

Andréa Borduchi Carvalho Franco de Salles

**Análise Citogenética e Molecular em
Hiperplasias e Neoplasias da Próstata**



Andréa Borduchi Carvalho Franco de Salles

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM
HIPERPLASIAS E NEOPLASIAS DA
PRÓSTATA

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", UNESP



866/99

São José do Rio Preto - SP

1998



ORIENTADORA: Prof^a Dr^a 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 (UNESP) "Júlio de Mesquita Filho", com auxílio financeiro da CAPES, CNPq, FAPESP e FUNDUNESP.

*"Para todos os seres humanos constitui quase um dever
pensar que o que se tiver realizado é sempre pouco
em comparação com o que resta por fazer."*

João XXIII



Para meus dois amores, David e Giovana

*"Onde não há amor, não há ação nem vida. O homem não será
plenamente ele mesmo se não for amado
e não se esforçar por amar."*

R. Voillaume



AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho não poderia deixar de agradecer as pessoas que de alguma maneira colaboraram para sua execução e conclusão. Assim, manifesto minha gratidão a todas elas e em especial :

à Profa. Dra. *Eloiza Helena Tajara da Silva*, pela dedicação profissional, orientação e avaliação criteriosa de cada etapa deste trabalho,

à Profa. Dra. *Nívea D. T. Conforti Froes*, pela colaboração em todos os momentos, inclusive na análise da pró-forma,

à Profa. Dra. *Angela Maria Vianna Morgante*, pelo auxílio nas fases iniciais deste projeto e análise da forma definitiva,

aos Profs. Drs. *Cristine Hackel, Cacilda Casartelli e Emmanuel de A. Burdmann*, pela atenção dispensada na análise da pró-forma e pelas sugestões apresentadas,

à Direção do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - UNESP de São José do Rio Preto, pela disposição das condições materiais necessárias,

ao Departamento de Biologia deste Instituto, pela acolhida e cessão de dependências e equipamentos necessários durante a realização deste trabalho,

à Coordenadora do Curso de Pós-graduação deste Instituto Profa. Dra. *Ana Elizabete da Silva*, pela orientação na parte burocrática deste projeto,

aos médicos Dr. *José Carlos Mesquita*, Dr. *Eliseu R Mello Denadai*, Dr. *Júlio Martins Filho*, Dr. *Rui Nogueira Barbosa*, e as suas respectivas equipes, pelo respeito, interesse e colaboração,

aos pacientes, pela contribuição imprescindível no desenvolvimento deste projeto,

aos Professores deste Instituto, pela amizade, conhecimento e experiência profissional que proporcionaram meu amadurecimento científico,

aos Funcionários do Departamento de Biologia, pela amizade, apoio e colaboração nesses anos de convívio,

aos Funcionários da Secção de Pós-graduação, da Biblioteca, do Polo de Computação e aos demais Funcionários deste Instituto, pela eficiência e disposição com que sempre nos atenderam,

ao Técnico *Josué Rodrigues dos Santos*, que sempre me ajudou com boa vontade,

aos Colegas do Curso de Pós-graduação, pela convivência diária e companheirismo nas horas alegres e nos momentos difíceis.

à todos os Pós-graduandos e Estagiários do Laboratório de Citogenética Humana e Biologia Molecular, pelo companheirismo e solidariedade.

aos Profs. Drs. *Agnes Cristina Fett Conte*, *Eny Maria Goloni Bertollo*, *Fádua Rosana Coelho Ritz* e *Luiz Carlos de Mattos*, pelo incentivo, troca de experiências e convivência amiga,

às Profas. Dras. *Érika Cristina Pavarino Bertelli* e *Nilce Barril* e Profa *Rosa S. Kawasaki-Oyama*, pela convivência amiga, incentivo, troca de experiências e esforços dedicados.

à minha avó *Deolinda Borduqui*, pelo afeto constante,

às minhas irmãs *Angélica* e *Juliana Borduchi Carvalho*, pelo carinho e compreensão,

aos meus pais *Joaquim Carvalho Filho* e *Maria Geni Borduchi Carvalho*, por todo amor e apoio dedicado em todos os momentos de minha vida e pelos esforços desempenhados para a minha formação profissional,

ao meu marido e companheiro *David Franco de Salles*, que sempre acreditou no meu trabalho, ajudando a concretizá-lo através do seu amor e compreensão,

à minha filha *Giovana Carvalho Franco de Salles*, meu maior tesouro, pelo amor ingênuo e sincero que ilumina todos os meus dias,

à *Deus*, por tudo.

Durante a realização deste trabalho foram redigidos para publicação os seis artigos originais relacionados abaixo e que se encontram no item Resultados. Tais artigos correspondem aos dados referentes aos objetivos 1 (artigo 1), 2 (artigos 2, 3, 4 e 5), 3 (artigos 2 e 5), 4 (artigo 6) e 5 (artigos 3 e 4).

1. Carvalho-Salles, A.B., Barril, N., Tajara, E.H. A simple procedure for rehybridization of nuclei analyzed previously by FISH. *Genetic Mol Biol*: 21, *in press*.
2. Carvalho-Salles, A.B. and Tajara, E.H. Assessment of culture conditions of neoplastic and nonneoplastic prostate specimens.
3. Carvalho-Salles, A.B., Denadai, E.R.M., Tajara, E.H. Análise citogenética molecular e evolução clínica em câncer de próstata. *J Bras Urol*, submitted.
4. Carvalho-Salles, A.B., Barril, N., Denadai, E.R.M., Mesquita, J.C., Tajara, E.H. Assessment of numerical chromosome abnormalities in prostatic neoplasia by fluorescence *in situ* hybridization. In 17th International Cancer Congress. 1998, Rio de Janeiro. Proceedings... Bologna Monduzzi, 1998.
5. Carvalho-Salles, A.B., Barril, N., Mesquita, J.C., Denadai, E.R.M., Tajara, E.H. Comparison of fluorescence *in situ* hybridization analyzes of nuclei from cultured cells and fresh tissues of prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, submitted.
6. Carvalho-Salles, A.B., Conforti-Froes., N.D.T., Rossit, A.R.B., Tajara, E.H. Role of glutathione-S-transferase T1 and M1 genotype in prostatic abnormalities.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações anatômicas e patológicas.....	01
I.2. Epidemiologia do câncer de próstata.....	02
I.3. Regulação hormonal da próstata.....	05
I.4. O receptor de andrógenos.....	11
I.5. Mecanismos moleculares da transformação maligna e da independência hormonal das células neoplásicas da próstata.....	13
I.6. Citogenética do câncer de próstata.....	17

II. OBJETIVOS.....22

III. RESULTADOS

III.1. A simple procedure for rehybridization of nuclei analyzed previously by FISH.....	23
III.2. Assessment of culture conditions of neoplastic and nonneoplastic prostate specimens.....	32
III.3. Análise citogenética molecular e evolução clínica em câncer de próstata.....	50
III.4. Assessment of numerical chromosome abnormalities in prostatic neoplasia by fluorescence <i>in situ</i> hybridization.....	64
III.5. Comparison of fluorescence <i>in situ</i> hybridization analyses of nuclei from cultured cells and fresh tissues of prostate cancer.....	77
III.6. Role of Glutathione S-transferase T1 and M1 genotype in prostatic abnormalities.....	90

IV. DISCUSSÃO.....107

V. RESUMO.....113

VI. SUMMARY.....115

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....117



I. INTRODUÇÃO

I.1. Considerações anatômicas e patológicas

O termo "próstata" é derivado da palavra grega "prohistani" que significa "em frente de" e foi utilizado pela primeira vez por Herophilus da Alexandria, em 335 A.C., para descrever um órgão localizado no abdômen, em frente da bexiga urinária (Kirby *et al.*, 1996). Apesar da sua existência ser reconhecida por mais de dois mil anos, só recentemente recebeu maior atenção pelo fato de ser sede de várias afecções inflamatórias, congestivas, hiperplásicas e neoplásicas.

A próstata é uma glândula acessória do trato reprodutor masculino que tem consistência fibroelástica e apresenta diâmetros máximos de 40 mm. Está localizada na base da bexiga urinária e, do ponto de vista anatômico, pode ser dividida em lobos laterais, anterior, posterior e mediano. Essa divisão somente é nítida no período embrionário e, no órgão adulto, o limite entre os lobos é impreciso, não existindo septos de tecido conjuntivo que os separem. Histologicamente, apresenta glândulas tubuloacinosas compostas e ramificadas, cuja secreção tem como principal função manter a viabilidade dos espermatozóides. As glândulas externas ou prostáticas propriamente ditas definem a zona periférica e as internas ou periuretrais definem a zona central (Rodrigues Neto Jr., 1986, Cotran *et al.*, 1991).

As glândulas da zona periférica caracterizam-se por pequenos espaços acinares delimitados por um epitélio colunar secretor, rodeado por um estroma muscular rico em fibras lisas que, durante a ejaculação, auxiliam o esvaziamento das secreções prostáticas na uretra. A zona central, por sua vez, contém ácinos relativamente grandes delimitados por um epitélio colunar baixo. A disposição com que os ductos dessa região desembocam na uretra parece torná-los relativamente livres do refluxo urinário intraprostático, ao contrário daqueles da região periférica. Uma terceira zona pode ainda ser identificada, a de transição, que compreende 5% a 10% da glândula e cujos ductos desembocam na uretra, próximos aos da zona central (Kirby *et al.*, 1996).

A próstata está presente estruturalmente desde a décima segunda semana de vida intra-uterina e permanece rudimentar até a adolescência, quando inicia seu desenvolvimento (Kirby *et al.*, 1996). A partir dessa época, seu crescimento é contínuo e dependente de um sistema regulatório complexo, com participação dos andrógenos durante os processos de morfogênese, citodiferenciação, proliferação e produção de secreções específicas. Sua velocidade de crescimento pode aumentar na terceira década de vida, resultando em hiperplasias benignas observadas em homens acima



dos 40 anos de idade ou em processos malignos típicos de idades mais avançadas (Rodrigues Neto Jr., 1986; Srougi, 1990, Meikle, 1995, SBU, 1996).

A maioria das neoplasias malignas dessa glândula mostra arranjo histológico, grau de diferenciação e comportamento biológico variáveis. Mais de 95% delas são representadas pelos adenocarcinomas com origem acinar. Cerca de 5% correspondem aos adenocarcinomas com origem no ducto prostático, 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 é o tipo mais comum e resulta de uma proliferação nodular do estroma e do tecido glandular. Outros tumores benignos são raros e representados por fibromas, endocondromas, 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 sintomas clínicos, porém não conseqüentes do crescimento local e sim de metástases; e, por último, no carcinoma **latente**, que não acarreta qualquer sintoma ao seu portador e provavelmente nunca progredirá para uma condição invasiva da doença. Esse último tipo é um achado histológico casual em material de patologia cirúrgica ou em material de necropsia (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. Tal 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 dependentes de fatores ambientais (Greene *et al.*, 1991).

I. 2. Epidemiologia do câncer de próstata

O câncer prostático constitui hoje um crescente problema de saúde do homem. Na maioria dos países desenvolvidos, essa neoplasia é a mais comumente diagnosticada e, depois do câncer de pulmão, é a principal causa de mortalidade por câncer no sexo masculino, com sobrevida média de nove anos, que é inferior à de vários outros tipos de tumores (Boring *et al.*, 1993; Kirby *et al.*, 1996). No Brasil, a frequência do carcinoma clínico de próstata é relativamente alta. O Instituto Nacional do Câncer projetou uma estimativa de mais de 14 mil casos novos no país em 1998 (INCA, 1998). É a mais frequente neoplasia do trato urogenital, especialmente 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 30% dos pacientes necropsiados acima de 40 anos de idade e em 50% dos homens acima de 70 anos (Rodrigues Neto Jr., 1986).

O número de casos da doença varia geograficamente, com áreas de maior ou menor ocorrência. Na cidade de Shanghai (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 (Srougi, 1990). É interessante observar que, já na primeira geração, os descendentes de migrantes que se deslocaram para áreas com prevalência maior que a do local de origem têm valores mais altos desse parâmetro que seus ancestrais (Lynch, 1989). De qualquer modo, deve ser salientado que essas diferenças, e mesmo os aumentos na incidência, podem ser, em parte, resultado da utilização de protocolos mais sensíveis de identificação dos portadores (Kirby *et al.*, 1996).

As variações no número de pacientes com a doença entre populações distintas parecem ser função de condições sócio-econômicas, 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 (Wynder, 1971) e, possivelmente, um pouco mais alta em fumantes (Hsing *et al.*, 1990; Adami *et al.*, 1996). Alguns grupos populacionais específicos são realmente mais atingidos, como é o caso dos negros americanos, que mostram frequência duas vezes maior que a dos brancos (Stearns e McGarvey, 1992; Hayes *et al.*, 1995). Esse fato não parece se repetir no Brasil e em outros países, onde costuma ser menos comum na raça negra (Srougi *et al.*, 1990).

Recentemente, tem sido demonstrado que a incidência é maior do que a esperada em homens com parentes que morreram dessa doença. Foi observado que o câncer de próstata possui a quarta maior associação familiar de todos os tumores já estudados, com valores mais altos do que o câncer de cólon e o de mama. Um possível oncogene localizado no braço longo do cromossomo 1, o *HPC1* (hereditary prostate cancer gene 1), parece estar envolvido nessas formas familiares (Smith *et al.*, 1996; Cooney *et al.*, 1997; Gronberg *et al.*, 1997). Entretanto, os resultados de

McIndoe *et al.* (1997) e Eeles *et al.* (1998) sugerem que o *locus HPC1* é responsável por uma minoria dos casos de câncer de próstata familiares, uma vez que não se mostrou alterado nas genealogias por eles estudadas. Entretanto, não deve ser esquecido que a frequência elevada de afetados em uma mesma família pode ser resultante tanto de predisposição genética como de fatores ambientais (Kirby *et al.*, 1996, Haas e Sakr, 1997).

Outros genes, além do *HPC1*, podem participar da tumorigênese prostática, como aqueles cujos produtos estão envolvidos nos processos de destoxificação de substâncias exógenas e endógenas (Caporaso e Goldstein, 1995, Murray *et al.*, 1995). Entre esses genes estão aqueles responsáveis pela codificação de isoenzimas da família das glutathione S-transferases (GSTs), que representam o principal grupo de enzimas de destoxificação envolvidas no metabolismo de vários carcinógenos, poluentes ambientais e drogas anticâncer. Assim, é razoável supor que a ausência dessas enzimas cause efeitos negativos em relação à tolerância de compostos xenobióticos (Hayes e Pulford, 1995).

O aumento de câncer de próstata observado nas populações urbanas realmente parece ser decorrente da poluição ambiental bem como da exposição ocupacional a substâncias químicas, como cola e outros derivados do petróleo, drogas em geral, fertilizantes e radiação. O agente químico específico responsável pela sua indução ainda não é conhecido, porém, níveis elevados de cádmium nos pacientes indica que esse pode ser um dos elementos relacionados à sua etiologia. Entretanto, indivíduos que exercem profissões sem exposição aos agentes citados, como vendedores, vigias e escriturários, também têm sido citados como portadores de riscos aumentados, o que sugere que muitos fatores ambientais diferentes podem promover o crescimento de focos latentes a lesões invasivas (Kirby *et al.*, 1996).

A alta incidência nos países ocidentais e, principalmente, em regiões de consumo elevado de gordura animal, ao contrário dos países orientais com maior ingestão de vegetais, tem apontado para diferenças na dieta como responsáveis por esses achados. Assim, a presença de vitamina A e fitoestrógenos nos alimentos, esses últimos responsáveis pela alteração do meio hormonal do indivíduo, podem proteger contra esse tipo de câncer (Whittemore *et al.*, 1995, Kirby *et al.*, 1996, Hass e Sakr, 1997).

Outro fator etiológico que tem sido proposto é a presença de agentes infecciosos. Através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), segmentos de DNA do vírus do papiloma humano (HPV) do tipo 16 têm sido detectados em amostras de próstata humana e indicado um possível papel para esse fator no

desenvolvimento de processos malignos (Moyret-Lalle *et al.*, 1995). Em um estudo realizado no Japão, a alta incidência de HPV tipo 18 foi correlacionada com o grau, diferenciação e estadio clínico, sendo observada uma frequência de 89% de HPV em amostras de metástases ósseas. Apesar disso, seu papel definitivo como indutor de lesões prostáticas ainda não foi totalmente estabelecido e necessita de investigações futuras (Weinjerma *et al.*, 1994). Um fato interessante citado por um grupo de autores é que mulheres de pacientes com a doença têm frequência elevada de carcinoma cervical, sabidamente associado com esse tipo de vírus. Um outro vírus candidato para a etiologia desse câncer é o do herpes *simplex* tipo 2, considerando que partículas de RNA virais e os correspondentes anticorpos já foram detectados em processos malignos e mesmo em hiperplasia benigna (Kirby *et al.*, 1996).

I.3. Regulação hormonal da próstata

Os andrógenos desempenham um importante papel durante a diferenciação e o desenvolvimento da próstata normal mas são também responsáveis pela iniciação e pela manutenção da hiperplasia benigna e do câncer prostático (Griffiths *et al.*, 1997). Desses andrógenos, 95% correspondem à testosterona (TT) produzida nas células de Leydig dos testículos por estimulação do hormônio luteinizante (LH) da hipófise que, por sua vez, é regulado pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRF) do hipotálamo (Figura 1). Os outros 5% de andrógenos são sintetizados nas adrenais sob a ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise, que é regulado pelo GnRF, e liberados principalmente na forma de androstenediona, periféricamente convertida em testosterona (Meikle, 1995). A prolactina e o hormônio de crescimento (GH) também estimulam a produção de andrógenos tanto nos testículos como nas adrenais, tendo a primeira um efeito mitogênico direto adicional sobre as células epiteliais da próstata (Galbraith e Duchesne, 1997).

A principal enzima da biossíntese da TT é a 17α -hidroxilase/C17, 20 liase, que converte, por hidroxilação e clivagem da cadeia lateral, a pregnenolona e a progesterona em diidroepiandrosterona e androstenediona, depois transformadas em androestenediol e testosterona, respectivamente, pela ação da 17β -hidroxiesteróide desidrogenase (17β -OHSD). O androestenediol, pela ação da 3β -hidroxiesteróide desidrogenase (3β -OHSD), também é convertido em testosterona que é liberada na circulação sanguínea e liga-se à albumina (Figura 2). Somente 5% desse esteróide permanece livre no plasma e biologicamente ativo (Chung *et al.*, 1987, Klus *et al.*,



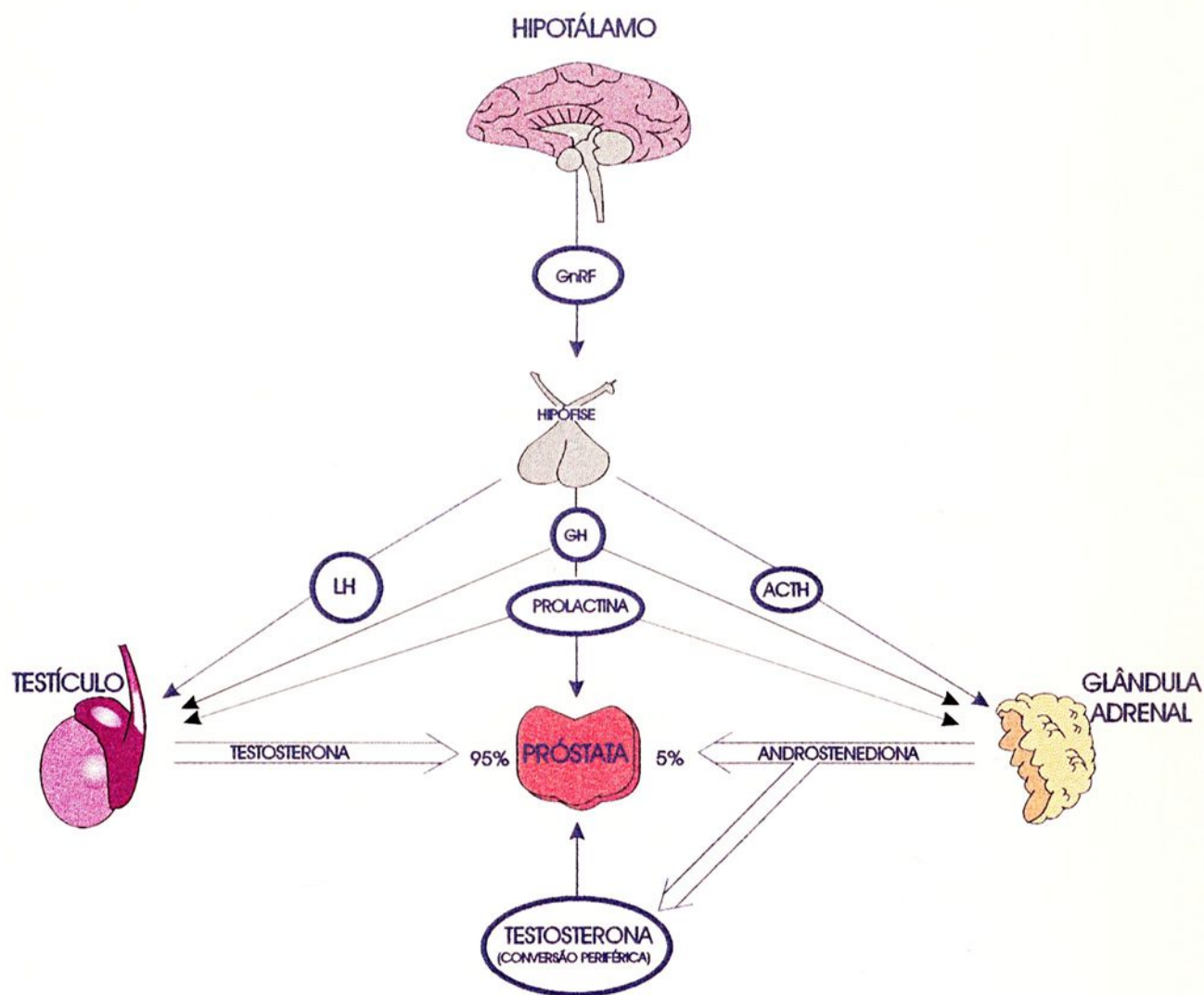


Figura 1. Hormônios envolvidos na regulação endócrina da glândula prostática. GnRF = Hormônio Liberador de Gonadotrofina; LH = Hormônio Luteinizante; ACTH = Hormônio Adrenocorticotrófico; GH = Hormônio de crescimento.

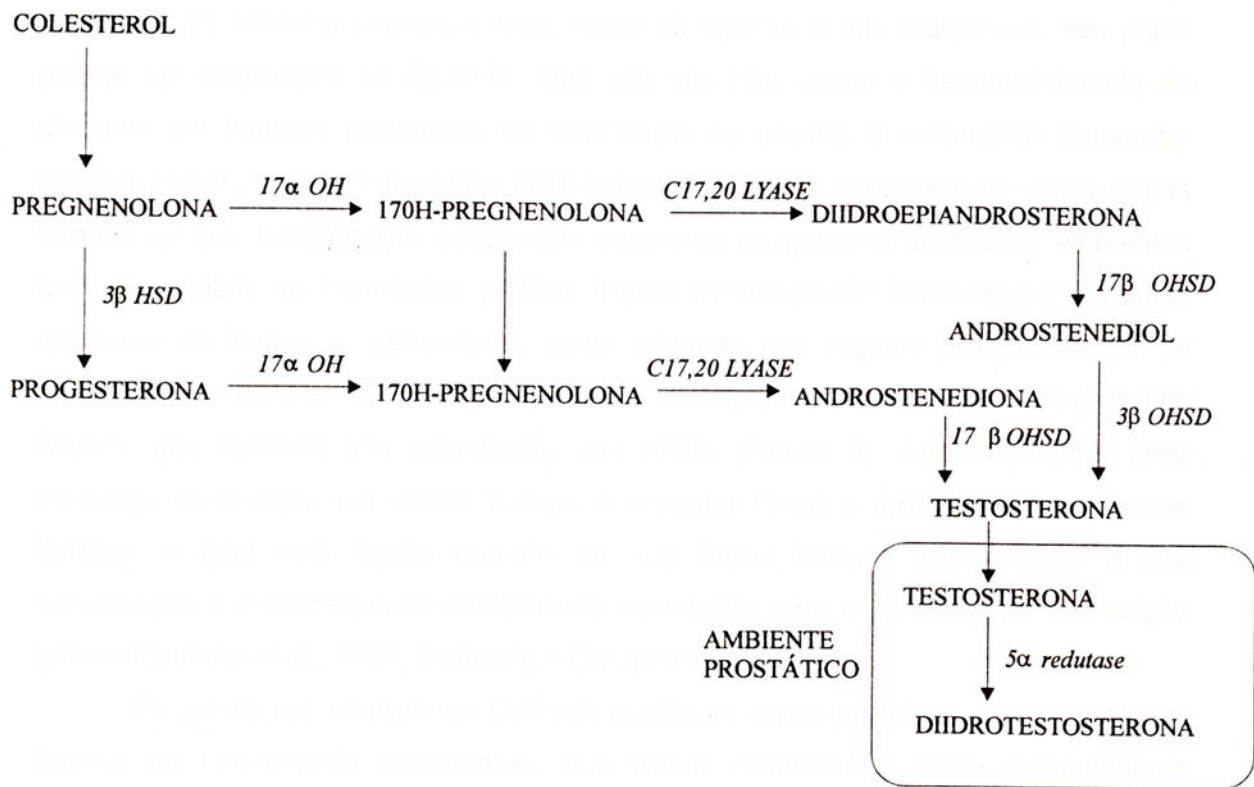


Figura 2.Esquema da biossíntese dos andrógenos. A pregnenolona e a progesterona são convertidas em testosterona que é liberada na corrente sangüínea, atravessa a membrana plasmática das células epiteliais prostáticas e é metabolizada em diidrotestosterona.

1996, SBU, 1996, Galbraith e Duchesne, 1997). O mecanismo de ação dos andrógenos sobre a próstata constitui uma sequência integrada de eventos. Inicialmente, a TT atravessa a membrana plasmática das células por interação hidrofóbica com os fosfolípidios e é metabolizada no núcleo em diidrotestosterona (DHT) através de uma reação catalisada pela enzima 5 α -redutase presente no envoltório nuclear (Meikle, 1995). A DHT, um andrógeno mais potente que a TT e o principal hormônio trófico da próstata, liga-se com grande afinidade a receptores androgênicos (AR), uma proteína nuclear que é expressa na maioria das células prostáticas, incluindo as epiteliais e as do estroma (Iwamura *et al.*, 1994, SBU, 1996). Embora a TT também possua a capacidade de ligar-se a tais receptores, seu papel parece ser secundário ao da DHT, uma vez que não ocorre o desenvolvimento da glândula em homens portadores de deficiência da enzima 5 α -redutase (Imperato-McGinley *et al.*, 1992). O complexo DHT-receptor modula a expressão de vários genes através de sua ligação com sequências consenso no genoma chamadas elementos que respondem ao hormônios (HREs). Essas estruturas são formadas por centenas de pares de bases e, geralmente, estão situadas nas regiões promotoras ou de *enhancers* (Griffiths *et al.*, 1997). O AR, após sua ligação à DHT, exibe seus dois *zinc fingers*, que facilitam sua associação aos HREs (Figura 3). Aparentemente, essa mudança conformacional ocorre porque o receptor libera a proteína 90 do choque térmico, à qual está ligado quando na sua forma inativa. Isso permite a sua dimerização e a consequente estabilidade necessária para o processo de transcrição gênica (Griffiths *et al.*, 1997, Galbraith e Duchesne, 1997).

Os genes sob controle do DHT-AR codificam várias proteínas, inclusive alguns fatores de crescimento importantes, que foram identificados como estimuladores potenciais da proliferação celular prostática (Brass *et al.*, 1995, Griffiths *et al.*, 1997). Entre eles estão os fatores de crescimento epidérmico e de fibroblastos (EGF e FGF), o semelhante à insulina (IGF-I e II), o transformante β (TGF β), o derivado de plaquetas (PDGF) e o de queratinócitos (KGF). Os sinais mitogênicos intrácrinos, autócrinos e parácrinos (Figura 4) são iniciados pela ligação desses fatores aos domínios externos dos seus receptores presentes na membrana celular, o que estimula a atividade de tirosina quinase situada no domínio intracelular do receptor e inicia uma cascata de sinais até o núcleo. Esses sinais regulam a transcrição de genes específicos, tais como o do antígeno específico da próstata (PSA), ou de protoncogenes, como o *C-MYC*, *C-FOS* ou *C-JUN*, que codificam proteínas envolvidas no processo normal de proliferação celular (Aaronson *et al.*, 1991, Griffiths *et al.*, 1997). Os produtos gênicos de *C-FOS* e

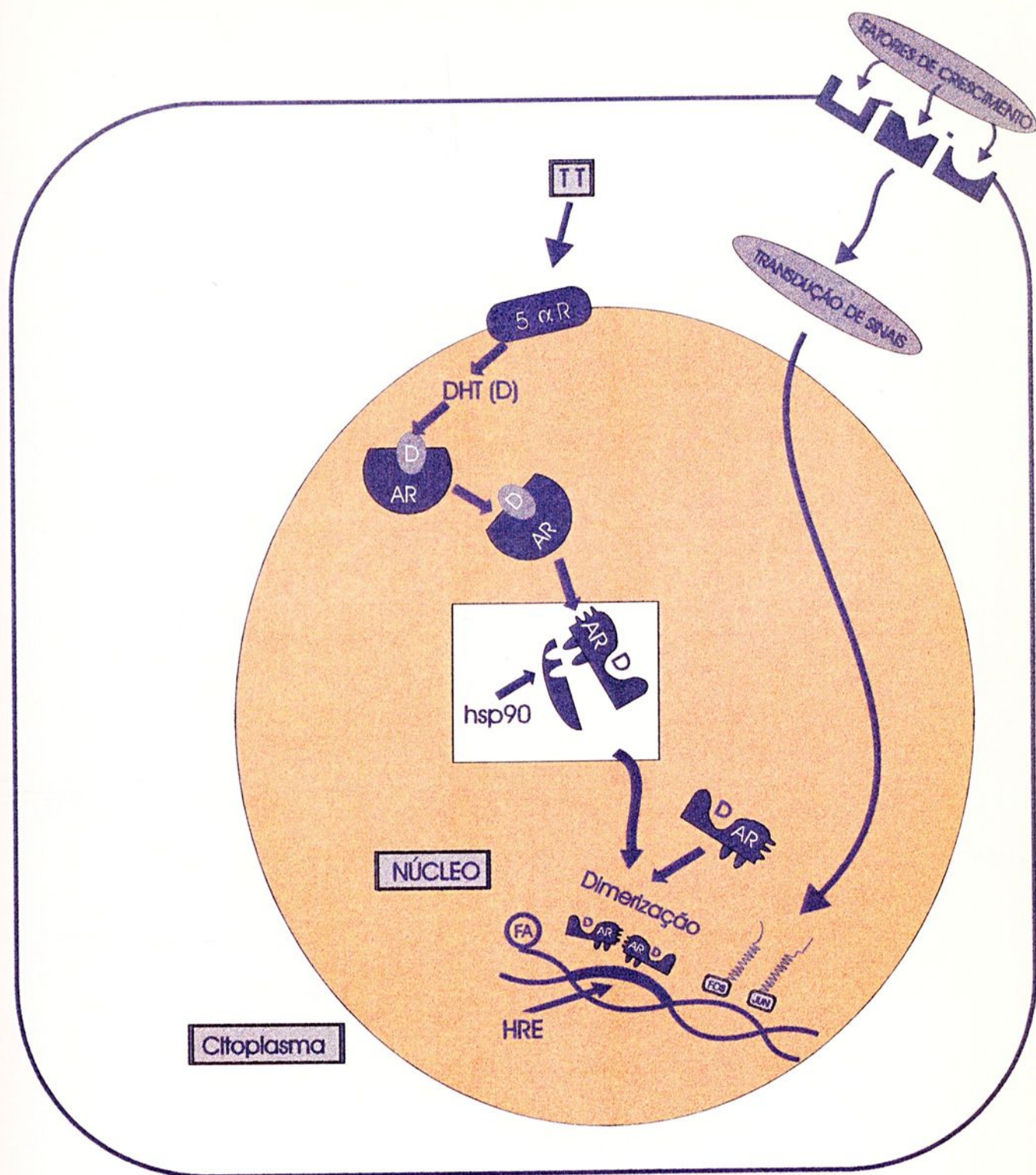


Figura 3. Ilustração mostrando os processos intracelulares da célula epitelial prostática que ocorrem após a formação do complexo DHT-AR, sua consequente alteração conformacional após a liberação da proteína hsp90 e interação funcional com o fator AP-1(C-FOS e C-JUN) na transcrição gênica. 5αR = 5α- redutase; hsp90 = proteína 90 do choque térmico; FA = fator acessório; TT = testosterona; AR = receptor de andrógenos; DHT = diidrotestosterona (modificada de Griffiths *et al.*, 1997).

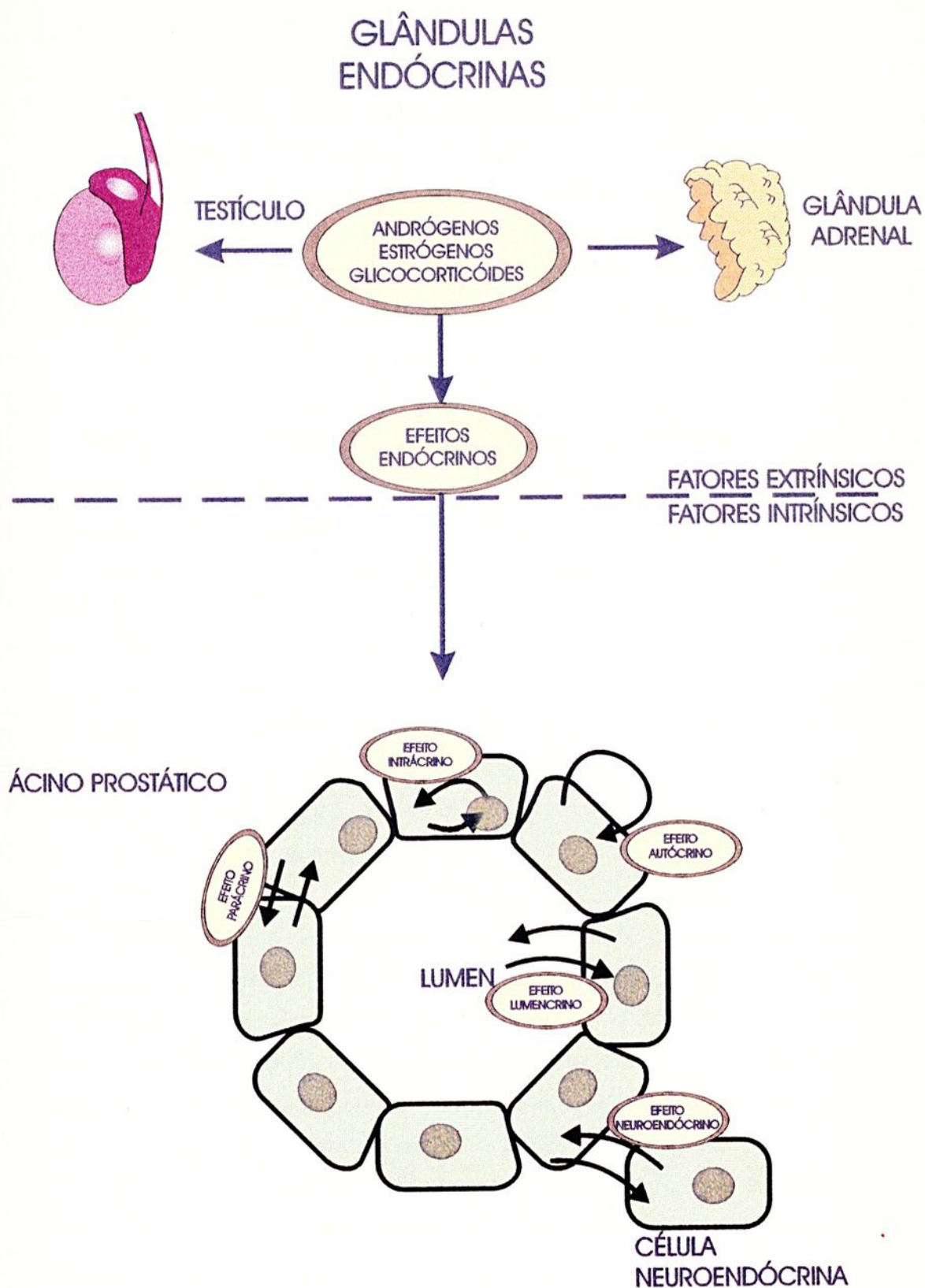


Figura 4. Fatores extrínsecos e intrínsecos envolvidos na proliferação da célula prostática (modificada de Griffiths *et al*, 1997).

C-JUN, por exemplo, formam homo ou heterodímeros através de seus domínios *leucine zippers* e são componentes do fator de transcrição AP-1 (Lewin, 1997). O complexo AP-1 reconhece sequências específicas no genoma, que se encontram próximas aos elementos HREs nas regiões promotoras de genes que respondem ao hormônio (Jones *et al.*, 1990). Essa proximidade de sequências reguladoras indica uma interação funcional (Figura 3) do complexo DHT-AR e do AP-1, aparentemente necessária para a transcrição de genes alvo (Griffiths *et al.*, 1997).

Além das cascatas de sinais desencadeados pelos andrógenos e pelos fatores de crescimento, outras substâncias também participam dos processos de desenvolvimento e diferenciação da próstata. Por exemplo, as células neuroendócrinas, presentes na glândula, contêm grânulos secretores com substâncias da família das cromograninas e das proteínas semelhantes ao hormônio da paratireóide, além de serotonina, somatostatina, bombesina e calcitonina que possuem atividades semelhantes às dos fatores de crescimento. Essas substâncias são importantes na proliferação das células prostáticas e atuam através de vários mecanismos de regulação, incluindo o autócrino e o parácrino (Figura 4). O envolvimento desses compostos no crescimento e na diferenciação prostática constitui uma prova de que esses processos são complexos e não têm os andrógenos como fatores atuantes exclusivos (Sant'Agnese e Cockett, 1996, Galbraith e Duchesne, 1997).

1.4. O receptor de andrógenos

O receptor de andrógenos (AR) é um fator transcricional, membro da superfamília de proteínas regulatórias nucleares que inclui, além de outros receptores de esteróides, o receptor do hormônio da tireóide e do ácido retinóico (Evans *et al.*, 1988, Lubahn *et al.*, 1988). Essas proteínas são relacionadas entre si por causa da alta homologia do seu domínio responsável pela ligação com as sequências HREs do genoma (Chang *et al.*, 1988 a, Evans *et al.*, 1988).

O AR é uma proteína formada por 910 aminoácidos e, estruturalmente, organizada em três domínios funcionais: o amino-terminal, que é essencial para a ativação da transcrição; a sequência central, rica em cisteína e com dois *zinc fingers*, que é altamente conservada e responsável pela ligação do receptor com os elementos HREs do DNA; e o domínio carboxi-terminal, que se liga ao andrógeno (Chang *et al.*, 1988 b, Brinkman *et al.*, 1989, Kuil e Brinkman, 1996). O gene está localizado na

banda Xq11-12 (Brown *et al.*, 1989) e sua região codificadora está dividida em oito exons. A sequência que codifica o domínio amino-terminal da proteína está presente no exon 1, enquanto o domínio de interação com o DNA é codificado pelos exons 2 e 3 e a informação para o domínio de ligação com o esteróide está distribuída entre os exons 4 a 8 (Chang *et al.*, 1988 b, Kuil e Brinkman, 1996). A deficiência completa ou parcial do domínio amino-terminal ou da região de ligação com o DNA inativa a capacidade transcricional do AR, mesmo quando o receptor se encontra associado ao andrógeno. Por outro lado, a maioria das alterações observadas na região carboxi-terminal impede sua ligação com o esteróide, porém, ativa a função transcricional mesmo na ausência do hormônio (Rundlett *et al.*, 1990, Jenster *et al.*, 1991, Simental *et al.*, 1991).

As comparações intra e interespecíficas mostram que as sequências de aminoácidos dos domínios de ligação com o DNA e da região de ligação com o hormônio são conservadas, tanto para o mesmo receptor como para receptores diferentes da mesma superfamília (Chang *et al.*, 1988 a, Lubahn *et al.*, 1989). Essa conservação evolutiva levou alguns pesquisadores a questionarem a especificidade transcricional *in vivo*, uma vez que os diferentes receptores de esteróides reconhecem uma mesma sequência de DNA (Ham *et al.*, 1988). Uma das explicações dadas foi que a regulação transcricional envolve a participação de fatores acessórios (Figura 3) que atuam como ativadores ou repressores transcricionais (Sun *et al.*, 1997). Por exemplo, a ERAP-160 e a GRIP1 funcionam como coativadores dos complexos receptor de estrógeno-DNA e receptor de glicocorticóide-DNA, respectivamente (Halachmi *et al.*, 1994, Hong *et al.*, 1996), a SRC-1 estimula a função de transativação de todos os receptores de esteróides (Oñate *et al.*, 1995) e a ARA70 desempenha a função de coativador específico da atividade transcricional do AR nas células prostáticas humanas (Yeh e Chang, 1996). Como exemplos de repressores estão os fatores de transcrição N-CoR e SMRT, que atuam sobre os receptores do hormônio da tireóide e do ácido retinóico (Chen *et al.*, 1995, Horlein *et al.*, 1995, Kurokawa *et al.*, 1995).

No domínio amino-terminal do AR, existem duas sequências polimórficas de trinucleotídeos CAG e GGC (Kazemi-Esfarjani *et al.*, 1995). As expansões CAG, que normalmente atingem de 11 a 33 repetições (com média de 20), codificam uma cadeia de poliglutamina na posição 172 e as repetições GGC codificam poliglicinas na posição 1342 da proteína. Tais expansões parecem estar inversamente relacionadas com sua atividade transcricional nas células prostáticas (Lubahn *et al.*, 1988, Sleddens *et al.*, 1993, Tut *et al.*, 1997).

O estudo de Irvine *et al.* (1995) em três grupos raciais diferentes mostrou uma predominância de alelos CAG pequenos nos negros americanos, que possuem um risco aumentado de desenvolver essa doença, tamanhos intermediários em homens brancos de origem não hispânica e número baixo de repetições em asiáticos, que manifestam as frequências mais baixas desse tipo de neoplasia. Giovannucci *et al.* (1997), avaliando o número de repetições CAG no gene do AR de amostras de adenocarcinomas prostáticos, concluíram que tumores com fenótipos mais agressivos, quando comparados aos menos agressivos, possuíam sequências polimórficas mais curtas.

Extensões homopoliméricas de aminoácidos semelhantes a essas têm sido observadas em muitas proteínas (Gerber *et al.*, 1994). Por exemplo, sequências com 20 ou mais resíduos de poliglutamina já foram referidas em muitos fatores de transcrição, incluindo a proteína NOTCH em drosófila (Wharton *et al.*, 1985), o fator de transcrição IID na espécie humana (Hoffmann *et al.*, 1990, Kao *et al.*, 1990), a GAL4 em leveduras (Gerber *et al.*, 1994) e o AR de diferentes organismos (Chang *et al.*, 1988 b). Repetições de trinucleotídeos são descritas também em genes de algumas doenças hereditárias. É o caso dos alelos do próprio gene do AR, que exibe de 40 a 62 repetições CAG no amino-terminal e causam a doença de Kennedy, uma síndrome neuromuscular degenerativa com insensibilidade ao andrógeno. Também são conhecidos os alelos dos genes responsáveis pela doença de Huntington, pela ataxia espinocerebelar tipo 1, pela doença de Machado-Joseph e pela síndrome do X frágil, que manifestam desde algumas dezenas até milhares de trinucleotídeos CAG ou CGG (Rosemberg, 1996). Certos alelos do gene SRD5A2, responsável pela síntese da isoenzima tipo II da 5- α redutase expressa na próstata, também contêm repetições de dinucleotídeos (TA) $_n$ na região 3' o que parece elevar a atividade da enzima, o nível de DHT na próstata e, conseqüentemente, os riscos de desenvolver alguns tipos de câncer prostático (Davis e Russel, 1993, Reichardt *et al.*, 1995).

I.5. Mecanismos moleculares da transformação maligna e da independência hormonal das células neoplásicas da próstata

Os carcinomas de próstata em estágios avançados são, geralmente, tratados com terapias que diminuem a atividade dos andrógenos circulantes, como a castração cirúrgica, a administração de análogos do hormônio luteinizante ou a inibição da atividade normal do AR por substâncias antiandrogênicas (Dawson, 1998).

Os antiandrógenos são frequentemente utilizados para o tratamento das lesões hormônio-dependentes e sua ação é baseada no potencial de competição pelos sítios do AR, sem a sua correspondente ativação. Com relação aos efeitos fisiológicos, podem ser divididos em dois grupos: os esteróides e os não esteróides. O primeiro grupo bloqueia a ação do andrógeno e possui atividade de glicocorticóide e de progesterona, essa última capaz de reprimir a produção do hormônio luteinizante e, conseqüentemente, da TT e da DHT. O segundo grupo, embora com capacidade de bloqueio de andrógenos, estimula o eixo hipotálamo - hipófise - gônada, o que pode levar a um aumento no nível desses hormônios (Kuyl e Brinkmann, 1996). Em ambos os casos, os mecanismos de ação incluem a indução de uma conformação anormal do receptor (Kuyl *et al.*, 1995), a deficiência no transporte do complexo hormônio-AR (Brinkmann *et al.*, 1983, Segnitz e Gehring, 1990), a falha na dissociação do complexo heterodimérico do receptor (Segnitz e Gehring, 1990) e a sua dimerização ou ligação com o DNA incompletas (Klein-Hitpass *et al.*, 1991).

Cerca de 20% dos tumores não possuem qualquer resposta à manipulação endócrina e muitos casos não mostram remissão permanente podendo, em um tempo variável, tornar-se hormônio-independentes e não responderem mais ao tratamento (Isaacs *et al.*, 1981, Habib, 1997). Existem alguns fatores que contribuem para a ineficiência desse tipo de terapia. Por exemplo, os níveis hormonais na corrente sanguínea podem não refletir o padrão androgênico intracelular da glândula e, assim, a manipulação do hormônio circulante ter apenas um pequeno impacto na proliferação do tecido prostático (Habib, 1997).

Outros fatores responsáveis pela falha na resposta ao tratamento são aqueles relacionados com a ativação permanente do receptor hormonal, mesmo na presença de concentrações baixas de andrógenos. Hobisch *et al.* (1995), através de técnicas imuno-histoquímicas, observaram a presença do AR em todas as amostras de metástases de carcinomas prostáticos humanos que haviam adquirido independência androgênica durante a terapia. Os autores concluíram que, provavelmente, a alteração do receptor estaria envolvida na progressão do tumor, levando ao estímulo do crescimento mesmo na ausência do hormônio ou, então, à inespecificidade do receptor em relação ao esteróide. Realmente, a análise do gene AR tem demonstrado que mutações específicas, nos exons 4 a 8, conferem vantagem proliferativa em alguns tipos de câncer hormônio-independentes (Gaddipati *et al.*, 1994, para referência) mas parece ser um evento incomum nos tumores em estágios iniciais (Paz *et al.*, 1997).

Gaddipati *et al.* (1994), utilizando amostras de pacientes com câncer de próstata metastático, detectaram uma substituição frequente no códon 877 (ACT →

GCT, Thr → Ala), presente no exon que codifica o domínio de ligação com o hormônio. Mutações nessa região também foram descritas em uma linhagem celular muito bem caracterizada, a LNCaP (Harris *et al.*, 1990, Veldscholte *et al.*, 1990), que é derivada de um nódulo linfático de paciente portador de tumor prostático disseminado, inicialmente tratado com administração de estrógeno e castração cirúrgica. É interessante citar que, na presença dessa mutação, os antiandrógenos têm um efeito estimulador sobre a proliferação. Assim, é possível que essa alteração dificulte a resposta aos agentes terapêuticos usados.

O estudo de Koivisto *et al.* (1997) mostra uma relação entre amplificações do gene do AR e resistência à terapia hormonal. Os autores observaram que tais amplificações ocorrem exclusivamente em tumores recorrentes que foram tratados com terapia de depleção hormonal durante um período maior que 12 meses. As lesões que não apresentaram, inicialmente, resposta ao tratamento androgênico ou aquelas que recorreram em um período inferior a um ano não possuíam amplificações do gene. Portanto, essa mutação não está correlacionada com a gênese do câncer ou mesmo com a progressão clínica de tumores não tratados. O aumento no número de cópias do gene e, conseqüentemente do seu produto, parece potencializar a resposta da célula, mesmo em baixas concentrações de andrógenos e deve ser responsável pela resistência adquirida à terapia hormonal. Por outro lado, a falha no tratamento de tumores inicialmente independentes ao hormônio, parece ser causada por outros mecanismos não relacionados com a amplificação do gene do AR.

Vários experimentos têm sugerido que a transformação de uma célula tumoral hormônio-dependente para um estágio de independência hormonal pode não envolver alterações no gene do receptor. A ativação de protooncogenes ou a inativação de genes supressores de tumor seriam as responsáveis pela proliferação celular mesmo na ausência de esteróides (Galbraith e Duchesne, 1997). Realmente, a introdução do oncogene *RAS* ativado em células da linhagem LNCaP é suficiente para fazer a sua conversão para a condição andrógeno-independente (Voeller *et al.*, 1991). Entretanto, a frequência de alterações nos genes dessa família em lesões prostáticas parece ser muito baixa (Carter *et al.*, 1990; Moyret-Lalle *et al.*, 1995) com algumas exceções (Anwar *et al.*, 1992). Outro oncogene, o *C-MYC*, tem expressão elevada de sua proteína referida por alguns autores como possível marcador de progressão tumoral (Jenkins *et al.*, 1997). Do mesmo modo, intensa imunocoloração para a proteína BCL-2 tem sido relacionada com inibição da apoptose causada por ablação androgênica, conseqüente resistência ao hormônio e comportamento mais agressivo da lesão

(Hockenbery *et al.*, 1991; Colombel *et al.*, 1993; Segal *et al.*, 1994; Raffo *et al.*, 1995). Com relação à expressão do oncoproduto ERBB2/NEU/HER-2, um receptor de membrana homólogo ao receptor de EGF, resultados conflitantes têm sido observados tanto entre autores diferentes quanto em estudos comparativos da expressão da proteína e da amplificação do DNA (Kuhn *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1993; Latil *et al.*, 1994) e não existe uma correlação definitiva sobre sua participação nos eventos carcinogênicos.

Outros genes também têm sido referidos. Shen *et al.* (1995), por exemplo, identificaram o gene *PTI-1*, um possível oncogene que parece ser membro de uma classe de fatores relacionados com a síntese protéica. A análise de sua sequência revelou homologia com uma forma mutada do fator de alongação $\alpha 1$ humano. Seu produto foi observado em amostras provenientes de carcinoma prostático mas não em hiperplasias ou espécimens normais, indicando que pode participar do processo de malignização desses tecidos.

Enquanto os oncogenes favorecem a proliferação celular, os 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 e 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, 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* ou de sua expressão podem, então, conferir vantagem proliferativa, e já foram observadas em estágios avançados de carcinoma prostático (Visakorpi *et al.*, 1992; Bookstein *et al.*, 1993; Navone *et al.*, 1993; Casalone *et al.*, 1993; Dinjens *et al.*, 1994; Henke *et al.*, 1994; Ittmann *et al.*, 1994), embora sejam citadas como eventos raros por vários autores, especialmente em tumores primários (Uchida *et al.*, 1993; Dinjens *et al.*, 1994; Latil *et al.*, 1994; Moyret-Lalle *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1996).

Em relação ao gene supressor *RB1*, algumas linhagens celulares hormônio-independentes exibem mutações nesse gene (Rubin *et al.*, 1991; Tricoli *et al.*, 1996)). Recentemente, Yeh *et al.* (1998), observaram que o seu produto liga-se especificamente ao AR em células de uma linhagem prostática hormônio-independente e induz, em até quatro vezes, o aumento da atividade transcricional do receptor na presença de diidrotestosterona. Por sua vez, a taxa de transcrição é aumentada em até

64 vezes quando o coativador ARA 70 também está presente no meio. Dessa forma, os autores concluíram que a pRB1 pode funcionar como um coativador da atividade transcricional do AR nas células prostáticas. Essa é a primeira observação feita da atuação positiva de uma proteína com função regulatória negativa, resultando na indução da transcrição *in vitro*.

Outros genes supressores também têm sido referidos como participando do desenvolvimento das lesões de próstata. Entre eles estão o *DCC* (Latil *et al.*, 1994; Crundwell *et al.*, 1996) e o *BRCA1* e 2 (Gao *et al.*, 1995 a, 1995 b; Murakami *et al.*, 1995; Stratton, 1996). Um número de estudos sobre perda de heterozigosidade (LOH) tem sugerido ainda a presença de supressores nas regiões cromossômicas 7q, 8p, 10q, 13q, 16q e 18q, que podem ser importantes na iniciação ou progressão tumoral (Bova *et al.*, 1993; Emmert-Buck *et al.*, 1995; Kagan *et al.*, 1995; Macoska *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1995; Zenklusen *et al.*, 1994; Cooney *et al.*, 1996; Crundwell *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996; Ittmann *et al.*, 1996; Komiya *et al.*, 1996; Lacombe *et al.*, 1996; Vocke *et al.*, 1996; Jenkins *et al.*, 1998). Os estudos moleculares realizados por Tricoli *et al.* (1993) têm revelado a participação de outros genes no desenvolvimento do câncer de próstata. É o caso do *SRY* mapeado na banda p11.3 do cromossomo Y e expresso em tecidos prostáticos hipertróficos e malignos. Seu produto é específico para o desenvolvimento testicular e contém sequências homólogas às de proteínas não histônicas de alta mobilidade capazes de ligar-se ao DNA. Entre os genes que contêm elementos de resposta a estas sequências estão o *SIS*, o *FOS* e o *MYCN*. Tais achados levantam a possibilidade de que a expressão do gene *SRY* pode resultar na ativação de oncogenes, com consequente proliferação celular, e ser responsável, além do desenvolvimento testicular, por importantes funções na próstata do adulto.

I.6. Citogenética do câncer de próstata

As aberrações cromossômicas observadas em células neoplásicas fornecem informações essenciais para o mapeamento de mutações que predisõem 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, tanto de formas herdadas como esporádicas (Goddard e Solomon, 1993).

No caso do câncer de próstata, as informações obtidas de análises citogenéticas convencionais são relativamente escassas quando comparadas com outros tipos de tumores comuns. Provavelmente, esse fato decorre das dificuldades referentes ao cultivo de suas células e, em consequência, da obtenção de boas preparações cromossômicas. Apesar de diferentes metodologias específicas para células prostáticas 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; Webb *et al.*, 1996). 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 e Stamey, 1986) 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; König *et al.*, 1988; Brothman e Patel, 1992) e em algumas centenas de culturas primárias de adenocarcinomas, leiomiossarcomas e adenomas. O cariótipo 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; Breitzkreuz *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) ou com sua seleção durante o cultivo. Realmente, König *et al.* (1993), Jones *et al.* (1994), Ketter *et al.* (1996) e Webb *et al.* (1996) observaram maior frequência de anomalias cariotípicas clonais nas preparações frescas.

A perda do cromossomo Y tem sido a alteração numérica mais comum nas lesões benignas e malignas (Atkins e Baker, 1985; Brothman *et al.*, 1989, 1990; Lundgren *et al.*, 1992; Micale *et al.*, 1992; Wullich *et al.*, 1992; Breitzkreuz *et al.*, 1993; Arps *et al.*, 1993; Casalone *et al.*, 1993; Milasin e Micic, 1994; Molennar *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996; Zitzelsberger *et al.*, 1996) 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 citados (Micale *et al.*, 1993).

Muitas aberrações esporádicas foram também detectadas 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 é coincidente com aquela encontrada nas anomalias recorrentes. Entre essas últimas, as mais comuns envolvem as regiões 1p, 1q, 2q11-13, 3p13-p21, 6q22-23, 7q22-q32, 8p21, 10q22-24, 12p11, 12q24, 14q24, 15q24-25, 16q22-24, 18q, 19p13 e q13, algumas delas resultando em deficiências parciais dos segmentos 3p, 6q, 7q, 8p, 10q, e 15q (Atkins e Baker, 1985; Gibas *et al.*, 1985; Ahmann *et al.*, 1986; Limon *et al.*, 1986 b; Pittman *et al.*, 1987; Lundgren *et al.*, 1988, 1992 b; Brothman *et al.*, 1989, 1990; Wullich *et al.*, 1992; Arps *et al.*, 1993; Breitzkreuz *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994; Milasin e Micic, 1994; Webb *et al.*, 1996; Zitzesberger *et al.*, 1996, Osman *et al.*, 1997, Ueda *et al.*, 1997, Chin *et al.*, 1998, Filipova *et al.*, 1998, Jenkins *et al.*, 1998, König *et al.*, 1998, Pan *et al.*, 1998). Outras alterações já foram repetidamente descritas, como as trissomias 1 e 7, a monossomia 17 e as amplificações por *double minutes* ou regiões homogeneamente coradas (Atkins e Baker, 1985; Ahmann *et al.*, 1986; Brothman *et al.*, 1989, 1990; Limon *et al.*, 1989; Babu *et al.*, 1990; Lundgren *et al.*, 1992; Micale *et al.*, 1992; Wullich *et al.*, 1992; Arps *et al.*, 1993; Breitzkreuz *et al.*, 1993; Casalone *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994; Milasin e Micic, 1994; Van Den Berg *et al.*, 1995, Qi *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996; Zetzelsberger *et al.*, 1996, König *et al.*, 1998). De modo geral, os achados sugerem que tanto a perda de genes supressores de tumor quanto a ativação de oncogenes podem ser eventos essenciais no desenvolvimento ou progressão do carcinoma prostático (Lundgren *et al.*, 1992 a). É importante observar que muitas das deficiências cromossômicas correspondem a regiões com perda de heterozigotidade citadas anteriormente, como por exemplo 7q, 8p e 10q, o que reforça a presença nesses locais de genes supressores.

A análise citogenética utilizando as técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e hibridação genômica comparativa (CGH) também têm confirmado esses resultados. Assim, diferentes autores têm observado perdas totais e parciais envolvendo os cromossomos e os segmentos 8/8p, 10/10q, 13q, 16q, 17/17p, 18/18q e Y e ganho de 7/7q, 8/8q, 10, 17 e X (Macoska *et al.*, 1994, 1995; Alcaraz *et al.*, 1994; Aly *et al.*, 1994; Bandyk *et al.*, 1994; Baretton *et al.*, 1994; Brothman *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1994; Henke *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994; Alers *et al.*, 1995; Cher *et al.*, 1995, 1996; Joos *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1995; Visakorpi *et*

al., 1995; Wang *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996; Brothman *et al.*, 1997, Jenkins *et al.*, 1997).

Os dados obtidos pela técnica de FISH em núcleos interfásicos são especialmente importantes por serem observados em material não cultivado. Como já referido, o cultivo de células pode selecionar determinados clones e, assim, o quadro cariotípico observado nem sempre refletir as características *in vivo*. Do mesmo modo, os estudos do conteúdo de DNA por citometria também podem ser feitos a partir de amostras frescas ou emblocadas em parafina e permitem a determinação das condições de ploidia do tecido no organismo. Muitas análises desse tipo já foram realizadas em lesões benignas e malignas da próstata para avaliação de prognóstico. Embora o número de casos seja reduzido, as hiperplasias mostram conteúdos de DNA diplóides (Frauenhoffer *et al.*, 1991), mas aneuploidias já foram referidas nesse grupo e em tecidos prostáticos normais (Haugen e Mjølnerød, 1990). Em relação aos carcinomas, a presença de conteúdos de DNA aneuplóides tem sido considerada uma evidência de agressividade da lesão e de pior prognóstico (Friedlander *et al.*, 1984; Frankfurt *et al.*, 1985; Fordham *et al.*, 1987; Lundberg *et al.*, 1987; Stephenson *et al.*, 1987; Adolfsson *et al.*, 1990; Al-Abadi e Nagel, 1990; Zetterberg e Forsslund, 1991; Stege *et al.*, 1990; Greene *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991; Robertson e Paulson, 1991; Hussain *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1993) e seu papel na progressão neoplásica pode ser explicada pelo efeito da dosagem gênica anormal (Frankfurt *et al.*, 1985). Apesar disso, deve ser referido 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 e Forsslund, 1991). Os resultados de Tribukait (1991) e Henke *et al.* (1994), 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 realizado por Deitch *et al.* (1993) relacionou o conteúdo de DNA com o grau histológico e o volume de tumores benignos. Os resultados revelaram que lesões muito pequenas e seu tecido adjacente eram diplóides. Por outro lado, a maioria daquelas com volumes maiores apresentavam ploidia anormal, do mesmo modo que o tecido próximo. 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 deve ter origem em múltiplos clones. Evidências para essa hipótese são fornecidas

pelos dados obtidos por Lundberg *et al.* (1987) com citometria de fluxo e Qian *et al.* (1995) com FISH, que referiram resultados heterogêneos entre amostras de diferentes áreas do mesmo tumor.

Os estudos de vários autores (Alcaraz *et al.*, 1994, Brown *et al.*, 1994, Persons *et al.*, 1994, Steilen *et al.*, 1994, Visakorpi *et al.*, 1994, Alers *et al.*, 1995, Lifson *et al.*, 1995) comparando os dados obtidos através da técnica de FISH e por citometria de fluxo, concluíram que a primeira é mais sensível na detecção de aneuploidias. A baixa concordância dessas metodologias pode ser decorrente do fato de que alterações cromossômicas só podem ser reveladas por citometria quando excedem pelo menos 4% da quantidade total de DNA, ou seja, aproximadamente o equivalente a um cromossomo grande e vários pequenos (Baretton *et al.*, 1994). Por outro lado, esses autores salientaram a necessidade de utilização de duas ou mais sondas para determinação do *status* de ploidia por meio da técnica de FISH.

II. OBJETIVOS

Desenvolver a habilidade de interpretar e analisar os resultados de pesquisas em português, com ênfase na compreensão da linguagem científica e na identificação dos elementos da linguagem científica, bem como a capacidade de aplicar os conhecimentos adquiridos na prática.

1. Identificar a finalidade de uma pesquisa e a metodologia utilizada, bem como a importância da pesquisa para a comunidade científica e para a sociedade em geral.
2. Descrever os resultados de uma pesquisa e a conclusão a que se chegou, bem como a validade dos dados e a confiabilidade das conclusões.
3. Avaliar a qualidade da linguagem utilizada em uma pesquisa científica, bem como a clareza e a precisão da linguagem.
4. Analisar a estrutura de uma pesquisa científica, bem como a organização dos dados e a apresentação dos resultados.
5. Comparar os resultados de pesquisas científicas, bem como a validade dos dados e a confiabilidade das conclusões, bem como a importância da pesquisa para a comunidade científica e para a sociedade em geral.

II. OBJETIVOS

Considerando a importância dos dados citogenéticos e moleculares no rastreamento de genes envolvidos na iniciação e progressão do processo neoplásico e, também, a alta incidência de tumores de próstata na população e a necessidade de informação prognóstica, nessas lesões, foi proposto o presente trabalho que pretendeu atingir os seguintes objetivos:

1. Estabelecer a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) no Laboratório de Citogenética Humana e Biologia Molecular do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto-SP.
2. Pesquisar, através da técnica de FISH, a ocorrência de anomalias numéricas em núcleos interfásicos de tumores de próstata frescos ou cultivados.
3. Avaliar a ocorrência de seleção celular *in vitro* nesses tumores com a utilização da técnica de FISH.
4. Analisar, através da técnica de PCR multiplex, o papel das variantes theta (GSTT1) e mu (GSTM1) da enzima glutationa S-transferase nas lesões benignas e malignas da próstata.
5. Comparar os resultados citogenéticos obtidos com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes e fornecer subsídios para prognóstico nos casos em que isso for possível.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

A SIMPLE PROCEDURE FOR REHYBRIDIZATION OF NUCLEI ANALYZED PREVIOUSLY BY FISH

Andréa Borduchi Carvalho-Salles, Nilce Barril and Eloiza Helena Tajara

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (ABC-S, NB, EHT); Serviço de Urologia, Faculdade de Medicina (JCM); Urologia Eliseu Denadai (ERMD), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Eloiza H. Tajara, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Caixa Postal 136.

15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

e-mail: [tajara @ bio.ibilce.unesp.br](mailto:tajara@bio.ibilce.unesp.br)

RUNNING TITLE: Rehybridization by FISH

ABSTRACT

We present a simple procedure for interphase fluorescence *in situ* rehybridization. This procedure was used to evaluate fresh prostate tumor from needle biopsy specimens. Digoxigenin-labeled DNA probes were hybridized onto nuclei which had been previously investigated by FISH using biotin-labeled DNA probes. This method makes it possible to reanalyze the same nuclei with different centromeric DNA probes and is useful in cases where a limited number of slides are available.

RESUMO

O presente trabalho descreve um procedimento simples para reibridização *in situ* fluorescente em núcleos interfásicos de amostras frescas de tumores de próstata obtidas a partir de biópsias aspirativas. Sondas α centroméricas marcadas com digoxigenina foram hibridizadas em núcleos anteriormente avaliados com diferentes sondas marcadas com biotina. Esse método permitiu a análise da mesma célula com diferentes sequências de DNA centroméricas, especialmente em casos com um número limitado de lâminas disponíveis.

KEY WORDS: Fluorescence *in situ* rehybridization, FISH, Interphase cytogenetic

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) provides a direct way of detecting specific DNA sequences in metaphase chromosomes and interphase nuclei. This technique has rapidly found applications in clinical and cancer research. In most FISH studies, fresh or stored fixed cells are used for hybridization experiments, and the slide is used only once (Wang-Rong *et al.*, 1995). We developed a simple procedure for FISH by which the same slide can be used for two consecutive FISH experiments with different detection systems and fluorochromes.

Tumor specimens obtained after needle biopsies from patients with prostate cancer were processed according to standard procedures (Brown *et al.*, 1994; Dierlamm *et al.*, 1996). In brief, the samples in saline solution were mechanically disaggregated and treated with hypotonic sodium citrate solution (1%) for 20 min and methanol/acetic acid (3:1) overnight. The remaining cell clumps were disaggregated with 60% acetic acid and the suspension was dropped onto cold slides which were stored at -70°C until used.

First Hybridization

Slides were pretreated with 2 x SSC (pH 7.0-7.4) for 30 min at 37°C, dehydrated in a graded ethanol series (70, 85 and 100%; 2 min each) at room temperature and air dried. An alternative pretreatment was also used as follows: the slides were washed in 70% acetic acid for 1 min at room temperature and three times in 1 x PBS for 4 min each at room temperature. Then, 100 µl DNAase-free RNAase A (Sigma; 100 µg/ml in 2 x SSC) was dropped onto a plastic coverslip, which was then placed over the pretreated slides and incubated for 45 min to 1 h at 37°C in a moist chamber with 2 x SSC, pH 7.0. After three washes for 5 min each in 2 x SSC, pH 7.0, dehydration in a graded ethanol series (70, 85 and 100%; 2 min each) and air drying, the slides were incubated in pepsin solution (Sigma; 10 mg in 100 ml 0.01 M HCl) for 5-10 min at 37°C and washed in 1xPBS (5 min). After incubation in 4% formaldehyde/1 x PBS for 10 min at 37°C, the slides were washed in 1 x PBS (5 min), dehydrated in a graded ethanol series for 2 min each and air dried.

Cellular DNA was denatured by immersing the slides in 70% formamide/ 2 x SSC (pH 7.0-7.4) for 2-4 min at 72°C, followed by dehydration in a cold ethanol series (-20°C). Five microliters of hybridization mixture (30 µl Hybrisol VI Oncor and 1.5 µl centromeric probe) was denatured for 5 min at 72-74°C. After brief cooling on ice, this mixture was added to each slide, which was then covered with an 18 x 18 mm coverslip and sealed

with rubber cement. Hybridization was allowed for 16-24 h in a moist chamber at 37°C. Then the slides were washed in 50% formamide and 2 x SSC for 5 min each at 37°C. After incubation in phosphate-Tween 20-PBT (30% BSA, 1% Tween 20/PBS) or phosphate buffer detergent-PBD (Oncor) for 2 min at room temperature, the biotin-labeled probe was detected with fluorescein-labeled avidin at final concentration of 1:1000 wash buffer (0.1M Tris-HCl pH 7.5; 0.15 M NaCl; 0,05% v/v Tween 20; 5% w/v non-fat dry milk powder), and the digoxigenin-labeled probe was detected with rhodamine-labeled anti-digoxigenin (Oncor). Detections were carried out for 30 and 5 min at 37°C, respectively, in a pre-warmed humidified chamber in the dark. The slides were washed in PBT or PBD (3 x 2 min) at room temperature (25° - 28°C). Probe signals were amplified with biotinylated anti-avidin at final concentration of 1:200 wash buffer and fluorescein-labeled avidin (Vector) or with rabbit anti-sheep and rhodamine-labeled anti-rabbit (Oncor). Nuclei were counterstained with 12 µl of 4' 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride/DAPI (0,1 µg/ml antifade solution/Oncor) or propidium iodide (0,6µg/ml antifade solution/Oncor) (Figure A1 and B1).

Second Hybridization

The slides, after previous hybridization analysis, were conserved in the dark at -70°C for four days to one month. For the second FISH, the coverslips were gently removed, and the slides were destained in 1 x PBS (pH 7.0) for 5 min and washed in a graded ethanol series (70, 85 and 100%) for 2 min each at room temperature. Slides and probes were denatured, and hybridization was performed for 24-36 h at 37°C in a moist chamber. Post-hybridization washes, detection and amplification of the probe signal were identical to those in the procedure for the first FISH, but pretreatment was omitted (Figure A2 and B2). For each probe, signals from about 300 nuclei were evaluated by two independent observers. For each analysis, the guidelines described by Eastmond *et al.* (1995) were followed: only nonoverlapping nuclei were counted, damaged nuclei were not included, signals had to be completely separated to be scored individually, and bilobed signals that were not completely separated were counted as one. For each experiment, one slide of normal fresh skin samples was used. Only slides that displayed hybridization efficiency of 80% or more were scored. Signals related to probes applied in previous hybridizations persisted with variable intensity. The morphology of nuclei was not lost

during the second hybridization and the first and second hybridizations showed a high efficacy, reaching more than 85% of the nuclei.

We conclude that, with the technique described the same slide can be used for up to two consecutive FISH experiments without loss of specificity and with variable intensity of hybridization signals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. James Robert Coleman for reviewing the text and FAPESP, CNPq and CAPES for financial support. Publication supported by FAPESP.

REFERENCES

- Brown, J.A., Alcaraz, A., Takahashi, S., Persons, D.L., Liember, M.M. and Jekins, R.B.** (1994). Chromosomal aneusomies detected by fluorescence *in situ* hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. *J. Urol.* 152: 1157-1162.
- Dierlamm, J., Wlodarska, I., Michaux, L., Starza, R., Zeller, W., Mecucci, C. and Van den Berger, H.** (1996). Successful use of the same slide for consecutive fluorescence *in situ* hybridization experiments. *Genes Chromosom. Cancer* 16: 261-264.
- Eastmond, D.A., Schuler, M., Rupa, D.S.** (1995). Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutation Res.* 348: 153-162.
- Wang-Rong, W., Perissel, B. and Malet, P.** (1995). Rehybridization on metaphases studied previously by FISH. An approach to analyze chromosome aberrations. *Cancer Genet. Cytogenet.* 85: 58-60.

LEGENDS

Figure 1. Two FISH experiments were consecutively performed on the same slides of a patient with prostate cancer. A₁) First hybridization with biotinylated centromeric probe for chromosome 7 and A₂) second hybridization with digoxigenin-labeled probe for chromosome 10. B₁) First hybridization with biotinylated centromeric probe for chromosome 7 and B₂) second hybridization with digoxigenin-labeled probe for chromosome 10. The nucleus on the left is likely composed of the superimposed signals of two chromosomes.

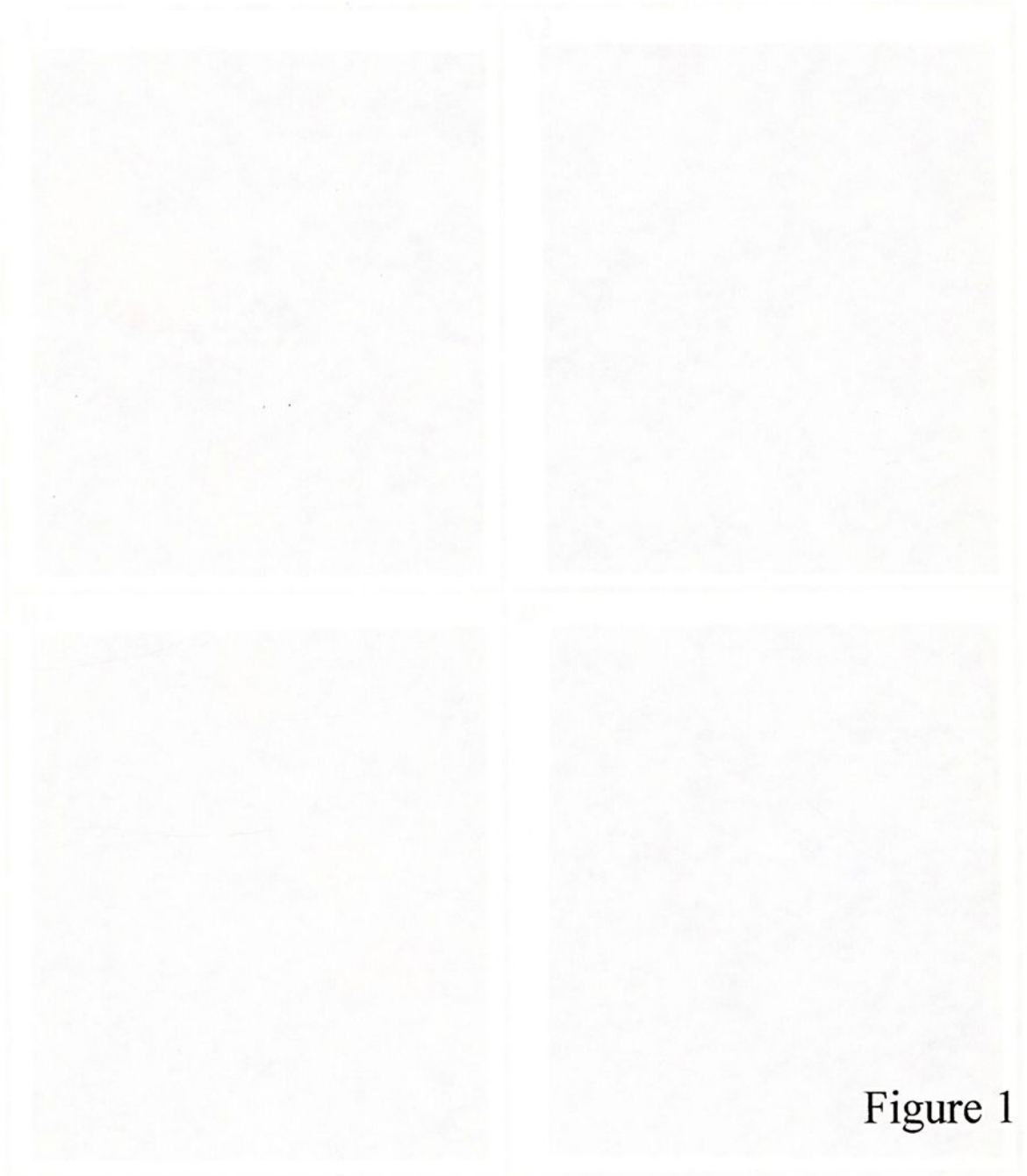
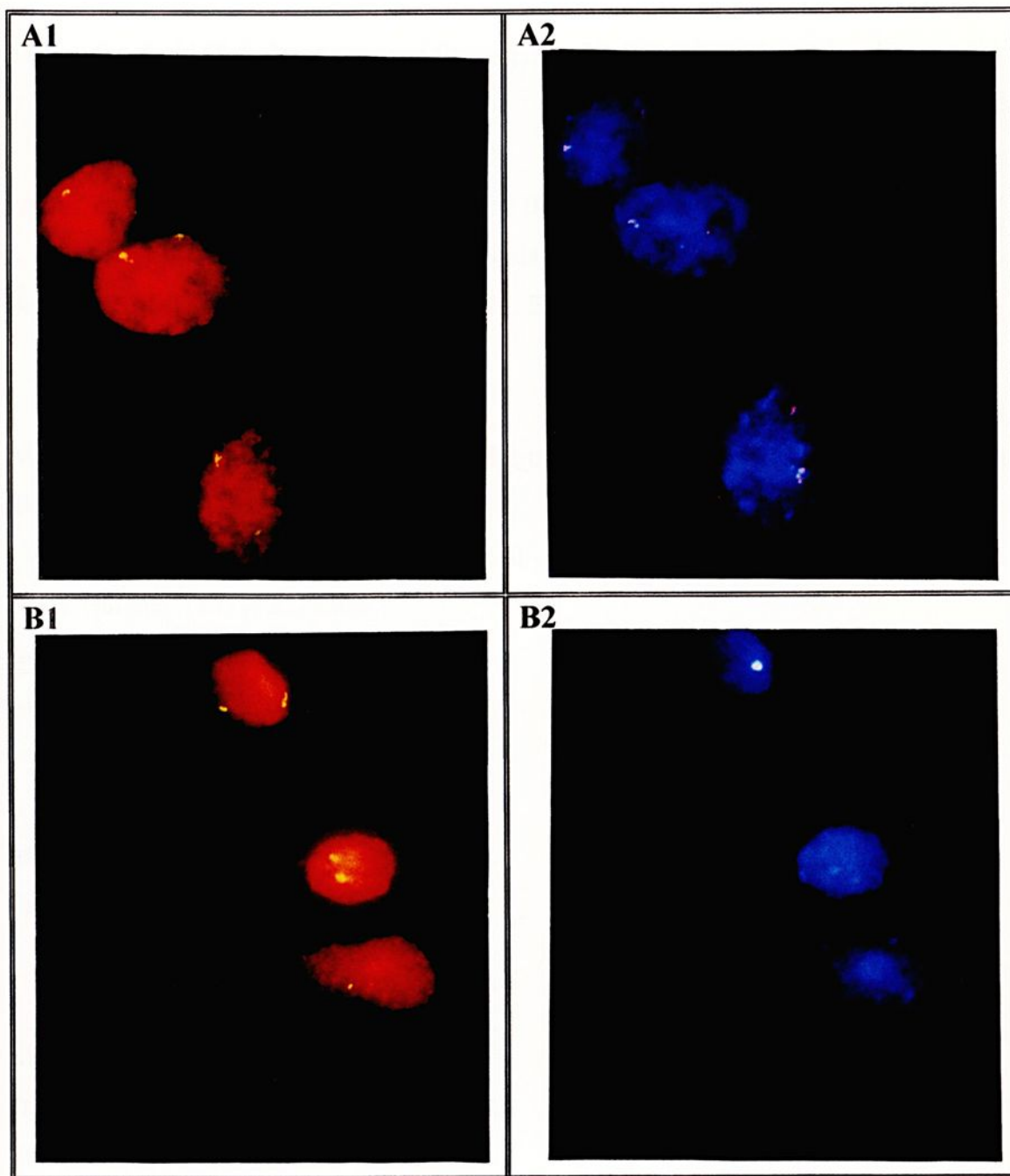


Figure 1



ASSESSMENT OF CULTURE CONDITIONS OF NEOPLASTIC AND NONNEOPLASTIC PROSTATE SPECIMENS

Andréa Borduchi Carvalho-Salles and Eloiza Helena Tajara.

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (ABC-S, NB, EHT); Serviço de Urologia, Faculdade de Medicina (JCM); Urologia Eliseu Denadai (ERMD), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Eloiza H. Tajara, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Caixa Postal 136.

15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

e-mail: [tajara @ bio.ibilce.unesp.br](mailto:tajara@bio.ibilce.unesp.br)

ABBREVIATED TITLE:

Culture conditions and prostate carcinoma

KEY WORDS:

Prostate

Cancer

Cell culture

Cytogenetic

ABSTRACT

Successful cytogenetic analysis of malignant tissues using conventional techniques depends upon the presence of viable, dividing malignant cells in the sample, and the ability to obtain metaphase cells with good-quality chromosome banding. In this report we describe an improved technique for short-term cultures of neoplastic and nonneoplastic prostate samples.

INTRODUCTION

Although prostate cancer is the most common neoplasia in elderly males, only limited cytogenetics studies have been published when compared with other common tumors. The low mitotic activity of the tumor in culture, probably resulting from the lack of information on the optimum nutritional requirements and the low yield of metaphase chromosome available for analysis are the main reasons for the limited informations [1, 5]. Cytogenetic analyzes, when successful, are characterized by an impressive lack of abnormal karyotypes [1-4] although loss of the Y chromosome and structural abnormalities involving chromosomes 1, 2, 3, 7, 8, 10, 12 and X or double minute (dmin) chromosomes have also been decribed [2, 6-21].

With the increased interest in the karyotypic pattern of cancer cells for clinical and research purposes, there have been efforts to reduce such technical problems [21-23]. In the present study we aim to establish optimum culture conditions of prostate carcinoma cells comparing the effects of several nutrients on cell proliferation and the procedures for tissue disaggregation and culturing with regard to cell attachment, the type of cells to grow out and the quality of metaphase chromosomes available for analysis.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples from 10 benign prostatic hyperplasias and 19 prostate adenocarcinomas were obtained from radical prostatectomy, transurethral resection or needle aspirative biopsies from patients without prior chemo or radiotherapy, referred for treatment to local hospitals.

The specimens were brought directly to the laboratory in sterile transport medium and disaggregated mechanically and/or enzymatically, cultured, harvested and staining as described below [24-25].

Culture Media and Reagents

Transport medium. Hanks solution supplemented with 250 IU/mL penicillin (SIGMA), 250 µg/mL streptomycin (SIGMA) and 30 µg/mL gentamycin (SIGMA).

Washing media. Transport medium supplemented with 2.5 µg/mL B amphotericin (SQUIBB).

Enzyme for tissue disaggregation. Stock solution at concentration of 2,000 U/mL Collagenase XI (SIGMA).

Growth medium I. HAM-F10 supplemented with 20% bovine serum (CULTILAB), 292 µg/mL L-glutamine (PUREX), 0.04 U/mL insulin (BIOBRAS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (SIGMA).

Growth medium II. Growth medium I supplemented with 10^{-6} M hydrocortisone (Solu-Cortef - UP JOHN).

Growth medium III. Growth medium I supplemented with 10 ng/mL epidermal growth factor (SIGMA).

Growth medium IV. HAM-F10 supplemented with 5% bovine serum, 292 µg/mL L-glutamine, 1 ng/mL like-insulin growth factor (SIGMA), 10 ng/mL epidermal growth factor, 10^{-6} M hydrocortisone, 0.006 µg/mL testosterone, 0,1 mg/mL glutation (SIGMA), 5 µL/mL medium vitamins (SIGMA-M6895), 100 IU/mL penicilin and 100 µg/mL streptomycin (SIGMA).

Mitotic arrest reagent. 2 µg/mL colcemid (SIGMA).

Dissociation reagent. 0.05/0.02 g/mL Trypsin-EDTA solution (CULTILAB)

Hypotonic solution. 0.75 M KCl or 1% sodium citrate (MERCK)

Fixative solution. Methanol/ acetic acid (3:1) (MERCK).

Staining solutions. 2% Giemsa/Sorensen buffer solution (MERCK)

Tissue Setup

The samples were submitted for three different procedures:

Setup A (mechanical and enzymatic disaggregation)

1. Rinse the tissue sample with washing medium.
2. Transfer the sample into a sterile Petri dish and mince the tissue with scissors into 1-2 mm³ pieces.
3. Add 0.5-1ml collagenase XI with or without 4mL growth medium and incubate for 16-48 hours or 20-40 minutes at room temperature, respectively.
4. Transfer the disaggregated tissue into a centrifuge tube, add 10 mL incomplete medium and spin down at 800-1000 rpm for 10 minutes.
5. Discard the supernatant and repeat the step 4.
6. Discard the supernatant and add 8 mL growth medium (I, II, III or IV), resuspend the pellet. Transfer 3mL of the suspension to three culture flasks and incubate at 37°C for approximately 48 hours.

Setup B (mechanical or enzymatic disaggregation and serial sedimentation)

1. Rinse the sample within washing medium.
2. Transfer the specimen into a sterile Petri dish, and mince the tissue with scissors into 1-2 mm³ pieces.
3. Transfer the pieces into a 15 mL centrifuge tube. Add 10 mL washing medium.
4. Let them sediment for 10-15 minutes, and transfer the supernatant to one tube (T1) and the sediment to another (T2).
5. Spin down the supernatant at 800-1000 rpm for 10 minutes. Resuspend the resulting pellet in 3 mL growth medium I or II and transfer the suspension to a culture flask (F1). Incubate at 37°C.

6. Add 3-5 mL growth medium I or II to the tube T2 obtained in step 4 and add 0.5 mL collagenase and incubate at 37°C for approximately 16 hours.
7. To disaggregate remaining tissue fragments from tube T2, draw the suspension up and down through a pipette several times but do not froth.
8. Transfer the suspension into a centrifuge tube, add 10 mL washing medium, pipette, and spin down at 800-1000 rpm for 10 minutes.
9. Discard the supernatant, resuspend the pellet in 10 mL washing medium, and let the suspension sediment for 10-15 minutes.
10. Transfer the ensuing supernatant to another centrifuge tube (T3) and spin down. Discard the supernatant and resuspend this pellet in growth medium (I or II) and transfer the cell suspension onto a culture flask (F3).
11. Resuspend the remaining pellet obtained through sedimentation (in step 8) in 10 mL washing medium and let the suspension sediment for 10-15 minutes.
12. Repeat the procedure described in step 8 until there are no more cells left in the supernatant.
13. Resuspend the final pellet (T4) in growth medium I or II and transfer the cell suspension onto a culture flask (F4).
14. Incubate the different supernatant fractions.

Setup C (mechanical disaggregation)

1. Rinse the sample with washing medium.
2. Transfer the specimen into a sterile Petri dish, and mince the tissue with scissors into 1-2 mm³ pieces.
3. Transfer small pieces of tissue and a minimal amount of complete culture medium (I, II or III, ~ 1mL per flask) into two or three culture flasks using a sterile Pasteur pipet, distributing pieces evenly over bottom (widest surface) of flask.
4. Carefully stand flask on end (bottom surface vertical and cap pointed up), close cap tightly, and incubate for 24 hours.
5. Add 4mL complete culture medium by letting it flow down side of flask opposite the tissue, being careful not to dislodge attached pieces of tissue. Cap flask tightly and incubate 2 days with flask lying flat (surface to which tissue is attached horizontal).

6. Examine explant for contamination as evidenced by cloudy appearance, acidity of culture medium, or obvious fungal growth. If none is seen, continue incubation.

Maintenance of Cultures

1. Daily inspection of the cultures by means of an inverted microscope is essential to determine the optimal time for harvesting. Look for cell attachment, growth of epithelia cell colonies, fibroblasts, or both, and mitotic activity.

2. When growth begins, replace medium twice per week. When several colonies are well-expanded and in log phase of growth (i.e., rounded up mitotic cells and empty space between colonies), harvest culture.

3. Change the medium on the day before harvesting.

Harvesting, Synchronization and Fixation

Harvesting A

1. Add colcemid to each flask at a final concentration of $2\mu\text{g/mL}$ and incubate for 2-16 hours.

2. Remove the medium from the culture flasks and save it in a centrifuge tube.

3. Add 10 mL prewarmed hypotonic solution (1% sodium citrate), letting the liquid slide slowly down side of flask. Also add the 1% sodium citrate solution to the centrifuge tube and incubate them 30-40 minutes. Transfer the suspension from the flask to a centrifuge tube.

4. Spin down both tubes at 800-1000 rpm for 10 minutes.

5. Discard the supernatant and add - drop by drop - 1 mL freshly prepared fixative, letting it run slowly down side of tube. Gently resuspend pellet, taking care not to splash cells all over the tube.

6. Add 9 mL fixative, letting run slowly down side of tube. Cap tube and incubate 20 minutes.

7. Spin down at 800-1000 rpm for 10 minutes. Remove the supernatant and add - drop by drop - 1 mL fixative. Gently resuspend the pellet, and add an additional 9 mL fixative.

8. Repeat step 7 three times.
9. Cap tube and chill 24 hours at -20°C .
10. Repeat step 7 resuspending the pellet in a small volume fixative (usually ~ 0.5 mL) so the desired concentration for dropping suspension onto slides is obtained.
11. Drop onto clean slides that have been kept in distilled water at 4°C , and air - dry.
12. Stain by GTG-banding.

Harvesting B

1. Add colcemid to each flask at a final concentration of $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ and incubate for 2-5 hours.
2. Remove the medium from flask and save it in a centrifuge tube (C1).
3. Wash the flask in 2 mL prewarmed trypsin/EDTA solution, which is then transferred to the tube centrifuge tube C1.
4. Add 2 mL prewarmed trypsin/EDTA solution to the flask and incubate at 37°C for 5 minutes.
5. Check for release of cells under an inverted microscope. These cells should be rounded up and floating. If cells are not released, tap on bottom of plate. If cells still do not release, incubate flask an additional 5 minutes.
6. Add 2 mL prewarmed 20% growth medium IV to help rinse cells from flask surface. Pipet suspension up and down to break up cell clumps. Transfer the suspension to the same centrifuge tube C1. Add 5 mL prewarmed growth medium IV to the flask to continue culture.
7. Spin down 10 minutes at 800-1000 rpm. Discard the supernatant.
8. Add -drop by drop- 1 mL prewarmed hypotonic solution ($0,75\text{M KCl}$) letting it slide slowly down side of tube. Tap gently to mix. Add an additional 6 mL prewarmed hypotonic solution, also letting the solution slide down side of tube before coming in contact with cell mixture. Cap tube and incubate at 37°C for 20-30 minutes.
9. Add - drop by drop - 1 mL freshly prepared fixative and mix gently by inverting the tube.
10. Let it stand for 10 minutes.

11. Add 6 mL fixative, letting it run slowly down side of tube. Cap tube and chill 1 hour at -20°C .
12. Centrifuge at 800-1000 rpm for 10 minutes. Remove the supernatant and add 10 mL of 3:1 fixative. Add the first milliliter drop by drop and gently resuspend before adding the remaining 9 mL.
13. Repeat step 12 two times.
14. Cap tube and chill 24 hours at -20°C .
15. Repeat step 12 resuspending the pellet in a small volume fixative (usually ~ 0.5 mL) so the desired concentration for dropping suspension onto slides is obtained.
16. Prepare slides and stain by GTG-banding.

Synchronization methods

1. Before 24 hours of harvest, change the growth medium and add 50 μL metotrexate solution (final concentration, 10^{-5} M). Incubate for 17 hours.
2. Discard the medium and add 5 mL fresh medium with 50 μL of timidine (final concentration, 10^{-3} M). Incubate for 4 hours.
3. Add colcemid at a final concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ and incubate for 3 hours.
4. Repeat the harvest A or B.

RESULTS AND DISCUSSION

Samples from 10 prostatic hyperplasias and 19 adenocarcinomas were cultured using different procedures for tissue disaggregation and culture conditions. *In vitro* growth was observed in 19 (37 replicas) of 29 (61 replicas) specimens investigated (5 benign prostatic hyperplasia and 14 primary prostate adenocarcinoma). Because the specimen size was small in most cases, all methodologic combinations were not tested on all samples.

Tissue disaggregation was an important step for the attachment and growth of prostate cells. Optimal disaggregation was observed when the sample was both minced and treated with enzymatic solutions. Cultures established after mechanical mincing only resulted in a very low growth rate and in delaying the harvesting for 5-31 days compared with 3-7 days for those that had also been disaggregated enzymatically. Using different collagenase concentrations and exposure times, the best results were obtained with lower concentrations (final concentration of 250 U/mL) for longer times (16-48 hs). These data are in agreement with the idea that different tumors require different enzyme conditions for dissociation of epithelial cells from the stromal elements [23].

Several culture media were tested: Ham F-10 supplemented with fetal bovine serum (SFB), glutamine (GLUE), epidermal growth factor (EGF), like-insulin growth factor (IGF), insulin (INS), glutation (GLUN), hydrocortisone (HYDRO), testosterone (TT), vitamins (VIT) and/or antibiotics (P/S). Growth medium modification was tested because of the hormonal dependence of prostate cell [26].

The use of medium IV (5% FBS and IGF, EGF, HYDRO, TT, GLUN, VIT, P/S) showed the best and faster cell outgrowth. Higher concentrations of FBS increased fibroblast growth since cells with fibroblast morphology were observed in a few cells from 8 of 12 (66,6%) specimens cultured in medium I - III and in a few cells from 2 of 10 (20%) specimens subcultured in medium IV.

Repeated sedimentation of incompletely disaggregated tissue to create several cell fractions, as described by Limon *et al.* [24], resulted in low success. Epithelial outgrowth was observed in one culture F2, whereas in F1, F3 or F4 the cells failed to attach. Such findings indicate that the procedure itself may be responsible for the results.

In brief, our attempts to develop a method suitable for short-term culture of cancer prostate cells have led us to the following conclusions: The technique, using mechanical and mild, long-term collagenase treatment for sample disaggregation and medium enriched

with low FBS concentrations, hormones, glutation and vitamins, yielded the largest increase of epithelial cells proliferation without contamination of fibroblasts (setup A, harvesting B, medium IV). In such conditions, the culture success was observed for 100% (10/10 samples; 23 replicas) of the cases (Table 1, Figure 1) and all harvesting were performed 3-7 days after culture setups. Using other methodologies, harvesting were performed 5 or 6 days (2 cases; 2 replicas) and 10-31 days (9 cases; 12 replicas) after culture setups. The methodological improvements applied for prostate cells may also be proved useful for short-term culturing and cytogenetic analysis of other hormone-dependent epithelial tumors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. José Carlos Mesquita, Dr. Eliseu R. Mello Denadai, Dr. Luis Cezar Fava Spessoto, Dr. Antonio Barbosa Oliveira Filho and Dr. Carlos Benedito Verona for providing the tumoral sample. FAPESP, FUNDUNESP, CNPq and CAPES for financial support.

REFERENCES

1. Sandberg AA (1992): Chromosomal abnormalities and related events in prostate cancer. *Hum Pathol* 23: 368-80.
2. Arps S, Rodewald A, Schmalenberger B, Carl P, Bressel M, Kastendieck H (1993): Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 66: 93-9.
3. Micale MA, Mohamed A, Sakr W, Powell IJ, Wolman SR (1992): Cytogenetics of primary prostatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 6: 165-173.
4. König JJ, Teubel W, Kamst E, Romijn JC, Schroder FH, Hagemeijer A (1998): Cytogenetic Analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 101: 116-22.
5. Chopra DP, Grignon DJ, Joiakim A, Mathieu PA, Mohamed A, Sakr WA, Powell JJ, Sarkar FH (1996). Differential growth factor responses of epithelial cell cultures derived from normal human prostate, benign prostatic hyperplasia, and primary prostate carcinoma. *J Cell Physiol* 169: 269-280.
6. Atkin BN, and Baker CM (1985): Chromosome 10 deletion in carcinoma of the prostate. *N England J Med* 312: 5.
7. Gibas Z, Edson P, Sandberg AA (1985): Chromosome rearrangements in a metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 16: 301-4.
8. Ahmann FR, Woo L, Hendrix M, Trent JM (1986): Growth in semisolid agar of prostate cancer cells obtained from bone marrow aspirates. *Cancer Res* 46:3560-4.
9. Pittman S, Russel PJ, Jelbart ME, Wass J, Reghavan D (1987): Flow cytometric and karyotypic analysis of a primary small cell carcinoma of the prostate: A xenografted cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 165-9.
10. 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* 35: 103-8.
11. Lundgren R, Mandhal N, Heim S, Limon J, Henrikson H, Mitelman F (1992): Cytogenetic analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. *Gene Chromosom Cancer* 4: 16-24.

12. Brothman AR, Lesho LJ, Somers KD, Schellhammer PF, Ladaga LE, Marchant DJ (1989): Cytogenetic analysis of four primary prostatic cultures. *Cancer Genet Cytogenet* 37: 241-8.
13. Brothman AR, Peehl DM, Patel AM, Mcneal JE (1990): Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res* 50: 3795-803.
14. Limon J, Lundgren R, Elfving P, Heim S, Kristoffersson U, Mandhal N, Mitelman F (1989): Double minutes in two primary adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 39: 191-4.
15. Wullich B, Breitkruz T, Zwergel T, Unteregger G, Seitz G, Zang KD (1992): Cytogenetic evidence of intratumoral focal heterogeneity in prostatic carcinomas. *Urol Int* 48: 372-7.
16. Milasin J and Micic S (1994): Double minute chromosome in an invasive adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 72: 157-9.
17. Van Den Berg D, Guan X-Y, Von Hoff D, Jenkins R, Bittner M, Griffin C, Kallioniemi O, Visakorpi T, McGill J, Herath J, Epstein J, Sarosdy M, Meltzer P, Trent J (1995): DNA sequence amplification in human prostate cancer identified by chromosome microdissection: Potential prognostic implications. *Clin Cancer Res* 1: 11-8.
18. Qi H, Dal Cin P, Voorde W, Elgamal A A, Poppel HV, Baert L, Van Den Berghe H (1996): Del (1)(q12) in adenocarcinomas of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 79-81.
19. Webb HD, Hawkins AL, Griffin CA (1996): Cytogenetic abnormalities are frequent in uncultured prostate cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 88: 126-32.
20. Carvalho-Salles AB, Mesquita JC, Tajara EH (1998): Del (1) (q12) and double minute chromosomes in a metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, submitted.
21. Konig JJ, Teubel W, Kamst E, Romijn JC, Schroder FH, Hagemeyer A (1998): Cytogenetic analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 101: 116-22.
22. Rubin CM (1992): Technical advances in the cytogenetic analysis of malignant tissues. *Cancer supplement* 69: 1567-1571.

23. Biran S, Vlodavsky I, Fuks Z, Lijovetzky G, Horowitz A T (1986): Growth of human mammary carcinoma cells from biopsy specimens in serum-free medium on extracellular matrix. *Int J Cancer* 38: 345-354.
24. Limon J, Lundren R, Elfving P, Heim S, Kristoffersson U, Mandhal N; Mitelman F (1990): An improved technique for short term culturing of human prostatic adenocarcinoma tissue of cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 191-9.
25. Peehl DM, Stamey TA (1986): Serum-free growth of adult human prostatic epithelial cells. *In vitro Cell Develop Biol* 22: 82-90.
26. Griffiths K, Morton MS, Nicholson RI. (1997): Androgens, androgens receptors, antiandrogens and treatment of prostate cancer. *Eur Urol* 32: 24-40.

Table 1. Frequency of prostate cell cultures showing attachment and cell growth 2-31 days after setup (M = mechanical, E = Enzymatic disaggregations).

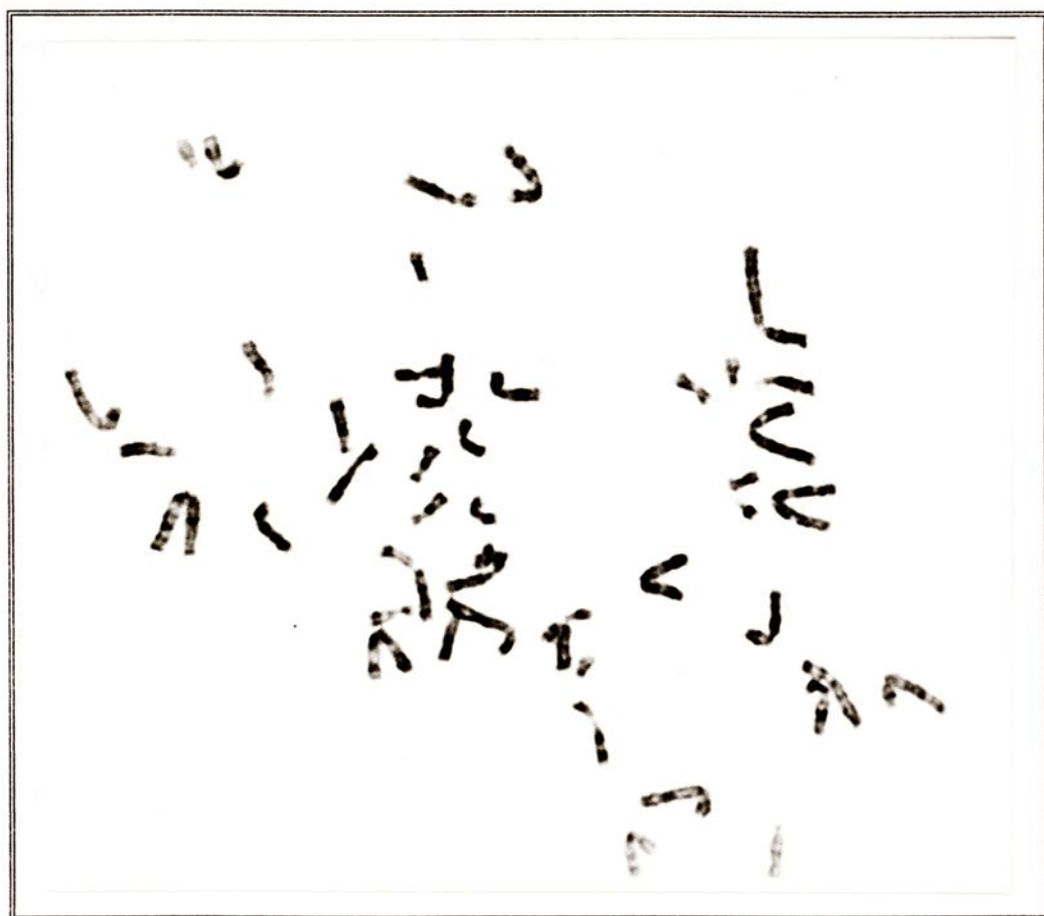
Parameters	Attachment				Cell Growth				Days Cultured										N° of Replicas
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	2 to 6	7 to 9	10 to 13	14 to 17	18 to 20	21 to 25	26 to 30	31			
Disaggregation																			
M	3	2	2		2	2								1	2	1	7		
M + E	14	5	6	25	4	3	4	25	11	14	3	1	1	1		1	50		
Serial	3	1			1									1			4		
Harvesting																			
A									2		3	1	1	3	2	2	14		
B									9	14							23		
Media																			
I	16	6	5	2	6	5	2		2		3	1	1	2	2	2	29		
II	1	2	1		3												4		
III		3	2		4	1								1			5		
IV				23					9	14							23		

LEGEND

Figure 1. G-banded plate illustrating the quality of chromosome preparation obtainable with the described method.



Figure 1



ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR E EVOLUÇÃO CLÍNICA EM 9 ADENOCARCINOMAS DE PRÓSTATA

Andréa B. Carvalho-Salles, Nilce Barril, Eliseu R. M. Denadai e Eloiza H. Tajara.

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (ABC-S, NB, EHT); Urologia Eliseu Denadai (ERMD), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO: Depto de Biologia, IBILCE/UNESP

ENDEREÇO: IBILCE, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Departamento de Biologia, UNESP, Caixa Postal 136, CEP: 15054-000 São José do Rio Preto, SP. Enviar correspondência para Eloiza H. Tajara (e-mail: tajara@bio.ibilce.unesp.br).

UNITERMOS: Próstata, Câncer, Citogenética, FISH

TÍTULO EM INGLÊS: Molecular cytogenetic analysis and clinical evolution in nine prostate adenocarcinomas

KEY WORDS: Prostate, Cancer, Cytogenetic, FISH

AUXÍLIO FINANCEIRO: CAPES, CNPq, FAPESP, FUNDUNESP



RESUMO

O câncer de próstata é uma das neoplasias mais frequentes em homens e, apesar dos esforços realizados nos últimos anos, poucos marcadores têm contribuído para a avaliação do seu prognóstico. Até o momento, também não foi identificada uma alteração genética específica que determine predisposição à doença. No presente trabalho, utilizamos a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para investigar a frequência de aneuploidia em células não cultivadas de nove lesões de próstata. Os achados foram comparados com o estadió clinicopatológico do paciente por ocasião da obtenção da amostra. A trissomia 7 e a poliploidia foram associadas com comportamento clinicamente agressivo e com grau elevado do tumor.

SUMMARY

Prostate carcinoma is one of the most common cancer in men. Despite significant efforts over the last several years, very few disease markers have added significantly to the prognostic information provided by stage and grade. To date, no single specific genetic defect has been identified that predisposes to the disease. In this study, we used fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to investigate the frequency of aneuploidy in noncultured cells from 9 prostatic lesions. The findings were compared with the clinicopathological status of the patients at the time of obtaining the specimen. The trisomy 7 and the polyploidy were associated with clinically aggressive behavior of the disease and higher tumor grade.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O câncer prostático constitui hoje a neoplasia com mais alta prevalência no sexo masculino e é uma das causas mais frequentes de morte. As metodologias disponíveis para sua detecção precoce são limitadas tanto em relação à sua sensibilidade quanto à especificidade. Além disso, existem ainda grandes dificuldades na identificação de tumores com potencial agressivo daqueles que permanecerão na forma latente e não acarretarão manifestações no seu portador (1). Nos últimos anos, várias tentativas têm sido realizadas para detecção de marcadores genéticos que pudessem auxiliar na definição do comportamento da lesão e os resultados já obtidos sugerem que a presença de clones celulares aneuplóides está associada com a progressão tumoral (2). O presente trabalho teve como objetivo investigar, através da técnica de FISH, a presença de alterações cromossômicas numéricas em nove amostras não cultivadas de adenocarcinomas prostáticos e avaliar se os achados podem ser utilizados como marcadores da evolução clínica da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas nove amostras de adenocarcinomas prostáticos moderadamente ou bem diferenciados, obtidas de indivíduos de cor branca e com idades variando entre 58 e 79 anos ($X=63,6$). Os fragmentos, após hipotonização e fixação, foram desagregados com ácido acético e a suspensão celular foi gotejada em lâminas. O material sofreu pré-tratamento com ácido acético, RNase e pepsina, desnaturação com solução de formamida e hibridação com sondas de DNA α -centromérico para seis cromossomos. A imunodeteção foi realizada com anticorpos conjugados a fluorocromos específicos (3-4).

RESULTADOS

As nove amostras de adenocarcinomas prostáticos foram analisadas para as sequências α -centroméricas dos cromossomos 1, 7, 8, 10, 11 e Y. Para cada sonda, os sinais foram observados por dois pesquisadores em aproximadamente 300 núcleos. Os limites para aneuploidia foram definidos pela adição de 4 desvios-padrões às frequências médias de sinais obtidos em seis amostras controles de pele normal.

Na Tabela 1 estão apresentados os dados sobre os achados citogenéticos, estadiamento clínico e anatomopatológico das nove amostras estudadas.

Todos os casos apresentaram trissomia e/ou tetrassomia do cromossomo 1 (Figuras 1A e B), cinco eram trissômicos e/ou tetrassômicos para o cromossomo 7 (M5, M7, M85, M130 e M131) (Figuras 1 C e D), dois para o cromossomo 8 (M85 e M133), cinco para o cromossomo 10 (M3, M85, M131, M133 e M134) e um para o 11 (M85). Apenas uma monossomia, a do cromossomo 8, foi observada (caso M26) (Figura 1E), enquanto que a nulissomia Y foi detectada em três casos (M3, M85 e M131) (Figura 1F). A amostra M85 foi considerada poliplóide, pois apresentou trissomia para pelo menos três sequências analisadas e tetrassomia para pelo menos uma sonda investigada.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram estudadas células interfásicas não cultivadas de carcinomas prostáticos através da técnica de FISH. Todas as amostras apresentaram alterações numéricas e as trissomias 1 e 7 e a nulissomia Y foram as mais frequentemente observadas.

As aberrações estruturais, mas não as numéricas, do cromossomo 1 constituem um evento frequente em tumores sólidos de maneira geral incluindo os de próstata (5-19). Shen *et al.* (1995) (20) identificaram, através de técnicas moleculares, um possível oncogene localizado nesse cromossomo, o *PTI-1* (*prostate tumor inducing gene 1*), cujo produto, homólogo ao fator de elongação $\alpha 1$ e associado com a síntese protéica, foi observado em tumores malignos mas não em hiperplasias benignas ou em tecidos normais da glândula. Um outro possível oncogene, localizado na braço longo do cromossomo 1, é o *HPC1* (*hereditary prostate cancer gene 1*), que parece estar envolvido nas formas familiares (21-24). Entretanto, os resultados de McIndoe *et al.* (1997) (25) e Eeles *et al.* (1998) (26) sugerem que o locus *HPC1* é responsável por uma minoria dos casos de câncer de próstata familiares, uma vez que não se mostrou alterado nas famílias por eles estudadas. Até o momento, a função desses genes na carcinogênese e suas relações com as aberrações observadas não foram esclarecidas (27).

A trissomia 7 e a nulissomia Y constituem as mais frequentes aneuploidias detectadas em tumores de próstata (15, 28-30). O cromossomo 7 contém o gene *ERBB* (gene do receptor do fator de crescimento epidérmico), cuja expressão aumentada já foi associada com estágios avançados, recorrência e tempo menor de sobrevida nesse grupo de neoplasias (31). Também contém o oncogene *MET*, mapeado em 7q31, cuja expressão foi observada em células tumorais e metastáticas da glândula (29, 31). O significado biológico da trissomia 7 em câncer de próstata ainda não foi esclarecido mas vários pesquisadores têm verificado que o ganho desse cromossomo está associado a estágios tardios da doença (30, 32-37). O papel da nulissomia Y, por outro lado, é questionável por ser observada tanto em tumores malignos como em hiperplasias benignas, tecidos sólidos normais e mesmo em medula óssea de homens idosos (18, 38-39).

Em relação à poliploidia, a presença de conteúdos diplóides é frequente em lesões benignas (40) enquanto conteúdos aneuplóides têm sido considerados uma evidência de

agressividade da lesão (2). Apesar disso, deve ser referido que tumores diplóides também podem ter um comportamento agressivo (34) e que os tetraplóides parecem ser menos malignos que os aneuplóides (41-42). Os resultados de Tribukait (1991) (2), 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 seguida de sucessivas perdas cromossômicas no tumor tetraplóide.

No presente estudo, a trissomia 7 e a poliploidia foram detectadas em tumores menos diferenciados (Tabela 1). O número de amostras analisadas foi pequeno mas os dados obtidos confirmam os da literatura e sugerem correlação dessas alterações com estágios mais avançados da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kirby SR, Christmas TJ, Brawer M. Prostate Cancer. *Mirror*, 1996: 170.
2. Tribukait D. DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology. *Acta Oncol*, 1991; 30 : 187-92.
3. Dracopoli NG, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman JG, Smith DR. *Current Protocols in Human Genetics*. USA, John Wiley & Sons, 1996.
4. Carvalho-Salles AB, Barril N, Tajara EH. A simple procedure to rehybridization on nuclei analysed previously by FISH. *Genet Mol Biol*, 1998; 20, *in press*.
5. Atkin BN, and Baker CM. Chromosome 10 deletion in carcinoma of the prostate. *N England J Med*, 1985; 312: 5.
6. Gibas Z, Edson P, Sandberg AA. Chromosome rearrangements in a metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, 1985; 16: 301-4.
7. Pittman S, Russel PJ, Jelbart ME, Wass J, Reghavan D. Flow cytometric and kariotypic analysis of a primary small cell carcinoma of the prostate: A xenografted cell line. *Cancer Genet Cytogenet*, 1987; 26: 165-9.
8. Lundgren R, Kristoffersson V, Heim S, Mandhal N, Mitelman F. Multiple structural chromosome rearrangement, including del 7q and del 10q, in an adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, 1988; 35: 103-8.
9. Lundgren R, Mandhal N, Heim S, Limon J, Henrikson H, Mitelman F. Cytogenetic analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. *Genes Chromosom Cancer*, 1992; 4: 16-24.
10. Brothman AR, Lesho LJ, Somers KD, Schellhammer PF, Ladaga LE, Marchant DJ. Cytogenetic analysis of four primary prostatic cultures. *Cancer Genet Cytogenet*, 1989; 37: 241-8.
11. Brothman AR, Peehl DM, Patel AM, Mcneal JE. Frequency and pattern of kariotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res*, 1990; 50: 3795-803.
12. Wullich B, Breitkruz T, Zwergel T, Unteregger G, Seitz G, Zang KD. Cytogenetic evidence of intratumoral focal heterogeneity in prostatic carcinomas. *Urol Int*, 1992; 48: 372-7.

13. Arps S, Rodewald A, Schmalenberger B, Carl P, Bressel M, Kastendieck H. Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, 1993; 66: 93-9.
14. Breitkreuz T, Romanakis K, Lutz S, Seitz G, Bonkhoff H, Unteregger G, Zwergel T, Zang KD, Wullich B. Genotypic characterization of prostatic carcinomas: a combined cytogenetic, flow cytometry, and *in situ* DNA hybridization study. *Cancer Res*, 1993; 53: 4035-40.
15. Casalone R, Portentoso P, Granata P, Minelli E, Righi R, Merone E, Pozzi E, Chiravalli AM. Chromosome changes in benign prostatic hyperplasia and their significance in the origem of prostatic carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1993; 68: 126-30.
16. Milasin J and Micic S. Double minute chromosome in an invasive adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, 1994; 72: 157-9.
17. Qi H, Dal Cin P, Voorde W, Elgamal A A, Poppel HV, Baert L, Van Den Berghe H. Del 1q12 in adenocarcinomas of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996; 26: 79-81.
18. Webb HD, Hawkins AL, Griffin CA. Cytogenetic abnormalities are frequent in uncultured prostate cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996; 88: 126-32.
19. Konig JJ, Teubel W, Kamst E, Romijn JC, Schroder FH, Hagemeyer A. Cytogenetic Analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998; 101: 116-22.
20. Shen R, Su Z, Olsson A A, Fisher, P.B. Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 6778-82.
21. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nussken DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Isaacs WB. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science*, 1996; 274: 1371-4.
22. Cooney KA, McCarthy JD, Lange E, Huang L, Miesfeldt S, Montie JE, Oesterling JE, Sandler HM, Lange K. Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst*, 1997; 89: 955-9.

23. Gronberg H, Xu J, Smith JR, Carpten JD, Isaacs SD, Freije D, Bova GS, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus HPC1 on chromosome 1. *Cancer Res*, 1997; 57: 4707-9.
24. Gronberg H, Isaacs SD, Smith JR, Carpten JD, Bova GS, Freije D, Xu J, Meyers DA, Collins FS, Trent JM, Walsh PC, Isaacs WB. Characteristics of prostate cancer in families potentially linked to the hereditary prostate cancer 1 HPC1 locus. *JAMA*, 1997; 278: 1251-5.
25. McIndoe RA, Stanford JL, Gibbs M, Jervik GP, Brandzel S, Neal CL, Li S, Gammack JT, Gay AA, Good EL, Hood L, Ostrander EA. Linkage analysis of 49 high-risk families does not support a common familial prostate cancer-susceptibility gene at 1q24-25. *Am J Hum Genet*, 1997; 61: 347-53.
26. Eeles RA, Durocher F, Edwards S, Teare D, Badzioch M, Hamound R, Gill S, Biggs P, Dearnaley D, Arden-Jones A, Dowe A, Shearer R, McLennan dl, Norman RI, Ghadirian P, Aprikian A, Ford D, Amos C, King TM, Labrie F, Simard J, Narod AS, Easton D, Foulkes WD. Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. *Am J Hum Genet*, 1998; 62: 653-8.
27. Chang GTG, Blok LJ, Steenbeek M, Veldscholte J, Van Weerden W, Van Steenbrugge GJ, Brinkmann AO. Differentially expressed genes in androgen-dependent and -independent prostate carcinomas. *Cancer Res*, 1997; 57: 4075-81.
28. Brown J A, Alcaraz A, Satoru T, Persons DL, Lieber MM, Jenkins RB. Chromosomal aneusomies detected by fluorescence *in situ* hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. *J Urol*, 1994; 152: 1157-62.
29. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvänen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola J, Kallioniemi O P. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 1995; 55: 342-7.
30. Wang RY, Troncoso P, Palmer JL, El-Naggar AK, Linag J.C. Trisomy by dual-color fluorescence *in situ* hybridization: A potential biological marker for prostate cancer progression. *Clinical Cancer Res*, 1996; 2: 1553-8.
31. Bandyk MG, Zhao L, Troncoso P, Pisters LL, Palmer JL, Von Eschenbach AC, Chung LWK, Liang JC. Trisomy 7: a potential cytogenetic marker of human prostate cancer progression. *Genes Chromosom Cancer*, 1994; 9: 19-27.

32. Alcaraz A, Takahashi S, Brown JA, Herath JF, Bergstralh EJ, Larson-Keller JJ, Lieber MM, Jenkins RB. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence *in situ* hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res*, 1994; 54: 3998-4002.
33. Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carrol PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative geneomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res*, 1996; 56: 3091-102.
34. Jones E, Zhu XL, Rohr LR, Stephenson RA, Brothman AR. Aneusomy of chromosome 7 and 17 detected by FISH in prostate cancer and the effects of selection *in vitro*. *Genes Chromosom Cancer*, 1994; 1: 163-70.
35. Takahashi S, Qian J, Brown JA, Alcaraz A, Bostwick DG, Lieber MM, Jenkins RB. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence *in situ* hybridization in needle biopsies. *Cancer Res*, 1994; 54: 3574-9.
36. Alers JC, Krijtenburger PJ, Vissers KJ, Bosman FT, Kwast TH, Dekken H. Interphase cytogenetics of prostatic adenocarcinoma and precursor lesions: Analysis of 25 radical prostatectomies and 17 adjacent prostatic intraepithelial neoplasias. *Genes Chromosom Cancer*, 1995; 12: 241-50.
37. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Herath, JF, Lieber MM, Jenkins RB. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res*, 1995; 55: 5408-14.
38. Molennar WM, Stoepker MEJ, Ruiter AJ, Hoekstra HJ, Van Den Berg E. Cytogenetic support for primary prostatic cancer in a patient presenting with a soft tissue mass in the leg. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996; 86: 147-9.
39. Zitzelsberger H, Szucs S, Robens E, Weier HU, Hofler H, Bauchinger M. Combined cytogenetic and molecular genetic analyses of fifty-nine untreated human prostate carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996; 90: 37-44.
40. Fraumeni EE, Jae MD, Ro J, El-Naggar AK, Ordonez NG, Ayala AG. Clear cell cribriform hyperplasia of the prostate. *Am J Clin Pathol*, 1991; 95: 446-53.
41. Montgomery BT, Blute ML, Farrow GM, Myers RP, Zincke H, Therneau TM, Lieber MM. Stage B prostate carcinoma. *Arch Surg*, 1990; 125: 327-31.
42. Zetterberg A & Forsslund G. Ploidy level and tumor progression in prostatic carcinoma. *Acta Oncol*, 1991; 30: 193-9.

Tabela 1. Comparação entre os achados citogenéticos obtidos através da técnica de FISH, estadiamento clínico e anatomopatológico das nove amostras de adenocarcinomas prostático estudadas (B=bem diferenciado; M=moderadamente diferenciado, NR=não referido)

Caso	Estadiamento		Grau de Gleason	Achados Citogenéticos
	Clínico	Anatomopatológico		
M3	Localizado	B	3.1	+1, +10, -Y
M5	NR	M	3	+1, +7
M7	Metastático	M	5.3	+1, +7
M26	Localizado	B	2.2	+1, -8
M85	Invasivo	M	2.3	+1/+1x2, +7x2, +8,+10,+11, -Y
M130	Localizado	M	5.2	+1, +7
M131	Localizado	M	2.5	+1, +7, +10, -Y
M133	Localizado	M	2.5	+1, +8/+8x2, +10
M134	Localizado	B2	5.2	+1, +10

LEGENDA

Figura 1. Fotomicrografias mostrando **(A, B)** duas, três ou quatro cópias do cromossomo 1; **(C, D)** duas, três ou quatro cópias do 7; **(E)** uma ou duas cópias do 8 e **(F)** uma ou nenhuma cópia do cromossomo Y.

Figura 1

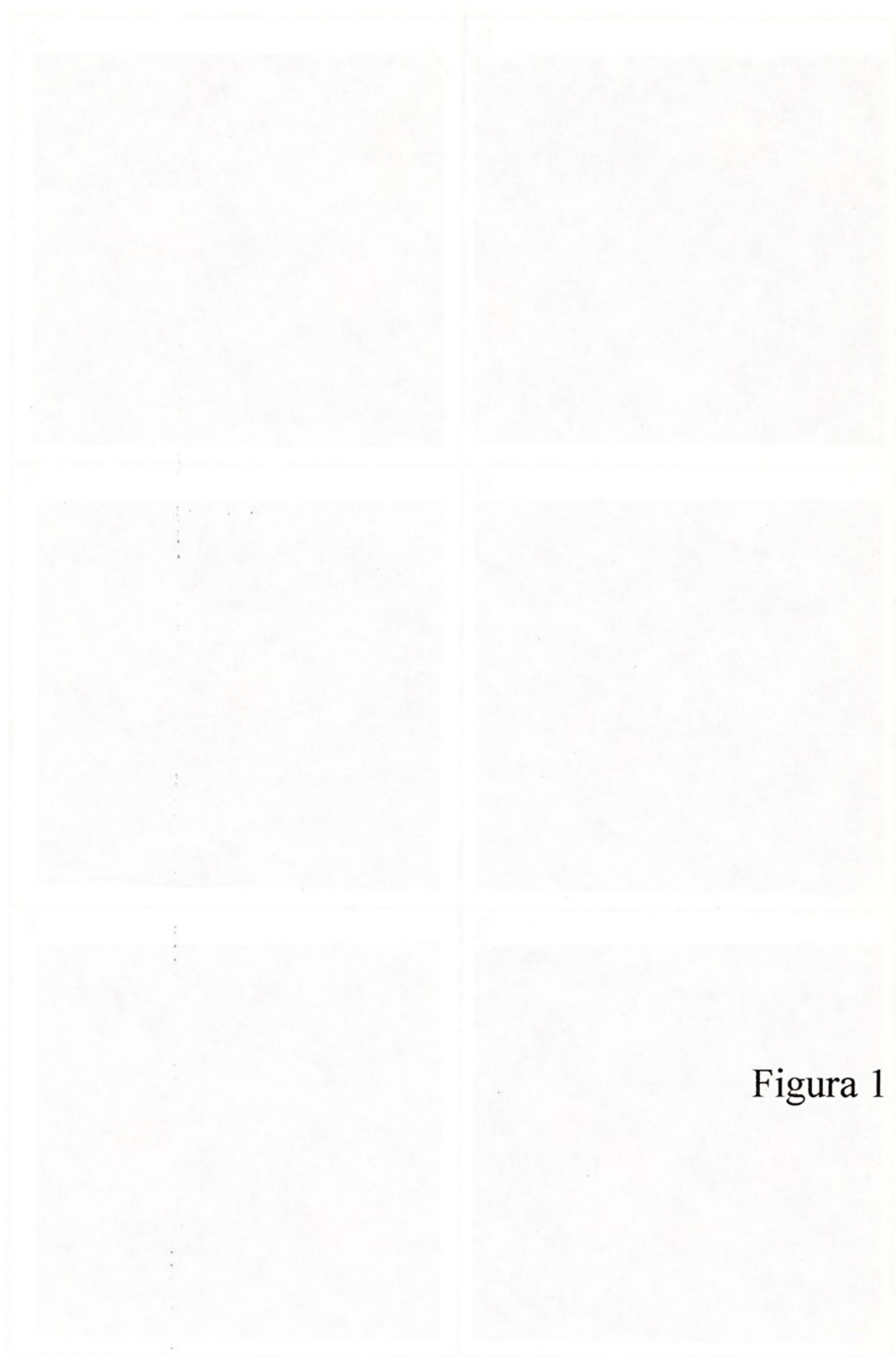
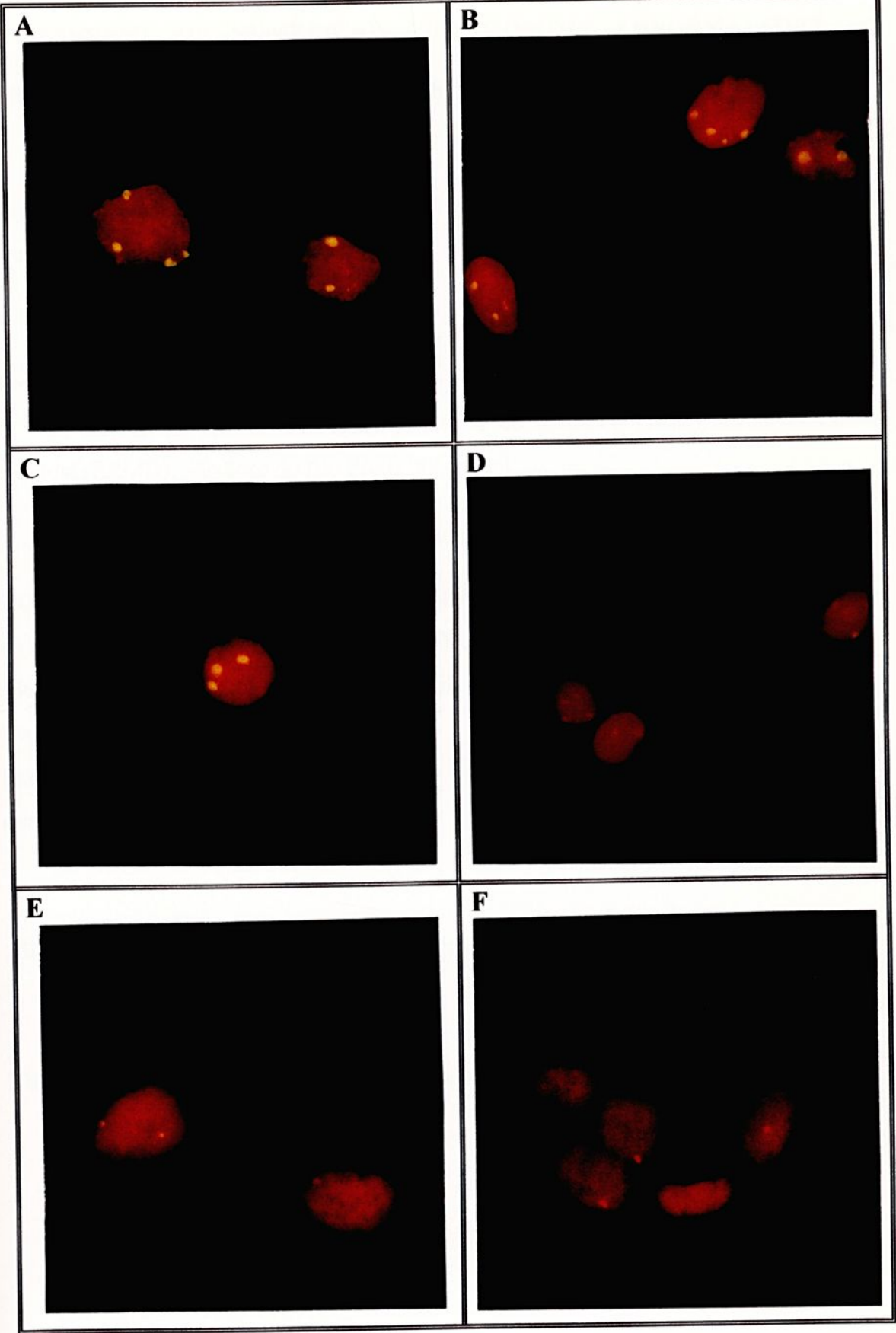


Figura 1



ASSESSMENT OF NUMERICAL CHROMOSOME ABNORMALITIES IN PROSTATIC NEOPLASIA BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION

Andréa Borduchi Carvalho-Salles, Nilce Barril, José Carlos Mesquita, Eliseu R. Mello Denadai and Eloiza Helena Tajara.

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (ABC-S, NB, EHT); Serviço de Urologia, Faculdade de Medicina (JCM); Urologia Eliseu Denadai (ERMD), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Professor Eloiza H. Tajara, PhD, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Caixa Postal 136.

15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

e-mail: [tajara @ bio.ibilce.unesp.br](mailto:tajara@bio.ibilce.unesp.br)

ABBREVIATED TITLE: FISH analysis of prostate cancer

KEY WORDS: Prostate, Cancer, FISH, Cytogenetic

SUMMARY

Prostate cancer is characterized by an unpredictable clinical behavior. Some tumors remain indolent for many years, whereas others progress rapidly to incurable metastatic disease. To date, no nonrandom cytogenetic abnormality has been identified in such disease, although evidence is increasing that aneuploidy is associated with advanced cancer stage and loss of tumor differentiation. In this study, we used fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to investigate the frequency of aneuploidy in noncultured cells from 17 prostatic adenocarcinomas. Aneusomy 7 and X and polyploidy were seen among the more advanced stages tumors but not in the nonaggressive lesions.

INTRODUCTION

Prostate carcinoma is one of the most common cancer in men in many countries. The etiology of this tumor is still unclear. Many risk factors have been proposed, including diet, hormonal milieu and environmental carcinogens. Several studies have also reported higher risks among family members of the probands (Whittemore *et al.*, 1995, Haas and Sakr, 1997).

Genetic changes underlying the development and progression of the prostate cancer are poorly known. No chromosomal anomaly can be regarded as consistent but evidence is increasing that aneuploidy is associated with advanced tumor stage and loss of tumor differentiation (Tribukai, 1991, Bandyk *et al.*, 1994). However, because metaphase cells are required for analysis, cytogenetic studies are hampered by the difficulties of specifically stimulating tumor cells to divide (Visakorpi *et al.*, 1995). Here, we used FISH techniques to investigate the frequency of aneuploidy in noncultured cells from prostatic adenocarcinoma.

MATERIALS AND METHODS

Tumor specimens obtained after needle biopsies from 17 patients with prostate adenocarcinoma were processed according to standard procedures (Brown *et al.*, 1994). In brief, the samples in saline solution were mechanically disaggregated and treated with hypotonic sodium citrate solution (1%) for 20 min and methanol/acetic acid (3:1) overnight. The remaining cell clumps were disaggregated with 60% acetic acid and the suspension was dropped onto cold slides which were stored at -70°C until used. Slides were treated with acetic acid, RNase and pepsin by the procedure reported previously (Carvalho-Salles *et al.*, 1998).

Denaturation of chromosomes and preparation of the hybridization mixture were done according to the instructions of the suppliers of the probes.

Hybridization was allowed overnight in a moist chamber at 37°C . The slides were washed in 50% formamide and 2xSSC pH 7 for 5 min each at 37°C . Detection of the hybridization signals and counterstaining of nuclei were performed as described elsewhere (Dracopoli *et al.*, 1996).

RESULTS AND CONCLUSION

In total, 17 prostate tumor specimens were analyzed for chromosomes 1, 7, 8, 10, 11, X and Y. For each probe, signals from about 300 nuclei were evaluated by two independent observers. For each analysis, the guidelines described by Eastmond *et al.* (1995) were followed: Only nonoverlapping nuclei were counted, damaged nuclei were not included, signals had to be completely separated to be scored individually, and bilobed signals that were not completely separated were counted as one. Only slides that displayed hybridization efficiency of 80% or more were scored. The evaluation of centromere copy numbers in 6 normal fresh skin sample was used to define the criteria of aneusomy. The average percentage of control nuclei with 2 signals of chromosomes 1, 7, 8, 10 and 11 was 86,6% (Table 1) and the average percentage of control nuclei with 1 signal of chromosomes X and Y was 88,5 % (Table 2). The cutoff criteria was defined adding 4 standard deviations to the averages of the normal skin data. Thus, a deletion or a nulisomy was diagnosed when more than 32,4 % or 21,9% of the enumerated nuclei showed only 1 or no signal for autosomal or gonosomal chromosome, respectively. Aneusomy with chromosomal gain was assumed when more than 5,1% or 4% of the enumerated nuclei exhibited 3 or 4 signals per nuclei for a autosomal DNA probe gain, respectively, and when more than 4% of the nuclei exhibited 2 or 3 signals per nucleus for a gonosomal DNA probe. Table 3 summarizes the loss and gain for each chromosome. The most frequent aberrations found were the loss of chromosome Y and gain of chromosome 1. Polyploidy (Figure 2A and B) and gain 7 (Figure 2C) and X were associated with clinically aggressive behavior of the disease or higher tumor grade and the monosomy 8 (Figure 1D) were observed in clinically nonaggressive disease (Table 4).

Gain of chromosome 7 is one of the most frequent chromosomal abnormalities in prostate cancer (Alcaraz *et al.*, 1994, Baretton *et al.*, 1994, Brown *et al.*, 1994, Visakorpi *et al.*, 1994, Takahashi *et al.*, 1994, Zitzelsberger *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1996). Its increased expression has also been associated with advanced stage recurrence, and poor prognosis and survival of several types of cancer (for review, see Wang *et al.*, 1996). Different genes are located in this chromosome and related to cell proliferation such as the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) (Spurr *et al.*, 1984), *MET* and *RAI* (Tsui *et al.*,

1995). Additionally, a putative prostate tumor supressor gene has been shown to reside on chromosome 7q31(Zenklusen *et al.*, 1994).

ALC The significance of diploidy or of triploidy X needs investigation because an important gene, the androgen receptor (*AR*), is located on this chromosome (Chang *et al.*, 1988). Since prostatic epithelium is androgen dependent and amplification of the *AR* gene was recently described in recurrent prostate carcinomas from patients who had failed androgen deprivation therapy, it is possible that such gene may related to prostate tumorigenesis. (Visakorpi *et al.*, 1995, Koivisto *et al.*, 1997). These results suggest that X aneusomy may contribute to genomic imbalance and would play a role in the progression of prostate neoplasia.

DISCUSSION Our results, as well as those from others studies (Bandyk *et al.*, 1994), suggest that FISH analysis is useful in identifying a clone of chromosomally aberrant cells within a primary tumor and that extra copies of chromosome 7 and X may be involved in prostate cancer, but confirmation is needed in a larger number of patients.

Financial Support: FAPESP

REFERENCES

- ALCARAZ, A., TAKAHASHI, S., BROWN, J. A., HERATH, J.F., BERGSTRALH, E. J., LARSON-KELLER, J. J., LIEBER, M. M., JENKINS, R. B. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence *in situ* hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res.*, v. 54, p.3998-4002, 1994.
- BANDYK, M.G., ZHAO, L., TRONCOSO, P., PISTERS, L.L., PALMER, J.L., von ESCHENBACH, A.C., CHUNG, L.W.K., LIANG, J.C. Trisomy 7: a potential cytogenetic marker of human prostate cancer progression, *Genes Chromosom. Cancer*, v. 9, p. 19-27, 1994.
- BROWN, J. A., ALCARAZ, A. , SATORU, T., PERSONS, D.L., LIEBER, M. M., JENKINS, R. B. Chromosomal aneusomies detected by fluorescence *in situ* hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma, *J. Urol.*, v. 152, p. 1157-1162, 1994.
- CARVALHO-SALLES, A.B., BARRIL, N., TAJARA, E.H. A simple procedure to rehybridization on nuclei analyzed previously by FISH, 1998, *in press*.
- CHANG, C., KOKONTIS, J., LIAO, S. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* v. 240, p. 324-326, 1988.
- DRACOPOLI, N.G., HAINES, J.L., KORF, B.R., MOIR, D.T. MORTON, C.C., SEIDMAN, J.G., SMITH, D.R. *Current Protocols in Human Genetics*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. 1996.
- EASTMOND, D.A., SCHULER, M., RUPA, D.S. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutation Res.*, v. 348, p.153-162, 1995.
- HAAS, G.P., SAKR, W.A. Epidemiology of prostate cancer, *CA Cancer J Clin*, v. 47, p.273-287, 1997.
- KOIVISTO, P., KONONEN, J., PALMBERG, C., TAMMELA, T., HYYTINEN, E., ISOLA, J., TRAPMAN, J., CLEUTJENS, K., NOORDZIJ, A., VISAKORPI, T., KALLIONIEMI, O.P. Androgen receptor gene amplification: A possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.*, v. 57, p. 314-319, 1997.

- TAKAHASHI, S., QIAN, J., BROWN, J. A., ALCARAZ, A., BOSTWICK, D. G., LIEBER, M. M., JENKINS, R. B. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence *in situ* hybridization in needle biopsies. *Cancer Res.*, v. 54, p.3574-3579, 1994.
- TRIBUKAIT, D., DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology. *Acta Oncol.*, v. 30, p. 187-192, 1991.
- TSUI, L.C, DONIS-KELLER, H., GRZESCHIL, K.H. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 7 Mapping 1994. *Cytogenet. Cell Genet.*, v. 71, p. 2-21, 1995.
- VISAKORPI, T., HYYTINEN, E. R., KALLIONIEMI, A. H., ISOLA, J. J., KALLIONIEMI, O. P. Sensitive detection of chromosome copy number aberrations in prostate cancer by fluorescence *in situ* hybridization. *Am. J. Pathol.*, v. 145, p.624-639, 1994.
- VISAKORPI, T., KALLIONIEMI, A. H., SYVÄNEN, A. C., HYYTINEN, E. R., KARHU, R., TAMMELA, T., ISOLA, J. J., KALLIONIEMI, O. P. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization, *Cancer Res.*, v. 55, p. 342-347, 1995.
- WANG, R.Y., TRONCOSO, P., PALMER, J.L., EL-NAGGAR, A .K., LINAG, J.C. Trisomy by dual-color fluorescence *in situ* hybridization. A potential biological marker for prostate cancer progression. *Clinical Cancer Res.*, v. 2, p.1553-1558, 1996.
- WHITEMORE, A.S., KOLONEL, L.N., WU, AH., JOHN, E.M., GALLAGHER, R.P., HOWE, G.R., BURCH, J.D., HANKIN, J., DREON, D.M., WEST, DW. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada, *J Natl Cancer Inst* ,v. 3, p. 652-661, 1995.
- ZENKLUSEN, J.C., THOMPSON, J.C., TRONCOSO, P., KAGAN, J., CONTI, C.J. Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: A possible tumor supressor gene at 7q31.1. *Cancer Res.*, v. 54, p. 6370-6373, 1994.
- ZITZELSBERGER, H., SZUCS, S., ROBENS, E., WEIER, H.U., HOFER, H., BAUCHINGER, M. Combined cytogenetic and molecular genetic analyzes of fifty-nine untreated human prostate carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 90, p. 37-44, 1996.

Table 1. Distribution of chromosomes 1,7, 8, 10 and 11 copy number in 4 samples of normal skin

CASE	% cells with chr. 1				% cells with chr. 7				% cells with chr. 8				% cells with chr. 10				% cells with chr. 11			
	Number of copies				Number of copies				Number of copies				Number of copies				Number of copies			
	1	2	3	N° cells	1	2	3	N° cells	1	2	3	N° cells	1	2	3	N° cells	1	2	3	N° cells
PN 1	10,5	87,6	1,9	324	8,2	89,1	2,7	303	14,7	85,3	0,0	307	22,3	76,1	1,6	305	8,2	91,5	0,3	306
PN 2	9,4	88,6	2,0	299	10,8	88,9	0,3	296	9,4	89,3	1,3	298	15,9	82,5	1,6	308	17,9	81,4	0,7	307
PN 3	8,0	88,7	3,3	300	10,8	86,9	2,3	305	18,6	80,4	1,0	291	16,0	83,3	0,7	300	9,7	90,3	0,0	299
PN 4	22,8	75,9	1,3	299	6,4	93,3	0,3	297	9,4	90,3	0,3	309	11,0	89,0	0,0	300	6,3	93,1	0,6	320

Table 2. Distribution of chromosomes X and Y copy number in 2 samples of normal skin.

CASE	% cells with chromosome X				% cells with chromosome Y			
	Number of copies				Number of copies			
	0	1	2	N° cells	0	1	2	N° cells
PN 5	8,0	92,0	0,0	300	13,7	86,3	0,0	264
PN 6	13,3	86,7	0,0	300	10,9	89,1	0,0	321

Table 3. Distribution of chromosomes 1, 7, 8, 10 11, X and Y copy number in 17 samples of prostate adenocarcinoma (NA = no available).

CASE	% cells with chr. 1					% cells with chr. 7					% cells with chr. 8				
	Number of copies					Number of copies					Number of copies				
	1	2	3	4	Nº cells	1	2	3	4	Nº cells	1	2	3	4	Nº cells
M3	19,6	64,5	15,9	0,0	327	11,6	87,1	1,3	0,0	303	24,6	74,4	1,0	0,0	301
M5	18,4	72,9	8,7	0,0	310	5,3	82,1	12,6	0,0	302	12,0	87,0	1,0	0,0	300
M7	12,4	81,7	5,9	0,0	338	12,3	78,3	7,5	1,9	309	18,8	81,2	0,0	0,0	309
M26	20,7	56,6	19,3	3,4	295	14,1	80,9	5,0	0,0	304	42,6	52,4	5,0	0,0	317
M85	8,2	63,3	23,5	5,0	319	1,4	56,3	24,6	17,7	293	5,6	72,5	19,0	2,9	305
M98	18,5	66,4	12,4	2,7	298	9,1	82,0	8,0	0,9	350	22,4	74,8	2,8	0,0	317
M99	12,9	77,1	9,7	0,3	310	17,2	80,6	2,2	0,0	319	23,0	73,7	3,3	0,0	304
M102	6,3	76,3	13,9	3,5	317	0,3	91,0	4,0	4,7	297	7,8	82,8	7,8	1,6	306
M126	2,7	86,0	10,6	0,7	300	5,1	83,3	8,0	3,6	311	11,4	82,7	4,7	1,2	342
M130	5,9	69,5	20,6	4,0	321	7,4	85,2	7,4	0,0	311	10,8	83,9	3,3	2,0	305
M131	8,7	69,0	19,6	2,7	367	8,9	76,6	14,5	0,0	337	9,6	87,4	3,0	0,0	303
M133	14,5	77,9	7,3	0,3	303	10,6	84,1	5,0	0,3	303	4,9	67,0	18,4	9,7	309
M134	4,9	79,5	14,0	1,6	308	11,4	86,7	1,6	0,3	306	12,8	85,6	1,6	0,0	312
M137	9,9	68,2	18,4	3,5	315	13,4	81,7	4,9	0,0	328	30,9	66,8	2,3	0,0	307
M138	12,0	80,7	7,3	0,0	301	10,3	87,1	2,6	0,0	310	52,9	44,2	2,4	0,5	382
M140	6,3	86,3	7,4	0,0	300	5,7	88,0	6,3	0,0	301	24,0	70,0	6,0	0,0	300
M1243	8,6	81,1	10,3	0,0	301	2,0	93,0	5,0	0,0	254	18,5	76,3	4,3	0,9	329

Continuation...

CASE	% cells with chr. 10					% cells with chr. 11					% cells with chr. X					% cells with chr. Y			
	Number of copies					Number of copies					Number of copies					Number of copies			
	1	2	3	4	Nº cells	1	2	3	4	Nº cells	0	1	2	3	Nº cells	0	1	2	Nº cells
M3	12,3	79,9	7,8	0,0	308	10,3	88,1	1,6	0,0	302	19,6	79,1	1,3	0,0	301	68,3	31,0	0,7	300
M5	17,6	80,6	1,8	0,0	284	15,1	84,3	0,6	0,0	311	12,2	85,8	2,0	0,0	303	12,8	87,2	0,0	304
M7	16,0	79,5	4,5	0,0	312	10,3	88,7	1,0	0,0	301	10,3	75,7	14,0	0,0	300	21,2	78,8	0,0	297
M26	17,0	80,7	2,0	0,3	300	18,7	81,3	0,0	0,0	300	9,4	90,3	0,3	0,0	299	14,7	85,3	0,0	306
M85	3,5	79,6	12,9	4,0	232	13,5	80,7	5,8	0,0	326	9,7	78,6	11,7	0,0	299	26,8	70,1	3,1	291
M98	21,4	76,7	1,9	0,0	309	14,5	84,3	1,2	0,0	324	19,3	79,4	1,3	0,0	311	27,8	70,9	1,3	320
M99	29,0	69,0	2,0	0,0	310	19,5	79,3	1,2	0,0	323	23,3	75,7	1,0	0,0	300	25,9	72,9	1,2	321
M102	6,8	83,9	3,8	5,5	311	3,1	89,3	6,0	1,6	318	12,9	80,7	6,4	0,0	311	10,4	86,1	3,5	316
M126	14,7	74,9	10,1	0,3	307	8,9	81,6	9,2	0,3	303	8,2	79,2	12,6	0,0	303	13,8	82,3	3,9	304
M130	23,3	75,4	1,3	0,0	305	15,0	82,4	2,6	0,0	314	26,7	71,7	1,6	0,0	300	17,6	81,5	0,9	319
M131	8,2	84,5	7,0	0,3	316	11,3	86,1	2,6	0,0	309	13,7	71,1	15,2	0,0	256	25,9	74,1	0,0	309
M133	12,7	78,8	8,5	0,0	292	13,0	85,7	1,3	0,0	154	14,9	72,6	12,5	0,0	296	16,7	83,3	0,0	228
M134	7,6	83,2	6,9	2,3	304	11,0	85,8	3,2	0,0	309	8,1	25,6	56,4	9,9	273	15,2	82,0	2,8	317
M137	7,9	82,9	9,2	0,0	315	NA	NA	NA	NA	NA	25,6	72,7	1,7	0,0	301	34,1	65,9	0,0	451
M138	16,4	81,3	2,3	0,0	305	NA	NA	NA	NA	NA	28,7	69,0	2,3	0,0	303	35,6	64,4	0,0	295
M140	25,7	74,3	0,0	0,0	307	NA	NA	NA	NA	NA	21,0	77,9	1,1	0,0	262	42,6	57,4	0,0	305
M1243	22,2	74,2	3,3	0,3	329	26,2	73,2	0,6	0,0	302	9,0	88,3	2,7	0,0	300	29,8	70,2	0,0	322

Table 4. Clinical and pathologic stage, Gleason's grade and cytogenetics data of 17 prostate tumor specimens *(B/B2 = tumor localized to the prostate; C/C1= extraprostatic extension; D2 = pelvic lymph node metastases; Invas.= invasive; Prost. = no extraprostatic extension; Metast. = with metastases).

Case	Stage*		Gleason's Grade	Cytogenetics Data
	Clinical / Pathologic			
M3	Prost.	B2	3.1	+1, +10, -Y
M5			3	+1, +7
M7	Metast.	D2	5.3	+1, +7, +X
M26	Prost.	B2	2.2	+1, -8
M85	Invas.	C1	2.3	+1/+1x2, +7x2, +8, +10, +11, +X, -Y
M98	Invas.	C	5.2	+1, +7, -Y
M99	Prost.	B		+1, -X, -Y
M102	Invas.	C1	3.2	+1, +7x2, +8, +10x2, +11, +X
M126	Prost.	C	3.4	+1, +7, +10, +11, +X
M130	Prost.	C1	5.2	+1, +7, -X
M131	Prost.	C1	2.5	+1, +7, +10, +X, -Y
M133	Prost.	C1	2.5	+1, +8/+8x2, +10, +X
M134	Prost.	B2	5.2	+1, +10, +X/+2 x X
M137	Prost.	C	2.5	+1, +10, -X, -Y
M138	Prost.	B	2.2	+1, -8, -X, -Y
M140	Invas.	C1	3.2	+1, +7, +8, -Y
M1243	Prost.	B	2.2	+1, -Y

LEGEND

Figure 1. Photomicrographs showing FISH with centromeric probes. **(A and B)** Nuclei with five copies of chromosome 1 and 10. **(C)** Nucleus with three copies of chromosome 7. **(D)** Nuclei with one copy of chromosome 8.

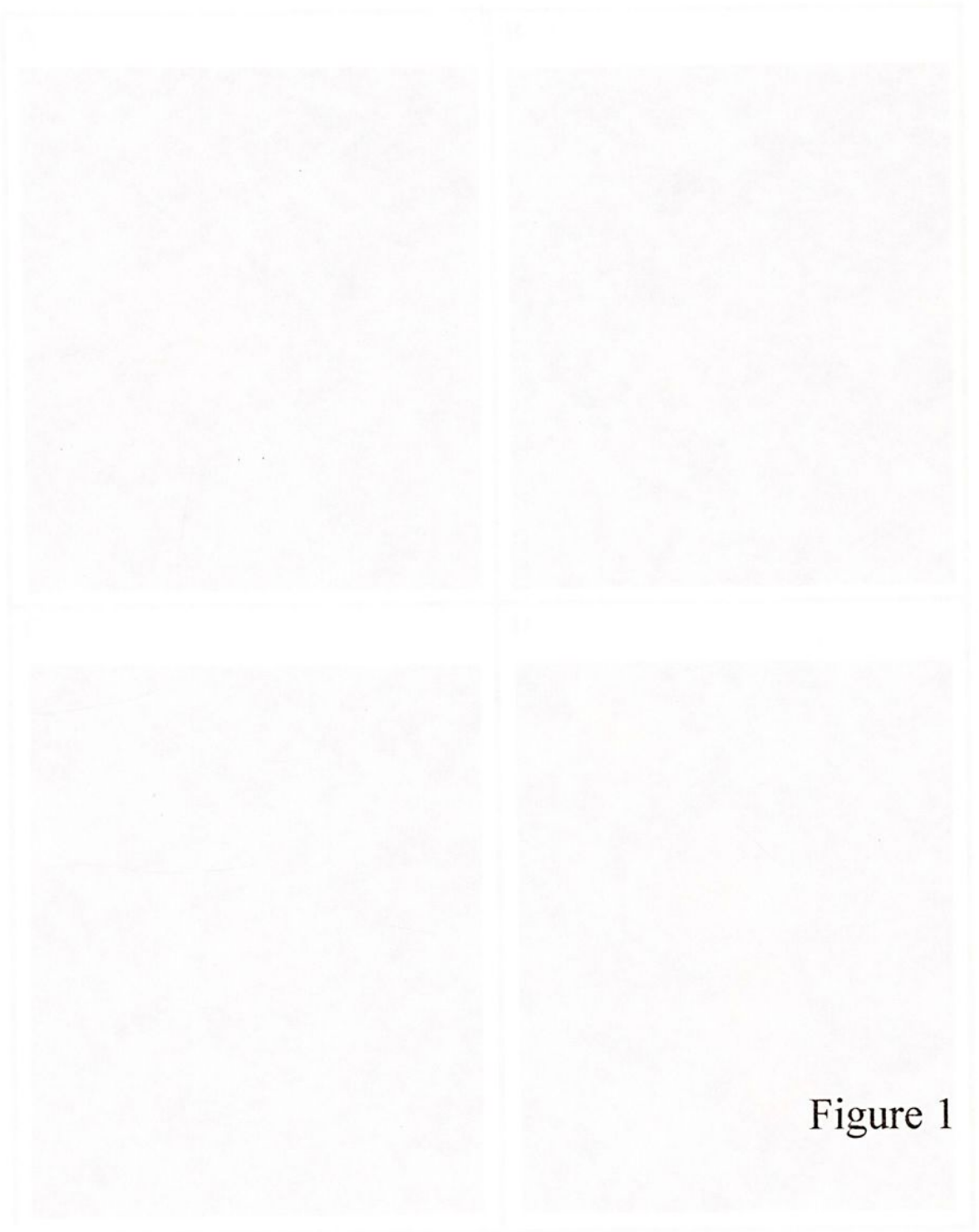
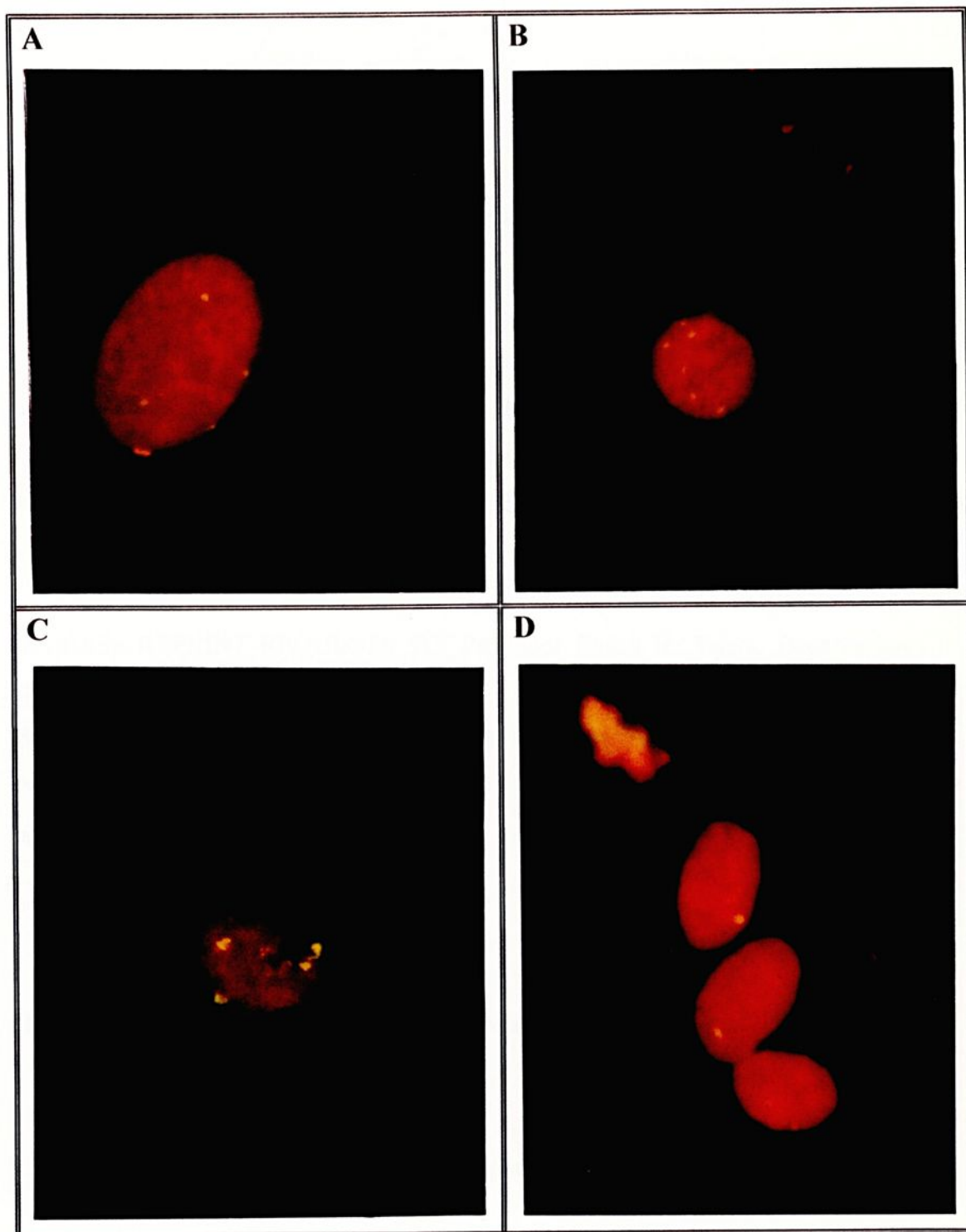


Figure 1



COMPARISON OF FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION ANALYSIS OF NUCLEI FROM CULTURED CELLS AND FRESH TISSUES OF PROSTATE CANCER

Andréa Borduchi Carvalho-Salles, Nilce Barril, José Carlos Mesquita, Eliseu R. Mello Denadai and Eloiza Helena Tajara.

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (ABC-S, NB, EHT); Serviço de Urologia, Faculdade de Medicina (JCM); Urologia Eliseu Denadai (ERMD), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Professor Eloiza H. Tajara, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Caixa Postal 136.

15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

e-mail: [tajara @ bio.ibilce.unesp.br](mailto:tajara@bio.ibilce.unesp.br)

ABBREVIATED TITLE: FISH analysis of prostate cancer

KEY WORDS: Prostate, Cancer, FISH, Cytogenetic

ABSTRACT

The cytogenetic findings obtained from nuclei of prostatic carcinomas before and after culture using FISH technique revealed significant differences. Cells with trisomies 1, 7 and 10 decreased in number during subcultivation and monosomy 8 and Y apparently had a proliferative advantage in culture.

INTRODUCTION

Prostate cancer is one of the most common malignancies in adult men in many countries and exhibits high mortality rates [1]. The etiology of this tumor is still unclear but a number of risk factors have been proposed, including animal fat consumption and some environmental carcinogens. Several studies have also reported higher risks among family members of the probands [2-3].

Despite its major health impact, the cytogenetic changes underlying the development and progression of this disease are relatively poorly known, specially because of the difficulties of obtaining good metaphase preparations for analyzes [4]. No chromosomal anomaly can be regarded as consistent, and many specimens have shown a normal diploid karyotype [5-8].

Obstacles of traditional karyotypic studies on this neoplasia include the difficulties of stimulating tumor cells to divide and the lack of morphological correlation between the analyzed metaphases and the original cells [9-10]. Such technical difficulties have been overcome with the introduction of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique, which allows analyzes of both numerical and structural chromosome aberrations in interphase nuclei. The investigation of these genetic abnormalities in nondividing cells that are fresh or preserved has been possible while maintaining the integrity of the surrounding tissue, which is crucial for cytological and histological studies [10].

Coupling chromosomal and molecular analysis, FISH has been applied in cultured cells and isolated nuclei from a variety of specimens and has provided insight into the mechanisms of initiation and progression of various human tumors, including prostate cancer [10-11]. However, the results from interphase cells have not been frequently compared with those from metaphase cells. In the present study, we analyzed nuclei from 9 cases of prostatic carcinoma before culture and after 7, 14 or 21 days *in vitro*, using FISH technique.

MATERIAL AND METHODS

Tumor specimens obtained after needle biopsies from 9 primary prostate adenocarcinomas were processed for FISH analysis before and after culture, according to standard procedures [9, 12-13]. All specimens were obtained from radical prostatectomy and needle aspirative biopsies from patients without prior chemo or radiotherapy.

Cultured Samples. Prior to culture, samples were mechanically and enzymatically dissociated, and the fragments were transferred to culture flasks containing HAM F-10 medium supplemented with 5% fetal calf serum, L-glutamine, like-insulin growth factor, epidermal growth factor, hydrocortisone, testosterone, glutation, vitamins and antibiotics. After 7 days, the cells were dispersed by trypsin treatment, and the cell suspension was removed to a centrifuge tube and harvested. Fresh medium was added to the culture flask and the remaining attached cells were reincubated and harvested 7 and/or 14 days later, as above. The cell suspension was dropped onto cold slides which were stored at -70°C until used.

Noncultured Cells. Nuclei were obtained from samples mechanically disaggregated and treated with hypotonic sodium citrate solution (1%) for 20 min and methanol/acetic acid (3:1) overnight. The remaining cell clumps were disaggregated with 60% acetic acid, and the suspension was dropped onto cold slides which were stored at -70°C until used.

Slides were treated with acetic acid, RNase and pepsin by the procedure previously reported [14]. Denaturation of the chromosomes and preparation of the hybridization mixture were done according to the instructions of the suppliers of the probes. In brief, hybridization was allowed overnight in a moist chamber at 37°C . The slides were washed in 50% formamide and 2xSSC pH 7 for 5 min each at 37°C . Detection of the hybridization signals and counterstaining of nuclei were performed as described elsewhere [13-14].

RESULTS

In total, 9 prostate tumor specimens, before and after culture, were analyzed by FISH using biotin or digoxigenin-labeled probes for the centromere of chromosomes 1, 7, 8, 10 and Y. For each probe, signals from about 300 nuclei were evaluated by two independent observers. The cutoff criteria were defined adding 4 standard deviations to the averages of the normal skin data.

Noncultured nuclei showed higher frequencies of aneuploidy than those of cultured cells. Only trisomy 1, nullosomy Y and monosomy 8 (Figures 1A, B and C) were seen after 21 days in culture (Table 1).

DISCUSSION

Prostate cancer is characterized by an unpredictable clinical behavior. Some tumors remain indolent for many years, whereas others progress rapidly to incurable metastatic disease [15]. At the present, no marker can accurately detect very early localized malignancies or lesions with a potentially aggressive behavior. Traditional cytogenetic studies have provided evidence that chromosomal alterations are significant diagnostic and prognostic markers in many leukemias and some solid tumors. However, no nonrandom cytogenetic abnormality has been identified in prostate cancer, but some studies have suggested that structural as well as numerical aberrations of chromosomes 1, 7, 8, 10 and Y might be of importance in the origin and progression of tumors [5-8, 16-18]. At the molecular level, progress is coming slowly [1, 19-23].

FISH represents a relatively new technique which can improve our knowledge on gene sequences involved in cancer without the need for obtaining good quality chromosome preparations. It also permits the reevaluation of previous cytogenetic findings obtained after culturing cells. In the present study, we analyzed prostatic carcinomas before and after culture. Cells with trisomies 1, 7 and 10 apparently have a proliferative disadvantage in culture, as previously referred by other authors [6, 24-27]. However, cells with monosomy 8 or nullosomy Y may be exceptions, since they were seen even after 21 days *in vitro*.

Our findings suggest that FISH analysis may help in the characterization of some prognostic markers associated with prostate cancer, overcoming the artifacts created by culturing cells, and probably will provide greater understanding of tumor pathogenesis when associated with molecular data.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. James Robert Coleman for reviewing the text and FAPESP, FUNDUNESP, CNPq and CAPES for financial support.



REFERENCES

1. Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE, Honn KV (1997): Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate* 31:264-281.
2. Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW (1995): Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 3: 652-661.
3. Haas GP and Sakr WA (1997): Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin* 47: 273-287.
4. Brookstein R, Macgrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F, Allred DG (1993): P53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res* 53: 3369-3373.
5. Brothman AR, Peechl DM, Patel AM, MacDonald GR, McNeal JE, Lagda LE, Schellhammer PF (1991): Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostatic tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 55: 79-84.
6. Konig JJ, Teubel W, Willem Van Dangen J, Hagemeijer A, Romijn JC (1993): Tissue culture loss of aneuploid cells from carcinomas of the prostate. *Genes Chromosom Cancer* 8: 22-27.
7. Lundgren R, Mandahl N, Heim S, Limon J, Herikson H, Mitelman F (1992): Cytogenetic analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. *Genes Chromosom Cancer* 4: 16-24.
8. Arps S, Rodewald A, Schmalenberger B, Carl P, Bressel M, Kastendieck H (1993): Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 66: 93-99.
9. Limon J, Lundgren R, Elfving P, Heim S, Kristoffersson U, Mandahl N, Mitelman F (1990): An improved technique for short term culturing of human prostatic adenocarcinoma tissue of cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 191-199.
10. Luke S, Varkey JA, Belogolovkin V, Ladoulis CT (1997): Current state of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in diagnostic pathology. *Cell Vision* 4: 16-31.

11. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Herath JF, Lieber MM, Jenkins RB (1995): Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res* 55: 5408-5414.
12. Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA (1986): Amplification of long term collagenase disaggregation for cytogenetic analysis of human solid tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 23: 305-315.
13. Dracopoli NG, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman JG, Smith DR (1996): *Current Protocols in Human Genetics*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA.
14. Carvalho-Salles AB, Barril N, Tajara EH (1998): A simple procedure to rehybridization on nuclei analyzed previously by FISH. *Genet Biol Mol* 21: *in press*.
15. Kirby SR, Christmas TJ, Brawer M (1996): *Prostate Cancer*, 1^a. Ed., Mirror, 170p.
16. Atkin BN, and Baker CM (1985): Chromosome 10 deletion in carcinoma of the prostate. *N England J Med* 312: 315.
17. Brothman AR, Peehl DM, Patel AM, McNeal JE (1990): Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res* 50: 3795-3803.
18. Bandyk MG, Zhao L, Troncoso P, Pisters LL, Palmer JL, von Eschenbach AC, Chung LWK, Liang JC (1994): Trisomy 7: a potential cytogenetic marker of human prostate cancer progression. *Genes Chromosom Cancer* 9: 19-27.
19. Gao X, Honn KV, Grignon DJ, Sakr W, Chen YQ (1993): Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor supressor gene DCC in prostatic carcinomas. *Cancer Res* 53: 2723-2727.
20. Gao X, Wu N, Grignon DJ, Zacharek A, Liu H, Sallowski A, Li G, Sakr, W, Sakar F, Porter AT, Chen YQ, Honn KV (1994): High frequency of mutator phenotype in human prostatic adenocarcinoma. *Oncogene* 9: 2999-3003.
21. Gao X, Zacharek A, Grignon DJ, Sakr W, Powell IJ, Porter AT, Honn KV (1995): Localization of potential tumor supressor loci to a <2Mb region on chromosome 17q in human prostate cancer. *Oncogene* 11: 1241-1247.
22. Gao X, Zacharek A, Sallowski A, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV (1995): Loss of heterozygosity of the *BRCA1* and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res* 55: 1002-1005.

23. Gao X, Chen YQ, Wu N, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV (1995): Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. *Oncogene* 1395-1398.
24. Ketter R, Zwergel T, Romanaski K, Unteregger G, Ziegler M, Zang KD, Wullich B (1996): Selection toward diploid cells in prostatic carcinoma derived cell cultures. *Prostate* 28: 364-371.
25. Micale NA, Sanford, J.S, Powell, IJ, Sakr WA, Wolman SR (1993): Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: Paraffin FISH vs metaphase analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 69: 7-12.
26. Webb HD, Hawkins AL, Griffin CA (1996): Cytogenetic abnormalities are frequent in uncultured prostate cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 88: 126-132.
27. Breitkreuz T, Romanakis K, Lutz S, Seitz G, Bonkhoff H, Unteregger G, Zwergel T, Zang KD, Wullich B (1993): Genotypic characterization of prostatic carcinomas: A combined cytogenetic, flow cytometry, and *in situ* DNA hybridization study. *Cancer Res* 53: 4035-4040.

Table 3. Cytogenetic findings in 9 samples of prostatic adenocarcinomas before or after 7, 14 or 21 days *in vitro* (na = no available).

Case	Days of culture			
	Noncultured	7	14	21
M102	+1, +7x2, +8, +10x2	+7, +10	+1	na
M126	+1, +7, +10	na	+1, -Y	-Y
M130	+1, +7	+1	na	na
M131	+1, +7, +10, -Y	+1, -Y	+7, -Y	-Y
M133	+1, +8/+8x2, +10	+1, -8, -Y	+1, -Y	na
M134	+1, +10	+1, +10, -8, -Y	+10	na
M137	+1, +10, -Y	na	+7, -8, -Y	+1, -8, -Y
M138	+1, -8, -Y	na	+1	+1, -8, -Y
M140	+1, +7, +8, -Y	+1, -8, -Y	+7, +10, -8, -Y	na

LEGEND

Figure 1. Photomicrographs showing FISH with centromeric probes. **(A)** Nuclei with two or three copies of chromosome 1. **(B)** Nuclei with one copy of chromosome 8. **(C)** Nuclei with one copy or without copy of chromosome Y.

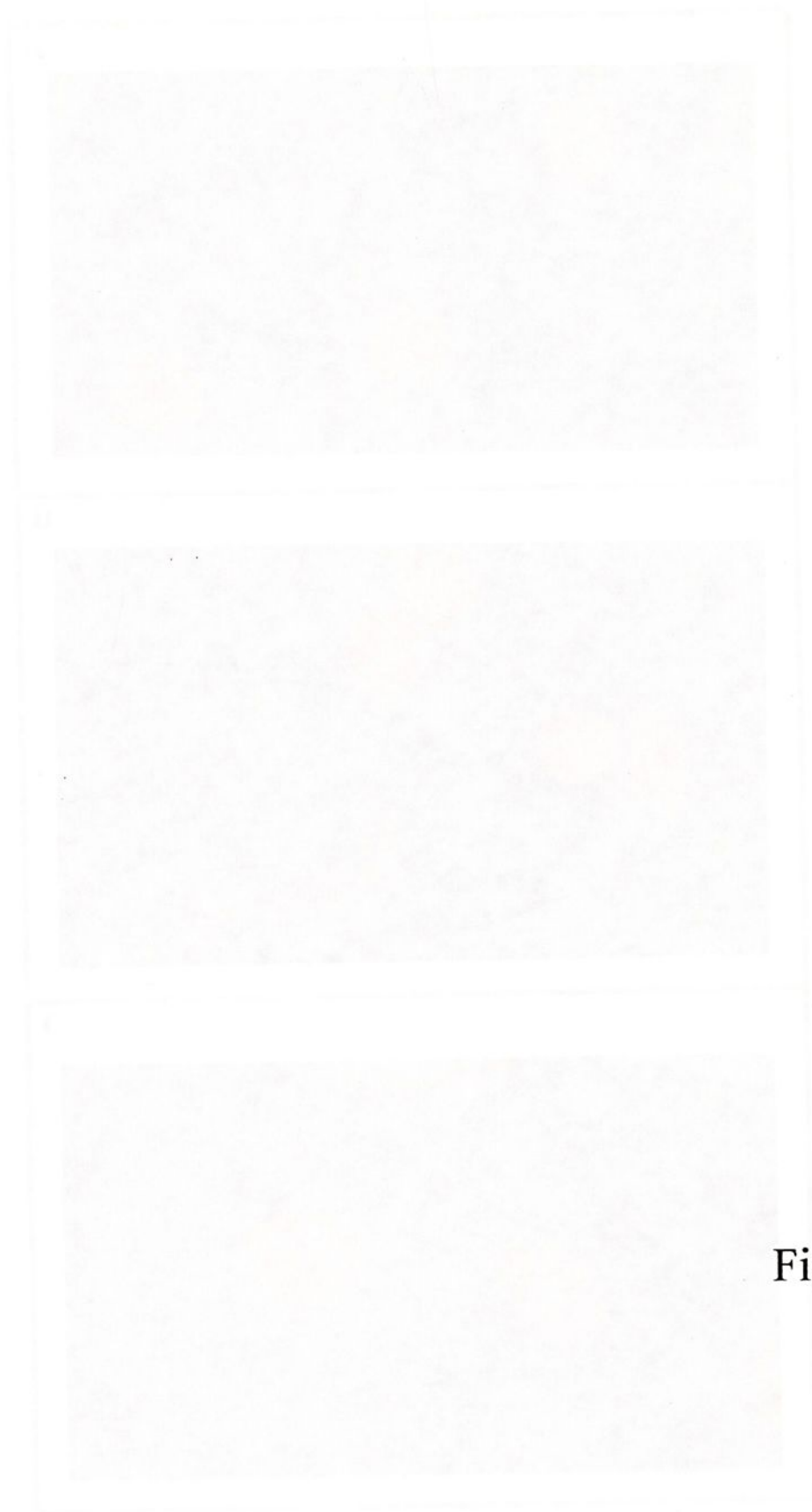
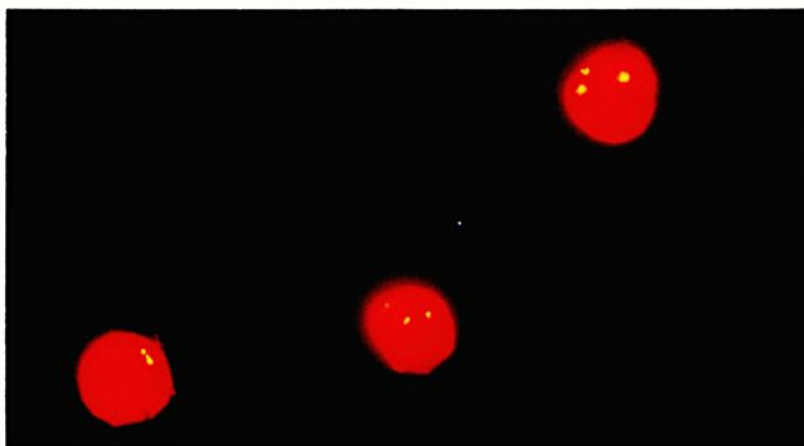
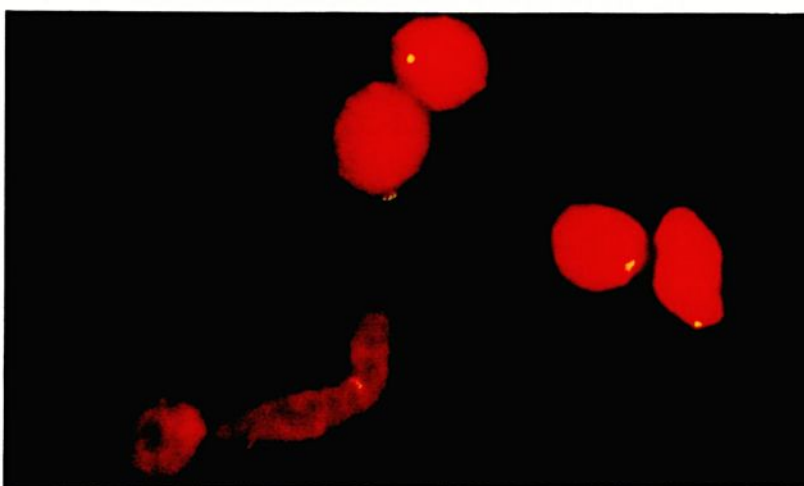


Figure 1

A



B



C



ROLE OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE T1 AND M1 GENOTYPE IN PROSTATIC ABNORMALITIES

Andréa B. Carvalho-Salles, Nívea D. T. Conforti-Froes, Andréa R. Batispta Rossit, Eloiza H. Tajara.

From Departamento de Biologia (ABC-S, EHT) and Departamento de Botânica (ARBR, NDTC-F). Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP). São José do Rio Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Eloiza H. Tajara, Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, Caixa Postal 136.

15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

ABBREVIATED TITLE: GST M1 and T1 and prostate abnormalities

KEY WORDS: Prostate, Cancer, Glutathione S-Transferase mu gene, Glutathione S-Transferase theta gene, Genetic Predisposition, PCR.

ABSTRACT

Glutathione S-transferase (GST) enzymes may prevent carcinogenesis through inactivation of reactive electrophiles by conjugation to reduced glutathione. It has been reported that individuals who have inherited unfavorable versions of such polymorphic enzymes are prone to the development of a variety of cancers. The main purpose of the present study was to search the relationship between GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and prostate diseases. In this work, we have studied 48 patients with prostatitis, benign prostate hyperplasia or prostate adenocarcinoma and 35 normal controls. Using PCR techniques we were able to detect that inheritance of unfavorable GSTT1 and/or GSTM1 null genotypes is not related with the development of prostate diseases.

INTRODUCTION

Certain human cancers are initiated by environmental chemicals acting as carcinogens or increasing the somatic mutation rate (Harden, 1995). A group of detoxification enzymes are responsible for metabolizing such genotoxic factors and have proved to be polymorphic in the general population (Seidegard et al., 1988, Pemble et al., 1994, Tan et al., 1995). Among the detoxification systems, the glutathione-S-transferase (GST) represent a major group playing critical roles in providing protection against electrophiles and products of oxidative stress. GST in humans have been studied by many researchers groups and it is thought that at least 20 isoenzymes exist [Hayes and Pulford, 1995].

In according of that, it is reasonable to suppose that the absence of specific isoenzymes will have a profound effect on the tolerance against xenobiotics. The existence of genetic polymorphisms in the population allow this question to be addressed, at least for a limited number of GST genes, by utilizing molecular epidemiology in order to postulate an association between disease and the absence of particular isoenzymes [Hayes and Pulford, 1995].

Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) is a member of Glutathione S-transferase family and its activity is lacking in about 38-70% of different ethnic populations [Board *et al.*, 1990]. In Brazil, GSTM1 null genotype has been found in 40-50% of Caucasians individuals [Arruda *et al.*, *in press*]. Glutathione S-transferase theta (GSTT1) is another member of this transferase family and the gene has been reported to be deleted in 38% of a European population [Pemble *et al.*, 1994], 20% in North Americans [Nelson *et al.*, 1995] and in 16-24% of a Brazilian Caucasian population [Arruda *et al.*, *in press*]. The ethnic distribution of the GSTT1 polymorphism is considerably different from, and clearly not linked to, that for the GSTM1 polymorphism [Hayes and Pulford, 1995].

Prostate cancer, which often appears relatively late in life, is one of the most common cancers in man (Kirby *et al.*, 1996). The etiology of this tumor is still unclear but a number of risk factors have been proposed. Several studies have demonstrated an excess of family clustering, suggesting a possible inherited genetic predisposition to the disease [Smith *et al.*, 1996, Cooney *et al.*, 1997, Gronberg *et al.*, 1997, McIndoe *et al.*, 1997, Eeles *et al.* 1998]. Animal fat consumption and some environmental carcinogens like

cadmium have also been associated with this disease [Whittemore *et al.*, 1995, Haas and Sakr, 1997].

In the present study, we applied the PCR multiplex methodology to analyse whether GSTM1 and GSTT1 null genotypes may confer increased risk associated with prostate disease in a Brazilian Caucasian population. These two genes were chosen because the mutated alleles are maintained at high frequency in the population (50% and 30%, respectively). Such high prevalence frequencies allow us to conduct our study with a small population size.



MATERIALS AND METHODS

Study subjects

Tissue samples from 7 prostatitis, 11 benign prostatic hyperplasias and 30 prostate adenocarcinomas were obtained from radical prostatectomy, transurethral resection or needle aspirative biopsies from patients without prior chemo or radiotherapy, referred for treatment for local hospitals. Normal healthy controls were recruited from regional blood center.

Genotype analysis

All primers used for polymerase chain reaction (PCR) analysis were custom synthesized in the Recombinant DNA Laboratory, Sealy Center for Molecular Science, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX. All other chemicals and reagents were from commercial sources and of highest purity available. DNA was isolated from prostate tumor samples followed by the extraction method reported [Banerjee *et al.*, 1995].

The genetic polymorphism analysis for the GSTM1 and the GSTT1 genes was determined simultaneously in a single assay using a multiplex PCR approach followed by the procedure previously reported [Abdel-Rahman, 1996, Conforti-Froes *et al.*, 1997]. Briefly, isolated DNA was amplified in a 50- μ l reaction mixture containing 30 pmol of each of the following GSTM1 primers: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C and 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G; and the following GSTT1 primers corresponding to the 3'-coding region of the human cDNA, 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC and 5'-TTC CCG GAT CAT GGC CAG CA. As an internal control, exon 7 of the CYP1A1 gene was co-amplified using the primers 5'-GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT and 5'-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC in the presence of 200 μ mol dNTPs, 5 μ l of 10xPCR buffer (10 x : 500mM KCL, 100mM Tris-HCl, pH 9.0) and 1.5 mM MgCl₂ and 2 U Taq DNA polymerase (Gibco-BRL). The PCR conditions consisted of an initial melting temperature of 94°C (5 min) followed by 35 cycles of melting (94°C, 2 min), annealing (59°C, 1 min) and extension (72°C, 1 min). A final extension step (72°C) of 10 min terminates the process. The PCR products from coamplification of GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 genes were then analyzed by electrophoresis on an ethidium bromide stained 2% 3:1 Nusieve Agarose gel. The GSTM1 and GSTT1 genotypes were detected by the

presence or absence of specific bands at 480 bp (for GSTT1) and a band at 215 bp (for GSTM1). A 312-bp band (for CYP1A1 gene) served as an internal control to document successful PCR amplification.

Statistical Analysis

Values were analyzed using Fisher's Exact Test. The probability level 0.05 was used as the criterion for significance.



RESULTS

In elucidating the association between polymorphic genes and prostate abnormalities, we determined the genotypes for GSTT1 and GSTM1 in 48 prostate disease patients and 35 controls.

A summary of the characteristics of our studied populations is shown in Tables 1 and 2.

The frequencies of the GSTT1 0/0 and GSTM1 0/0 genotypes in prostate disease group were 22,92% (11/48) and 43,75% (21/48), and in control group was 28,57% (10/35) e 48,57% (17/35), respectively (Figure 1). In stratifying prostatitis, benign hyperplasia and adenocarcinoma, our results indicate that there is no significant association between null genotypes and the type of lesion (Fisher's Exact Test). In prostatitis group, the proportion of GSTT1 0/0 and GSTM1 0/0 genotype was 28,57% (2/7) and 42,86% (3/7) (Figure 2A), in benign hyperplasia was 9,09% (1/11) and 63,64% (7/11) (Figure 2B), and in adenocarcinoma group was 26,67% (8/30) and 36,67% (11/30) (Figure 2C), respectively (Table 3). Also the relative risk prostate disease for smoker and etilist group is apparently similar in different GSTT1 or GSTM1 genotypes.

Regarding the relative risk for abnormalities prostate group and combined polymorphism GSTT1/M1 0/0, GSTT1/M1 0/+ and GSTT1/M1 +/+, there was no associated risk. The frequencies of T1M1 0/0, T1M1 +/0 and T1M1 0/+ genotypes were 6,25% (3/48), 37,5% (18/48) and 16,67% (8/48) in patients group and 11,43% (4/35), 37,14% (13/35) and 17,14% (6/35) in control group, respectively.

DISCUSSION

The incidence of various cancers has been associated with GSTM1 null alleles. A particularly strong association has been described for colon, lung and bladder carcinoma (Zhong et al., 1993). Although less is known about the homozygosity for the null allele of GSTT1, a higher incidence was found among patients with myelodysplastic syndromes (Chen et al., 1996) and a possible early onset of colon cancer has been described (Chenevix-Trench et al., 1995). Despite the great number of information indicating that GSTs influence cancer susceptibility, it is unclear why a genotype is associated with one cancer but not with another. At present, there is no basis for predicting which cancers will be influenced by GST polymorphism although other studies indicate that the GSTs are critical in the metabolism of environmental carcinogens (Hayes and Pulford, 1995). To our knowledge, no data on the relationship between GST T1 and M1 polymorphisms and prostate diseases have been published. In the present study the findings are not suggestive of a protective effect of such enzymes to the development of prostate cancer and contrast with the increased risks for certain GST genotypes in other types of diseases. These results may be dependent of the fact that prostate disease are not correlated with environmental factors metabolized by GSTs. Conversely, given the vast number of detoxification enzymes and the complexity of chemicals mixtures to which an individual may be exposed, assessment of susceptibility based on the analysis of single genotypes may not be sufficient (El-Zein *et al.*, 1997).

REFERENCES

1. Abdel-Rahman, S.Z. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996; 107: 229-233.
2. Arruda, V.R., Grignolli, C.E., Gonçalves, M.S., Soares, M.C., Menezes, R., Saad, S.T.O., Costa, F.F. Prevalence of the homozygous for the deleted alleles of glutathione S-transferase Mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. *Clinical Genet* 1998, *in press*.
3. Banerjee, S.K., Makdisi, W.S., Weston, A.P., Mitchell, S. M., Campbell, D.R. Microwave-based DNA extraction from paraffin embedded tissue for RCR amplification. *BioTechniques* 1995; 18: 769-773.
4. Board, P.G., Coggan, M., Johnston, P., Ross, Suzuki, T.G.W. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferase: A complex of gene families. *Pharmacol Ther* 1990; 48: 357-369.
5. Chen, H., Sandler, D.P., Taylor, J.A., Shore, D.L., Liu, E., Bloomfield, C.D., Bell, D.A. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 1996; 347: 295-297.
6. Chenevix-Trench, G., Young, J., Coggan, M., Board, P. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: Susceptibility to colon cancer and age of onset. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1655-1657.
7. Conforti-Froes N., El-Zein-Randa, Abdel-Rahman, A. Zwischenberger, J.B., Au, W.W. Predisposing genes and increased chromosome aberrations in lung cancer cigarette smokers. *Mutation Res* 1997; 379: 53-59.
8. Cooney, K.A., McCarthy, J.D., Lange, E., Huang, L., Miesfeldt, S., Montie, J.E., Oesterling, J.E., Sandler, H.M., Lange, K. Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 955-959.
9. Eeles, R.A., Durocher, F., Edwards, S., Teare, D., Badzioch, M., Hamound, R., Gill, S., Biggs, P., Dearnaley, D., Arden-Jones, A., Dowe, A., Shearer, R., McLennan, D.L., Norman, R.L., Ghadirian, P., Aprikian, A., Ford, D., Amos, C., King, T.M., Labrie, F., Simard, J., Narod, A.S., Easton, D., Foulkes, W.D. Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 653-658.

10. El-Zein, R., Conforti-Froes, N., Au, W.W. Interactions between genetic predisposition and environmental toxicants for development of lung cancer. *Environmental Molecular Mutagenesis* 1997; 30: 196-204.
11. Gronberg, H., Xu, J., Smith, J.R., Carpten, J.D., Isaacs, S.D., Freije, D., Bova, G.S., Walsh, P.C., Collins, F.S., Trent, J.M., Meyers, D.A., Isaacs, W.B. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. *Cancer Res* 1997; 57: 4707-4709.
12. Haas, G.P., Sakr, W.A., Epidemiology of prostate cancer, *CA Cancer J Clin* 1997; 47: 273-287.
13. Harnden, D.G. Inherited susceptibility to mutation. In Phillips, D.H., Venit, S. (eds) *Environmental Mutagenesis*. Bio Scientific Publishers Limited, Oxford 1995: pp61-81
14. Hayes, J.D., Pulford, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *C.R.C. Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 6: 445-603.
15. Kirby, S.R., Christmas, T.J., Brawer, M. 1996: *Prostate Cancer*, 1^a. Ed., Mirror, 170p.
16. McIndoe, R.A., Stanford, J.L., Gibbs, M., Jervik, G.P., Brandzel, S., Neal, C.L., Li, S., Gammack, J.T., Gay, A.A., Good, E.L., Hood, L., Ostrander, E.A. Linkage analysis of 49 high-risk families does not support a common familial prostate cancer-susceptibility gene at 1q24-25. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 347-353.
17. Nelson, H.H., Weincke, J.K., Christiani, D.C., Cheng, T.J., Zuo, Z-F., Schwartz, B.C., Lee, B-K., Spitz, M.R., Wang, M., Xu, X., Kelsley, K.T. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995; 6: 1243-1245.
18. Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Kettere, B., Taylor, J.B. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300: 271-276.
19. Seidegard, J., Vorachek, W.R., Pero, R.W., Pearson, W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Acad Sci USA* 1988; 85: 7293-7297.

20. Smith, G., Dale Smith, C.A., Wolf, C.R. Pharmacogenetic polymorphisms. In Phillips, D.H., Venit, S. (eds.) Environmental Mutagenesis. Bio Scientific Publishers Limited, Oxford 1995: pp 83-106.
21. Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D., Gronberg, H., Xu, J., Isaacs, S.D., Brownstein, M.J., Bova, G.S., Guo, H., Bujnovszky, P., Nussken, D.R., Damber, J.E., Bergh, A., Emanuelsson, M., Kallioniemi, O.P., Walker-Daniels, J., Bailey-Wilson, J.E., Beaty, T.H., Meyers, D.A., Walsh, P.C., Collins, F.S., Trent J.M., Isaacs, W.B. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. Science 1996: 274: 1371-1374.
22. Tan, K.L., Webb, G.C., Baker, R.T., Board, P.G. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (GSTT2) to chromosome 22. Genomics 1995: 25:381-387.
23. Whittemore, A.S., Kolonel, L.N., Wu, A.H., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., Burch, J.D., Hankin, J., Dreon, D.M., West, D.W. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada, J Natl Cancer Inst 1995: 3: 652-661.
24. Zhong, S., Wyllie, A. M., Barnes, D., Wolf, C.r., Spurr, N.k. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. Carcinogenesis 1993: 14: 1821-1824.



Table 1. Genotype distribution of GSTT1 and GSTM1 polymorphic genes of 35 controls specimens.

CONTROL	GENOTYPE (T1/M1)
13	0/+
14	0/+
15	0/0
16	0/0
42	0/0
43	+/+
44	+/+
45	+/+
61	+/+
73	+/+
84	+/+
93	+/0
94	+/0
96	+/+
97	+/0
98	+/+
99	+/0
100	0/0
102	+/+
104	0/+
106	+/0
109	+/0
110	+/0
114	0/+
115	+/0
116	+/0
117	0/+
120	+/+
121	+/0
124	+/+
128	+/0
129	+/+
134	0/0
148	+/0
174	+/+

Table 2. Genotype distribution of GSTT1 and GSTM1 polymorphic genes in 48 samples of prostate lesions (AD = adenocarcinoma, HBP = benign hyperplasia, PR = prostatitis).

Case	Diagnostic	Age	Tabagism	Etilism	Genotype (T1/M1)
1	AD	70	NO	NO	+/+
2	AD	70	NO	YES	+/o
3	AD	66	YES	YES	+/+
4	AD	68	YES	YES	o/+
5	AD	75	YES	YES	o/+
6	AD	75	YES	YES	o/+
7	AD	69	YES	YES	+/o
8	AD	51	NO	NO	o/+
9	AD	69	YES	YES	+/+
10	AD	70	NO	NO	o/o
11	AD	72	YES	NO	+/+
12	AD	69	YES	NO	+/+
13	AD	84	NO	NO	+/+
14	AD	68	YES	YES	o/+
15	AD	71	YES	NO	+/+
16	AD	66	YES	NO	+/+
17	AD	65	NO	NO	o/o
18	AD	71	YES	YES	+/+
19	AD	67	YES	YES	+/o
20	AD	60	YES	YES	+/o
21	AD	63	YES	YES	+/+
22	AD	69	NO	YES	o/o
23	AD	71	NO	YES	+/o
24	AD	66	YES	YES	+/+
25	AD	65	NO	NO	+/o
26	AD	70	NO	YES	+/+
27	AD	67	NO	NO	+/+
28	AD	65	YES	YES	+/o
29	AD	68	YES	YES	+/+
30	AD	72	YES	YES	+/o
31	HBP	76	YES	NO	+/o
32	HBP	67	YES	YES	+/o
33	HBP	61	YES	YES	+/o
34	HBP	62	NO	NO	+/o
35	HBP	64	NO	NO	o/+
36	HBP	90	YES	YES	+/+
37	HBP	64	NO	YES	+/o
38	HBP	72	NO	NO	+/+
39	HBP	73	YES	YES	+/o
40	HBP	63	YES	YES	+/o
41	HBP	69	YES	YES	+/+
42	PR	61	YES	YES	+/o
43	PR	73	YES	NO	o/+
44	PR	63	NO	NO	o/+
45	PR	69	YES	YES	+/o
46	PR	70	YES	YES	+/+
47	PR	59	YES	YES	+/o
48	PR	55	YES	YES	+/+

Table 3. Genotype distribution of GSTT1 and GSTM1 polymorphic genes in 30 prostate adenocarcinoma (AD), 11 benign prostate hyperplasia (BHP), 7 prostatitis (PR) and control group.

Study Subjects	Mean Age	GSTT1 0/0 (%)	GSTM1 0/0 (%)
AD	68,7	8/30 (26,7%)	11/30 (36,7%)
BHP	69,1	1/11 (9,1%)	1/11 (63,6%)
PR	64,1	2/7 (28,6%)	3/7 (42,9%)
Control	-	10/35 (28,57%)	17/35 (48,57%)

LEGENDS

Figure 1. Frequency of the GSTT1 0/0 and GSTM1 0/0 genotypes in patient group.

Figure 2. Frequency of GSTT1 0/0 and GSTM1 0/0 genotype in prostatitis, benign prostate hyperplasias and prostate adenocarcinomas groups.



Figure 1

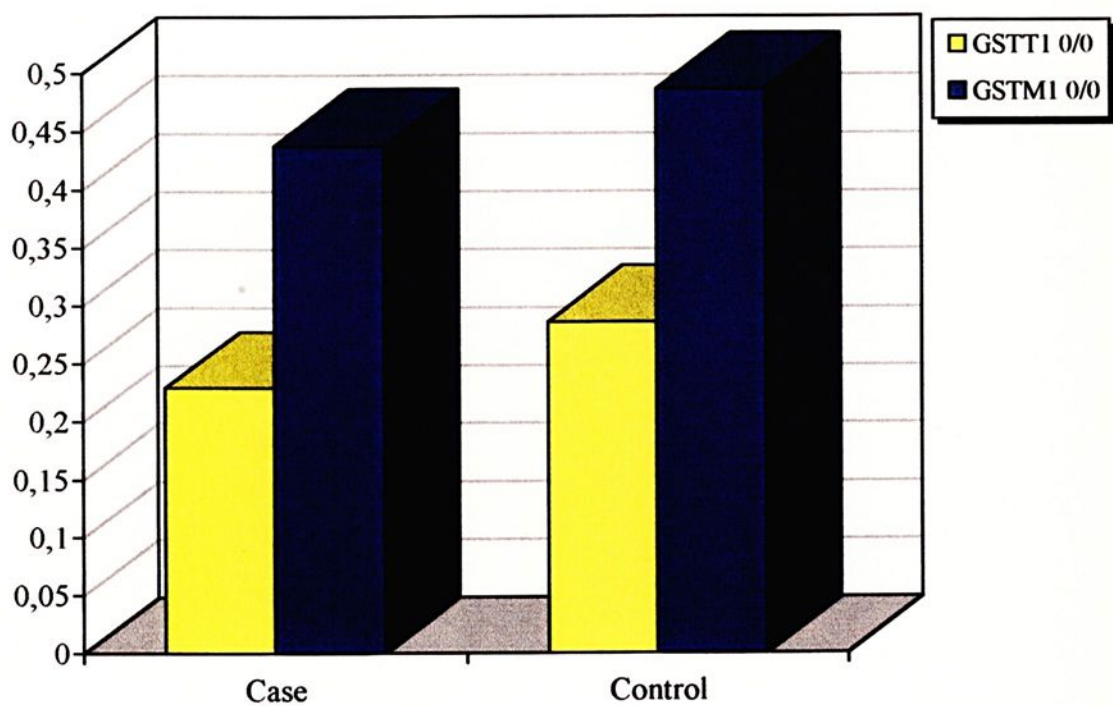
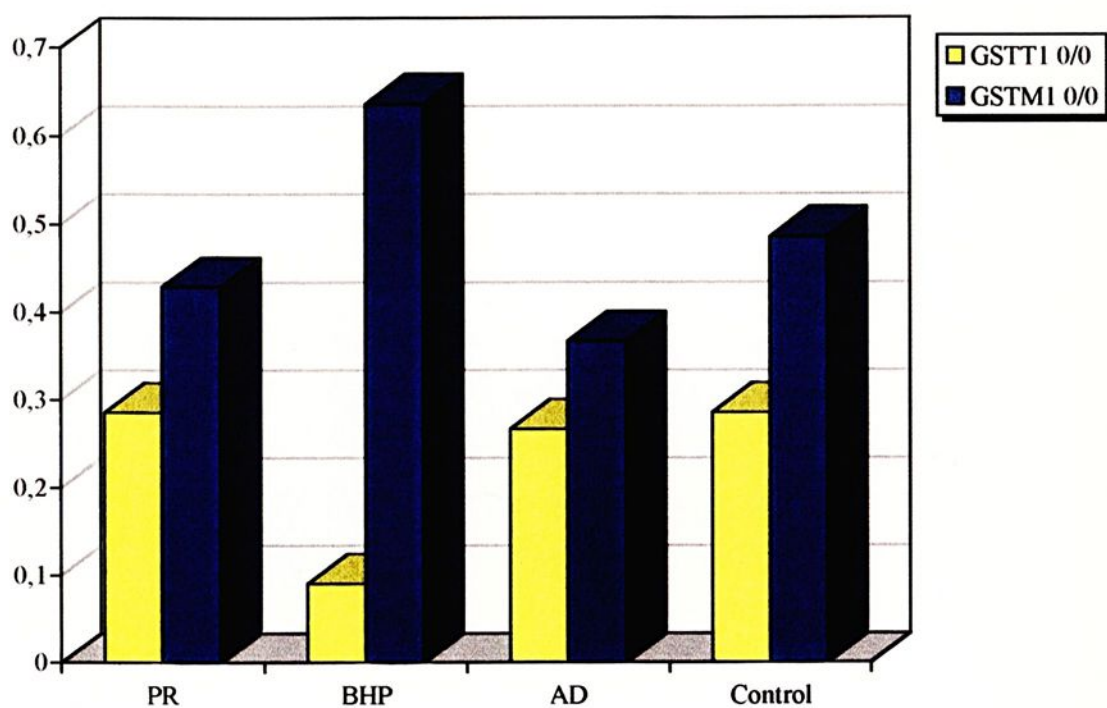




Figure 2



IV. DISCUSSÃO

A próstata é um órgão sujeito a doenças benignas e malignas e, por isso, atrai grande interesse para a definição das características de suas células normais e neoplásicas. A frequência de carcinoma prostático é elevada em muitas populações e avanços recentes nos testes diagnósticos, tais como testes sorológicos para o antígeno PSA complementados com ultrassonografia e o desenvolvimento de técnicas de biópsia, têm levado à detecção precoce dessa doença em homens assintomáticos. Apesar disso, existem ainda muitas dificuldades na identificação dos tumores que irão progredir para formas mais agressivas. Para que tais dificuldades sejam superadas, seria importante o reconhecimento de um marcador biológico que pudesse facilitar a distinção entre as lesões com potencial maligno e aquelas biologicamente indolentes e, além disso, entre aquelas que permanecerão *in situ* ou que formarão metástases (Wang *et al.*, 1996).

De maneira geral, os dados da literatura mostram que anomalias cariotípicas simples não podem ser definidas como marcadores desse grupo de neoplasias ou relacionadas com suas características histológicas. Entretanto, alguns autores têm chamado atenção para o fato de que a poliploidia seguida de perdas cromossômicas pode representar um evento comum associado com a malignidade ou com o comportamento agressivo da lesão (Tribukait, 1991). Realmente, 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 a). Também reforçam essa idéia os dados de Micale *et al.* (1993), obtidos após a utilização de técnicas de citogenética convencional em células cultivadas e de hibridação *in situ* fluorescente em material proveniente de tecido emblocado em parafina. A maioria das lesões em estágios iniciais mostrou cariótipos diplóides normais em ambas as análises. A técnica de FISH, porém, 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 aneuplóides. Os dados fornecidos pela técnica de citometria complementam as afirmações acima e, segundo a revisão feita por Stearns e McGavey (1992), indicam que o conteúdo normal de DNA preconiza uma menor probabilidade de metástases.

No presente trabalho, foram estudados, pela técnica de FISH, núcleos interfásicos de 17 amostras frescas não cultivadas de adenocarcinomas prostáticos, nove das quais também foram analisadas após períodos variáveis de cultivo. Além disso, foi realizado um estudo piloto envolvendo seis amostras de adenocarcinomas derivadas de tecido emblocado em parafina.



O achado mais frequente, encontrado em 100% dos casos, foi a trissomia 1. Aberrações estruturais, mas não numéricas, desse cromossomo constituem um evento comum em tumores sólidos de maneira geral (Atkin e Baker, 1985; Gibas *et al.*, 1985; Pittman *et al.*, 1987; Lundgren *et al.*, 1988, 1992 b; Brothman *et al.*, 1990; Wullich *et al.*, 1992; Arps *et al.*, 1993; Breitzkreuz *et al.*, 1993; Casalane *et al.*, 1993; Milasin e Micic, 1994; Qi *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996). Shen *et al.* (1995) identificaram, através de técnicas moleculares, um possível oncogene localizado no cromossomo 1, o *PTI-1* (*prostate tumor inducing gene 1*), cujo produto, homólogo ao fator de alongação $\alpha 1$ e associado com a síntese protéica, foi observado em tumores malignos mas não em hiperplasias benignas ou em tecidos normais da glândula. Um outro gene presente no braço longo do cromossomo 1, o *HPC1* (*hereditary prostate cancer gene 1*) foi identificado recentemente e parece ser responsável pelas formas familiares desse tumor (Chang *et al.*, 1997). Entretanto, os resultados de McIndoe *et al.* (1997) and Eeles *et al.* (1988) sugerem que esse *locus* está envolvido somente nos casos de genealogias com mais de quatro parentes de primeiro grau afetados.

A trissomia do cromossomo 7, acompanhada ou não de tetrassomia, esteve presente em nove adenocarcinomas não cultivados estudados. Ganhos desse cromossomo têm sido observados em uma grande variedade de tumores, (Barril *et al.*, 1998, para referência). No caso dos carcinomas de próstata, diferentes estudos sugerem que essa trissomia é a anomalia cromossômica mais frequente e, juntamente com a trissomia 8, está ligada a estágios tardios e comportamento agressivo da lesão (Alcaraz *et al.*, 1994, Bandyk *et al.*, 1994, Brown *et al.*, 1994, Jones *et al.*, 1994, Takahashi *et al.*, 1994, Alers *et al.*, 1995; 1997, Qian *et al.*, 1995, Visakorpi *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1996, Geburek *et al.*, 1997, Jenkins *et al.*, 1997 e 1998 Maturri *et al.*, 1998). O estudo de Jenkins *et al.* (1998), utilizando a técnica de FISH, mostrou que a região 7q31 é geneticamente instável e talvez relacionada com a presença de um sítio frágil nesse local, o FRA7G.

Deve ser salientado que o cromossomo 7 contém o gene *ERBB* (gene do receptor do fator de crescimento epidérmico), cuja expressão aumentada já foi associada com estágios avançados, recorrência, prognóstico desfavorável e tempo menor de sobrevida em vários tipos de neoplasias. Também contém os oncogenes *C-ERBA*, *RA1* e *MET*, esse último mapeado em 7q31 e com expressão em células tumorais e metastáticas de próstata (Miyajima *et al.*, 1989, Tsui *et al.*, 1995, Visakorpi *et al.*, 1995; Cher *et al.*, 1996).

A trissomia do cromossomo 8 foi detectada em amostras de quatro adenocarcinomas. Um desses casos também apresentou tetrassomia e dois outros exibiram monossomia desse cromossomo. Qian *et al.* (1996), utilizando a técnica de

FISH, observou a presença de trissomia 8 em 32% das neoplasias intraepiteliais da próstata (PIN) analisadas. Essa neoplasia ocorre frequentemente em indivíduos com carcinoma e é considerada sua precursora. Por outro lado, Alers *et al.* (1995) reportaram que alterações no cromossomo 8 consistiam no achado mais frequentemente observado nos casos de carcinoma investigados mas estavam ausentes nas lesões do tipo PIN por eles analisadas. No presente estudo, a trissomia 8 foi observada em três possíveis casos de poliploidia que apresentaram grau de Gleason variando de 5 a 7 e em um outro que também mostrou trissomia 1 e 7 além de nulissomia Y e grau de Gleason igual a 5. Esses achados colocam a trissomia 8 mais associada com progressão do que com iniciação das lesões prostáticas. É importante lembrar que o oncogene *MYC* está localizado em 8q24 e que a sua amplificação já foi verificada por análise de Southern blot nesse grupo de doenças (Bova *et al.*, 1993; Van den Berg *et al.*, 1995). Além disso, Cher *et al.* (1995) e Jenkins *et al.* (1998) notaram, após a aplicação de técnicas moleculares, que em tumores avançados a região mais comumente amplificada era a 8p21.3, o que indica a presença, nesse local, de genes importantes para a progressão tumoral.

Em relação à monossomia 8, Macoska *et al.* (1994) encontraram perda desse cromossomo em células hiperplásicas e neoplásicas da próstata e os autores relacionaram tal achado a eventos iniciais da tumorigênese. O mesmo foi observado por Huang *et al.* (1996), utilizando a técnica de FISH, em relação ao segmento 8p. Na verdade, a perda de heterozigosidade (LOH) de um ou ambos os alelos de segmentos da região 8p, além daqueles em 10q e 16q, tem sido observada na maioria dos carcinomas de próstata (Carter *et al.*, 1990; Bova *et al.*, 1993; Trapman *et al.*, 1994). Crundwell *et al.* (1996) sugeriram que esse segmento deve conter genes supressores de tumor. Alguns candidatos incluem o gene da DNA polimerase β , da *heregulin* (*HGL*), da síndrome de Werner, do receptor do fator de crescimento de fibroblastos, da proteína fosfatase 2 (*PPP2CB*) e do receptor β -3 adrenérgico (*ADRB3*). Nesse ponto é interessante citar que os dois casos de monossomia 8 observados neste estudo correspondiam a tumores localizados na glândula prostática e com comportamento menos agressivo.

Oito amostras de adenocarcinomas apresentaram células com trissomia ou tetrassomia do cromossomo 10, o que também já foi observado por diferentes autores, do mesmo modo que a sua monossomia (Macoska *et al.*, 1993; Baretton *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1994; Henke *et al.*, 1994; Alers *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1997). Cher *et al.* (1996) e Ittmann *et al.* (1996) referem a presença em 10q22.1-qter do gene *MX11*, um candidato a supressor de tumor cuja proteína parece reprimir a atividade de *MYC* e, quando ausente, pode levar à ativação desse oncogene. Lacombe *et al.* (1996) caracterizaram regiões alteradas do cromossomo 10 utilizando 15 marcadores de



microssatélites em uma amostra composta por tecido normal prostático e tumores primários. Na maioria dos casos os autores verificaram alterações que envolviam principalmente rearranjos e deficiências, em especial das regiões 10q23-24 e 10q21, e referiram que tais eventos são não casuais e, provavelmente, possuem um importante papel na tumorigênese desse neoplasma.

A trissomia do cromossomo 11 foi observada em três amostras. Brown *et al.* (1994) e Cher *et al.* (1996) também relataram trissomia 11 parcial ou total em casos de adenocarcinomas metastáticos estudados. Entretanto, essa alteração não é citada por muitos outros autores utilizando técnicas de citogenética convencional ou molecular. De qualquer modo, é interessante que, no caso do trabalho de Cher *et al.* (1996) citado, a região numericamente alterada foi a 11p15.5 onde está localizado o oncogene *HRAS*. Recentemente, dois candidatos a genes supressores de tumor (*KAT1* e *CD44*) também foram localizados no cromossomo 11 (11p11.2 e 11p13) e parecem inibir a formação de metástases em câncer de próstata (Dong *et al.*, 1995, 1996; Kallakury *et al.*, 1996).

Ganho do cromossomo X foi detectado em amostras de sete adenocarcinomas e um também era trissômico para esse cromossomo. Dois desses casos foram consideradas poliplóides. Outros quatro eram nulissômicos para esse cromossomo. O significado biológico da duplicação do X ainda não é bem compreendido, entretanto, é sabido que nesse cromossomo está localizado o gene do receptor de andrógenos (*AR*), cuja amplificação foi recentemente descrita em amostras de carcinomas recorrentes de pacientes que não responderam à terapia endócrina ou com comportamento metastático (Visakorpi *et al.*, 1995, Koivisto *et al.*, 1995, Geburek *et al.*, 1997).

Outro achado muito frequente, encontrado em 11 dos casos estudados, foi a nulissomia do cromossomo Y, o que está de acordo com os dados de citogenética convencional citados pela literatura (Arps *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1996; Zitzelsberger *et al.*, 1996; entre outros). O significado dessa alteração, contudo, é ainda questionável por ser observada tanto em tumores malignos como em hiperplasias benignas, tecidos sólidos normais e mesmo em medula óssea de homens idosos (Molennar *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996; Zitzelsberger *et al.*, 1996).

Duas amostras analisadas parecem ser *near*-tetraplóides pois apresentaram uma alta frequência de núcleos com três ou quatro sinais para pelo menos duas das sondas empregadas nesse estudo. Além do ganho cromossômico, perdas também devem ter ocorrido em relação ao grau de ploidia inferido, o que sugere ter havido uma duplicação do genoma e em seguida perdas sucessivas. Segundo o modelo proposto por Tribukait (1991), esses eventos seriam característicos de estágios tumorais mais avançados, o que realmente foi observado para as duas amostras citadas.

É importante salientar que a poliploidia é um mecanismo pelo qual a célula tem a opção de elevar os níveis de expressão de determinados genes importantes para o processo maligno. Células com perda de cromossomos portadores de genes responsáveis por supressão tumoral poderiam ser selecionadas durante tal processo. Mecanismo semelhante tem sido referido para explicar a amplificação do gene do receptor de andrógeno, presente no cromossomo X, em carcinomas que foram tratados inicialmente com ablação hormonal. Nesses casos, polissomia X ou múltiplas cópias e, menos frequentemente, alelos mutantes do gene do receptor foram observados e devem ser consequência da forte pressão de seleção presente (Koivisto *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997).

Os andrógenos, atuando através de seus receptores, são essenciais para a proliferação e diferenciação da próstata normal. Dados recentes sugerem que esses hormônios regulam negativamente a expressão do gene *p16*, que é um inibidor de quinases dependentes de ciclinas envolvidas na progressão do ciclo celular (Lu *et al.*, 1997). Esses resultados mostram uma das ligações da ação androgênica com a regulação da proliferação e, de certa forma, ilustram como alterações na dosagem gênica podem afetar a taxa de divisão celular e constituir mecanismos para a origem do câncer de próstata.

A comparação dos dados citogenéticos presentes com o grau histológico e com o estadiamento clínico das amostras mostrou a presença das trissomias 7 e 8, da diploidia X e da poliploidia na maioria dos tumores menos diferenciados enquanto a monossomia 8 esteve presente nas lesões localizadas. Apenas um caso apresentou trissomia X o que, de acordo com a literatura, pode estar relacionado com o fenômeno de insensibilidade ao andrógeno e indicar um prognóstico desfavorável para o paciente. O acompanhamento clínico poderá confirmar essa hipótese.

Com relação às alterações detectadas em amostras analisadas antes e depois do cultivo, os resultados sugeriram que a frequência de células com trissomias 1, 7 e 10 diminuiu durante o sub-cultivo enquanto a monossomia 8 e a nulissomia Y aparentemente conferiram vantagem proliferativa *in vitro*. Tais resultados falam a favor de uma seleção negativa ou positiva de algumas alterações cromossômicas com o decorrer do cultivo celular. Ketter *et al.* (1996) também relataram que, em seus experimentos utilizando a técnica de FISH em preparações citogenéticas, a população de células aneuplóides foi perdida após o sub-cultivo e referiram que as aneuploidias foram confinadas aos núcleos interfásicos, enquanto as metáfases mostravam-se diplóides. Esses achados indicam que células portadoras de determinadas aberrações cromossômicas devem proliferar menos que as normais. Com base nesses dados, é possível concluir que, no caso dos tumores

prostáticos, a análise citogenética convencional após cultura de células não deve ser utilizada como única técnica para detecção dos eventos cariotípicos pois algumas alterações são selecionadas e nem sempre refletem as verdadeiras condições *in vivo*.

V. RESUMO

V. RESUMO



O câncer de próstata é uma das neoplasias mais frequentes em muitos países e atinge, geralmente, os homens em idades mais avançadas. A base genética dessa doença não está completamente esclarecida mas já foram descritas diferentes alterações cromossômicas como a perda do cromossomo Y e as alterações estruturais envolvendo os cromossomos 1, 2, 3, 7, 8, 10, 12 e X, além de amplificações gênicas como *double minutes*. No presente trabalho, nós analisamos amostras de adenocarcinomas prostáticos não cultivadas ou após 7, 14 ou 21 dias *in vitro*, utilizando a técnica de FISH com sondas α -centroméricas para os cromossomos 1, 7, 8, 10, 11, X e Y. Nas 17 amostras frescas analisadas, a trissomia 1 e a nulissomia Y constituíram as aneuploidias mais frequentemente observadas. A poliploidia e as aneusomias 7 ou X foram associadas a comportamento clinicamente agressivo e a grau elevado do tumor enquanto a monossomia 8 foi detectada em tumores menos agressivos.

Nove amostras foram investigadas antes e após cultivo usando diferentes metodologias. A desagregação mecânica e enzimática e a suplementação do meio de cultura com baixa concentração de soro fetal bovino, além de, fatores de crescimento, hormônios, glutatona e vitaminas permitiu uma maior proliferação de células epiteliais e menor contaminação por fibroblastos. Com essa metodologia, o sucesso do cultivo foi verificado em 100% (10/10) das amostras, que tiveram interrupção de cultura entre o terceiro e o sétimo dia, enquanto que, com outras técnicas, o bloqueio da divisão celular foi realizado após 5-6 (2 casos) ou 10-31 (16 casos). Após a utilização da técnica de FISH, as células não cultivadas mostraram maior frequência de aneuploidias que as cultivadas. Os núcleos com aneusomias aparentemente foram selecionados *in vitro*, porém aqueles com monossomia 8 e nulissomia Y foram exceções, uma vez que estiveram presente após 21 dias de cultivo. Nossos achados sugerem que os resultados obtidos através da técnica de FISH podem auxiliar no prognóstico de tumores prostáticos, superando as dificuldades derivadas do cultivo celular, e provavelmente permitirão um maior entendimento da tumorigênese quando associados a outros dados moleculares.

No presente trabalho, também foi investigada a susceptibilidade para o câncer de próstata através da metodologia de PCR multiplex, avaliando-se os genótipos de glutatona S-transferase T1 e M1 em 48 amostras de lesões prostáticas. Genótipos nulos para a GSTT1 e GSTM1 foram encontrados em 22,92% e 43,75% dos casos analisados, respectivamente, o que é estatisticamente similar a frequências detectadas na população normal. Os achados sugerem, portanto, que não existe um efeito protetor de tais enzimas no desenvolvimento desse tipo de câncer, o que contrasta com a susceptibilidade aumentada para outros tipos de tumores em indivíduos portadores de

determinados genótipos de GST. Esse resultado pode ser decorrente do fato de que as doenças prostáticas não estão correlacionadas com fatores ambientais metabolizados pelas GSTs. Além disso, existe um grande número de enzimas de destoxificação e uma alta complexidade de misturas químicas às quais os indivíduos podem estar expostos e, dessa forma, as análises de susceptibilidade baseadas na investigação de um único genótipo provavelmente não são suficientes.

VI. SUMMARY

VI. SUMMARY

Prostate cancer, which often appears relatively late in life, is one of the most common cancers in man in many countries. The genetic basis of this disease is not well understood, but loss of the Y chromosome and structural abnormalities involving chromosomes 1, 2, 3, 7, 8, 10, 12 and X or double minute chromosomes have been described. In the present study, we analyzed nuclei from prostatic adenocarcinoma before culture and/or after 7, 14 or 21 days *in vitro* for chromosomes 1, 7, 8, 10, 11, X and Y using FISH technique. In 17 noncultured prostate tumor specimens, the most frequent aberrations found were the loss of chromosome Y and the gain of chromosome 1. Polyploidy and aneusomy 7 or X were associated with clinically aggressive behavior of the disease or higher tumor grade and monosomy 8 was observed in clinically nonaggressive disease.

Nine prostate tumor specimens were also analyzed before and after culture using different methodologies. Mechanical and mild, long-term collagenase treatment for sample disaggregation and medium enriched with low FBS concentrations, growth factors, hormones, glutation and vitamins, yielded the largest increase of epithelial cells proliferation without contamination of fibroblasts. The culture success was observed for 100% (10/10) of the cases and all harvesting were performed 3-7 days after culture setups. Using other methodologies, harvesting were performed 5-6 days (2 cases) and 10-31 days (16 cases) after culture setups. After FISH analyzes, the noncultured nuclei exhibited higher frequencies of aneuploidy than those from cultured cells. Nuclei with aneusomies apparently had a proliferative disadvantage in culture. However, cells with monosomy 8 or nulissomy Y may be exceptions, since they were seen even after 21 days *in vitro*. Our findings suggest that FISH analyzes may help in the characterization of some prognostic markers associated with prostate cancer, overcoming the artifacts created by culturing cells, and probably will provide greater understanding of tumor pathogenesis when associated with other molecular data.

Evaluating the susceptibility for prostate cancer, we applied PCR multiplex methodology to analyze glutathione-S-transferase T1 and M1 (GSTT1 and GSTM1) genotypes in 48 sample of prostate lesions. The frequencies of the GSTT1 0/0 and GSTM1 0/0 genotypes in prostate disease group were 22,92% and 43,75%, respectively, which are statistically similar to the frequencies detected in normal population. Therefore, the findings are not suggestive of a protective effect of such enzymes to the development of prostate cancer and contrast with the increased risks for certain GST genotypes in other types of diseases. The results may be dependent of the fact that prostate disease are not correlated with environmental factors metabolized by GSTs. Conversely, given the vast number of detoxification enzymes and the complexity of chemicals mixtures to

which an individual may be exposed, assessment of susceptibility based on the analysis of single genotypes may not be sufficient.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONSON, S.A. Growth factors and cancer. *Science*; 254: 1146-1143, 1991.
- ADAMI, H.O., BERGSTROM, R., ENGHOLM, G., NYRÉN, O., WOLK, A., EKBOM, A. A prospective study of smoking and risk of prostate cancer. *Int J Cancer*, v. 67, p. 764-768, 1996.
- ADOLFSSON, J., RONSTROM, L., HEDLUND, P.O., LOWHAGEN, T., CARSTENSEN, J., TRIBUKAIT, B. The[A1] prognostic value of modal deoxyribonucleic acid in low grade, low stage untreated prostate cancer. *J Urol*, v. 144, p. 1404-1407, 1990.
- AHMANN, F.R., WOO, L., HENDRIX, M., TRENT, J.M. Growth in semisolid agar of prostate cancer cells obtained from bone marrow aspirates. *Cancer Res*, v. 46, p. 3560-3564, 1986.
- AL-ABADI, H., NAGEL, R. 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, 1990.
- ALCARAZ, A., TAKAHASHI, S., BROWN, J. A., HERATH, J.F., BERGSTALH, E. J., LARSON-KELLER, J. J., LIEBER, M. M., JENKINS, R. B. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence *in situ* hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res*, v. 54, p.3998-4002, 1994.
- ALERS, J.C., KRIJTENBURG, P.J., ROSENBERG, C., HOP, W.C., VERKERK, A.M. SCHRODER, F.H., VAN DER KWAST, T.H., BOSMAN, F.T., VAN DEKKEN, H. Interphase cytogenetic of prostatic tumor progression: specific chromosomal abnormalities are involved in metastasis to the bone. *Lab Invest*, v. 77, p. 437-448, 1997.
- ALERS, J.C., KRIJTENBURGER, P.J., VISSERS, K.J., BOSMAN, F.T, KWAST, T.H., DEKKEN, H. Interphase cytogenetics of prostatic adenocarcinoma and precursor lesions: Analysis of 25 radical prostatectomies and 17 adjacent prostatic intraepithelial neoplasias. *Genes Chromosom Cancer*, v. 12, p. 241-250, 1995.
- ALY, M.S., DAL CIN, P., VOORDE, W.V., POPPEL, H., AMEYE, F., BAERT, L., VAN DE BERGHE, H. Chromosome abnormalities in benign prostatic hyperplasia. *Genes Chromosom Cancer*, v. 9, p. 227-233, 1994.
- ARPS, S., RODEWALD, A., SCHMALENBERGER, B., CARL, P., BRESSEL, M., KASTENDIECK, H. Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 66, p. 93-99, 1993.
- ATKIN, B.N., BAKER, C.M. Chromosome 10 deletion in carcinoma of the prostate. *N England J Med*, v. 312, p. 315, 1985.

- BABU, V.R., MILES, B.J., GERNY, J.C., WEISS, L., VAN DYKE, D.L. Cytogenetic study of four cancer of the prostate. *Cancer Res*, v. 48, p. 83-87, 1990.
- BANDYK, M.G., ZHAO, L., TRONCOSO, P., PISTERS, L.L., PALMER, J.L., VON ESCHENBACH, A.C., CHUNG, L.W.K., LIANG, J.C. Trisomy 7: a potential cytogenetic marker of human prostate cancer progression. *Genes Chromosom Cancer*, v. 9, p. 19-27. 1994.
- BARETTON, G.B., VALINA, C., VOGT, T., SCHNEIDERBANGER, K., DIEBOLD, J., LOHRS, U. Interphase cytogenetic analysis of prostatic carcinomas by use of nonisotopic *in situ* hybridization. *Cancer Res*, v. 54, p. 4472-4480, 1994.
- BARRIL, N., CARVALHO-SALLES, A.B., TAJARA, E.H. Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thiroid gland by *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, submitted.
- BOOKSTAIN, R., MACGROGAN, D., HILSENBECK, S.G., SHARKEY, F., ALLRED, C. p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res* v. 53, p. 3369-3373, 1993.
- BORING, C.C., SQUIRES, T.S., TONG, T. Cancer statistics. *Ca Cancer J Clin*, v. 43, p. 7-26, 1993.
- BOVA, G. S., CARTER, B. S., BUSSEMAKERS, J. G., EMI, M., FUJIWARA, Y., KYPRIANOU, N., JACOBS, S. C., ROBINSON, J. C., EPSTEIN, J. I., WALSH, P. C., ISAACS, W. B. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res*, v. 53, p. 3869-3873, 1993.
- BRASS, A.L., BERNARD, J., PATAI, B.L., SALVI, D., RUKSTAILS. Androgen up-regulates epidermal growth factor receptor expression and binding affinity in PC3 cell lines expressing the human androgen receptor. *Cancer Res* v. 55, p.3197-3203. 1995.
- BREITKREUZ, T., ROMANAKIS, K., LUTZ, S., SEITZ, G., BONKHOFF, H., UNTEREGGER, G., ZWERGEL, T., ZANG, K.D., WULLICH, B. Genotypic characterization of prostatic carcinomas: a combined cytogenetic, flow cytometry, and *in situ* DNA hybridization study. *Cancer Res*, v. 53, p. 4035-4040, 1993.
- BRINKMANN, A. O., FABER, P.W., VAN ROOIJ, H.C., KUIPER, G.G., RIS, C., KLAASSEN, P., VAN DER KORPUT, J.A., VOORHORST, M.M., VAN LAAR, J.H., MULDER, E. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* v. 34, p.307-310, 1989.

- BRINKMANN, A.O., LINDH, L.M.L., BREDVELD, D.I., MULDER, E., VAN DER MOLEN, H.J. Cyproterone acetate prevents translocations of the androgen receptor in the rat prostate. *Mol Cell Endocrinol* v. 32, p. 117-129, 1983.
- BROOKS, J.D., BOVA, S., EWING, C.E., PIANTADOSI, S., CARTER, B.S., ROBINSON, J.C., EPSTEIN, J.I., ISAACS, W.B. An uncertain role for *p53* gene alterations in human prostate cancers. *Cancer Res*, v. 56, p. 3814-3822, 1996.
- BROOKSTEIN, R., MACGROGAN, D., HILSENBECK, S.G., SHARKEY, F., ALLRED, D.G. *P53* is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res*, v. 53, p. 3369-3373, 1993.
- BROTHMAN, A.R. Cytogenetic studies in prostate cancer: are we making progress? *Cancer Genet Cytogenet*, v.95, p. 116-121, 1997.
- BROTHMAN, A.R., LESHO, L.J., SOMERS, K.D., SCHELLHAMMER, P.F., LADAGA, L.E., MARCHANT, D.J. Cytogenetic analysis of four primary prostatic cultures. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 37, p. 241-248, 1989.
- BROTHMAN, A.R., PATEL, A.M. Characterization of 10 marker chromosomes in a prostatic cancer cell line *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, v. 60, p. 8-11, 1992.
- BROTHMAN, A.R., PATEL, A.M., PEEHL, D.M., SCHELLHAMMER, P.F. Analysis of prostate tumor cultures using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Cancer Genet Cytogenet*, v. 62, p. 180-185, 1992.
- BROTHMAN, A.R., PEECHL, D.M., PATEL, A.M., MACDONALD, G.R., McNEAL, J.E., LAGDA, L.E, SCHELLHAMMER, P.F. Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostatic tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 55, p. 79-84, 1991.
- BROTHMAN, A.R., PEEHL, D.M., PATEL, A.M. McNEAL, J.E. Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res*, v. 50, p. 3795-3803, 1990.
- BROWN, C.J., GOSS, S.J., LUBAHN, D.B., JOSEPH, D.R., WILSON, E.M., FRENCH, F.S., WILLARD, H.F. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* v. 44, p. 264-269, 1989.
- BROWN, J. A., ALCARAZ, A. , SATORU, T., PERSONS, D.L., LIEBER, M. M., JENKINS, R. B. Chromosomal aneusomies detected by fluorescence *in situ* hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. *J Urol*, v. 152, p. 1157-1162, 1994.

- CAPORASO, N., GOLDSTEIN, A. Cancer genes: single and susceptibility: exposing the difference. *Pharmacogenetics*, v. 5, p. 59-63.
- CARTER, B.S., EPSTEIN, J.I., ISAACS, W.B. RAS gene mutations in human prostate cancer. *Cancer Res*, v. 50, p. 6830-6832, 1990.
- CASALONE, R., PORTENTOSO, P., GRANATA, P., MINELLI, E., RIGHI, R., MERONE, E., POZZI, E., CHIRAVALLI, A. M. Chromosome changes in benign prostatic hyperplasia and their significance in the origem of prostatic carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 68, p. 126-130, 1993.
- CHANG, C, KOKONTIS J, LIAO S. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequence of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*; v. 85, p. 7211-7215, 1988 a.
- CHANG, C., KOKONTIS, J., LIAO, S. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* v. 240, p. 324-326, 1988 b.
- CHANG, G.T.G., BLOK, L.J., STEENBEEK, M., VELDSCHOLTE, J., VAN WEERDEN, W., VAN STEENBRUGGE, G.J., BRINKMANN, A.O. Differentially expressed genes in androgen-dependent and -independent prostate carcinomas. *Cancer Res*, v. 57, p. 4075-4081, 1997.
- CHEN, J.D., EVANS, R.M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* v. 377 p. 454-457. 1995.
- CHER, M. L., BOVA, G.S., MOORE, D.H., SMALL, E.J., CARROL, P.R., PIN, S.S., EPSTEIN, J.I., ISAACS, W.B., JENSEN, R.H. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative geneomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res*, v. 56, p. 3091-3102, 1996.
- CHER, M. L., MAcGROGAN, D., BOOSKSTEIN, R., BROWN, J. A., JENKINS, R. B., JENSEN, R. H. Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence *in situ* hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosom Cancer* v. 11, p. 153-162, 1995.
- CHIN, R.K., HAWKINS, A.L., ISAACS, W.B., GRIFFIN, C.A. E1A transformed normal human prostate epithelial cells contain a 16q deletion. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 103, p. 155-163, 1998.
- CHUNG, B., PICADO-LEONARD, J., HANJU, M., BIENKOWSKI, M., HALL, P.F. Cytochrome P 450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNA indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 84, p. 407-411, 1987.

- COLOMBEL, M., SYMANS, F., GIL, S., O'TOOLE, K.M., CHOPIN, D., BENSON, M., OLSSON, C.A., KORSMEYER, S., BUTTYAN, R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein BCL-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol*, v. 143, p. 390-400, 1993.
- COONEY, K.A., MCCARTHY, J.D., LANGE, E., HUANG, L., MIESFELDT, S., MONTIE, J.E., OESTERLING, J.E., SANDLER, H.M., LANGE, K. Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst* v. 89, p. 955-959, 1997.
- COONEY, K.A., MCCARTHY, J.D., LANGE, E., HUANG, L., MIESFELDT, S., MONTIE, J.E., OESTERLING, J.E., SANDLER, H.M., LANGE, K. Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst*, v. 89, p. 955-959, 1997.
- COONEY, K.A., WETZEL, J.C., MERAJVER, S.D., MACOSKA, J.A., SINGLETON, T.P., WOJNO, K.J. Cistint regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. *Cancer Res*, v. 56, p. 1142-1145, 1996.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. *Patologia Estrutural e Funcional*. 4th ed. Rio de Janeiro, Koogan, 1991.
- CRUNDWELL, M.C., CHUGHTA, S., KNOWLES, M., TAKLE, L., LUSCOMBE, M., NEOPTOLEMOS, J.P., MORTON, D.G., PHILLIPS, S.M.A. Allelic loss on chromosomes 8p, 22q and 18q (DCC) in human prostate cancer. *Int J Cancer*, v. 69, p.295-300, 1996.
- CUNNINGHAM, J.M., SHAN, A., WICK, M.J., McDONNELL, S.K., SCHAID, D.J., TESTER, D.J., QIAN, J., TAKAHASHI, S., JENKINS, R.B., BOSTWICK, D.G., THIBODEAU, S.N. Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, v. 56, p. 4474-4482, 1996.
- DAVIS, D.L., RUSSELL, D.W. Unusual length polymorphism in human steroid 5 α -reductase type 2 gene (SRD5A2). *Hum Mol Genet*, v. 2, p. 820, 1993.
- DAWSON, N.A. Hormonal therapy for prostate cancer: what you need to know. In Annual Meeting of ASCO Educational Book, 34. 1998, Los Angeles. Proceedings... Bologna: Monduzzi, 1998. p 368-372.
- DEITCH, A.D., MILLER, G.J., de VERE WHITE, R.W. Significance of abnormal diploid DNA histograms in localized prostate cancer and adjacent benign prostatic tissue. *Cancer*, v. 72, p. 1692-1700, 1993.

- DINJENS, W.N.M., VAN DER WEIDEN, M.M., SCHROEDER, F. H., BOSMAN, F. T., TRAPMAN, J. Frequency and characterization of p53 mutations in primary and metastatic human prostate cancer. *Int J Cancer*, v. 56, p. 630-633, 1994.
- DONG, J.T., ISAACS, W.B., ISAACS, J.T. Molecular advances in prostate cancer. *Curr Opin Oncol*, v. 9, p. 101-107, 1997.
- DONG, J.T., LAMB, P.W., RINKER-SCHAEFFER, C.W., VUKANOVIC, J., ICHIKAWA, T., ISAACS, J.T., BARRET, J.C. *KAI 1*, a metastasis supressor gene for prostate cancer on human chromosome. *Science*, v.268, p.884-886, 1995.
- EASTMOND, D.A., SCHULER, M., RUPA, D.S. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutation Res.*, v. 348, p.153-162, 1995.
- EELES, R.A., DUROCHER, F., EDWARDS, S., TEARE, D., BADZIOCH, M., HAMOUND, R., GILL, S., BIGGS, P., DEARNALEY, D., ARDERN-JONES, A., DOWE, A., SHEARER, R., MCLENNAN, D.L., NORMAN, R.L., GHADIRIAN, P., APRIKIAN, A., FORD, D., AMOS, C., KING, T.M., LABRIE, F., SIMARD, J., NAROD, A.S., EASTON, D., FOULKES, W.D. Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. *Am J Hum Genet*, v. 62, p. 653-658, 1998.
- EMMERT-BUCK, M.R., VOCKE, C.D., POZZATTI, R.O., DURAY, P.H., JENNINGS, S.B., FLORENCE, C.D., ZHUANG, Z., BOSTWICK, D.G., LIOTTA, L.A., LINEHAN, W.M. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res*, v. 55, p. 2959-2962, 1995.
- EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, v. 240, p. 889-895, 1988.
- FILIPPOVA, G.N., LINDBLOM, A., MEINCKE, L.J., KLENOVA, E.M., NEIMAN, P.E., COLLINS, S.J., DOGGETT, N.A., LOBANENKOV. A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancer. *Genes Chromosom Cancer*, v. 22, p. 26-36, 1998.
- FORDHAM, M.V.P., BURDEGT, A.H., MATTHEWS, J., WILLIAMS, G., COOKE, T. Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometric and its relation to clinical outcome. *Br J Surg*, v. 73, p. 400-403, 1987.
- FRANKFURT, O.S., CHIN, J.L., ENGLANDER, L.S., RECO, W.R., PONTES, J.E., RUSTUM, Y.M. Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer. *Cancer Res*, v. 45, p. 1418-1423, 1985.

- FRAUENHOFFER, E.E., JAE, M.D., RO, J., EL-NAGGAR, A.K., ORDONEZ, N.G., AYALA, A.G. Clear cell cribriform hyperplasia of the prostate. *Am J Clin Pathol*, v. 95, p. 446-453, 1991.
- FRIEDLANDER, M.L., HEDLEY, D.W., TAYLOR, I.W. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J Clin Pathol*, v. 37, p. 961-974, 1984.
- GADDIPATI, J.P., MCLEOD, D.G., HEINDENBERG, H.B., SESTERHENN, A.M., FINGER, M.J., MOUL, J.W., SRIVASTAVA, S. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res* v. 54, p. 2861-2864, 1994.
- GALBRAITH, S.M., DUCHENSE, G.M. Androgens and prostate cancers: biology, pathology and hormonal therapy. *Eur J Cancer* v. 33, p. 545-554, 1997.
- GAO, X., ZACHAREK, A., GRIGNON, D.J., SAKR, W., POWELL, I.J., PORTER, A.T., HONN, K.V.. Localization of potential tumor supressor loci to a <2Mb region on chromosome 17q in human prostate cancer. *Oncogene*, v.11, 1241-1247, 1995 b.
- GAO, X., ZACHAREK, A., SALLOWSKI, A., GRIGNON, D.J., SAKR, W., PORTER, A.T., HONN, K.V.. Loss of heterozygosity of the *BRCA1* and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res* v. 55, p. 1002-1005, 1995 a.
- GEBUREK, B.M., KOLLMORGEN, T. A., QIAN, J., D'SOUZA-GEBUREK, S.M., LIEBER, M.M., JENKINS, R.B. Chromosomal anomalies in stage D1 prostate adenocarcinoma primary tumors and lymph node metastases detected by fluorescence *in situ* hybridization. *J Urol*, v. 157, p.223-227, 1997.
- GERBER, H.P., SEIPEL, K., GEORGIEV, O., HOFFERER, M., HUG, M., RUSCONI, S., SCHAFFNER, W. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science*, v. 263, p. 808-811, 1994.
- GIBAS, Z., EDSON, P., SANDBERG, A.A. Chromosome rearrangements in a metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 16, p. 301-304, 1985.
- GIOVANNUCCI, E., STAMPFER, M.J., KRITHIVAS, K., BROWN, M., BRUFISKY, A., TALCOTT, J., HENNEKENS, C.H., KANTOFF, P.W. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 94, p. 3320-3323, 1997.
- GODDARD, A.D., SOLOMON, E. Genetic aspect of cancer. In: HARRIS, K. HIRSCHHORM B. (Ed.). *Advances in Human Genetics*. London, Plenum Press, 1993.
- GREENE, D.R., TAYLOR, S.R., AIHARA, M., YOSHIDA, K., EGAWA, S., PARK, S.H., TIMME, T.L., YANG, G., SCARDINO, P.T., THOMPSON, T.C. DNA ploidy and

- clonal selection in *ras* + *myc* - induced mouse prostate cancer. *Int J Cancer*, v. 60, p. 395-399, 1995.
- GREENE, D.R., TAYLOR, S.R., WHEELER, T.M., SCARDINO, P.T. DNA ploidy by image analysis of individual foci prostate cancer: a preliminary report. *Cancer Res*, v. 51, p. 4084-4089, 1991.
- GRIFFITHS, K., MORTON, M.S., NICHOLSON, R.I. Androgens, androgens receptors, antiandrogens and treatment of prostate cancer. *Eur Urol* v. 32, p. 24-40, 1997.
- GRONBERG, H., ISAACS, S.D., SMITH, J.R., CARPTEN, J.D., BOVA, G.S., FREIJE, D., XU, J., MEYERS, D.A., COLLINS, F.S., TRENT, J.M., WALSH, P.C., ISAACS, W.B. Characteristics of prostate cancer in families potentially linked to the hereditary prostate cancer 1 *HPC1* locus. *JAMA*, v. 278, p. 1251-1255, 1997.
- GRONBERG, H., XU, J., SMITH, J.R., CARPTEN, J.D., ISAACS, S.D., FREIJE, D., BOVA, G.S., WALSH, P.C., COLLINS, F.S., TRENT, J.M., MEYERS, D.A., ISAACS, W.B. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus *HPC1* on chromosome 1. *Cancer Res*, v.57, p. 4707-4709, 1997.
- GRONBERG, H., XU, J., SMITH, J.R., CARPTEN, J.D., ISAACS, S.D., FREIJE, D., BOVA, G.S., WALSH, P.C., COLLINS, F.S., TRENT, J.M., MEYERS, D.A., ISAACS, W.B. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (*HPC1*) on chromosome 1. *Cancer Res*, v. 57, p. 4707-4709, 1997.
- HAAS, G.P., SAKR, W.A., epidemiology of prostate cancer, *CA Cancer J Clin*, v. 47, p.273-287, 1997.
- HABIBI, F.K. Steroid hormones and cancer: IV prostate cancer. *Eur J Surg Oncol* v. 23 p.264-268, 1997.
- HALACHMI, S., MARDEN, E., MERTI, G., MACKAY, H., ABBONDANZA, C., BROWN, M. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* v. 264, p. 1455-1458, 1994.
- HALLOWES, R., COX, S., HAYARD, S., DESHPANDE, N., TOWLER, J. 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, 1991.
- HAM. J., THOMSON, A., NEEDHAM, M., WEBB, P., PARKER, M. Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumor virus. *Nucleic Acid Res* v. 16, p. 5263-5276, 1988.

- HARRIS, S.E., RONG, Z., HARRIS, M.A., LUBAHN, D.D. Androgen receptor in human prostate carcinoma LNCaP/ADEO cells contains a mutation which alters the specificity of the steroid-dependent transcriptional activation region. *Endocrinology* v. 126, p. 93, 1990.
- HAUGEN, O.A., MJÖLNÉR, O. DNA-ploidy as prognostic factor in prostatic carcinoma. *Int J Cancer*, v. 45, p. 224-228, 1990.
- HAYES, J.D., PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *C.R.C. Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 6, p. 445-603, 1995.
- HAYES, R. B., LIFF, J. M., POTTERN, L. M., GREENBERG, R. S., SCHOENBERG, J. B., SCHWARTZ, A. G., SWANSON, G. M., SILVERMAN, D. T., BROWN, L. M., HOOVER, R. N., FRAUMENI, JR., J. F. Prostate cancer risks in U.S. blacks and whites with a family history of cancer. *Int J Cancer*, v.60, p.361-364, 1995.
- HENKE, R.P., KRUGER, E., AYHAN, N., HUBNER, D., HAMMERER, P. Frequency and distribution of numerical chromosomal aberrations in prostatic cancer. *Hum Pathol* v. 25, p. 476-484, 1994.
- HOBISCH, A., CULING, Z., RADMAYR, C., BARTSCH, G., KLOCKER, H., HITTMAYER, A. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer Res* v. 55, p. 3068-3072, 1995.
- HOCKENBERY, D. M., ZUTTER, M., HICKEY, W., NAHM, M., KORSMEYER, S. J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88, p. 6961-6965, 1991.
- HOFFMANN, A., SINN, E., YAMAMOTO, T., WANG, J., ROY, A., HORIKOSHI, M., ROEDER, R.G. Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFII). *Nature* v. 346, p. 387-390, 1990.
- HONG, H., KOHLI, K., TRIVED, A., JOHNSON, D.L., STALLCUP, M.R. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 93, p. 4948-4952, 1996.
- HORLEIN, A.J., NAAR, A.M., HEINZEL, T., TORCHIA, J., GLOSS, B., KUROKAWA, R., RYAN, A., KAMEI, Y., SODERSTROM, M., GLASS, C.K., ROSENFELD, M.G. *Nature* v. 377, p.397-403, 1995.

- HSING, G., WACHOLDER, S., CO CHEIN, H.T., BLOT, W.J. Diet, tobacco use, and fatal prostate cancer. Results from the luteran brotherhood cohort study. *Cancer Res*, v. 50, p. 6836-6840, 1990.
- HUANG, S.F., XIAO, S., RENSHAW, A.A., LOUGHLIN, K.R., HUDSON, T.J., FLETCHER, J.A. Fluorescence *in situ* hybridization evaluation of chromosome deletion patterns in prostate cancer. *Am J Pathol*, v. 149, p. 1565-1573, 1996.
- HUSSAIN, M.H., POWEL, I., ZAKI, N., MACIOROWISKI, Z., SAKR, W., KUKURUGA, M., VISSHER, D., HAAS, G.P., PONTES, J.D., ENSLEY, J.F. Flow cytometric DNA analysis of fresh prostatic resections. *Cancer*, v. 72, p. 3012-3019, 1993.
- IMPERATO-MCGINLEY, J., GAUTIER, T., ZIRINSKY, K., HOM, T., PALOMO, O., STEIN, E., VAUGHAN, E.D., MARKISZ, J.A., RAMOREZ DE ARELLANO, E., KAZAM E. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol & Metab* v. 75, p. 1022-1026, 1992.
- INCA: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, Editora INCA, 1998, 18p.
- IRVINE, A.R., YU, M., ROSS, R.K., COETZEE, G.A. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res* v. 55, p. 1937-1940, 1995.
- ISAACS, J.T., COFFEY, D.S. Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma. *Cancer Res* v. 45, p. 5070-5075, 1981.
- ITTMANN, M. Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*, v. 56, p. 2143-2147, 1996.
- ITTMANN, M., WIECZOREK, R., HELLER, P., DAVE, A., PROVET, J., KROLEWSKI, J. Alterations in the p53 and MDM-2 genes are infrequent in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas. *Am J Pathol*, v. 145, p. 287-293, 1994.
- IWAMURA, M., ABRAHAMSSON, P.A., BENNING, C.M., COCKETT, A. T., DI SANT'AGNESE, P.A. Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *J Histochem Cytochem* v. 42, p. 783-788, 1994.
- JELLINGHAUS, W., OKODA, K., RAGG, C., GERARD, H., SCHRODER, F.H. Chromosomal studies of human prostatic tumors "in vitro". *Investigat Urol*, v. 14, p. 16-19, 1976.

- JENKINS, R., TAKAHASHI, S., DELACEY, K., BERGSTRALH, E., LIEBER, M. Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chromosom Cancer*, v. 21, p. 131-143, 1998.
- JENKINS, R.B., QIAN, J., LIEBER, M.M., BOSTWICK, D.G. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res*, v. 57, p. 524-531, 1997.
- JENSTER, G., VAN DER KORPUT, H.A., VAN VROONHOVEN, C., VAN DER KWAST, T.H., TRAPMAN, J., BRINKMANN, A.O. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* v. 5, p. 1396-1404, 1991.
- JOHANSSON, B., HEIM, S., MANDAH, N., MERTENS, F., MITELMAN, F. Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosom Cancer*, v. 6, p. 199-205, 1993.
- JONES N. Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell* v. 6, p. 9-11, 1990.
- JONES, E., ZHU, X. L., ROHR, L. R., STEPHENSON, R. A., BROTHMAN, A. R. Aneusomy of chromosome 7 and 17 detected by FISH in prostate cancer and the effects of selection in vitro. *Genes Chromosom Cancer*, v. 11, 163-170, 1994.
- JONES, E.C., McNEAL, J., BRUCHOVSKY, N., JONG, G. DNA content in prostatic adenocarcinoma. *Cancer*, v. 66, p. 752-757, 1990.
- JOOS, S., BERGERHEIM, U.S., PAN, Y., MATSUYAMA, H., BENTZ, M., MANOIR, S., LITCHTER, P. Mapping of chromosomal gains and loss in prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer*, v. 14, p. 267-276, 1995.
- KAGAN, J., STEIN, J., BARBAIAN, R.J., JOE, Y.S., PISTERS, L.L., GLASSMAN, A.B., ESCHENBACH, A.C., TRONCOSO, P. Homozygous deletions at 8p22 and 8p21 in prostate cancer implicate these regions as the sites for candidate tumor suppressor genes. *Oncogene*, v. 11, p.2121-2126, 1995.
- KALLAKURY, B.V.S., YANG, F., FIGGE, J., SMITH, K., KAUSIK, S.J., TACY, N.J., FISHER, H.A.G., KAUFMAN, R., FIGGE, H., ROSS, J.S. Decreased levels of CD44 protein and mRNA in prostate carcinoma: correlation with tumor grade and ploidy. *Cancer*, v. 78, p. 1461-1469, 1996.
- KAO, C.C., LIEBERMAN, P.M., SCHMIDT, M.C., ZHOU, Q., PEI, R., BERK, A.J. Cloning of a transcriptionally active human TATA binding factor. *Science* v. 29, p. 1646-50, 1990.

- KAZEMI-ESFARJANI, P., TRIFIRO, M.A, PINSKY, L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)*n*-expanded neuropathies. *Hum Mol Genet*, v.4, p. 523-527, 1995.
- KETTER, R., ZWERGEL, T., ROMANASKI, K., UNTEREGGER, G., ZIEGLER, M., ZANG, K.D., WULLICH, B. Selection toward diploid cells in prostatic carcinoma derived cell cultures. *Prostate*, v. 28, p. 364-371, 1996.
- KIRBY, S.R., CHRISTIMAS, T.J., BRAWER, M. *Prostate Cancer*, 1ª. Ed., 1996, Mirror, 170p.
- KLEIN-HITPASS. L., CATO. A.C.B., HENDERSON, D., RYFFEL, G.U. Two types of antiprogestins identified by their differential action in transcriptionally active extracts from T47D cells. *Nucleic Acid Res* v. 19, p.1227-1234, 1991.
- KLUS, G.T., NAKAMURA, J., LI, J., LING, Y., SON, C., KEMPPAINEN, J., WILSON, E.M., BRODIE, A M.H. Growth inhibition of human prostate cells *in vitro* by novel inhibitors of androgen synthesis. *Cancer Res*, v.56, p. 4956-4964, 1996.
- KOIVISTO, P., KONNEN, J., PALMBERG, C., TAMMELA, T., HYYTIMEN, E., ISOLA, J., TRAPMAN, J., CLEUTJENS, K., NOORDZIJ, A., VISAKORPI, T., KALLIONIEMI, O.P. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res*, v. 57, p. 314-319, 1997.
- KOMIYA, A., SUZUKI, H., UEDA, T., YATANI, R., EMI, M., ITO, H., SHIMAZAKI, J. Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromosom Cancer*, v. 17, p. 245-253, 1996.
- KONIG, J.J., HAGEMEIJER, A., SMIT, B., KAMST, E., ROMIJN, J.C., SHODER, F.H. Cytogenetic characterization of an established xenografted prostatic adenocarcinoma cell line (PC-82). *Cancer Genet Cytogenet*, v. 34, p. 91-99, 1988.
- KONIG, J.J., TEUBEL, W., KAMST, E., ROMIJN, J.C., SCHRODER, F.H., HAGEMEIJER, A. Cytogenetic Analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 101, p. 116-122, 1998.
- KONIG, J.J., TEUBEL, W., WILLEM van DANGEN, J., HAGEMEIJER, A., ROMIJN, J.C. Tissue culture loss of aneuploid cells from carcinomas of the prostate. *Genes Chromosom Cancer*, v. 8, p. 22-27, 1993.
- KUHN, E.J., KURNOT, R.A., SESTERHENN, I.A., CHANG, E.H., MOUL, J.W. Expression of the *c-erbB-2* (*HER-2/neu*) oncoprotein in human prostatic carcinoma. *J Urol*, v. 150, p. 1427-1433, 1993.

- KUIL, C.W., BERREVOETS, C.A., MULDER, E. Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization. Studies on the mechanism of antiandrogen action. *J Biol Chem* v. 270, p. 27569-27576, 1995.
- KUIL, C.W., BRINKMANN, A.O. Androgens, antiandrogens and androgen receptor abnormalities. *Eur Urol* v.29, p 78-82, 1996.
- KUROKAWA, R., SODERSTROM, M., HORLEIN, A.J., HALACHMI, S., BROWN, M., ROSENFELD, M.G. GLASS, C.K. Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* v. 377, p. 451-454, 1995.
- LACOMBE, L., ORLOW, I., REUTTER, V.E., FAIR, W.R., DALBAGNI, G., ZHANG, Z., CORDON-CARDO, C. Microsatellite instability and deletion analysis of chromosome 10 in human prostate cancer. *Int J Cancer*, v. 69, p. 110-113, 1996.
- LATIL, A., BARON, J.C., CUSSENOT, O., FOURNIER, G., SOUSSI, T., BOCCON-GIBOD, L., DUC, A.L., ROUESSÉ, J., LIDEREAU, R. Genetic alterations in localized prostate cancer: Identification of a common region of deletion on chromosome arm 18q. *Genes Chromosom Cancer*, v. 11, p.119-125, 1994.
- LEWIN B. *Genes VI*. New York, Oxford University Press, 1997.
- LIFSON, B., PIZZOLO, J.G., ELHOSSEINY, A.A., CHOUDHURY, M.S., MELAMED, M.R. Comparison of fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometric DNA ploidy analysis in paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens. *Anal Quant Cytol Histol*, v. 17, p. 93-99, 1995.
- LIMON, J., DAL CIN, P., SANDBERG, A.A. Amplification of long term collagenase disaggregation for cytogenetic analysis of human solid tumor. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 23, p. 305-315, 1986a.
- LIMON, J., DAL CIN, P., SANDBERG, A.A.. Cytogenetic findings in a primary leiomyosarcoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 22, p. 159-167, 1986b.
- LIMON, J., LUNDGREN, R., ELFIVING, P., HEIM, S., KRISTOFFERSSON, U., MANDHAL, N., MITELMAN, F. Double minutes in two primary adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 39, p. 191-194, 1989.
- LIMON, J., LUNDREN, R., ELFIVING, P., HEIM, S., KRISTOFFERSSON, U., MANDHAL, N.; MITELMAN, F. An improved technique for short term culturing of human prostatic adenocarcinoma tissue of cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 46, p. 191-199, 1990.



- LU, S., TSAI, S.Y., TSAI, M. Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: Androgen regulation of *CDK2*, *CDK4* and *CKI p16* genes. *Cancer Res*, v.57, p. 4511-4516, 1997.
- LUBAHN, D.B., JOSEPH, D.R., SULLIVAN, P.M., WILLARD, H.F., FRENCH, F.S., WILSON, E.M. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* v. 240, p. 327-330, 1988.
- LUBANH, D.B., BROWN, T.R., SIMENTAL, J., HIGGS, H.N., MIGEON, C.J., WILSON, E.M., FRENCH, F.S. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 86, p. 9534-9538, 1989.
- LUNDBERG, S., CARSTENSEN, J., RUDQUIST, I. DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res*, v. 47, p. 1973-1977, 1987.
- LUNDGREN, R., KRISTOFFERSSON, V., HEIM, S., MANDHAL, N., MITELMAN, F. Multiple structural chromosome rearrangement, including del (7q) and del (10q), in an adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 35, p. 103-108, 1988.
- LUNDGREN, R., MANDHAL, N., HEIM, ANDERSON, H., MITELMAN, F. Chromosome abnormalities are associated with unfavorable outcome in prostatic cancer patients. *J. Urol*, v. 147, p. 784-788, 1992 a.
- LUNDGREN, R., MANDHAL, N., HEIM, S., LIMON, J., HENRIKSON, H., MITELMAN, F. Cytogenet analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. *Genes Chromosom Cancer*, v. 4, p. 16-24, 1992 b.
- LYNCH, H.T., HIRAYAMA, T. *Genetic epidemiology of cancer*. Florida, CRC press, 1989.
- MACOSKA, J.A., TRYBUS, T.M., BENSON, P.D., SAKR, W., GRIGNON, D.J., WOJNO, K.D., PIETRUK, T., POWELL, I.J. Evidence for three tumor supressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res*, v. 55, p. 5390-5395, 1995.
- MACOSKA, J.A., TRYBUS, T.M., SAKR, W., WOLF, M.C., BENSON, P.D., POWELL, I.J., PONTES, J.D. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. *Cancer Res*, v. 54, p. 3824-3830, 1994.
- MATTURRI, L., BIONDO, B., CAZZULO, A., MONTANARI, E., RADICE, F., TIMOSSO, R., TURCONI, P., LAVEZZI, A. M.Detection of trisomy 7 with fluorescence *in situ*

- hybridization and its correlation with DNA content and proliferating cell nuclear antigen-positivity in prostate cancer. *Am J Clin Oncol*, v. 21, p. 253-257, 1998.
- MCINDOE, R.A., STANFORD, J.L., GIBBS, M., JERVIK, G.P., BRANDZEL, S., NEAL, C.L., LI, S., GAMMACK, J.T., GAY, A.A., GOOD, E.L., HOOD, L., OSTRANDER, E.A. Linkage analysis of 49 high-risk families does not support a common familial prostate cancer-susceptibility gene at 1q24-25. *Am J Hum Genet*, v. 61, p. 347-353, 1997.
- MEIKLE, A.W. Endocrinology of the prostate and of benign prostate hyperplasia. In DeGroot LJ, (Ed.). *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 1985: 2459-2473.
- MELLON, K., THOMPSON, S., CHARLTON, R.G., MARSH, C., ROBINSON, M., LANE, D.P., HARRIS, A.L., HORNE, C.H.W., NEAL, D.E. p53, c-erb-2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J. Urol*, v. 147, p. 496-499, 1992.
- MICALE, M.A., MOHAMED, A., SAKR, W., POWELL, I.J., WOLMAN, S.R. Cytogenetics of primary prostatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 61, p. 165-173, 1992.
- MICALE, N.A., SANFORD, J.S., POWELL, I.J., SAKR, W.A., WOLMAN, S.R. Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: Paraffin FISH vs metaphase analysis. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 69, p. 7-12, 1993.
- MILASIN, J., MICIC, S. Double minute chromosome in an invasive adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 72, p. 157-159, 1994.
- MILLER, J., HORSFALL, D.J., MARSHAL, V.R., RAO, D.M., LEONG, A.S.Y. The prognostic value of deoxyribonucleic acid flow cytometric analysis in stage D2 prostatic carcinoma. *J Urol*, v. 145, p. 1192-1196, 1991.
- MIYAJIMA, N., HORIUCHI, R., SHIBUYA, Y., FUKUSHIGE, S., MATSUBARA, K., TOYOSHIMA, K., YAMAMOTO, T. Two *erbA* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite strands of the same genetic locus. *Cell*, v. 57, p. 31-39, 1989.
- MOLENNAR, W.M., STOEPKER, M.E.J., RUITER, A.J., HOEKSTRA, H.J., VAN DEN BERG, E. Cytogenetic support for primary prostatic cancer in a patient presenting with a soft tissue mass in the leg. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 86, p. 147-149, 1996.
- MONTGOMERY, B.T., BLUTE, M.L., FARROW, G.M., MYERS, R.P., ZINCKE, H., THERNEAU, T.M., LIEBER, M.M. Stage B prostate carcinoma. *Arch Surg*, v. 125, p. 327-331, 1990.

- MOYRET-LALLE, C., MARÇAIS, C., JACQUEMIER, J., MOLE, J. P., DAVER, A., SORET, J. Y., JEANTEUR, P., OZTURK, M., THEILLET, C. *ras*, *p53* and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int J Cancer*, v. 64, p. 124-129, 1995.
- MURAKAMI, Y.S., BROTHMAN, A.R., LEACH, R.J., WHITE, R.L. Suppression of malignant phenotype in human prostate cancer cell line by fragments of normal chromosomal region 17q. *Cancer Res*, v. 55, p. 3389-3394, 1995.
- MURRAY, G.I., TAYLOR, V.E., MCKAY, J.A., WEAVER, R.J., EWEN, S.W., MELVIN, W.T., BURKE, M.D. The immunohistochemical localization of drug-metabolizing enzymes in prostate cancer. *J Pathol*, v. 177, p. 147-152, 1995.
- NAVONE, N.M., TRONCOSO, P., PISTERS, L.L., GOODROW, T.L. PALMER, J.L., NICHOLS, W.W., VONESCHENBACH, A.C., CONTI, C.J. *p53* protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Nat Cancer Int*, v.85, p. 1657-1669, 1993.
- NIELSEN, K., OVERGAARD, J., BENTZEN, S.M., BRUUN, E. Histological grade, DNA ploidy and mean nuclear volume as prognostic factors in prostatic cancer. *APMIS*, v.101, p. 614-620, 1993.
- OÑATE, S.A., TSAI, S.Y., TSAI, M.J., O'MALLEY, B.W. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* v. 270, p. 1354-1357, 1995.
- OSMAN, I., SCHER, H., DALBAGNI, G., REUTER, V., ZHANG, Z.F., CORDON-CARDO, C. Chromosome 16 in primary prostate cancer: a microsatellite analysis. *Int J Cancer*, v. 16, p.590-584, 1997.
- PAN, Y., MATSUYAMA, H., WANG, N., YOSHIHIRO, S., HAGGARTH, L., LI, C., TRIBUKAIT, B., EKMAN, P., BERGERHEIM, U.S. Chromosome 16q24 deletion and decreased E-cadherin expression: possible association with metastatic potential in prostate cancer. *Prostate*, v. 15, p. 31-38, 1998.
- PAZ, A., LINDNER, A., ZISMAN, A., SIEGEL, Y. A genetic sequence change in the 3'-noncoding region of the androgen receptor gene in prostate carcinoma. *Eur Urol*, v. 31, p. 209-15, 1997.
- PEEHL, D.M., STAMEY, T.A. Serum-free growth of adult human prostatic epithelial cells. *In vitro Cell Develop Biol*, v. 22, p. 82-90, 1986.
- PERSONS, D.L., TAKAI, K., GIBNEY, D.J., KATZMENN, J.A., LIEBBER, M.M., JENKINS, R.B. Comparison of fluorescence *in situ* hybridization with flow cytometry and static



- image analysis in ploidy analysis of paraffin-embedded prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol*, v. 25, p. 678-683, 1995.
- PITTMAN, S., RUSSEL, P.J., JELBART, M.E., WASS, J., REGHAVAN, D. Flow cytometric and karyotypic analysis of a primary small cell carcinoma of the prostate: A xenografted cell line. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 26, p. 165-169, 1987.
- QI, H., DAL CIN, P., VOORDE, W., ELGAMAL, A. A., POPPEL, H.V., BAERT, L., VAN DEN BERGHE, H. Del(1)(q12) in adenocarcinomas of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 26, p.79-81, 1996.
- QIAN, J., BOSTWICK, D.G., TAKAHASHI, S., BORELL, T.J., HERATH, J.F., LIEBER, M.M., JENKINS, R.B. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res*, v. 55, p. 5408-5414, 1995.
- RAFFO, A.J., PERLMAN, H., CHEN, M.W., DAY, M.L., STREITMAN, J.S., BUTTYAN, R. Overexpression of *bcl-2* protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res*, v. 55, p.4438-4445, 1995.
- REICHARDT, J.K.V, MAKRIDAKIS, N., HENDERSON, B.E., YU, M.C., PIKE, M.C., ROSS, R.K. Genetic variability of the human *SRD5A2* gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res* v. 55, p. 3973-3975, 1995.
- ROBERTSON, C. N., PAULSON, D. F. DNA in radical prostatectomy specimens. *Acta Oncol*, v. 30, p. 205-207, 1991.
- RODRIGUES NETO JR, N. *Urologia*. São Paulo. Livraria Roca LTDA, 1986, 854p.
- ROSEMBERG, R.N. DNA-triplet repeats and neurologic disease. *N England J Med* v. 335, p. 1222-1224, 1996.
- ROSS, J.S., NAZEER, T.P., CHURCH, K., AMATO, C., FIGGE, H., RIFKIN, M.D., FISHER, H.A.G. Contribution of *HER-2/neu* oncogene expression to tumor grade and DNA content analysis in the prediction of prostatic carcinoma metastasis. *Cancer*, v. 72, p. 3020-3028, 1993.
- RUBIN, S.J., HALLAHAN, D.E., ASHMAN, C.R. Two prostate cancer cells lines demonstrate abnormalities in tumor supressor genes. *J Surg Oncol* v. 46, p. 31-36, 1991.
- RUNDLETT, S.E., WU, X.P., MIESFELD, R.L. Functional characterizations of the androgen receptor confirm that the molecular basis of androgen action is transcriptional regulation. *Mol Endocrinol* v.4, p. 708-714, 1990.

- SANT'AGNESE, A.E. COCKETT, A.T.K. Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer*, v.78, p. 357-361, 1996.
- SBU. Treatment in Mass screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst, supplement* p. 46-61, 1996.
- SEGAL, N. H., COHEN, R. J., HAFJEJEE, Z., SAVAGE, N. BCL-2 proto-oncogene expression in prostatic cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell. *Arch Pathol Lab. Med*, v. 118, p. 616-618, 1994.
- SEGNITZ, B., GEHRING, U. Mechanism of action of a steroidal antigluco corticoid in lymphoid cells. *J Biol Chem* v. 265, p. 2789-2796, 1990.
- SHEN, R., SU, Z., OLSSON, A. A., FISHER, P.B. Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 92, p. 6778-6782, 1995.
- SIMENTAL, J.A., SAR, M., LANE, M.V., FRENCH, F.S., WILSON, E.M. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* v. 266, p. 510-518, 1991.
- SLEDDENS, H.F.B.M., OOSTRA, B.A, BRINKMANN, AO, TRAPMAN, J. Trinucleotide (GGN) repeat polymorphism in the human androgen receptor (AR) gene. *Hum Mol Genet*, v. 2, p. 493, 1993.
- SMITH, J.R., FREIJE, D., CARPTEN, J.D., GRONBERG, H., XU, J., ISAACS, S.D., BROWNSTEIN, M.J., BOVA, G.S., GUO, H., BUJNOVSZKY, P., NUSSKEN, D.R., DAMBER, J.E., BERGH, A., EMANUELSSON, M., KALLIONIEMI, O.P., WALKER-DANIELS, J., BAILEY-WILSON, J.E., BEATY, T.H., MEYERS, D.A., WALSH, P.C., COLLINS, F.S., TRENT, J.M., ISAACS, W.B. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science*, v. 274, p.1371-1374, 1996.
- SROUGI, M., SIMON, D. *Cancer Urológico*. São Paulo, Gráfica Platina, 1990, 490p.
- STEARNS, M.E., MCGARVEY, T. Prostate cancer: therapeutic, and basic studies. *Lab Invest*, v. 67, p. 540-552, 1992.
- STEGE R., LUNDH, B., TRIBUKAIT, B., POUSETTE, A., CARLSTROM, K., HASENSEN, M. Deoxyribonucleic acids ploidy and the direct assay of prostatic acid phosphatase and specific antigen in fine needle aspiration biopsies as diagnostic methods in prostatic carcinoma. *J Urol*, v. 144, p. 299-302, 1990.
- STELEIN, H., FETTER, R., ROMANAKIS, K., ZWERGEL, T., UNTEREGGER, G., BONKHOF, H., SEITZ, G., ZIEGLER, M., ZANG, K.D., WULLICH, B. DNA

- aneuploidy in prostatic adenocarcinoma: a frequent event as shown by fluorescence in situ DNA hybridization. *Hum Pathol*, v. 25, p. 1306-1313, 1994.
- STEPHENSON, R. A., ZAHNISER, D. J., WONG, K. L., HUTCHINSON, M. L. An image analysis method for assessment of prognostic risk in prostatic cancer: a pilot study. *Analytical Cell Pathol*, v. 3, p. 243-248, 1987.
- STRATTON, M.R. Recent advances in understanding of genetic susceptibility to breast cancer. *Hum Mol Genet*, v. 5, p. 1515-1519, 1996.
- SUN, Z., PAN, J., BALK, S.P. Androgen receptor-associated protein complex binds upstream of the androgen-responsive elements in the promoters of human prostate-specific antigen and kallikrein 2 genes. *Nucleic Acid Res* v. 25, p. 3318-3325, 1997.
- SUZUKI, H., EMI, M., KOMIYA, A., FUJIWARA, Y., YATANI, R., NAKAMURA, Y. Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosom Cancer*, v. 13, p.168-174, 1995.
- TAKAHASHI, S., QIAN, J., BROWN, J. A., ALCARAZ, A., BOSTWICK, D. G., LIEBER, M. M., JENKINS, R. B. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence *in situ* hybridization in needle biopsies. *Cancer Res*, v. 54, p.3574-3579, 1994.
- TAKAHASHI, S., SHAN, A.L., RITLAND, S.R., DELACEY, K., BOSTWICK, D.G., LIEBER, M.M., THIBODEAU, S.N., JENKINS, R.B. Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression. *Cancer Res*, v. 55, p. 4114-4119, 1995.
- TRAPMAN, J., SLEDDENS, H.F.B.M., VAN DER WEIDEN, M.N., DINJENS, W.N.M., KONIG, J.J., SANTERSE, B., SCHRÖDER, F.H., FABER, P.W., BOSMAN, F.T. Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between loci *D8S87* and *D8S113* in human prostate cancer. *Cancer Res*, v.54, p. 6061-6064, 1994.
- TRIBUKAIT, D. DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology. *Acta Oncol*, v. 30, p. 187-192, 1991.
- TRICOLI, J. V., YAO, J., D'SOUZA, S.A., BRACKEN, R.B. Detection of sex-region Y (SRY) transcripts in human prostate adenocarcinoma and benign prostatic hypertrophy. *Genes Chromosom Cancer*, v. 8, p. 28-32, 1993.

- TRICOLI, J.V., GUMERLOCK, P.H., YAO, J.L., CHI, S.G., D'SOUZA, S., NESTOK, B.R., WHITE, R.W.V. Alterations of the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma. *Genes Chromosom Cancer*, v. 15, p.108-114, 1996.
- TSUI, L.C., DONIS-KELLER, H. GRZESCHI, K.H. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 7 Mapping 1994. *Cytogenet Cell Genet*, v. 72, p. 2-21, 1995.
- TUT, T.G., GHADESSY, F.J., TRIFIRO, M.A., PINSKY, L., YONG, E.L. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced *trans*-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clinical Endocrinol & Metabol*; 82: 3777-3782, 1997.
- UCHIDA, T., WADA, C., SHITARA, T., EGAWA, S., KOSHIBA, K. Infrequent involvement of p53 gene mutations in the tumorigenesis of Japanese prostate cancer. *Br J Cancer*, v. 68, p. 751-755, 1993.
- UEDA, T., KOMIYA, A., EMI, M., SUZUKI, H., SHIRAISHI, T., YATANI, R., MASAI, M., YASUDA, K., ITO, H. Allelic losses on 18q21 are associated with progression and metastasis in human prostate cancer. *Genes Chromosom Cancer*, v. 20, p. 140-147, 1997.
- VAN DEN BERG, C., GUAN, X-Y., VON HOFF, D., JENKINS, R., BITTNER, M., GRIFFIN, C., KALLIONIEMI, O., VISAKORPI, T., MCGILL, J., HERATH, J., EPSTEIN, J., SAROSDY, M., MELTZER, P., TRENT, J. DNA sequence amplification in human prostate cancer identified by chromosome microdissection: Potential prognostic implications. *Clin Cancer Res*, v.1, p. 11-18, 1995.
- VELDSCHOLTE, J., RIS-STALPERS, C., KUIPER, G.G., JENSTER, G., BERREVOETS, C., CLAASSEN, E., VAN ROOIJ, H.C., TRAPMEN, J., BRINKMANN, A.O., MULDER, E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* v. 173, p. 534-540, 1990.
- VISAKORPI, T., KALLIONIEMI, A. C., HEIKKINEN, A., KOIVULA. T., ISOLA, J. Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst*, v. 84, p. 883-887, 1992.
- VISAKORPI, T., KALLIONIEMI, A. H., SYVÄNEN, A. C., HYYTINEN, E. R., KARHU, R., TAMMELA, T., ISOLA, J. J., KALLIONIEMI, O. P. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, v. 55, p. 342-347, 1995.

- VISAKORPI, T., HYYTINEN, E., KALLIONIEMI, A., ISOLA, J., KALLIONIEMI, O.P. Sensitive detection of chromosome copy number aberrations in prostate cancer by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Pathol*, v. 145, p. 624-630, 1994.
- VOCKE C.D., POZZATTI, R.O., BOSTWICK, D.G., FLORENCE, C.D., JENNINGS, S.B., STRUP, S.E., DURAY, P.H., LIOTTA, L., EMMERT-BUCK, M.R., LINEHAN, W.M. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res*, v. 56, p. 2411-2416, 1996.
- VOELLER, H.J., WILDDING, G., GELMANN, E.P. *v-H-ras* expression confers hormone independent growth to LNCaP prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* v. 5, p. 209-216, 1991.
- WANG, R.Y., TRONCOSO, P., PALMER, J.L., EL-NAGGAR, A .K., LINAG, J.C. Trisomy by dual-color fluorescence *in situ* hybridization: A potential biological marker for prostate cancer progression. *Clinical Cancer Res*, v. 2, p.1553-1558, 1996.
- WEBB, H.D., HAWKINS, A.L., GRIFFIN, C.A. Cytogenetic abnormalities are frequent in uncultured prostate cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 88, p. 126-132, 1996.
- WEIJERMAN, P. C., KÖNIG, J. J., WONG, S. T., NIESTERS, H. G. M., PEEHL, D. M. Lipofection-mediated immortalization of human prostatic epithelial cells of normal and malignant origin using human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Res*, v. 54, p.5579-5583, 1994.
- WHARTON, K.A., YEDVOBNICK, B., FINNERTY, V.G., ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in *D. melanogaster*. *Cell*, v. 40, p. 55-62, 1985.
- WHITTEMORE, A.S., KOLONEL, L.N., WU, AH., JOHN, E.M., GALLAGHER, R.P., HOWE, G.R., BURCH, J.D., HANKIN, J., DREON, D.M., WEST, DW., Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada, *J Natl Cancer Inst* ,v. 3, p. 652-661, 1995.
- WULLICH, B., BREITKRUIZ, T., ZWERGEL, T., UNTEREGGER, G., SEITZ, G., ZANG, K.D. Cytogenetic evidence of intratumoral focal heterogeneity in prostatic carcinomas. *Urol Int*, v. 48, p. 372-377, 1992.
- WYNDER, E.L., MABUCHI, K., WHITMORI, Jr, W.F. Epidemiology of cancer of the prostate. *Cancer*, v. 28, p. 344-360, 1971.
- YEH, S., CHANG. C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA₇₀, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 93, p. 5517-5521, 1996.

- YEH, S., MIYAMOTO, H., NISHIMURA, K., KANG, H., LUDLOW, J., HSIAO, P., WANG, C., SU, C., CHANG, C. Retiniblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 20, p. 361-367, 1998.
- ZENKLUSEN, J.C., THOMPSON, J.C., TRONCOSO, P., KAGAN, J., CONTI, C.J. Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: A possible tumor suppressor gene at 7q31.1. *Cancer Res*, v. 54, p. 6370-6373, 1994.
- ZETTERBERG, A., FORSSLUND, G. Ploidy level and tumor progression in prostatic carcinoma. *Acta Oncol*, v. 30, p. 193-199, 1991.
- ZITZELSBERGER, H., SZUCS, S., ROBENS, E., WEIER, H.U., HOFER, H., BAUCHINGER, M. Combined cytogenetic and molecular genetic analyses of fifty-nine untreated human prostate carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 90, p. 37-44, 1996.





unesp