi submetida à desagregação mecânica e enzimática e cultivada em 5 réplicas, apenas duas com crescimento celular. Foram obtidas 165 metáfases, duas das quais permitiram somente a contagem do número cromossômico, 15 foram examinadas em coloração usual, 3 foram parcialmente analisadas em bandamento G e 3 totalmente analisadas. Dez células eram near tetraplóides, três mostraram endorreduplicação (Figura 3) e 20 células apresentavam cromossomos com cromátides separadas. Entre as 21 metáfases analisadas, cinco eram aneuplóides e três exibiram um cromossomo Cq- com tamanho semelhante ao de um cromossomo do grupo E (Figura 4A). Uma outra célula exibiu um cromossomo 3 submetacêntrico e um cromossomo Dq+ (Figura 4B).

Tabela 7. Alterações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nos três adenocarcinomas estudados.

Caso	Aberrações cromossômicas	Réplica	MO	MA
752	46,XY,3p+,Dq+[1]	IV-1	165	21
	46,XY,Cq-[3]	IV-1		
	45,XY,-C[1]	IV-1		
	45,XY,-G[1]	IV-1		
	44,XY,-C,-E[1]	IV-1		
	42,XY,-C,-C,-D,-G[1]	IV-1		
	39,XY,-6,-7,-16,-16,-19,-20,-20[1]	V-4		
	Near tetraplóide[10]	IV-1 e V-1		
	Endorreduplicação[3]	IV-1		
	Separação de cromátides[20]	IV-1		
1022	47,XY,1q-,r(?)[1]	III-5	335	19
	46,XY,dic(?2),1q-[1]	III-5		
	46,XY,dic(?)[1]	III-5		
	46,XY,?12p-[1]	III-5		
	46,XY,tr(11,?17,19)[1]	III-5		
	45,XY,-G[1]	III-5		
	Hipotetraplóide,tr(?),tr(?),r(?)[1]	III-5		
	Hipotetraplóide,tr(A,C,?G)[1]	III-5		
	Hipotetraplóide,1-14dmin[3]	III-5		
	Near tetraplóide[83]	III-4 e 5		
	Endorreduplicação[2]	III-4 e 5		
	Separação de cromátides[3]	III-5		
1040	47,XY,+mar[1]	I-1	291	17
	46,XY,3q+[1]	III-4		
	46,XY,Bp+,Bp-[1]	I-1		
	Near tetraplóide[7]	I-1 e III-3 e 4		



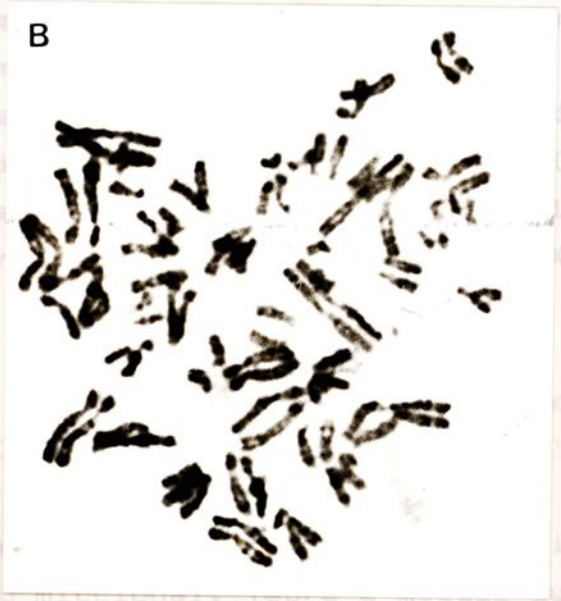


Figura 3. Visão parcial de metáfases (A) do caso 752 e (B) do caso 1022 apresentando endorreduplicação.

CASO 1022

O paciente, com 77 anos, de cor branca, procurou o Ambulatório de Urologia com queixa de dor e ardência miccional, jato fino e dificuldade em urinar. O exame clínico revelou uma próstata com tamanho duas vezes maior que o normal, endurecida e com nódulo à esquerda. O paciente, então, foi submetido à ressecção transuretral da glândula e a análise histopatológica dos fragmentos obtidos revelou um adenocarcinoma moderadamente diferenciado e invasor.

Uma amostra do material de ressecção foi submetida à desagregação mecânica ou enzimática e cultivada em cinco réplicas, das quais quatro apresentaram crescimento celular, mas apenas uma atingiu proliferação satisfatória e sofreu bloqueio. Foi obtido um total de 335 metáfases, 110 das quais permitiram somente a contagem do número cromossômico. Duas delas exibiram endorreduplicação, três mostraram cromossomos com cromátides separadas e oitenta e três eram **near** tetraplóides (Figura 5), algumas com figuras trirradiais, cromossomos em anel, cromossomos acêntricos e **double minutes** (Figuras 6A, C, D e 7). Entre as três células analisadas em coloração usual e entre as 11 parcialmente analisadas em bandamento G, foram observados cromossomos dicêntricos, monossomia G e uma figura trirradial (Figura 6B). Duas metáfases revelaram a presença de um cromossomo 1q- associado a dicêntrico ou marcador e outra tinha cariótipo 46,XY,?12p- (Figuras 4C, D e E).

CASO 1040

O paciente, com 66 anos, cor branca , fumante e sem antecedentes de câncer na família, procurou a Clínica de Urológica com história de esforço miccional, febre e micção purulenta. O exame clínico detectou glândula sensível , aumentada e com superfície lisa. O paciente, após o exame, foi submetido à ressecção transuretral da próstata. Os fragmentos obtidos na cirurgia foram encaminhados ao exame histopatológico que revelou um adenocarcinoma

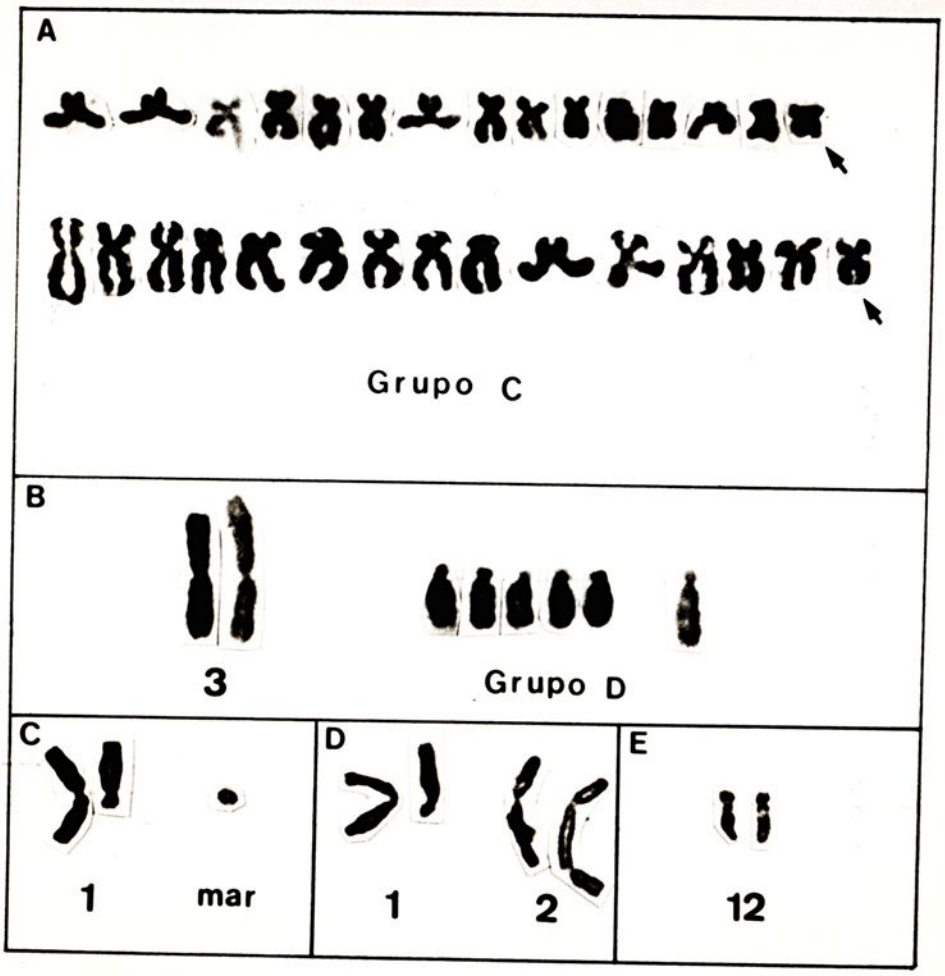


Figura 4. Cariogramas parciais das aberrações cromossômicas estruturais observadas nos adenocarcinomas estudados. (A) Duas células do caso 752 mostrando um cromossomo Cq-. (B) Célula do caso 752 exibindo um cromossomo 3 submetacêntrico e um Dq+. (C e D) Células do caso 1022 apresentando um cromossomo 1q- associado a marcador ou a um possível cromossomo 2 dicêntrico, respectivamente. (E) Possível deficiência 12p observada em uma célula do caso 1022.



Figura 5. Visão total de uma metáfase near tetraplóide do caso 1022.

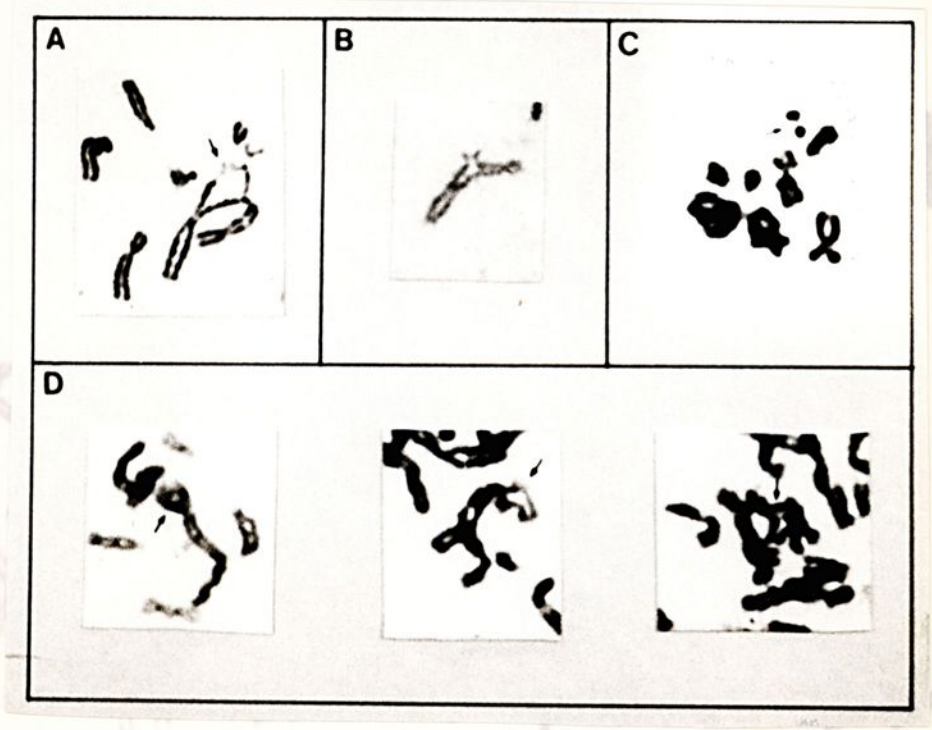


Figura 6. Visão parcial de metáfases do caso 1022: (A) Figura trirradial em uma metáfase hipotetraplóide envolvendo cromossomos dos grupos A, C e, possivelmente, G. (B) Figura trirradial em uma metáfase 46,XY envolvendo os cromossomos 11,?17 e 19. (C) **Double minutes** em metáfase hipotetraplóide. (D) Duas figuras trirradiais e um possível cromossomo em anel em uma célula hipotetraplóide.



Figura 7. Visão parcial de uma metáfase hipotetraplóide do caso 1022 contendo **double minutes** e cromossomos acêntricos.

moderadamente diferenciado.

Uma amostra da glândula foi cultivada por explante primário e também após desagregação enzimática. Oito réplicas foram cultivadas, das quais sete apresentaram crescimento celular. Foi obtido um total de 291 metáfases, nove das quais permitiram somente a contagem do número cromossômico, 12 foram analisadas em coloração usual, quatro foram analisadas parcialmente e uma completamente em bandamento G. Sete células eram near tetraplóides, uma apresentou um cromossomo marcador e duas exibiram os cariótipos 46,XY,3q+ e 46,XY,Bp+,Bp-.

B. Hiperplasias benignas

Os achados citogenéticos relativos aos tumores benignos estudados estão resumidos na Tabela 8.

CASO 766

O paciente, com 61 anos, cor branca, não fumante e recentemente submetido a exame de Raio X, procurou o Ambulatório de Urologia queixando-se de dificuldade em iniciar micção, policiúria e gotejamento terminal. O toque prostático mostrou a glândula com tamanho três vezes maior que o normal e consistência fibroelástica. Após o exame, o paciente foi submetido à ressecção transuretral da próstata e a análise histopatológica dos fragmentos obtidos revelou uma hiperplasia benigna.

Uma amostra do material foi cultivada em duas réplicas das quais foram obtidas vinte e três metáfases, duas analisadas em coloração usual. Uma delas mostrou cariótipo 45,XY,+C,-E,-E e outra tinha número cromossômico próximo ao poliplóide.

CASO 843

O paciente, com 66 anos, cor branca e sem antecedente de neoplasia, procurou o Ambulatório de Urologia onde foi submetido à ressecção transuretal da glândula prostática. Os fragmentos do

Tabela 8. Alterações cromossômicas detectadas e número de metáfases afetadas [] entre aquelas obtidas (MO) e analisadas (MA) nas amostras de hiperplasias benignas estudadas.

Caso	Aberrações Cromossômicas	Réplica	MO	MA
766	45,XY,+C,-E,-E[1]	I-2	23	2
	Near tetraplóide[1]	I-2		
843	46,XY,3p+ or q+,Cq-[1]	III-3	221	61
	46,XY,del(9),(q11 or q12)[1]	III-3		
	46,XY,Cq-[2]	III-3		
	46,XY,-B,?tas(12;12)[1]	III-4		
	46,XY,Dq-[1]	III-3		
	47,XY,+mar[1]	III-3		
	44,XY,-2,-F[1]	III-4		
	45,XY,-3[1]	III-3		
	45,XY,-B[2]	III-3		
	45,XY,-C[3]	III-3		
	45,XY,-D[1]	III-3		
	45,XY,-E[1]	III-3		
	45,XY,-G[2]	III-3		
	44,XY,-G,-G[1]	III-3		
	43,XY,-C,-F,-G[1]	III-3		
	Near tetraplóide[5]	III-3		
	Endorreduplicação[2]	III-3		
	Separação de cromátides[1]	III-3		
896	46,XY,3p+ or q+[4]	III-2 e 3	604	74
	46,XY,-C,3p+,22q+[1]	III-2		
	46,XY,Cq+[1]	III-2		
	46,XY,22p+[1]	III-3		
	47,XY,+D[1]	III-2		
	47,XY,+E[1]	III-3		
	48,XY,+C,+G[1]	III-3		
	45,XY,-3[1]	III-3		
	45,XY,-B[3]	III-2 e 3		
	45,XY,-9[1]	III-3		
	45,XY,-D[1]	III-2		
	45,XY,-F[1]	III-2		
	45,XY,-22[1]	III-3		
	45,XY,-G[3]	III-1 e 2		
	45,XY,-G ou -E?[1]	III-2		
	44,XY,-C,-22[1]	III-3		
	45,XY,-B,-F,+mar[1]	III-3		
	46,XY,-E,+mar[1]	III-2		
	Near tetraplóide[7]	III-1 e 3		
962	44,XY,-C,-D[1]	I-3	12	2
	Hipotetraplóide,r(?),?7dmin[1]	I-3		
	Near tetraplóide[1]	I-3		
1181	46,XY,3q+[1]	I-1	193	15
	46,XY,Bp-[1]	I-1		
	46,XY,?9,18p-[1]	I-1		
	47,XY,-C,3q+,+mar[1]	I-1		
	Hipotetraplóides[39]	I-1		
	Separação de cromatides[44]	I-1		
1247	45,XY,-D,Bq-,Bp+[1]	III-4	20	5
	Near tetraplóide[1]	III-4		
	Separação de cromátides[1]	III-4		

tecido obtidos foram encaminhados para exame anatomopatológico, que diagnosticou uma hiperplasia benigna.

Uma amostra do material foi cultivada por explante e também após desagregação enzimática. Das seis réplicas semeadas, cinco mostraram crescimento celular, mas apenas três sofreram bloqueio de divisão. Foi obtido um total de 221 metáfases, 38 examinadas com coloração usual, 18 parcialmente analisadas após técnica de bandamento G e cinco completamente analisadas. A maioria das células era diplóide, cinco eram near tetraplóide, duas apresentava endorreduplicação e uma exibiu cromossomos com cromátides separadas. Quatorze metáfases mostraram perdas cromossômicas aparentemente casuais, duas delas com cariótipo 45,XY, -B (Figura 8A), uma exibiu a deficiência del(9)(q11 or q12) (Figura 9C) e outra uma possível associação telomérica tas(12;12) e monossomia B (Figura 8A). Em três células foi observada a presença de um cromossomo Cq-, em uma delas associado a um cromossomo 3 submetacêntrico, e outras duas mostraram um cromossomo Dq- ou um marcador.

CASO 896

O paciente, de 62 anos, cor branca, fumante e sem antecedentes de câncer, procurou o Ambulatório de Urologia com queixa de dificuldade miccional progressiva. O toque prostático mostrou a glândula com tamanho duas vezes maior que o normal e consistência fibroelástica. O paciente sofreu ressecção transuretral da glândula e a análise histopatológica dos fragmentos obtidos revelou uma hiperplasia benigna da próstata.

Uma amostra do tecido foi submetida à desagregação mecânica e enzimática e cultivada em três réplicas, todas com crescimento celular. Foi obtido um total de 604 metáfases, a maioria delas diplóide e apenas sete near tetraplóides. Quinze células mostraram perdas cromossômicas aparentemente casuais, quatro delas com monossomia B associada ou não a outras alterações (Figura 8B), duas exibiram cromossomos marcadores (Figura 8D), três eram trissômicas (Figura 8C e E) e uma tinha cariótipo Cq+. Um cromossomo

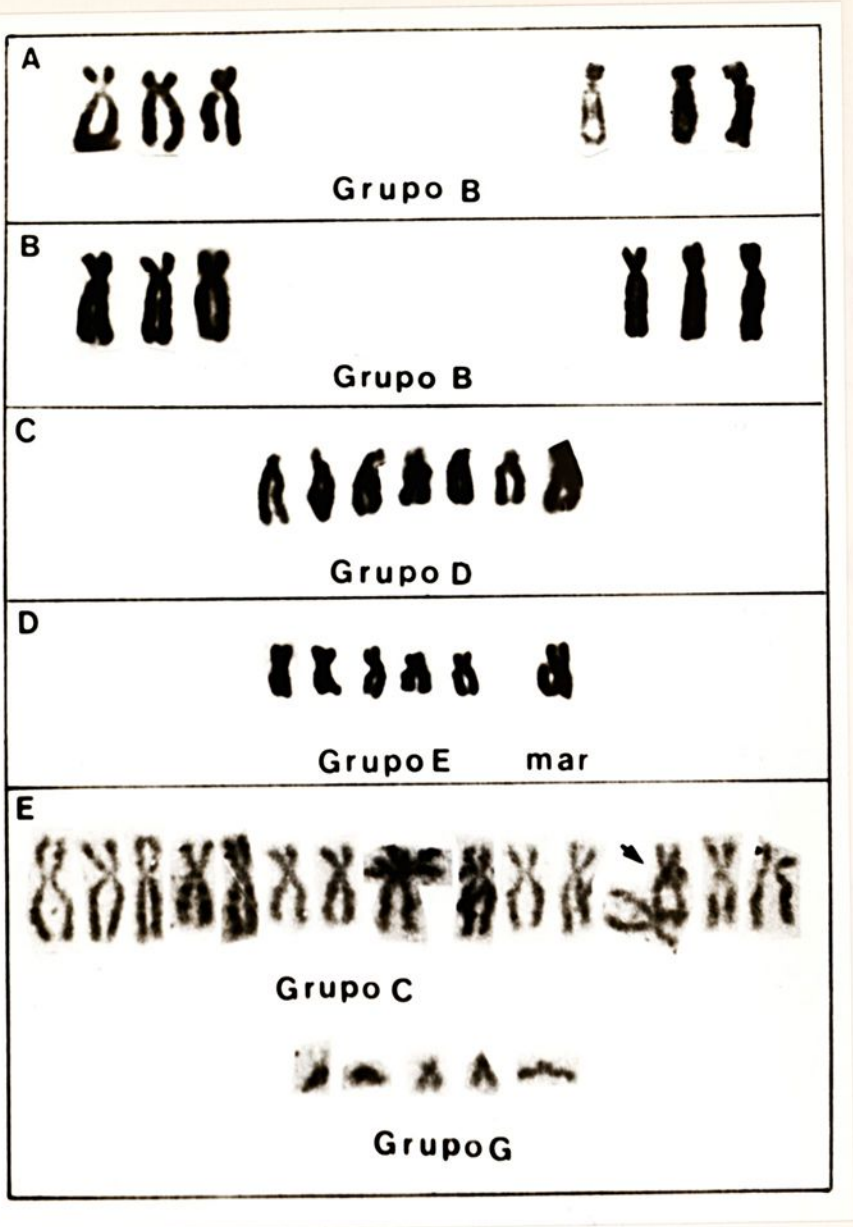


Figura 8. Cariogramas parciais de duas hiperplasias benignas estudadas exibindo aberrações cromossomicas numéricas. (A) Monossomia B observadas em duas células do caso 843. (B) Duas células do caso 896 contendo monossomia B. (C) Trissomia D em uma célula do caso 896. (D) Monossomia E e cromossomo marcador observados em uma metáfase do caso 896. (E) Trissomia C e G em uma célula do caso 896. A seta indica um cromossomo do grupo g.

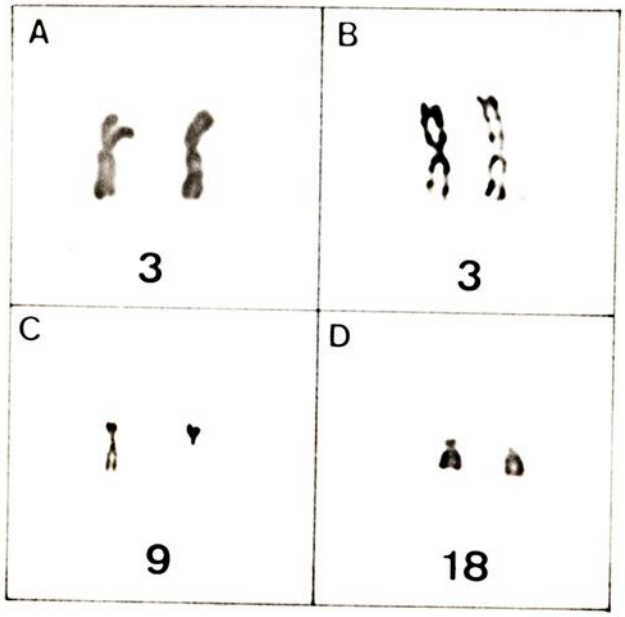


Figura 9. Cariogramas parciais de duas hiperplasias benignas apresentando aberrações cromossômicas estruturais. (A) Cromossomo 3 submetacêntrico observado em células do caso 896 e (B) do caso 1181. (C) Deficiência del(9)(q11 or q12) em uma célula do caso 896. (D) Deficiência del(18)(p) observada em uma célula do caso 1181.

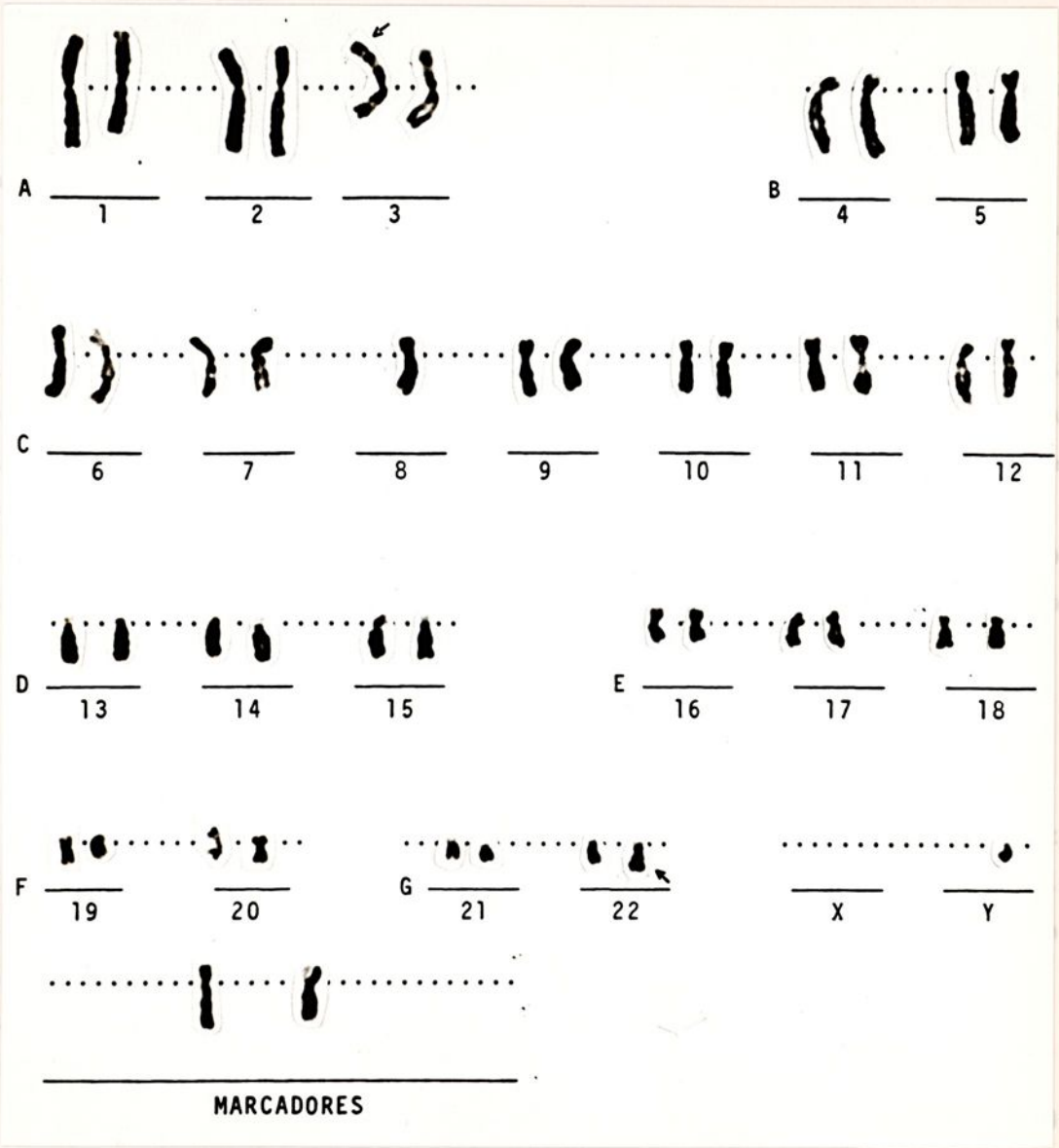


Figura 10. Cariograma total de uma metáfase do caso 896 com cariótipo 46,XY,-C,3p+,22q+.

3 submetacêntrico foi observado em cinco metáfases, uma delas também com monossomia C, e um cromossomo 22q+ (Figura 10).

CASO 962

O paciente procurou o Ambulatório de Urologia com queixa de dificuldade miccional. Foi submetido ao toque prostático e, após o exame, sofreu ressecção transuretral da próstata. A análise dos fragmentos diagnosticou uma hiperplasia benigna da glândula prostática.

Uma amostra do material foi desagregada mecânica ou enzimáticamente e cultivada em quatro réplicas, das quais apenas uma apresentou crescimento celular. Foi obtido um total de 12 metáfases, duas analisadas em coloração usual e duas outras permitiram somente a contagem do número cromossômico. Duas células eram **near** tetraplóides, uma delas com vários cromossomos acêntricos, **double minutes** e um cromossomo em anel (Figura 11), e outra mostrou o cariótipo 44,XY,-C,-D.

CASO 1181

O paciente, de cor branca, com 67 anos de idade, procurou o Instituto de Urologia e Nefrologia com queixa de dificuldade miccional. Foi submetido ao exame de toque prostático e, então, encaminhado para uma biópsia aspirativa dirigida por ultrassonografia. A análise dos fragmentos diagnosticou uma hiperplasia benigna da próstata.

Uma amostra da glândula foi submetida à desagregação mecânica e cultivada em duas réplicas, das quais apenas uma apresentou proliferação celular. Foi obtido um total de 193 metáfases. Trinta e nove delas eram hipotetraplóides e 44 apresentavam separação de cromátides (Figura 12). Nove células foram analisadas em coloração usual, cinco parcialmente e uma completamente em bandamento G. Duas apresentaram deficiência parcial do braço curto do cromossomo 18 (Figura 9D) ou de um cromossomo B e outras duas exibiram um cromossomo 3 submetacêntrico (Figura 9B),



Figura 11. Visão total de uma metáfase do caso 962 exibindo **double minutes**, cromossomos acêntricos e anel.



Figura 12. Visão total de uma metáfase do caso 1181 com separação de cromátides

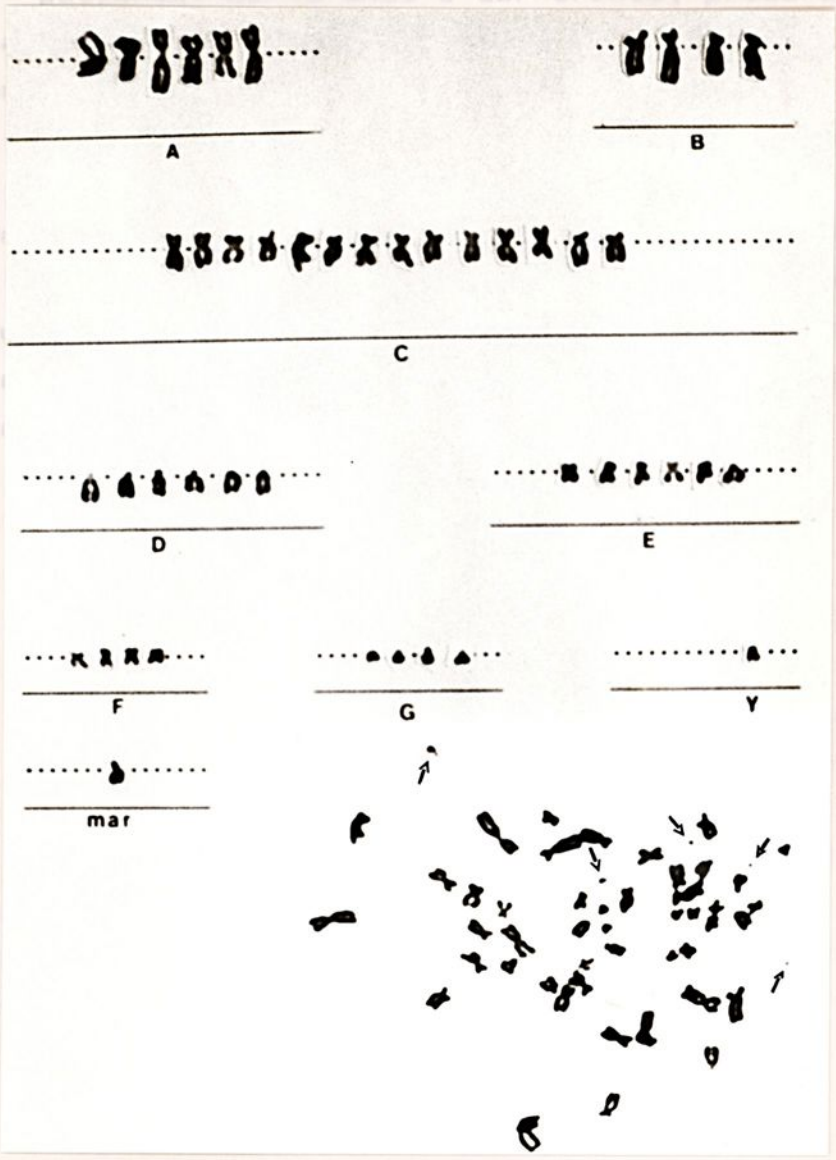


Figura 13. (A) Cariograma de uma metáfase do caso 1181 com cariótipo 46,XY,-C,3q+,+mar. (B) Visão total da metáfase mostrando cinco acêntricos.

em uma delas associado com diferentes alterações (Figura 13).

CASO 1247

O paciente, de 58 anos e cor branca, procurou o Instituto de Urologia e Nefrologia com queixa de dificuldade miccional. Após o toque prostático, o paciente foi encaminhado a uma biópsia aspirativa dirigida por ultrassonografia. A análise dos fragmentos identificou uma hiperplasia benigna da próstata.

Uma amostra do material foi cultivada em quatro réplicas das quais foram obtidas 20 metáfases. Cinco foram analisadas em coloração usual, uma das quais apresentou o cariótipo 45,XY,-D,Bq-, Bp+. Uma metáfase era near tetraplóide e outra exibiu cromossomos com cromátides separadas.

V. Discussão

A próstata é um orgão com predisposição a doenças benignas e malignas e, por isso, atrai grande interesse para a caracterização das propriedades e funções de suas células. A análise do tecido normal e também de nódulos hiperplásicos e de outras lesões dependem, muitas vezes, de culturas primárias e de longa duração. Desse modo, algumas técnicas têm sido elaboradas com o objetivo de obter um grande número de células viáveis após a desagregação do tecido e de atingir níveis adequados de divisão celular pela adição de diferentes agentes mitogênicos ao cultivo. No entanto, o sucesso tem sido restrito. No caso de estudos citogenéticos, a dificuldade em estabelecer culturas de curta duração é a principal causa que limita a obtenção de informações (Limon **et al.**,1990).

Com a finalidade de detectar a influência de diferentes fatores sobre a proliferação de células prostáticas **in vitro** e, consequentemente, de obter uma técnica adequada que resultasse em boas preparações cromossômicas, foram realizados alguns ensaios preliminares sobre condições de cultivo. Esses ensaios utilizaram um número pequeno de amostras e, portanto, seus resultados não permitiram generalizações mas servem de base para que outros estudos sejam feitos.

A adição de hidrocortisona ao meio de cultura, embora recomendada por Peehl & Stamey (1986) e Freshney (1987), não mostrou um efeito consistente em testes realizados com células de quatro tumores. É provável que tal resultado seja consequência da concentração usada, uma vez que alguns trabalhos referem-se à utilização desse hormônio em níveis mais elevados que aqueles presentemente empregados. Por exemplo, Leibovitz (1986) e Mertens (comunicação pessoal, 1991) sugerem que a hidrocortisona deve ser usada em quantidades iguais a 3,61 ug/ml e 200 ug/ml, respectivamente, cerca de 10 a 1000 vezes maior que aquela utilizada no presente trabalho (0,5 ug/ml) e recomendada por Freshney (1987).

Além da hidrocortisona, outros fatores podem promover a divisão celular, de forma isolada ou sinergisticamente. Investigações dos mecanismos moleculares e celulares responsáveis

pela iniciação e progressão do câncer de próstata sugerem que uma variedade de fatores de crescimento desempenham um papel importante na proliferação e na diferenciação tanto da próstata normal como das células prostáticas tumorais (Thompson, 1990). Com base nessas informações, o fator de crescimento epidérmico foi adicionado a cinco culturas, porém os resultados não mostraram qualquer efeito sobre a proliferação. Sabe-se que o EGF possui papel mitogênico, isoladamente ou somado a hidrocortisona (Limon **et al.**, 1990), em cultivo de células normais e tumorais da próstata, porém sua ação é reduzida em culturas de carcinoma com alta densidade celular (Thompson, 1990), provavelmente devido à secreção elevada de fatores de crescimento endógenos (Hofer **et al.**, 1991). Essa pode ser uma das explicações para os resultados obtidos nesse experimento, que iniciou com densidades focais elevadas em virtude da semeadura por explante primário. Um outro ponto que deve ser considerado é o fato de que a expressão de alguns receptores para fatores de crescimento é regulada por andrógenos (Thompson, 1990). Desse modo, nos cultivos com EGF, poderia ser necessaria a adição de testosterona (Schwurmans **et al.**, 1991) que, como citada anteriormente, estimula a secreção da glândula e o crescimento da lesão, se essa já existir (Srougi, 1990).

Pandis **et al.**(1992) referem que o modo pelo qual a amostra é processada inicialmente pode ser crucial para os resultados citogenéticos e citam como exemplo seus achados em quatro tumores de mama cultivados após desagregação mecânica ou enzimática. Foram observadas diferenças clonais entre as réplicas, o que indica heterogeneidade citogenética do tumor e dados cariotípicos que refletem o tipo de dissociação do tecido ou o tempo em cultura. Com a finalidade de avaliar esse parâmetro, diferentes técnicas de processamento foram testadas. Embora com bons resultados descritos pela literatura (Limon **et al.**, 1990; Pandis **et al.**, 1992), o processamento seriado não resultou em elevação dos índices mitóticos ou de boas preparações cromossômicas, nas condições laboratoriais disponíveis. O crescimento celular mais adequado foi observado com o emprego da técnica de desagregação enzimática simples do tecido por colagenase, proposta por Limon **et al.** (1986), ou da técnica de

explante primário. Isto ocorreu provavelmente porque, nessas duas situações, o material era menos manuseado e, portanto, menos sujeito a perdas, contaminação e lesão. Não é possível descartar, entretanto, a possibilidade de que a utilização do meio Ham F-10, e não do PFMR-4 recomenada por Limon **et al.** (1990), seja em parte responsável pelo insucesso obtido quando diferentes frações de sedimentação foram usadas. Nesse ponto, convém salientar que o meio PFMR-4 não suplementado com soro fetal bovino (SFB) têm sido usado para inibir o crescimento de fibroblastos em culturas de células prostáticas humanas (Peehl & Stamey, 1986). Entretanto, a adição de SFB geralmente melhora a viabilidade das células neoplásicas (Limon **et al.**, 1990) e não parece ter influenciado, no presente estudo, a proliferação substancial de células fibroblastóides. Em relação a esse aspecto, Limon **et al.** (1990) cita que o processamento seriado retém uma maior porcentagem de células viáveis originadas do epitélio neoplásico da glândula além de pequenas estruturas semelhantes a ácinos que aumentam a migração e proliferação dessas células **in vitro**. Entretanto, o método de explante primário também pode levar a esses resultados, dado que mantém uma certa arquitetura do tecido. De qualquer modo, as diferenças entre as técnicas não afetaram o crescimento de células epitelióides, que foram as únicas visíveis em todas as culturas com metáfases. Infelizmente, não existem marcadores disponíveis para o reconhecimeneto de células neoplásicas e do epitélio normal (Konig **et al.**, 1993) e não é possível afirmar que apenas um dos tipos esteve presente.

Além dos ensaios descritos, foram avaliadas também as densidades celulares iniciais de cultivo que variaram entre 0,20 x 10^4 e 27,60 x 10^4 células/ml em amostras de um adenocarcinoma e duas hiperplasias benignas de próstata. Os dados obtidos sugeriram que densidades iguais ou superiores a 5 a 6 x 10^4 células/ml parecem favorecer o crescimento celular, o que já foi citado pela literatura (Bird e Forrester, 1981; Freshney, 1987). Tal fato provavelmente decorre dos efeitos favoráveis da interação entre células próximas para a proliferação celular, que está ausente em culturas iniciadas com suspensões muito diluídas (Peehl e Stamey, 1986; Freshney, 1987).

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

Nesse estudo, foram cultivadas amostras de tumores de próstata de 76 indivíduos. As neoplasias benignas foram as mais frequentemente recebidas e esse resultado pode ser explicado pelo fato de serem mais comuns entre homens até 70 anos, que constituem a parcela maior da população. A faixa etária dos indivíduos ficou entre os valores esperados e exibiu idades mais avançadas para aqueles portadores de carcinoma ($\bar{x}$ =70 anos) e mais baixa para os afetados por hiperplasia benigna ($\bar{x}$ =63 anos), como já foi referido por Rodrigues Neto Jr. (1986). Os pacientes caucasóides também foram mais frequentes e tal fato provavelmente reflete a composição da população atendida. Além disso, no Brasil, os portadores de tumores de próstata são mais observados entre os de raça branca (Srougi, 1990), o que reforça o papel de fatores etiológicos, genéticos e sócioculturais no desenvolvimento dessa condição (Wynder, 1971; Hsing, 1990).

Em relação ao sucesso na cultura das amostras recebidas, os resultados mostraram que aproximadamente 60% dos casos não exibiram proliferação celular, um valor relativamente baixo em função das tentativas de adequadação das condições de cultivo ao material de estudo. O número de casos com metáfases passíveis de análise também foi pequeno e igual a aproximadamente 28% entre aqueles que mostraram crescimento celular. Esse resultado pode ter sido consequente da composição do meio de cultura empregado, de sua suplementação e da eficiência ou validade dos demais reagentes e frascos utilizados. O próprio comportamento das células, determinado pela constituição genética ou por influências humorais recebidas *in vivo*, pode ter contribuído para um baixo índice mitótico. Tais dificuldades, que também são descritas na literatura (Limon *et al.*, 1990; Sandberg, 1992), explicam de certa forma os avanços limitados na área da citogenética dessas lesões. De qualquer modo, os problemas enfrentados são inerentes ao estudo dos tumores sólidos e compreendem, além dos já citados, a frequente contaminação dos espécimens, que muitas vezes impossibilita seu crescimento *in vitro*. Por exemplo, doze (15%) dos tumores recebidos exibiram a presença de bactérias durante a desagregação enzimática ou nas fases iniciais do cultivo, primariamente responsável pelo insucesso nesses casos. Como

os microrganismos foram detectados logo após o processamento e a semeadura, é possível que fossem resultantes de manuseio inadequado durante a colheita do espécimen, embora realizado em centro cirúrgico e por pessoal médico treinado.

No presente estudo, todos os nove tumores revelaram cariótipos normais na maioria de suas células. Tal achado está de acordo com aqueles da literatura, principalmente pelo fato de que seis lesões eram benignas. Realmente, a análise de dez hiperplasias benignas prostáticas por Casalone **et al.** (1993) mostra, em cinco casos, apenas a perda clonal do Y e um rearranjo estrutural, além de diferentes anomalias esporádicas na maioria deles.

Em relação aos dados citogenéticos em lesões malignas referidos pela literatura, a maioria daqueles observados em células obtidas após culturas de curta duração também mostrou apenas cariótipos normais (Jellinghaus **et al.**, 1976; Gibas **et al.**, 1985; Brothman **et al.**, 1989, 1990; Babu **et al.**, 1990 Micale **et al.**, 1992; Lundgren **et al.**, 1992). Tal achado pode ser explicado como decorrente da proliferação de células epiteliais normais presentes no espécimen ou de fibroblastos derivados do tecido conjuntivo adjacente, que certos autores acreditam ser consequente dos processos de desagregação enzimática da amostra por colagenase (Konig **et al.**, 1993). Pode também ser especulado que a alteração primária em câncer de próstata ocorre em nível submicroscópico ou gênico (Brothman **et al**, 1990).

Recentemente, Konig **et al** (1992), analisando núcleos interfásicos com a técnica de hibridização **in situ** fluorescente (FISH), observaram declínio da triploidia e tetraploidia após cultivo celular. Micale **et al.** (1993), por sua vez, compararam análises citogenéticas convencionais de tumores prostáticos e aquelas após FISH em tecidos emblocados em parafina e observaram diferenças significativas no tipo e extensão das aberrações cromossômicas. O mesmo foi verificado por Konig **et al.** (1993) após a utilização da técnica de citometria de fluxo para a análise do espécimen fresco, e de hibridização **in situ** fluorescente antes e após cultura celular. Seus resultados revelaram uma redução de 44 até 85% de aneuploidia e podem explicar a elevada frequência de

cariótipos diplóides, provavelmente em virtude da seleção dessas células em detrimento daquelas com aberrações cromossômicas. Apesar desses achados, a análise citométrica realizada por diferentes laboratórios tem mostrado que muitos desses tumores são realmente diplóides ou têm números cromossômicos próximos a 46 (Brothman et al., 1990; Jones et al., 1990; Haugen & MjOlnerOd, 1990; Micale et al., 1992).

As seis lesões hiperplásicas presentemente investigadas exibiram perdas cromossômicas esporádicas, exceto a monossomia de um cromossomo B, observada em três células do caso 893 e em quatro do caso 896. E interessante ressaltar que foram detectados marcadores, além de algumas anomalias estruturais esporádicas dos cromossomos 9, 12 e 18 e outras recorrentes como aquelas envolvendo o cromossomo 3 e um cromossomo C. Nesse último caso, existe a possibilidade de se tratar de uma deficiência do braço longo do cromossomo 7 ou 10, já referida em alguns carcinomas de próstata (Atkin & Baker, 1985; Gibas et al., 1985; Konig et al., 1988, 1993; Lundgren et al., 1989, 1992). Em relação à monossomia B, é conveniente citar que monossomia do cromossomo 5 já foi referida por Brothman et al. (1990) em tumores prostáticos e pode indicar o início do processo de malignização nas lesões hiperplásicas em questão.

De modo geral, durante muito tempo foi aceito que lesões benignas apresentavam constituição cromossômica normal em virtude das raras figuras mitóticas e de núcleos atípicos em preparações histológicas, e de achados citogenéticos normais obtidos sem o auxílio de técnicas de bandamento cromossômico (Sandberg, 1990). Entretanto, estudos recentes em várias condições consideradas benignas com base no seu comportamento e dados histológicos têm levado à sugestão de que as aberrações cromossômicas nem sempre estão ligadas ao estado maligno ou então que alguns tumores benignos devem ser considerados pré-malignos ou mesmo malignos (Sandberg, 1988; Teyssier et al., 1989). Por exemplo, tanto os leiomiomas quanto os leiomiossarcomas apresentam rearranjos das regiões 7q22-q32, 19q22 e 12q14-15 (Havel et al., 1989; Kiechle-Schwarz et al., 1990). Do mesmo modo, os lipomas mostram o envolvimento consistente das bandas 12q13-q14, o que é também descrito em lipossarcomas

mixóides (Dal Cin & Sandberg, 1989; Frigere **et al.**, 1990; Sreekantaiah **et al.**, 1990). Em alguns desses casos ocorre a aparente coincidência de alterações em uma mesma região cromossômica, tanto em processos malignos como em seus equivalentes benignos, o que indica um padrão citogenético semelhante no desenvolvimento dessas condições.

No grupo dos adenocarcinomas, chamou a atenção novamente a deficiência Cq- vista em três células do caso 752, a presença de um cromossomo 3 submetacêntrico nos caso 752 e 1040 e a deficiência parcial do cromossomo 1 observada em duas células do caso 1022. Em relação a esse último achado, rearranjos estruturais do cromossomo 1 foram descritos por Atkin e Baker (1985) e Konig **et al.** (1988) em carcinomas e sarcomas e, constituem um evento frequente em tumores sólidos de maneira geral (Teyssier, 1989; Sandberg, 1990).

Um padrão potencialmente relacionado com a progressão do câncer de próstata tem emergido da correlação das anomalias cariotípicas com a diferenciação da lesão. As aberrações cromossômicas são muito mais comuns em tumores pobremente diferenciados, o que pode sugerir que estejam mais envolvidas com características biológicas desses carcinomas do que com sua iniciação (Brothman **et al.**, 1990; Lundgren **et al.**, 1992). Também reforçam essa idéia os dados de Micale **et al.** (1993) obtidos após a utilização das técnicas de citogenética convencional em células cultivadas e de hibridização **in situ** fluorescente em material proveniente de amostras embebidas em parafina. A maioria das lesões em estadios menos avançados mostrou cariótipos diplóides normais tanto na análise citogenética convencional quanto por FISH. Essa última, entretanto, revelou-se mais eficiente na detecção de aberrações cromossômicas de modo geral e, além disso, demonstrou que os tumores classificados como mais avançados eram caracterizados por um maior número de cromossomos envolvidos em eventos aneussômicos. Os dados fornecidos pela técnica de citometria complementam as afirmações acima e, segundo a revisão feita por Stearns & McGarvey (1992), indicam que o conteúdo normal de DNA preconiza uma menor probabilidade de metástases.

As análises citogenéticas convencionais mostram algumas alterações específicas em carcinomas prostáticos. O achado mais frequente é a perda do cromossomo Y (Atkin e Backer, 1985; Lundgren **et al.**, 1988, 1992; Brothman **et al.**, 1989, 1990; Babu **et al.**, 1990; Micale **et al.**, 1992), embora seu significado seja ainda questionável por ser observada também em hiperplasias benignas, em células normais de diferentes tecidos e em medula óssea de homens idosos (Lundgren **al.**, 1992; Casalone **et al.**, 1993). Entretanto, a técnica de hibridização **in situ** tem revelado que essa alteração está presente apenas em células neoplásicas (Micale **et al.**, 1993; Van Debben & Alers, 1993) e, portanto, relacionada com esse tipo de tumores. E interessante que, na presente amostra de nove tumores, foram observadas poucas células com monossomia G, aparentemente não identificada como sendo perda do cromossomo Y.

Rearranjos estruturais dos braços longos dos cromossomos 7 e 10, em particular nas bandas 7q22 e 10q24, também foram identificadas por vários autores como alterações citogenéticas consistentes, embora não tenham sido correlacionadas com características clínicas como a sobrevida dos pacientes (Lundgren **et al.**, 1992). A deficiência 8p, mais especificamente 8p22, também é frequente e deve estar associada com a perda em homozigose do loco MSR contido nessa banda e detectada por análises moleculares realizadas por BOVA **et al.** (1993). A monossomia dos cromossomos 1, 2 e 5 e a perda dos alelos dos cromossomos 16 e 18 são comuns e, juntamente com os rearranjos estruturais descritos, sugerem alteração da expressão de oncogenes e de genes supressores de tumor que pode ser responsável pelo desenvolvimento de algumas neoplasias da próstata (Brothman **et al.**, 1990 e Micale **et al.**, 1992). E interessante citar que uma célula da amostra 1181 de hiperplasia benigna exibiu uma deficiência parcial do braço curto do cromossomo 18. Seu significado, entretanto, não pode ser avaliado.

Uma outra alteração cromossômica numérica que parece ser importante nesse grupo de lesões é a trissomia 7, identificada também através da técnica FISH por Micale **et al.** (1993) e por Bandyk **et al.** (1994) em núcleos interfásicos. Esses últimos autores acreditam que a anomalia está relacionada com a progressão do tumor

por conferir às células cancerosas uma vantagem proliferativa, talvez decorrente do desequilíbrio de dosagem do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico mapeado em 7p13 (McAlpine, **et al.**, 1991; Micale **et al.**, 1992). As trissomias foram raras entre as amostras estudadas. Infelizmente, os cromossomos extras não puderam ser identificados e, mesmo que o fossem, o significado de anomalias com tais frequências seria pouco consistente.

As amplificações gênicas caracterizadas pela presença de **double minutes** ou regiões homogeneamente coradas já foram vistas em vários tumores primários e linhagens celulares de próstata por diferentes autores (Brothman **et al.**, 1989, 1990; Limon **et al.**, 1989; Lundgren **et al**, 1992; Arps **et al.**, 1993) e também pelo presente trabalho, mas sua relação com características histológicas, estágio ou prognóstico da neoplasia não tem sido referida. Esses dois fenômenos citogenéticos são bem conhecidos em neuroblastomas e em tumores de células pequenas de pulmão, onde estão associados com níveis elevados e produtos de oncogenes da família MYC e com maior agressividade da lesão (Brodeur **et al.**, 1986; Brooks **et al.**, 1987).

Um fato interessante observado em todas as amostras estudadas foram as alterações não recorrentes do tipo aneuploidias, que incluiram principalmente perdas cromossômicas. Tais eventos, presentes em até 21 % das células de todos os casos (Tabela 9), já foram detectados por Brothman **et al.** (1990), Micale **et al.** (1992) e Breitkreuz **et al.** (1993) em mais de 15% de 119 carcinomas prostáticos. Considerando que as metáfases analisadas por este estudo e por outros não apresentavam sinais de lesão, esses achados podem representar uma característica das células neoplásicas relacionada com instabilidade genética responsável pela origem de clones hipodiplóides. E possível que a perda do Y seja um subgrupo dessas aneuploidias que tem vantagens proliferativas. Como tanto no presente trabalho como nos demais citados as trissomias foram raras, o mecanismo envolvido não deve ser a falta de disjunção mitótica.

Considerando o exposto acima, a frequência elevada de carcinomas latentes na população e a detecção de hipodiploidias em lesões benignas, parece razoável a hipótese de que mecanismos inespecíficos como a instabilidade genética estão envolvidos na

carcinogênese da próstata (Breikreuz et al., 1993) e podem ser importantes na progressão do tumor para um estágio metastático e agressivo (Micale et al., 1992). Não pode ser esquecido, entretanto, que períodos prolongados de cultivo exercem um papel importante na origem de instabilidade cromossômica. Tais períodos foram de 5 a 31 dias nos tumores estudados, embora os casos 752, 843 e 896 com frequência elevada de células aneuplóides tiveram tempos de cultura diferentes, ou seja, 22, 13 a 31 e 10 a 14 dias, respectivamente.

A ausência de clones anômalos no presente estudo pode estar relacionada com o número limitado de células analisadas em bandamento G, o que leva a um número menor de eventos identificados. A instabilidade genética, portanto, deve ser maior que aquela notificada. E possível também que, se mais metáfases de boa qualidade tivessem sido obtidas, a clonalidade seria verificada para algumas das aberrações cromssômicas.

A observação de células com números cromossômicos próximos ao tetraplóide foi feita em todas as amostras estudadas, atingindo níveis de 26% das metáfases obtidas em um adenocarcinoma (1022) e 20% em uma hiperplasia benigna (1181) (Tabela 9). Esses fenômeno, juntamente com a hiperdiploidia, já foi referida por vários autores em lesões malignas (Lundgren et al., 1988, 1992; Brothman et al., 1989, 1990; Micale et al., 1992; Wullich et al., 1992; entre outros). A ploidia anormal de DNA também foi detectada em estudos citométricos e correlacionada com o volume e progressão do tumor, embora esteja às vezes presente em áreas de simples hiperplasia da glândula (Deitch et al., 1993). E possível, portanto, que a poliploidia represente um evento comum nas células prostáticas e esteja associada com a malignidade ou com o comportamento da lesão (Svendsen et al., 1990).

Tribukait (1991) e Zetterberg & Forsslund (1991) reforçam o conceito de um desenvolvimento contínuo do tumor de próstata, do estágio inicial para um estágio mais avançado, associado à duplicação do genoma diplóide seguido de sucessivas perdas cromossômicas no tumor tetraplóide. Entretanto, considerando esse aspecto, os achados da amostra 1181 podem sugerir um início de malignização enquanto aqueles da amostra 1022, que compreenderam

principalmente hipotetraploidia além de outras anomalias incomuns, podem indicar um mau prognóstico e requerer um tratamento clínico mais agressivo. Em relação a essas últimas anomalias citadas, as figuras trirradiais e os acêntricos, provavelmente decorrentes de trocas cromatídicas, nunca foram citados em doenças de próstata.

A endorreduplicação é citada como sendo predominante nas passagens iniciais da cultura, ao contrário da poliploidia que aumenta com o número de repiques (Chen e Shaw, 1973). No presente estudo, foi observada em dois casos de adenocarcinomas (752 e 1022) e em uma hiperplasia (843) e sua frequência foi sempre inferior a 2%.

Outro fenômeno interessante observado foi o de células com separação de cromátides nas amostras de adenocarcinomas e em duas hiperplasias benignas, atingindo frequências de 12% (caso 752) e 22% (caso 1181). Tais eventos já foram referidos na análise de algumas neoplasias hematopoéticas e seminomas e creditados como sendo responsáveis pela origem de células poliplóides (Atkin e Baker, 1992). Entretanto, outros autores, como Chamla (1988), referem que a separação de cromátides pode ser decorrente de condições **in vitro**, tais como exposição prolongada ou doses elevadas de colcemide. Essa hipótese, porém, não explica os presentes achados pois o tempo de bloqueio nas amostra 1181 foi de apenas 2 horas e a concentração de colcemide na amostra 752 foi reduzida à metade em relação as demais.

A frequência com que células com números cromossômicos elevados e com monossomias esporádicas foi observada nos adenocarcinomas e hiperplasias benignas de próstata estudados é sugestiva de instabilidade genética nessas lesões. Se tais eventos estão relacionados com a progressão tumoral ou com a heterogeneidade do tumor não foi possível determinar e a resposta a questões desse tipo requerem uma análise prospectiva e a investigação de sua associação com alterações moleculares. Os próprios dados da literatura mostram que anomalias cariotípicas simples não podem ser definidas como marcadores desse grupo de neoplasias e nenhuma correlação foi evidenciada, até o presente, de um evento citogenético com características histológicas da lesão. Além disso, o câncer de próstata tem muitos focos tumorais e uma quantidade

variável de estroma e epitélio não maligno e a existência de múltiplos clones citados por alguns autores (Arps et al., 1993; Micale et al., 1992) pode representar heterogeneidade genética. Uma implicação desses dados é que a alteração primária deve ocorrer no nível gênico ou submicroscópico e que qualquer conclusão sobre avaliação prognóstica das anomalias cromossômicas é prematura, com exceção daquela a partir de conteúdos elevados de DNA e comportamento agressivo.

Tabela 9. Frequências relativas* de células diplóides (DI), hipo e hiperdiplóides (HP), pseudodiplóides (PD) e near tetraplóides (NT) em culturas primárias de seis hiperplasias benignas e três adenocarcinomas** de próstata.

Caso	DI	HP	PD	NT
752**	57%	24%	19%	6%
766	50%	50%	0%	4%
843	57%	33%	10%	2%
896	78%	14%	8%	1%
962	50%	50%	0%	8%
1022**	63%	11%	26%	26%
1040**	70%	18%	12%	2%
1181	73%	7%	20%	20%
1247	80%	20%	0%	5%

* As frequências de células DI, HP e PD foram calculadas sobre o número de células analisadas e aquelas de células NT sobre o número de células obtidas.

VI. Resumo

O câncer prostático é uma das neoplasias mais frequentes em homens e, apesar da alta incidência dessa lesão na população, os dados citogenéticos são limitados quando comparados com outros tumores sólidos comuns. Esse fato provavelmente decorre das dificuldades referentes ao cultivo de suas células e, consequentemente, da obtenção de boas preparações cromossômicas. Os estudos citogenéticos já realizados têm revelado aneuploidias, além de deleções envolvendo os cromossomos 1, 7, 8 e 10. Entretanto, os próprios dados da literatura mostram que anomalias cariotípicas simples não podem ser definidas como marcadores desse grupo de neoplasia e nenhuma correlação foi evidenciada, até o presente, entre um evento citogenético e características histológicas da lesão.

O objetivo do presente estudo foi investigar os padrões cariotípicos em três adenocarcinomas primários e seis hiperplasias benignas da próstata. O principal achado foi o cariótipo diplóide normal, encontrado em 69% de todas as células analisadas. As perdas ou ganhos cromossômicos não clonais também foram frequentes e detectados em aproximadamente 21% metáfases estudadas e as células **near** tetraplóides foram observadas em uma frequência que variou entre 1% a 26% das metáfases.

As aberrações cromossômicas estruturais foram observadas em menos que 12% das células e incluem as deficiências parciais de um cromossomo C, e do cromossomo 1 e um cromossomo 3 submetacêntrico, além de cromossomos marcadores, acêntricos, anéis, **double minutes** e figuras trirradiais.

A presença dessas aberrações aparentemente casuais sugerem que a instabilidade cromossômica pode ser caracteristica das culturas de lesões prostáticas. A alta proporção de metáfases supostamente normais, por sua vez, parece indicar que a alteração primária nesse grupo de tumores deve ocorrer no nível gênico ou submicroscópico. Esses achados requerem uma análise prospectiva com a investigação de técnicas citogenéticas e moleculares combinadas para a determinação dos mecanismos citogenéticos precisos e da

sequência de eventos associados com a iniciação e a progressão do câncer prostático.

VII. Summary

Prostatic cancer is one the most common malignacy in men. Despite the high incidence of this neoplasia, the cytogenetic data are still limited as compared to other solid tumors. The main reasons for this lack of information are due to the low mitotic activity of the tumor in culture and the low yield of metaphase chromosomes available for analysis. Previous reports of a small number of primary prostate tumors have demonstrated both the loss or gain of chromosomes as well as deletion involving chromosomes 1, 7, 8 and 10. Howewer, to date, no consistent abnormality is known to be associated with this cancer and its metastatic progression to other sites.

The aim of the present study was to investigate the karyotypic pattern of three primary adenocarcinomas and six benign hyperplasias of the prostate by conventional cytogenetic analysis. The most common findings was a normal male diploid chromosome complement, found in 69% of all cells analyzed. Cultures demonstrated chromosome instability, defined herein as nonclonal gain or loss of chromosomes in more than 21% of the mataphases. In those cases, loss of chromosomes was more common than gain. Near-tetraploidy was also seen in 1% to 26% of cells of all samples.

Apparently random structural aberrations were observed in less than 12% of all cells. These included a Cq-, 1q- and a submetacentric chromosome 3, and also markers, acentric, rings, double minute chromosomes and trirradial figures. The extend of apparently random aberrations suggests that chromosome instability characterizes cultured prostatic lesions and the high proportion of apparently normal metaphases may indicate that the earliest primary change in this tumor occurs at the submicroscopic level. Those findings require further studies and a combine cytogenetic and molecular approach to investigate the precise genetic mechanisms and sequence of events associated with initiation and progression of prostatic cancer.

VIII. Referências bibliográficas

ADOLFSSON, J., RONSTROM, L., HEDLUND, P.O., LOWHAGEN, T., CARSTENSEN, J., TRIBUKAIT, B. (1990). The prognostic value of modal deoxyribonucleic acid in low grade, low stage untredted prostate cancer. **J. Urol.**, v. 144, p 1404-1407.

AHMANN, F.R., WOO, L., HENDRIX, M., TRENT, J.M. (1986). Growth in semisolid agar of prostate cancer cells obtaneid from bone marrow aspirates. **Cancer Res.**, v. 46, p. 3560-3564.

AL-ABADI, H. & NAGEL, R. (1990). Nuclear DNA analysis: the relevance of ploidy, DNA heterogeneity and phases of the cell cycle in 329 patients with prostatic carcinoma. **Urol. Int.**, v. 45, p. 350-355.

ARPS, S., RODEWALD, A., SCHMALENBERGER, B., CARL, P., BRESSEL, M., KASTENDIECK, H. (1993). Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 66, p. 93-99.

ATKIN, B.N. & BAKER, C.M. (1985). Chromosome 10 deletion in carcinoma of the prostate. **N. England J. Medicine**, v. 312, p. 315.

ATKIN, N.B. & BAKER, M.C. (1992). Mitotic spindle failure in human cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 62, p. 106-107.

BABU, V.R., MI;LES, B.J., GERNY, J.C., WEISS, L., VAN DYKE, D.L. (1990). Cytogenetic study of four cancer of the prostate. **Cancer Res.**, v. 48, p. 83-87.

BANDYK, M.G., ZHAO, L., TRONCOSO, P., PISTERS, L.L., PALMER, J.L., von ESCHENBACH, A.C., CHUNG, L.W.K., LIANG, J.C. (1994). Trisomy 7: a potential cytogenetic marker of human prostate cancer progression. **Gene Chromosome Cancer**, v. 9, p. 19-27.

BERGES, R.R., FURUYA, Y., REMINGTON, L., ENGLISH, H.F., JACKS, T., ISAACS, J.T. (1993). Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, v.90, p. 8910-8914.

BIRD, B.R. & FORRESTER, F.T. (1981). **Basic laboratory tecniques in cell culture.** Atlanta, Departament of helth and tumor services.

BORING, C.C., SQUIRES, T.S., TONG, T. (1993). Cancer statistics, 1993. **Ca. Cancer J. Clin.**, v. 43, p. 7-26.

BOVA, G. S., CARTER, B. S., BUSSEMAKERS, J.G., EMI, M., FUJIWARA, Y., KYPRIANOW, N., JACOBS, S. C., ROBINSON, J. C., EPSTEIN, J. I., WALSH, P. C. ISAACS, W. B. (1993). Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human rpostate cancer. **Cancer Res.**, v. 53, p. 3869-3873.

BREITKREUZ, T., ROMANAKIS, K., LUTZ, S., SEITZ, G., BONKHOFF, H., UNTEREGGER, G., ZWERGEL, T., ZANG, K.D., WULLICH, B. (1993). Genotypic characterization of prostatic carcinomas: a combined cytogenetic, flow cytometry, and **in situ** DNA hybridization study. **Cancer Res.**, v. 53, p. 4035-4040.

BRODEUR, G.M. & SEEGER, R.C. (1986). Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanismis and clinical implication. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19, p. 101-111.

BROOKS JUNIOR, B.J., BATTEY, J., NAU, M.M., GAZDAR, A.F., MINNA, J.D. (1987). Amplification and expression of the MYC gene in small-cell lung cancer. **Adv. Viral Oncol.**, v. 7, p. 155-172.

BROTHMAN, A.R., LESHO, L.J., SOMERS, K.D., SCHELLHAMMER, P.F., LADAGA, L.E., MARCHANT, D.J. (1989). Cytogenetic analysis of four priimary prostatic cultures. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 37, p. 241-248.

BROTHMAN, A.R., PEEHL, D.M., PATEL, A.M.. McNEAL, J.E. (1990). Frequency and pattern of kariotypic abnormalities in human prostate cancer. **Cancer Res.**, v. 50, p. 3795-3803.

BROTHMAN, A.R., PEECHL, D.M., PATEL, A.M., MAcDONALD, G.R., McNEAL, J.E., LAGDA, L.E, SCHELLHAMMER, P.F. (1991). Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostatic tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 55, p. 79-84.

BROTHMAN, A.R., PATEL, A.M., PEEHL, D.M., SCHELLHAMMER, P.F. (1992). Analysis of prostate tumor cultures using fluorescence in situ hibridization (FISH). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 62, p. 180-185.

BROTHMAN, A.R. & PATEL, A.M. (1992). Characterization of 10 marker chromosomes in a prostatic cancer cell line in situ hibridization. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 60, p. 8-11.

CARTER, B.S., EPSTEIN, J.I., ISAACS, W.B. (1990). RAS gene mutations in human prostate cancer. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6830-6832.

CASALONE, R., PORTENTOSO, P., GRANATA, P., MINELLI, E., RIGHI, R., MERONE, E., POZZI, E., CHIRAVALLI, A. M. (1993). Chromosome changes in benign prostatic hyperplasia and their significance in the origem of prostatic carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 68, p. 126-130.

CHAMLA, Y. (1988). C-anaphases in lymphocyte cultures versus premature centromere division syndromes. **Hum. Genet.**, v. 78, p. 111-114.

CHEN, T.R. & SHAW, M.W. (1973). Stable chromosome changes in a human malignant melanoma. **Cancer Res.**, v. 33, p. 2042-2047.

CHING, K.Z., RAMSEY, E., PETTIGREW, N., CUNHA, R.D., JANSON, M., DODD, J.G. (1993). Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. **Mol. Cell Biochem.**, v. 126, p. 151-158.

COLLINS, V.P., KUNIMI, K., BERGERHEIM, U., EKMAN, P. (1991). Molecular genetics and human prostatic carcinoma. **Acta Oncol.**, v. 30, p. 181-185.

CRAWFORD. E.D. (1990). Hormonal terapy of prostatic carcinoma. **Cancer**, v. 66, p. 1035-1038.

DAL CIN, P. & SANDBERG, A.A. (1989). Chromosome changes in soft tissue tumors: Begign and malignant. **Cancer Invest.**, v. 7, p. 63-76.

DEITCH, A.D., MILLER, G.J.. de VERE WHITE, R.W. (1993). Significance of abnormal diploid DNA histograms in localized prostate cancer and adjacente benign prostatic tissue. **Cancer**, v. 72, p. 1692-1700.

FORDHAM, M.V.P., BURDEGT, A.H., MATTHEWS, J., WILLIANS, G.,; COOKE, T. (1986). Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometric and its relation to clinical outcome. **Br. J. Surg.**, v. 73, p. 400-403.

FRANKFURT, O.S., CHIN, J.L., ENGLANDER, L.S., RECO, W.R., PONTES, J.E., RUSTUM, Y.M. (1985). Relatiship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1418-1423.

FRAUENHOFFER, E.E., JAE, M.D., RO, J., EL-NAGGAR, A,K., ORDONEZ, N.G., AYALA, A.G. (1991). Clear cell cribriform hyperplasia of the prostate. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 95, p. 446-453.

FRESHNEY, R.T. (1987). **Culture of animal cells - A manual of basic technique.** Edt Alan R. Liss, Inc, New York, 254p.

FRIEDLANDER, M.L., HEDLEY, D.W., TAYLOR, I.W. (1984). Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. **J. Clin. Pathol.**, v. 37, p. 961-974.

FRIGERE, M.F., MUGNERET, F., TURC-CAREL, C. (1990). Chromosomal studies in a series of 13 lipossarcomas. Del(6)(q14q24) as non randon secundary change associated with mixoid subtipe. **In: 2nd European workshop on cytogenetics and molecular genetics of human solid tumors**, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for Human Genetics, University of Leuven, p68.

GIBAS, Z., EDSON, P., SANDBERG, A.A. (1985). Chromosome rearrangements in a metastatic adenocarcinoma of the prostate. **Cancer Genet. Cytogenetic.**, v. 16, p. 301-304.

GODDARD, A.D. & SOLOMON, E. (1993). Genetic aspect of cancer. **In: Advances in Human Genetics.** Ed. Harris & K Hirschhorm. Plenum Press, London.

GREENE, D.M., TAYLOR, S.R., WHEELER, T.M., SCARDINO, P.T. (1991). DNA ploidy by image analysis of individual foci prostate cancer: a preliminary report. **Cancer Res.**, v. 51, p. 4084-4089.

HALLOWES, R., COX, S., HAYARD, S., DESHPANDE, N., TOWLER, J. (1991). Effects of flutamide and hidroxi-flutamide on the growth of human benign prostatic hyperplasia cells in primary culture - A preliminary report. **Anticancer Res.**, v. 11, p. 1799-1805.

GROUCHY, J.D.E. & TURLEAU, C. (1977). **Atlas des Maladies Cromosomiques.** Paris, Expansion Scientific Francise.

HAUGEN, O.A. & MJOLNERO, O. (1990) DNA-ploidy as prognostic factor in prostatic carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 45, p. 224-228.

HAVEL, G., DAHLENFORDS, R., WEDELL, B., MARK, J. (1989). Similar chromosomal evolution in a uterine stromomyosarcoma and in one of two leiomyomas from same patient. **APMIS.**, v. 97, p. 143-146.

HEIM, S. & MITELMAN, F. (1986). Numerical chromosome aberrations in human neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 22, p. 99-108.

HOFER, D.R., SHERWOOD, E.R., BROMBERG, W.D., MEDELSONHN, J., LEE, C. (1991). Autonomous growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells: role of tranforming growth factor alpha[1]. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2780-2785.

HSING, G., WACHOLDER, S., CO CHEIN, H.T., BLOT, W.J. (1990). Diet, tabacco use, and fatal prostate cancer. Results from the luteran brotherhood cohort study. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6836-6840.

ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. HARNDEN, D.G., PATH. F.R.C., KLINGER, H.P. (1985). Ed. Karger, Besel, p117.

ISCN: Guidelines for cancer cytogenetics. Supplement to an international system for human cytogenetic nomenclature. MITTELMAN. F. (1991). Ed. Karger, Besel, p56

JELLINGHAUS, W., OKODA, K., RAGG, C., GERARD, H., SCHRODER, F.H. (1976). Chromosomal studies of human prostatic tomors "in vitro". **Investigat. Urol.**, v. 14, p. 16-19.

JONES, E.C., McNEAL, J., BRUCHOVSKY, N., JONG, G,. (1990) DNA content in prostatic adenocarcinoma. **Cancer**, v. 66, p. 752-757.

KIECHLE-SCHARZ, M., SREEKENTAIACH, C., BERGER, C.S., PEDRONE, S., MEDCHILL, M.T., SURTI, U., SANDBERG, A.A. (1990). Nonrandon cytogenetic changes in leiomyomas of the female genitourinary tract. **In: 2nd European workshop on cytogenetics and molecular genetics of human solid tumors**, Leuven, 30/07-01/08/1990, **Abstracts**, Center for human Genetics, University of leuven, p.59.

KIM, J.H., SHERWOOD, E.D., SUTKOWSKI, D.M., LEE, C., KOZLOWSKI, J.M. (1991). Inhibition of prostatic tumor cell prolifrration by suramin: alterations in TGF alpha-mediated autocrine growth regulation and cell cycle distribution. **J. Urol.**, v. 146, p. 171-176.

KNUDSON JUNIOR, A.G. (1989). Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. **Cancer**, v. 63, p. 1888-1891.

KONIG, J.J., HAGEMEIJER, A., SMIT, B., KAMST, E., ROMIJN, J.C., SHODER, F.H. (1988). Cytogenetic characterization of an established senografted prostatic adenocarcinoma cell line (PC-82). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 34, p. 9-99.

KONIG, J.J., TEUBEL, W., ROMIJN, H., HAGEMEIJWER, A., SCHODER, F.H. (1992). Intherphase cytogenetics of proastate cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 66, p. 151.

KONIG, J.J., TEUBEL, W., WILLEM van DANGEN, J., HAGEMEIJER, A., ROMIJN, J.C. (1993). Tissue culture loss of aneuploid cells from carcinomas of the prostate. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 8, p. 22-27.

KOOISTRA, A., KONIG, J.J., ROMIJN, J.C., SCHRODER, F.H. (1991). Negative control of epithelial cell proliferation by prostatic stroma. **Anticancer Res.**, v. 11, p. 1495-1500.

LEIBOVITZ, A. (1986). Development of tumor cell lines. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19, p. 11-19.

LANGELER, E.S., VANUFFELEN, C.J.C., BLANKENSTEIN, M.A., VANSTEENBRUGGE, G.J., MULDER, E. (1993). Effect of culture conditions on androgen sensitivity of the human prostatic cancer cell line LNCaP. **Prostate**, v.23, p. 213-223.

LIMON, J., DAL CIN, P., SANDBERG, A.A. (1986a). Amplification of long term collagenese disagregation for cytogenetic analysis of human solid tumor. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 23, p. 305-315.

LIMON, J., DAL CIN, P., SANDBERG, A.A. (1986b). Cytogenetic findings in a primary leiomyosarcoma of the prostate. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 22, p. 159-167.

LIMON, J., LUNDGREN, R, ELFIVING, P., HEIM, S., KRISTOFFERSSON, U., MANDHAHAL, N., MITELMAN, F. (1989). Double minutes in two primary adenocarcinoma of the prostate. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 39, p. 191-194.

LIMON, J., LUNDREN, R., ELFIVING, P., HEIM, S., KRISTOFFERSSON, U., MANDHAL, N.; MITELMAN, F. (1990). An improved techinique for short term culturing of human prostatic adenocarcinoma tissue of cytogenetic analysis. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 46, p. 191-199.

LUNDBERG, S., CARSTENSEN, J., RUDQUIST, I. (1987). DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. **Cancer Res.**, v. 47, p. 1973-1977.

LUNDGREN, R., KRISTOFFERSSON, V., HEIM, S., MANDHAL, N., MITELMAN, F. (1988). Multiple structural chromosome rearrangement, including

del(7q) and del(10q), in an adenocarcinoma of the prostate. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 35, p. 103-108.

LUNDGREN, R., MANDHAL, N., HEIM, S., LIMON, J., HENRIKSON, H., MITELMAN, F. (1992a). Cytogenet analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. **Gene Chromosome Cancer**, v. 4, p. 16-24.

LUNDGREN, R., MANDHAL, N., HEIM, ANDERSON, H., MITELMAN, F. (1992b). Chromosome abnormalities are associated with unfavorable outcomo in prostatic cancer patients. **Journal Urol.**,v. 147, 784-788.

LYNCH, H.T. & HIRAYAMA, T. (1989). **Genetic epidemiology of cancer.** Florida: CRC press.

MARTIKAINEN, P., KYPRIANOU, N., TUCKER, R.W., ISAACS, J.T. (1991). Programed death of nonproliferating androgen-indepenent prostatic cancer cells. **Cancer Res.**, v. 51, p. 4693-4700.

MELLON, K., THOMPSON, S., CHARLTON, R.G., MARSH, C., ROBINSON, M., LANE, D.P., HARRIS, A.L., HORNE, C.H.W., NEAL, D.E. (1992). p53, c-erb-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. **J. Urol.**, v. 147, p. 496-499.

MERCKEL, D.E. & McGUIRE, W.L. (1990). Ploidy, proliferative activity and prognosis. **Cancer**, v. 65, p. 1194-1205.

MICALE, M.A., MOHAMED, A., SAKR, W., POWELL, I.J., WOLMAN, S.R. (1992). Cytogenetics of primary prostatic adenocarcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 61, p. 165-173.

MICALE, N.A., SANFORD, J.S., POWELL, I.J., SAKR, W.A., WOLMAN, S.R. (1993). Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: Paraffin FISH vs metaphase analysis. **Cancer Genet. Cytogenet.** , v. 69, p. 7-12.

MILLER, J., HORSFALL, D.J, MARSHAL, V.R., RAO, D.M., LEONG, A.S.Y. (1991). The prognostic value of deoxyribonucleic acid flow cytometric analysis in estage D_2 prostatic carcinoma. **J. Urol.**, v. 145, p. 1192-1196.

MITELMAN, F. (1985). **Catalogue of chromosome aberrations in cancer.** Ed 2ª., New York, Alan R. Liss. Inc.

MITELMAN, F. (1986). Clustering of chromosomal breakpoints in neoplasia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 19. p. 67-71.

MIYAUCHI, T., NAGAYAMA, T., MARUYAMA, K. (1992). Chromosomal abnormalities in carcinoma and hyperplasia of the prostate.

Japanese J. Urol., v. 83, p. 66-74.

MONTOGOMERY, B.T., BLUTE, M.L., FARROW, G.M., MYERS, R.P., ZINCKE, H., THERNEAU, T.M., LIEBER, M.M. (1990). Stage B prostate carcinoma. **Arch. Surg.**, v. 125, p. 327-331.

MORRIS, G.L. & DODD, J.G. (1990). Epidermal growth factor receptor mRNA levels in human prostatic tumors and cell lines. **Journal Urol.**, v. 143, p.2-1274.

NAVONE, N.M., TRONCOSO, P., PISTERS, L.L., GOODROW, T.L. PALMER, J.L., NICHOLS, WW., VONESCHENBACH, A.C., CONTI, C.J. (1993). p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. **J. Nat. Cancer Int.**, v.85, p. 1657-1669.

NEVALAINEN, M.T., HARKONEN, P.L., VALVE, E.M., PING, W., NURMI, M., MARTIKAINEN, P.M. (1993). Hormone regulation of human prostate in organ culture. **Cancer Res.**, v. 53, p. 5199-5107.

OLEA, N., SAKABE, K., SOTO, A.M., SONNENSCHEIN, C. (1990a). The proliferation effect of "anti-androgens" on the androgen-sensitive human prostate tumor cell line LNCaP. **Endocrinilogy**, v. 126, p. 1457-1463.

OLEA, N., ALMODOVAR, J.M.R., PEDRAZA, V. (1990b). Hormonodependencia en lineas celulares tumorales mamarias y prostaticas. **Rev. Espanhola Fisiol**, v. 46, p. 83-88.

PANDIS, N., HEIM, S., BARDI,G., LIMON,J., MANDAHL,N., MITELMAN,F. (1992). Improved techniques for short-term culture and cytogenetic analysis of human brest cancer. **Gene Cromosome Cancer**, v. 4, p. 1-7.

PARIS CONFERENCE (1971): Standardization in human cytogenetics. **Birth Defects, 8.**

PARIS CONFERENCE (1971) SUPPLEMENT (1975): Standardization in human cytogenetics. **Birth Defects, 11.**

PEEHL, D.M. & STAMEY, T.A. (1986). Serum-free growth of adult human prostatic epithelial cells. **In vitro Cell Develop. Biol.**, v. 22, p. 82-90.

PEEHL, D.M., WONG, S.T., STAMEY, T.A. (1991). Cytostatic effects of suramin on prostate cancer cells cultured from primary tumors. **Journal Urol.**, v. 145, p. 624-630.

PITTMAN, S., RUSSEL, P.J., JELBART, M.E., WASS, J., REGHAVAN, D. (1987). Flow cytometric and kariotypic analysis of a primary small cell carcinoma of the prostate: A xenografted cell line. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 26, p. 165-169.

ROBERTSON, C.N. & PAULSON, D.F. (1991). DNA in radical prostatectomy specimens. **Acta Oncol.**, v. 30, p. 205-207.

SANDBERG, A.A., TURC-CAREL, C., GEMMIL, R.M. (1989). Chromosome in solid tumors and beyond. **Cancer Res.**, v. 48, p. 1049-1059.

SANDBERG, A.A. (1990) **The Chromosome in Human Cancer and Leukemia**, 2ª. Ed, New York, Elsevier North, Holland, 1315p.

SANDBERG, A.A. (1992). Chromosomal abnormalities and related events in prostate cancer. **Hum. Pathol.**, v. 23, p. 368-380.

SCHURMANS, A.L.G., BOLT, J., VELDSCHOLTE, J., MULDER, E. (1991). Regulation of growth of LNCaP human prostate tumor cells by growth factors and steroid hormones. **J. Steroid Biochem. Mol Biol.**, v. 40, p. 193-197.

SELDEN, J.R, MOORHEAD, P.S., OEHLERT, M.L., PATTERSON, D.F. (1975). The giemsa banding pattern of the canine karyotype. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 15, p. 380-387.

SIMARD, J., VEILLEUX, R., LAUNOIT, Y., HAAGENSEN, D.E., LABRIE, F. (1991). Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cencer cell. **Cancer Res.**, v. 51, p. 4336-4341.

SOLOMON, E., BORROW, J., GODDARD, A.D. (1991). Chromosome aberrations and cancer. **Science**, v. 254, p. 1153-1160.

SREEKANTAIACH, C., LEONG, S., SANDBERG, A.A. (1990). Complex cytogenetic changes in benign neoplasms. Report of six lipomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 47, p. 113-130.

SROUGI, M. & SIMON, D. (1990). **Cancer Urológico.** São Paulo, Gráfica Platina, 490p.

STEARNS, M.E. & McGARVEY, T. (1992). Prostate cancer: therapeutic, and basic studies. **Lab. Invest.**, v. 67, p. 540-552.

STEPHENSON, R.A., JAMES, B.C., GAY, H., FAIR, W.R., WHITMORI, Jr, W.F., MELAMED, M.R. (1987). Flow Cytometric of prostate cancer: Relatioship of DNA content to survival. **Cancer Res.**, v. 47, p. 2504-2509.

STEPHENSON, R.A., ZAHNISER, D.J., WONG, K.L., HUTCHINSON, M.L. (1991). An image analysis method for assessment of prognostic risk in prostate cancer: a pilot study. **Analytical Cell Pathol.**, v. 3, p. 243-248.

SVENDSEN, L.B., THORUP, S., LARSEN, J.K., BULOW, S., HORN, T. (1990). Correlation between in vitro tetrploid in skin fibrolblasts and development of sporadic colorectal carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 50. p. 139-149.

SZUCS, S., ZITZELSBERGER, H., BREUL, J., SCHILLING, W., ENDRES, S., HOFLER, H., BAUCHINGER, M. (1992). Cytogenetic analysis of 20 cases of primary cultures of human prostate cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 63, p. 151.

TEYSSIER, J.R. (1989). The chromosomal analysis of human solid tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 37, p. 103-125.

TILLEY, W.D., WILSON, C.M., MARCELLI, M., McPHAUL, M.J. (1990). Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines. **Cancer Res, 50:** 5382-5386.

THOMPSON, T.C. (1990). Growth factors and oncogenes in prostate cancer, **Cancer Cell**, v. 2, p. 345-354.

THOMPSON, M.W., McINNES, R.R., WILLARD, H.F. (1991). **Genetics in medicine.** 5.ed. philadelphia: Sauners Company, 500p.

TRIBUKAIT, D.(1991). DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology. **Acta Oncol.**, v. 30, p. 187-192.

TRICOLI, J. V., YAO, J., D'SOUZA, S.A., BRACKEN, R.B. (1993). Detection of sex-region Y (SRY) trancripts in human prostate adenocarcinoma and benign prostatic hypertrophy. **Gene Chromosome Cancer**, v. 8, p. 28-32.

UCHIDA, T., WADA, C., SHITARA, T., EGAWA, S., KOSHIBA, K. (1993). Infrequent involvement of p53 gene mutations in the tumorigenesis of japanese prostate cancer. **Br. J. Cancer**, v. 68, p. 751-755.

VAN DEKKEN, H. & ALERS, J. (1993). Loss of chromosomo Y in prostatic cancer cells but not in stromal tissue. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 66, p. 131-132.

VISAKORPI, T., KALLIONIEMI, O.P., HEIKKNEN, A., KOIVULA, T., ISOLA, J. (1992). Small subgroup of aggressive, highly proliferative

prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. **J. Nat. Cancer Int.**, v. 84, p. 883-887.

WOLF, D.A., SCHLZ, P., FITTLER, F. (1990). Synthetic androgens suppress the transformed phenotype in the human prostate carcinoma cell line LNCaP. **Br. J. Cancer**, v. 64, p. 47-53.

WYNDER, E.L., MABUCHI, K., WHITMORI, Jr, W.F. (1971). Epidemiology of cancer of the prostate. **Cancer**, v. 28, p. 344-360.

WULLICH, B., BREITKREUZ, T., ZWERGEL, T., UNTEREGGER, G., SEITZ, G., ZANG, K.D. (1992). Cytogenetic evidence of intratumoral focal heterogeneity in prostatic carcinomas. **Urol. int.**, v. 48, p. 372-377.

ZETTERBERG, A. & FORSSLUND, G. (1991). Ploidy level and tumor progression in prostatic carcinoma. **Acta Oncol.**, v. 30, p. 193-199.

IX. Apêndice

IX.1. Meios de cultura e soluções utilizadas

a. Meios de cultura

a.1. Meio Ham-F10 (SIGMA)

- 9,8 g do pó de meio de cultura e 0,6 g de bicarbonato de sódio diluídos em 1000 ml de água desionizada autoclavada. A solução foi esterilizada por filtração e estocada em volumes de 100 ml a 5°C, por um período aproximado de 30 dias.

a.2. Meio de cultura completo

- 100 ml de meio de cultura Ham-F10 (SIGMA)
- 1 ml de solução de penicilina/estreptomicina (concentração final de 125 U/ml : 125 ug/ml) ou de penicilina/quemicetina (concentração final de 125 U/ml : 5 ug/ml)
- 5, 15, 20 ou 30 ml de soro fetal bovino (CULTILAB)
- 1 ml de solução de glutamina 200 mM
- 0,1 ml de solução de insulina

Sua estocagem foi feita a 5°C por um período aproximado de 15 dias.

b. Solução de Hanks sem Ca e Mg

- 1000 ml de água desionizada
- 8,0 g de NaCl
- 0,4 g de KCl
- 1,0 g de glicose
- 60 mg de KH^2PO^4
- 47,5 mg de Na^2HPO^4
- 17 mg de vermelho de fenol

A solução foi distribuída em volumes de 100 ml e estocada a -20°C.

A solução de Hanks recebeu diferentes antibióticos de acordo com sua finalidade, se para transporte ou lavagem da amostra. A anfotericina B foi utilizada apenas na solução de lavagem em virtude de sua grande toxicidade. Ambos os tipos foram estocados a 5ºC, por períodos de até seis meses

b.1. Para transporte da amostra

- 100 ml da solução de Hanks sem Ca e Mg
- 2 ml de solução de penicilina/estreptomicina (concentração final de 250 U/ml : 250 ug/ml) ou de penicilina/quemicetina (concentração final de 250 U/ml : 10ug/ml)
- 0,2 ml de sulfato de gentamicina (concentração final de 0,04 mg/ml)

b.2. Para lavagem da amostra

- 100 ml da solução de Hanks sem Ca e Mg
- 2 ml de solução de penicilina/estreptomicina (concentração final de 250 U/ml : 250 ug/ml) ou de penicilina/quemicetina (concentração final de 250 U/ml : 10 ug/ml)
- 0,2 ml de sulfato de gentamicina (concentração final de 0,04 mg/ml)
- 50 ul de anfotericina B (concentração final de 2,5 ul/ml)

c. Solução de penicilina/estreptomicina (SQUIBB/CEME) (12500 U/ml / 12500 ug/ml)

A solução de uso foi obtia a partir de:

- 0,5 ml de solução-mãe de penicilina (concentração final de 1 000 000 U/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril
- 1 ml de solução-mãe de estreptomicina (concentração final de 500 000 ug/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril

- 38,5 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

A solução-mãe e de uso foram estocadas a -20°C por um período de um ano e seis meses.

d. Solução de penicilina/quemicetina (SQUIBB/CARLO-ERBA) (12500 U/ml 500ug/ml)

A solução uso foi obtida a partir de:

- 0,5 ml de solução-mãe de penicilina (concentração final de 1 000 000 U/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril
- 0,5 ml de solução-mãe de quemicitina concentração final de 40 000 ug/ml) preparada a partir da solução comercial diluída em água desionizada estéril
- 39 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

A solução-mãe e de uso foram estocadas a -20°C por um período de um ano e seis meses.

e. Solução de L-glutamina (PUREX) (200 Mm)

A solução de L-glutamina foi obtida diluindo-se:

- 2,92 g de L-glutamina em 100 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

Após a esterilização por filtração, foi estocada a -20°C por um ano.

f. Solução de insulina (BIOBRAS U-40)

A solução comercial possui concentração de 40 U/ml e está pronta para uso. Foi estocada a 5°C por um período aproximado de 30 dias.

g. Solução de sulfato de gentamicina (Garamicina-SCHERING) (20 U/ml)

A solução comercial possui concentração de 20 U/ml e está pronta para o uso. Foi estocada a 5°C por um período de um ano e meio.

h. Solução de anfotericina B (Fungizon-SQUIBB) (5 mg/ml)

A anfotericina B foi preparada dilúindo-se:

- 50 mg de anfotericina B em 10 ml de água desionizada autoclavada. A solução foi estocada a -20°C por um período apriximado de seis meses.

i. Solução de succinato sódico de hidrocortisona (SOLUCORTEF, UP JOHN) (10^{-6} M)

A solução de uso foi obtida diluindo-se:

- 100 mg do sal de hidrocortisona em 200 ml de água desionizada estéril (solução-mãe 10-3 M, estocada a -20oC no escuro, após filtração)

- 50 ul da solução-mãe em 100 ml de meio completo (solução de uso 10-6 M ou 0,5 ug/ml, estocada a -20oC no escuro_

As soluções foram estocadas por um período aproximado de um ano.

j. Solução de fator de crescimento epidérmico (EGF) (SIGMA) (1 ug/100ml)

A solução-mãe foi preparada diluindo-se 0,1 mg de EGF em 10 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

A solução de uso foi obtida pela diluição de 0,5 ml da solução-mãe em 5 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg

A solução-mãe e de uso foram estocadas a -20°C por um período aproximado de um ano.

k. Solução de colagenase (GIBCO-TIPO II) (2 000 U/ml)

A solução de colagenase foi obtida dissolvendo-se essa substância em meio de cultura incompleto numa concentração final de 2 000 U/ml. Após seu preparo, foi mantida em banho-maria a 37°C por duas horas e, em seguida, a 5°C por 12 a 14 horas. A solução foi, então, esterilizada por filtração e estocada a -20°C por dois a três meses.

l. Solução de colquicina

- 1,0 mg de colquicina (uma pérola)
- 60 ml de água desionozada estéril

A solução foi distribuída em frascos escuros, que foram autoclavados por 30 minutos e estocados a 5°C por até seis meses.

m. Solução de colcemide (SIGMA) (2 ug/ml)

A solução de colcemide foi preparada a partir de:

- 100 ug de colcemide em 10 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução-mãe 10ug/ml). Foi estocada a -20°C após filtração por um período aproximado de seis meses

-2 ml de solução-mãe em 10 ml de solução de Hanks sem Ca e Mg (solução de uso 2 ug/ml). Foi estocada a 5°C por um período aproximado de seis meses.

n. Solução hipotônica de citrato de sódio (1%)

-1,0% de citrato de sódio em 100 ml de água desionizada

Foi estocada a temperatura ambiente ou a 5°C por dois a três meses.

o. Fixador

- 3 partes de metanol
- 1 parte de ácido acético glacial

Foi preparada minutos antes do uso.

p. Tampão Sorensen, pH 6,8

Foi preparado a partir de:

- 49 ml de solução A
- 51 ml de solução B
- 200 ml de água desionizada

Estocado a 5°C por no máximo seis meses

p.1. Solução A

- 14,196 g de difosfato de sódio (Na^2PO^4)
- 500 ml de água desionizada

p.2. Solução B

- 13,61 g de monofosfato de potássio (KH^2PO^4)
- 500 ml de água desionizada

q. Solução de tripsina

q.1. Solução de tripsina (BIOBRAS ou DIFCO) para bandamento cromossômico

A solução foi preparada dissolvendo-se 0,06 g de tripsina em 60 ml de PBS minutos antes do uso.

q.2. Solução de tripsina/EDTA (CULTILAB) para repique das culturas

A solução estápronta para o uso e foi mantida a -20ºC por um período aproximado de seis meses.

r. Solução salina de PBS

A solução foi preparada dissolvendo-se:
- 8 g de NaCL
- 0,2 g de KCl
- 1,15 g de NA^2PO^4
- 0,2 g de KH^2PO^4
- 1000 ml de água desionizada

A solução foi mantida a 5ºC por no máximo sies meses

s. Corante de Giemsa (MERCK) (2%)

A solução-mãe foi obtida dissolvendo-se:

- 0,5 g de Giemsa em 33 ml de glicerina durante duas horas a 60ºC em banho-maria. Após esfriamento, foram adicionados 33 ml de metanol e a solução foi mantida em vidro escuro uma semana. Após esse período, a solução foi filtrada e estocada á temperatura ambiente.

A solução de uso foi preparada diluindo-se 0,5 ml da solução-mãe em 24,5 ml de tampão Sorensen, imediatamente antes do uso.

t. Solução de azul de tripano 0,4% (CARLO-ERBA) (0,4%)

A solução foi obtida diluindo-se:
- 0,4 g do pó em
-10 ml e água

A solução foi esterilizada por filtração e estocada a 5ºC por um período aproximado de seis meses.