

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

ELIANE ANTONIOLI

**“COMPORTAMENTO DA CÉLULA MUSCULAR LISA DA
PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS APÓS PRIVAÇÃO
ANDROGÊNICA IN VIVO E SOB
ESTIRAMENTO MECÂNICO IN VITRO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eliane Antonioli
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

[Assinatura]
Orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Campinas, 2007.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C253c	<p>Antonioli, Eliane Comportamento da célula muscular lisa da próstata ventral de ratos após privação androgênica <i>in vivo</i> e sob estiramento mecânico <i>in vitro</i> / Eliane Antonioli. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Próstata. 2. Célula muscular lisa. 3. Castração. 4. Estiramento mecânico. I. Carvalho, Hernandes Faustino de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Smooth muscle cell behavior of rat ventral prostate after androgen deprivation *in vivo* and mechanical stretch assay *in vitro*.

Palavras-chave em inglês: Prostate; Smooth muscle cell; Castration; Mechanical stretch.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Hernandes Faustino de Carvalho, Miguel Arcanjo Áreas, Edson Rosa Pimentel, Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, Renee Laufer Amorim.

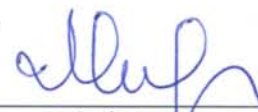
Data da defesa: 10/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 10 de agosto de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Orientador)



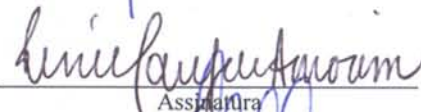
Assinatura

Prof. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves



Assinatura

Prof. Dra. Renée Laufer Amorim



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



Assinatura

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Assinatura

Prof. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Assinatura

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis".

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Sou uma pessoa muito feliz, pois estou cercada de muitos amigos que me ajudaram imensamente a concluir este trabalho, sou eternamente grata a todos que de uma forma ou outra colaboraram comigo. É difícil expressar em palavras os sentimentos, porém gostaria de deixar registrada a importância das pessoas que me acompanharam durante o período do meu doutorado.

Hernandes, meu mestre, foram 6 anos e meio de convivência, aprendi muito com você durante esse período e sou muito grata por ter auxiliado a tornar-me uma profissional melhor, obrigada pela oportunidade de trabalho e todo apoio fornecido.

Quero deixar registrada a minha eterna gratidão aos amigos do laboratório, que estavam sempre dispostos a me ajudar: Taize, sempre pronta a me ajudar com os blottings e com os textos, muito obrigada; Danilo, muito obrigada pelos inúmeros géis que você montou; Alexandre, muito obrigada pela ajuda com as imagens e com as sugestões de correções do projeto de qualificação; Liliam, muito obrigada pela compreensão quanto ao uso da sala de cultura e por deixar o material organizado, desculpe não ter ajudado muito nesses momentos finais; Iênê, seus conselhos e sugestões me ajudaram muito a persistir e a me organizar, muito obrigada pelo tempo que você dedicou a mim; Elusa, Andréia, Henrique, Thiago, obrigada por ter tornado a convivência mais agradável; Tati, Sheila, Karina, Aninha, Klélia obrigada pelos momentos de atenção e pelas nossas conversas, sempre me dando força para concluir mais esta etapa.

Manuel e Heloísa, mesmo não tendo participado desta etapa final, a amizade de vocês foi muito importante, sem contar a grande ajuda que recebi de vocês durante todo o percurso até aqui, muito obrigada pelos bons momentos que passamos juntos e pela amizade que ficou.

Silvia, já éramos amigas, mas o fato de vivenciarmos juntas essa etapa final nos aproximou mais ainda, considero você uma grande companheira, agradeço muito pela sua

valiosa amizade. Muito obrigada pela ajuda com os experimentos, pelas conversas, pelo consolo, por tudo.

Aos amigos que fiz no departamento de Biologia Celular, desculpe não listar os nomes, pois são muitos, foram bons momentos que passamos juntos e levo todos comigo, é muito bom saber que deixo muitos amigos aqui.

Aos amigos que fiz em outros departamentos e instituições, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e a amizade que foi o melhor resultado. Em especial agradeço Natália, Talita e Bel, muito obrigada pela ajuda e pelas conversas.

Sou grata a Líliam Panagio, secretária do programa de pós-graduação pela sua exemplar competência e sua paciência em me auxiliar com a documentação, especialmente nessa etapa final, muito obrigada.

Aos professores que cederam seu laboratório para a execução de parte dos meus experimentos, em especial aos professores Kléber Franchini, Aníbal Vercessi, Helena Nader, muito obrigada pela disposição e confiança.

Um agradecimento especial aos professores Sérgio L. Felisbino, Carmen V. Ferreira e Miguel A. Áreas pela disponibilidade e rapidez com que fizeram a análise prévia desse trabalho.

Não existem palavras que possam expressar a minha gratidão por você, Fábio, meu grande amigo, companheiro, você foi o meu porto seguro, sempre me ajudando e me dando força. Você sabe que parte do título é seu e só não desisti porque você estava sempre ao meu lado, muito obrigada por tudo, te amo!

Lucas, o fruto do meu grande amor, que me trouxe muita alegria, amor, paz e momentos maravilhosos, você também foi muito importante nesta etapa, pois seu carinho sempre compesca tudo, te amo filho!

Meus pais amados, Eloi e Maria, vocês foram essenciais nesta etapa, me fornecendo apoio, carinho, muito obrigada pela grande ajuda e por me mostrar em que eu conseguiria e que vocês sempre estariam ao meu lado, amo vocês!

Sumário

Resumo.....	08
Abstract.....	09
I. Introdução.....	10
1.1. Desenvolvimento prostático.....	10
1.2. Composição celular da próstata.....	14
1.3. Célula Muscular Lisa Prostática (CML).....	17
1.3.1. A célula muscular lisa e sua modulação fenotípica.....	18
1.3.2. A célula muscular lisa prostática e hormônios esteróides.....	22
1.4. Contração do músculo liso.....	24
1.5. Atividade contrátil da próstata.....	26
1.6. Efeito da castração sobre as células prostáticas.....	27
1.6.1. A matriz extracelular prostática e sua remodelação frente à castração.....	30
II. Objetivos.....	33
III. Artigos.....	34
3.1. Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate.	35
3.2. Cyclic but not static mechanical stretch induces prostatic smooth muscle cell hypertrophy.	43
IV. Considerações Finais.....	65
V. Referências Bibliográficas.....	67
VI. Declaração Comitê de Ética.....	81

Resumo

As células musculares lisas (CML) são o principal componente do estroma prostático e desempenham um importante papel na manutenção da fisiologia do órgão, atuando na contração durante a ejaculação, na sua remodelação frente a neoplasias e/ou privação androgênica, na produção de fatores parácrinos e na síntese/degradação/reorganização da matriz extracelular, segundo um intrincado mecanismo de comunicação com as células epiteliais. Além disso, tem sido também proposto que a invasão tumoral depende de uma participação ativa das células estromais, inclusas as CML, na produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e/ou seus inibidores dentre outros fatores. O presente estudo investigou a expressão dos marcadores de músculo liso na próstata ventral de ratos após longo período de castração. Em outra frente de investigação foi analisado o efeito do estiramento mecânico no comportamento das CML *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que as CML são afetadas pela privação androgênica. Embora demonstrem mudanças morfológicas, estas células expressam marcadores de músculo liso em nível de proteína (α -actina e cadeia pesada da miosina de músculo liso) e de RNAm (*smoothelin*, sm22 e calponina). Estes resultados suportam a idéia de que CML prostática pode modular o seu fenótipo (contrátil vs. sintético) sem alterar o estado de diferenciação. Sabe-se que a função primária das CML prostáticas está relacionada à contração do órgão e que isto impõe uma deformação mecânica sobre estas células. Por esta razão, resolveu-se investigar se haveria modulação do seu comportamento frente ao estiramento *in vitro*, sob condições controladas. Foi demonstrado que as CML diminuem a atividade proliferativa em resposta ao estiramento cíclico da mesma forma que ao estiramento estático. Em relação à expressão de proteínas relacionadas à atividade contrátil (α -actina e cadeia pesada da miosina de músculo liso), os resultados obtidos indicam que as CML respondem ao estiramento cíclico com um aumento na concentração destas proteínas o que poderia indicar hipertrofia celular, o que foi confirmado pela quantificação do conteúdo de F-actina por citometria de fluxo. Este efeito não foi observado frente ao estiramento estático. Os dois conjuntos de dados confirmam que as CML apresentam grande versatilidade fenotípica, respondendo de formas diferentes não somente a estímulos hormonais, mas também a variação na demanda funcional.

Abstract

Smooth muscle cells (SMC) are the main component of the prostatic stroma and play important roles in the organ physiology, acting on the contraction associated with ejaculation and on the remodeling related to neoplasias or androgen deprivation, on the production of paracrine factors and the synthesis/degradation/reorganization of extracellular matrix components, after an intricate mechanism of intercommunication with epithelial cells. Besides, it has been proposed that tumor invasion depends on the active participation of stromal cells, including SMC, on the production of MMPs and/or their inhibitors among other factors. The present study investigated the expression of smooth muscle markers on the rat ventral prostate after long term androgen deprivation. Another set of experiments were designed to study the effect of mechanical stretching on SMC behavior in culture. The results demonstrated that SMC are affected by androgen deprivation. Even though the SMC exhibited morphological changes, they kept the expression of smooth muscle markers at the protein (SM α -actin and SM-MHC) and mRNA levels (smoothelin, sm22 and calponin). These results reinforce the idea that prostatic SMC modulate their phenotype (contractile vs. synthetic) without compromise the differentiation state. It is well known that the primary function of the SMC is the organ contraction and that it subjects the cells to mechanical deformation. For this reason, it was decided to test whether SMC modulate their behavior in response to mechanical stretching *in vitro* under controlled conditions. It was demonstrated that both cyclic and static mechanical stretches decrease SMC proliferation. On the other hand, cyclic stretching increased the concentration in SM-MHC and SM α -actin that could be associated with cell hypertrophy. To confirm this hypothesis, the F-actin content was measured through the intensity of FITC-phalloidin labeling by flow cytometry at the single cell level. The results confirmed that cyclic stretching caused a significant increase in cytoskeleton mass, what is compatible with cell hypertrophy. This effect was not observed after static stretching. The two sets of results confirm that SMC exhibit great phenotypical versatility, responding not only to hormonal stimuli, but also to functional demands.

I. Introdução

1.1. Desenvolvimento prostático

A próstata é uma glândula exócrina do aparelho reprodutor que contribui com uma fração importante do líquido seminal e com a capacitação e sobrevivência dos espermatozoides, fornecendo íons, lipídios estruturais de membrana, substâncias imunossupressoras e anti-inflamatórias. A próstata é considerada um órgão contrátil, sendo que as secreções prostáticas são estocadas nos ácinos e liberadas para a uretra na ejaculação, pela contração das células musculares lisas (CMLs).

O motivo para a investigação da regulação do crescimento e fisiologia prostática dá-se pela existência de algumas complicações patológicas que afetam essa glândula, sendo sítio de inflamação e de alterações proliferativas benignas e malignas, que ocorrem principalmente com o envelhecimento (Men et al., 2001).

O desenvolvimento da glândula prostática em roedores é iniciado no final da gestação, conforme os brotos prostáticos emergem do seio urogenital (SUG). Em contraste aos humanos, a glândula sofre extensiva ramificação e diferenciação celular durante o período pós-natal (Sugimura et al., 1994), sendo que seu desenvolvimento finaliza-se na maturidade sexual (Hamilton et al., 1959).

O SUG, subdivisão da cloaca embrionária, é estruturado por uma camada epitelial derivada do endoderma, envolvida por uma camada mesenquimal de origem mesodérmica. Em camundongos, tanto machos como fêmeas, o SUG surge 13 dias após a concepção (Hamilton et al., 1959; Marker et al., 2003). Entretanto, os SUGs de ambos os sexos são indistinguíveis morfológicamente até aproximadamente 17,5 dias após a concepção, quando a morfogênese prostática se inicia, em um processo que depende do aparecimento do andrógeno circulante que é produzido pelos testículos fetais (Wilson et al., 1981; Marker et al., 2003).

O evento inicial da morfogênese prostática é o crescimento de cordões sólidos da região epitelial do SUG em direção ao mesênquima adjacente (Aümuller, 1979), o qual é invadido como resultado de uma intensa atividade proliferativa (Sugimura et al., 1986a). Os passos subsequentes como a morfogênese ductal, canalização (surgimento do lúmen), diferenciação celular epitelial e

estromal, também dependem da estimulação androgênica e ocorrem frente a um aumento perinatal transitório na concentração de testosterona (Corbier et al., 1995).

O processo de ramificação dos cordões epiteliais acontece durante as duas primeiras semanas de vida, quando se bifurcam em ramos laterais, originando, três diferentes pares de lóbulos prostáticos bilateralmente simétricos, denominados: próstata ventral (PV), próstata dorsolateral (PDL) e glândula de coagulação ou próstata anterior (GC ou PA) (Aümuller, 1979) (Fig. 1).

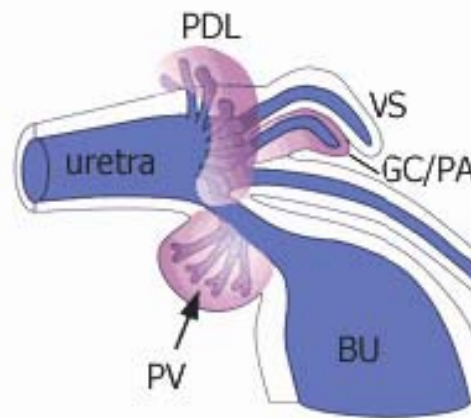


Fig. 1. Esquema do trato urogenital de rato macho ao nascimento. (PV) próstata ventral, (PDL) próstata dorsolateral, (GC/PA) glândula de coagulação ou próstata anterior e (VS) vesícula seminal e (BU) bexiga urinária (modificado de Thomson et al., 2002).

Tanto o epitélio do SUG como os brotos prostáticos não expressam receptores para andrógenos funcionais em níveis detectáveis, enquanto o mesênquima do SUG e o mesênquima da próstata em formação apresentam grande quantidade destes receptores. Portanto, o primeiro tecido alvo de andrógenos é o mesênquima do seio urogenital, que direciona o brotamento, a ramificação e a diferenciação epitelial por intermédio de fatores parácrinos. Por outro lado, o epitélio em desenvolvimento induz a diferenciação e o padrão morfológico de desenvolvimento do músculo liso. Desse modo, essa interação entre epitélio e mesênquima/estroma é bidirecional (Cunha et al, 1987). Isto sugere que a ação dos andrógenos na morfogênese prostática deva ser indireta, atuando via mesênquima, uma vez que parte significativa do crescimento epitelial e da ramificação dos dutos, dependente do estímulo androgênico, ocorre na fase em que as células epiteliais não apresentam receptores para andrógenos funcionais (Donjacour & Cunha, 1988).

Conforme os cordões epiteliais “se canalizam” o epitélio se reorganiza em duas populações celulares distintas: uma camada descontínua de células epiteliais basais ao longo da lâmina basal, e uma população de células luminais colunares altas (Hayward et al., 1996). Já as células mesenquimais diferenciam-se em uma camada de célula muscular lisa que envolve as estruturas epiteliais (Hayward et al., 1996) (Fig. 2).

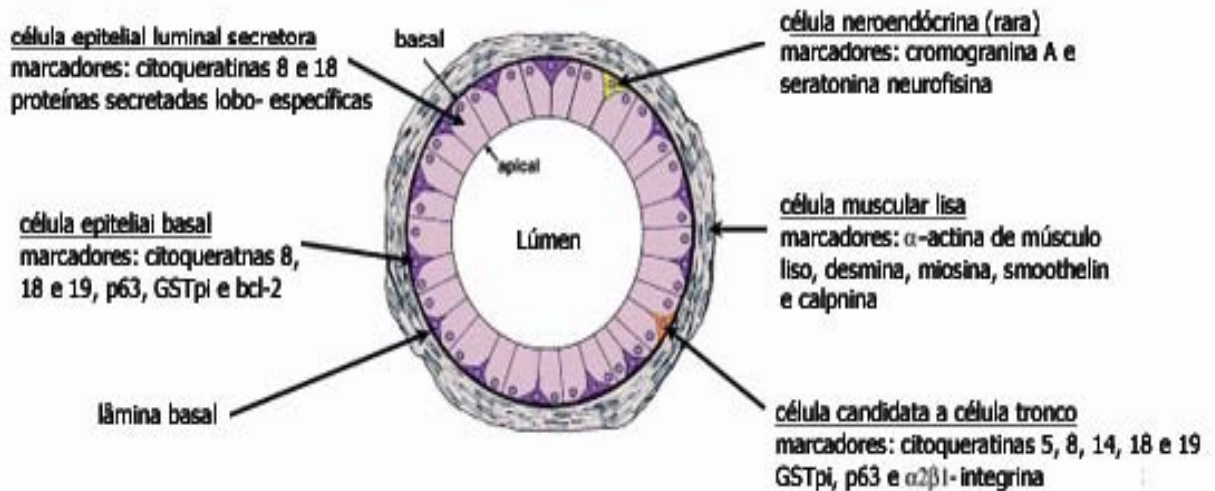


Fig.2. Diagrama de corte transversal de um ácino prostático é mostrado com setas indicando os tipos celulares que estão presentes e seus respectivos marcadores. Modificado de Marker et al. (2003).

Estudos demonstraram que existe uma clara correlação entre os níveis de testosterona sérica e os eventos relacionados com o desenvolvimento pós-natal, propondo o seguinte esquema representativo dos diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos, da primeira até a décima segunda semana de vida (Vilamaior et al., 2006). (Fig. 3).

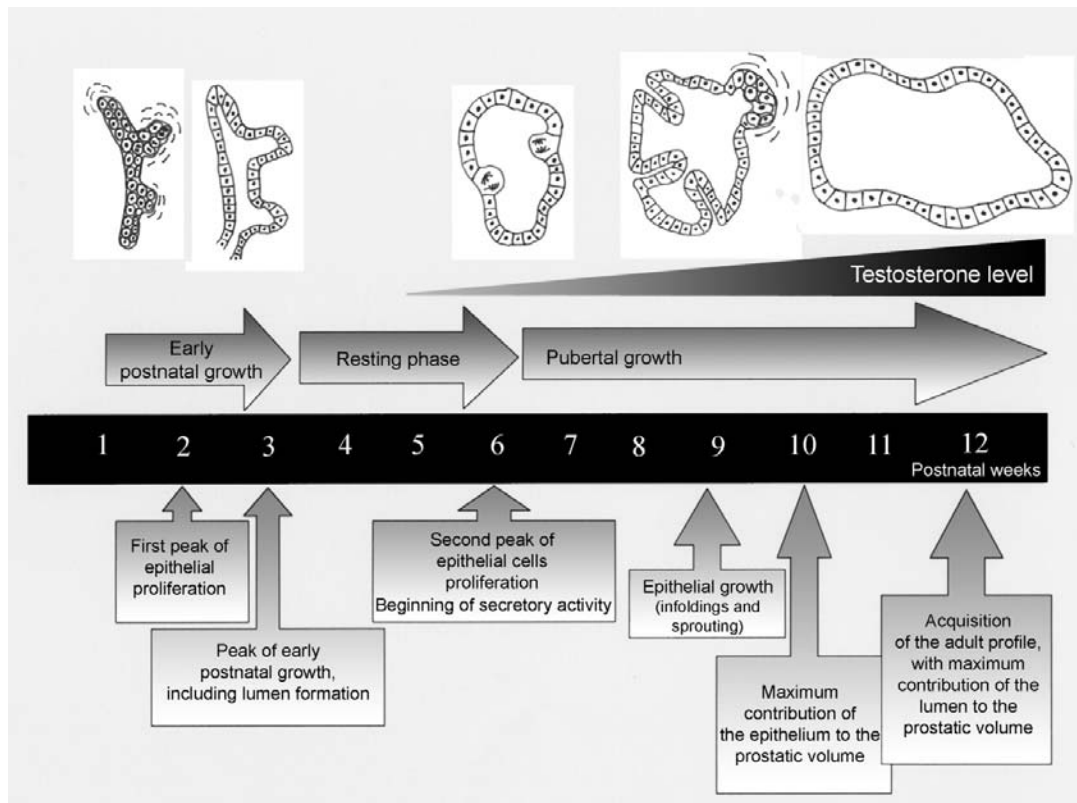


Fig. 3. Esquema representativo dos estágios do desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos da 1ª à 12ª semana, destacando os principais eventos de cada fase do desenvolvimento (Vilamaior et al., 2006).

Segundo análises de Vilamaior et al. (2006), na segunda e sexta semanas de vida, observam-se dois principais picos de proliferação celular. O primeiro pico precede a formação da luz glandular e o segundo precede o aumento da atividade secretora. Entre a primeira e a segunda semana existe uma clara alteração do epitélio e do estroma para a formação do lúmen. Na terceira semana observa-se uma alteração nas células epiteliais, tornando mais visível a região ocupada pelo complexo de Golgi, onde também se observa um acúmulo de secreção no lúmen. Entre a quarta e sexta semana, não foram observados eventos marcantes, considerando-se essa uma fase de repouso. O primeiro aumento dos níveis de testosterona sérica foi observado na sexta semana, atingindo os níveis mais altos a partir da nona semana.

A morfogênese prostática culmina com o desenvolvimento de uma glândula madura composta de células epiteliais secretoras e CMLs contráteis (Cunha et al., 2004). O início do crescimento prostático aparece na puberdade, onde existe um maior aumento no peso seco da

próstata e no número de ramificações dos dutos (Sugimura et al., 1986). Estes dados sugerem que a próstata é mais sensível a baixos níveis de testosterona quando está se desenvolvendo (surgimento das ramificações dos dutos). Porém, quando é exposta a maior concentração de andrógenos (puberdade), a próstata responde de uma maneira diferente da anterior, incrementando seu peso seco (Hayward e Cunha, 2000).

1.2. Composição celular da próstata

A próstata é composta por um conjunto de estruturas epiteliais túbulos-alveolares, que encontram-se envolvidas por um denso estroma fibromuscular (Hayward & Cunha, 2000, Aümuller, 1979).

Em roedores, a próstata é subdividida em lobos morfológicos e bioquimicamente distintos, nomeados de acordo com sua localização anatômica: dorsal, lateral e ventral. Cada lobo tem características histológicas distintas e expressam diferentes grupos de proteínas secretoras (Hayashi et al., 1991, Cunha et al., 2004). A figura 4 apresenta um esquema da próstata de rato em vista anterior e posterior.

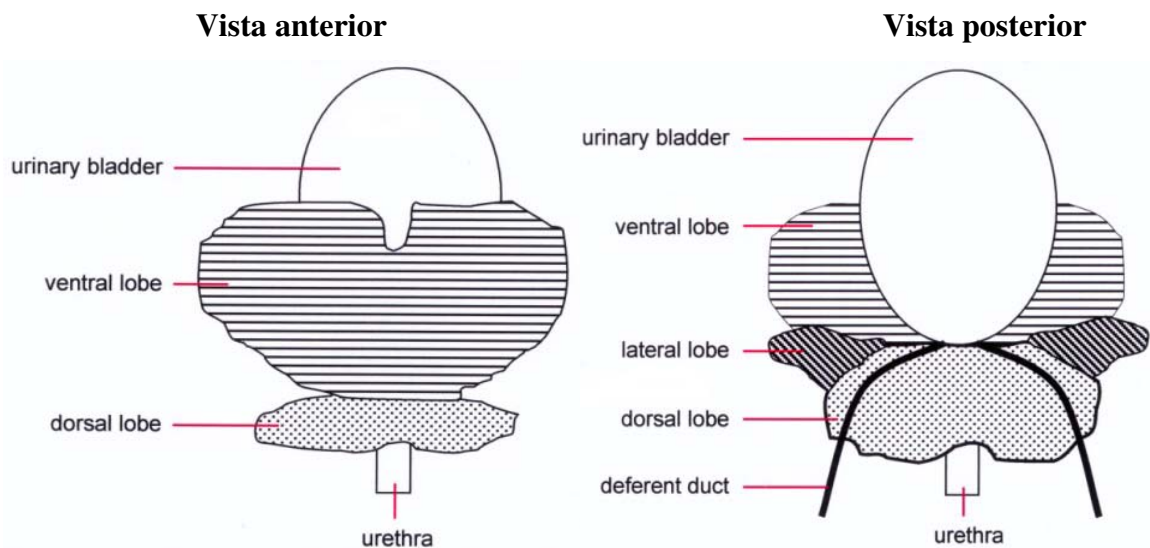


Fig. 4: Esquema anatômico da próstata ventral de ratos demonstrando a sua localização em relação à bexiga urinária e uretra. Ilustra também a divisão da próstata em lobos: ventral, lateral e dorsal. (Kittel et al., 2004).

Na próstata ventral de rato, cada lóbulo prostático consiste de oito conjuntos de dutos que se originam a partir da uretra como uma estrutura tubular simples que se ramifica distalmente. Esse conjunto de dutos é dividido em três regiões morfológica e funcionalmente distintas: distal, intermediária e proximal, de acordo com sua posição em relação à uretra (Lee et al., 1990; Shabsigh et al., 1999).

Na região distal, são encontradas células epiteliais colunares altas capazes de produzir os componentes da secreção prostática e com alta atividade proliferativa. As células epiteliais são circundadas por uma camada esparsa e descontínua de células musculares lisas, associadas a um grande número de fibroblastos (Nemeth & Lee, 1996). Essa distribuição das células estromais pode estar associada com o crescimento da população de células epiteliais (Lee et al., 1990; Prins et al., 1991; Nemeth & Lee, 1996).

Na região intermediária, as células epiteliais também são colunares altas, possuem características morfológicas e funcionais semelhantes à porção distal. Entretanto, são pouco proliferativas. Nesta região, a camada de células musculares lisas é fina e contínua. Em ambas as regiões foram observadas poucas células em apoptose (Lee et al., 1990; Nemeth & Lee, 1996).

No entanto, na região proximal, as células epiteliais são cúbicas e baixas, onde observam-se células apoptóticas frequentemente. Nessa região as células musculares lisas estão dispostas em uma camada espessa, o que provavelmente está relacionado com a ejeção da secreção prostática durante a ejaculação. Tanto na região intermediária como na proximal, os componentes fibrosos estão presentes no espaço entre os dutos e, ocasionalmente, intercalam a camada de células musculares lisas. Estes arranjos assumidos pelas células estromais podem estar relacionados com o comportamento das células epiteliais (Nemeth & Lee, 1996) (Fig. 5).

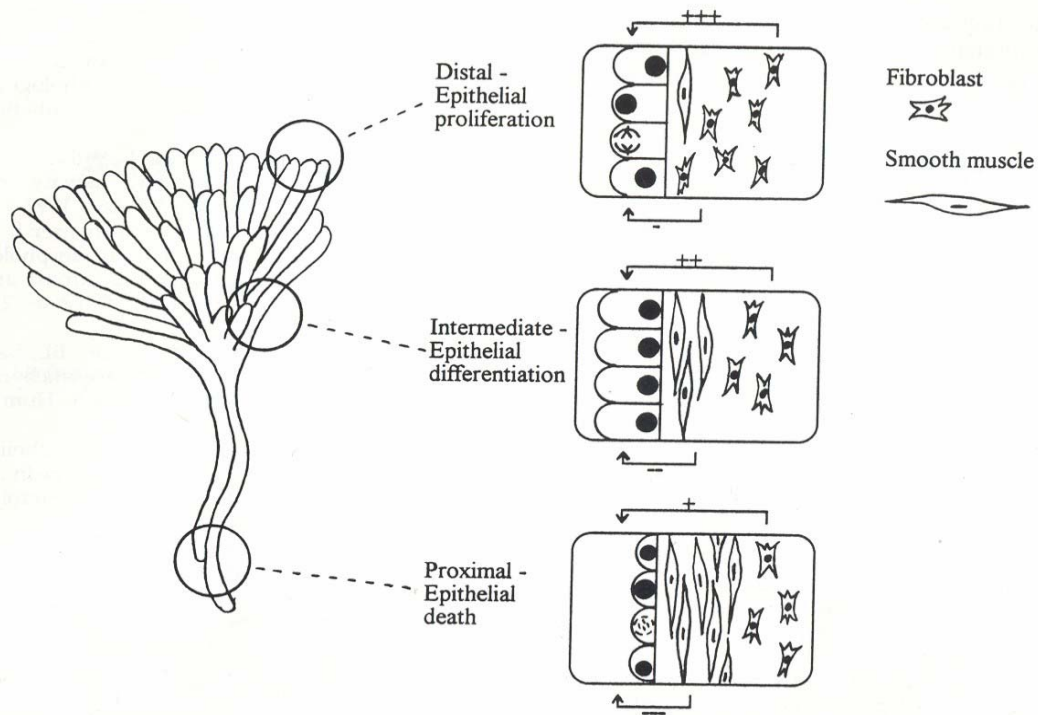


Fig. 5. Esquema demonstrativo do sistema ductal. Na região distal, abundantes fibroblastos colaboram com a produção de fatores que induzem a proliferação epitelial. O aumento de células musculares lisas na região intermediária pode bloquear estes fatores ou produzir fatores inibitórios do epitélio, colaborando com a diferenciação deste. Altos níveis de fatores inibitórios produzidos pelas células musculares lisas na região proximal provavelmente induz a morte das células epiteliais (Nemeth & Lee, 1996).

O compartimento estromal prostático é uma organização complexa de células e matriz extracelular (MEC). Os tipos celulares encontrados no estroma prostático incluem fibroblastos, macrófagos teciduais, células endoteliais vasculares e as células musculares lisas. A MEC é composta de fibras de colágeno, proteoglicanos, entre outras moléculas que se associam a fatores de crescimento, moléculas regulatórias e enzimas remodeladoras. Esses componentes, células e MEC atuam de maneira coordenada para regular as funções celulares e manter a homeostase tecidual (Tuxhorn et al., 2001).

As células prostáticas respondem a uma variedade de fatores esteróides e não esteróides e produzem uma grande variedade de fatores de crescimento, que combinados criam um ambiente glandular ótimo assegurando o equilíbrio (Daves & Eaton, 1991). Múltiplas vias de transdução de sinal influenciam na ação esteróide. Tipicamente estas vias levam ao aumento da resposta ao andrógeno ou à ativação do receptor independente do ligante (Gerdes et al., 1998).

1.3. Célula Muscular Lisa Prostática (CML)

A CML é a principal componente celular do estroma prostático e além de ocupar um grande volume no estroma prostático e ser responsável pela contração da glândula durante a ejaculação, desempenha funções importantes, criando um ambiente propício para a manutenção do epitélio, seja em situações normais ou patológicas.

Sugere-se que as CMLs participam do desenvolvimento prostático pela regulação da interação do mesênquima com o epitélio durante o processo de indução prostática (Thomson et al., 2002). A porção ventral do mesênquima do SUG é uma área condensada separada do epitélio uretral por uma camada de CMLs diferenciadas (Thomson et al., 2002). Esta camada menos desenvolvida em ratos machos, permite que os cordões de origem epitelial mantenham o contato necessário com o mesênquima do SUG para que aconteça subsequente morfogênese (Thomson et al., 2002). Nas fêmeas, como a camada de músculo liso é contínua, o mesênquima do SUG fica isolado da uretra tornando raro o aparecimento de cordões epiteliais. Sendo assim, as CMLs podem agir como um regulador da elongação dutal prostática e morfogênese da ramificação (Thomson et al., 2002; Cunha et al., 2004) (Fig 6).

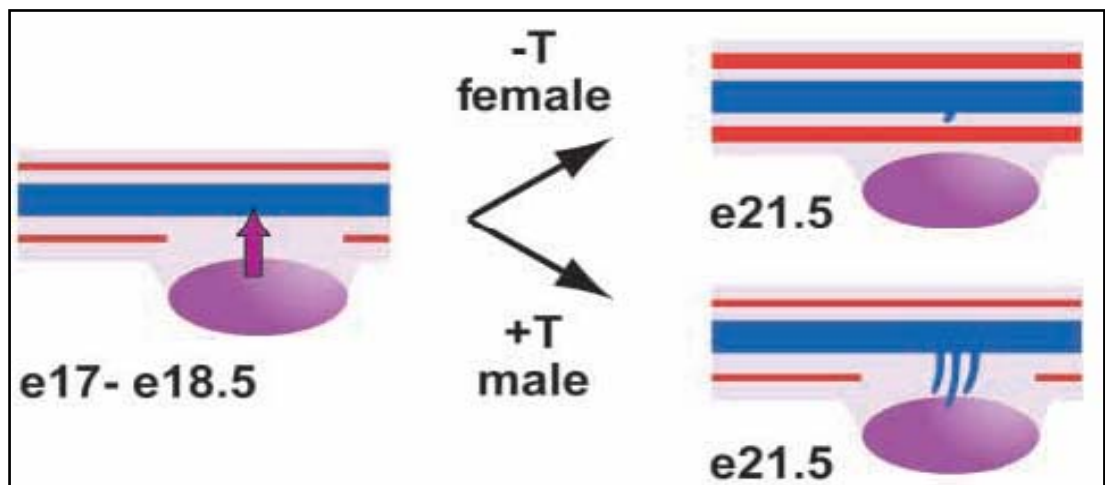


Fig. 6. Modelo representativo da indução da próstata ventral de ratos. A camada muscular (vermelho) é descontínua nos machos, permitindo a interação entre o mesênquima urogenital (MUG) (roxo) e o epitélio (azul) (e21.5- idade gestacional), enquanto nas fêmeas, esta camada muscular é contínua, isolando o MUG, e impedindo assim a formação dos cordões epiteliais (e21.5-idade gestacional) mesmo na presença de testosterona. e17-e18.5 (idade gestacional que ocorre a interação entre mesênquima e epitélio) (Thomson et al., 2002).

1.3.1. A célula muscular lisa e sua modulação fenotípica

As CML representam 22% da área total da próstata humana (Shapiro et al, 1992), predominando ao redor dos dutos, onde se encontram em íntimo contato com a lâmina basal das células epiteliais. Já na próstata ventral de ratos, as CMLs ocupam 5% do volume total da glândula e cerca de 14% do estroma (Antonioli et al., 2004). As CMLs têm um papel preponderante no controle da morfogênese prostática (Chrisman & Thomson, 2004) e nos mecanismos de estimulação parácrina, especialmente sobre o epitélio (Farnsworth, 1999).

O citoesqueleto das CMLs é composto de filamentos de actina, filamentos intermediários e proteínas associadas. Os filamentos intermediários localizam-se com uma subpopulação de feixes de filamentos da actina distinta do aparelho contrátil (North et al., 1994) e estão relacionados com manutenção da forma da CML (Small et al., 1977). Os filamentos de actina do citoesqueleto são ancorados nas adesões focais, que atuam como um reforço sob a superfície da CML (Small et al., 1985). A organização geométrica destas disposições assegura que a tensão contrátil seja distribuída uniformemente sobre a matriz extracelular.

A remodelação do citoesqueleto de actina é vista como um evento central na regulação da contração do músculo liso. As rho-GTPases e proteínas associadas, desempenham um importante papel na organização dos filamentos de actina nas fibras de estresse e na diferenciação das CML, auxiliando na estabilização e desestabilização de proteínas que interagem com os filamentos de actina (Doevendans & van Eys, 2002).

As CMLs apresentam grande plasticidade funcional (Owens, 1995, Worth et al., 2001; Owens et al., 2004), sendo capaz de modular o seu fenótipo frente a diferentes situações fisiológicas e patológicas, o que é caracterizado pela mudança na expressão de genes específicos.

Esta plasticidade celular permite as CMLs apresentarem dois fenótipos: um sintético (desdiferenciado e/ou proliferativo) e um contrátil (diferenciado). O processo de diferenciação é, ao contrário das células musculares estriadas, reversível, um fenômeno referido como modulação, caracterizado pela expressão de proteínas específicas (van der Loop et al, 1996; Owens, 2004). Os eventos envolvendo a diferenciação ou desdiferenciação das CMLs são numerosos, incluindo vias dependentes de citocinas e fatores de crescimento (Doevendans & van Eys, 2002).

Uma das principais deficiências nos estudos que investigam o papel da mudança fenotípica das CMLs é distinguir “marcadores de diferenciação”, os quais indicam o estado

relativo de diferenciação das CMLs, dos “marcadores de linhagem”, que identificam as CMLs dos outros tipos celulares (Owens, 2004).

Até o presente, muitos marcadores das CMLs diferenciadas (fenótipo contrátil) foram descritos, geralmente relacionados com as isoformas do aparelho contrátil do músculo liso. Recentemente, um grupo de marcadores foi proposto como característicos das CMLs diferenciadas: α -actina de músculo liso, calponina, SM22, *smoothelin*, caldesmona, tropomosina (Doevendans & van Eys, 2002; Owens, 2004). Já as proteínas gelsolina, profilina, cofilina e α -actinina são expressas em CMLs sintéticas e atuam regulando o estado polimérico e o comprimento dos filamentos de actina, caracterizando o estado desdiferenciado das CMLs (Doevendans & van Eys, 2002) (Fig. 7). O ideal é conjugar o uso de vários marcadores, juntamente com análise morfológica detalhada das CMLs, tornando mais confiável o reconhecimento de CMLs modificadas que podem perder temporariamente alguns marcadores normais como parte de um processo de injúria/doença (Owens, 2004).

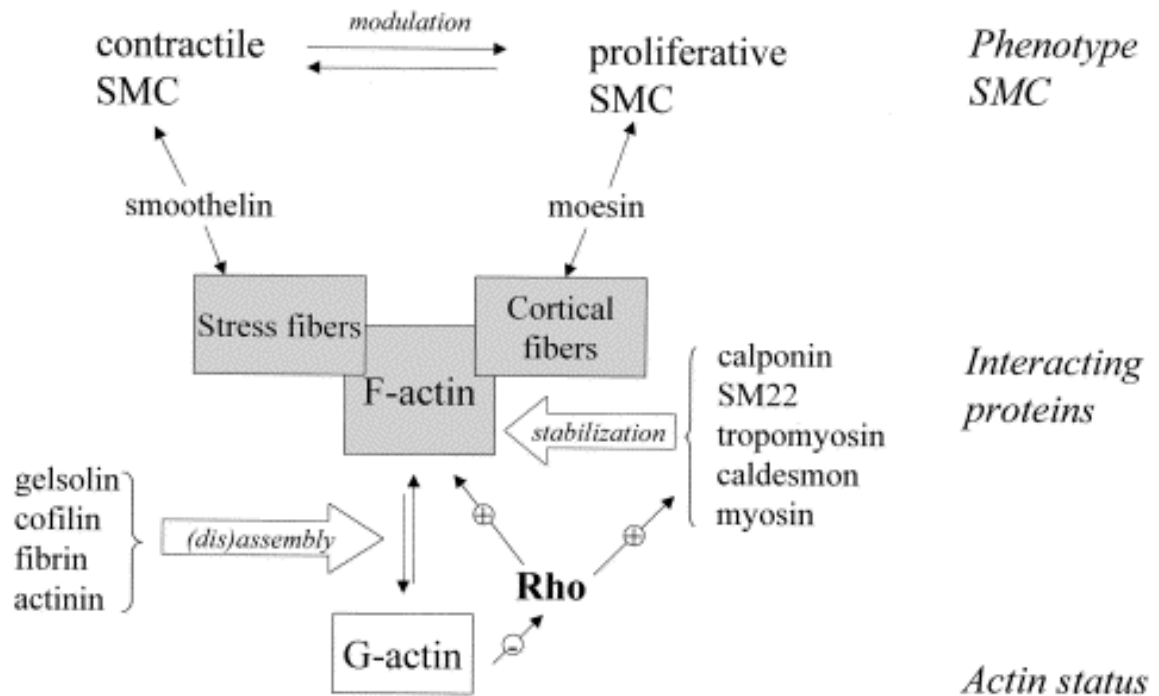


Fig.7. A relação entre o fenótipo da CML e a estrutura física da actina é mediada por proteínas de interação com actina. Um grupo (gelsolin, etc) facilita a polimerização e a desmontagem da actina filamentar. Outro grupo (calponina, etc) estabiliza a actina filamentar. As proteínas, moesin e smoothelin podem ser classificadas como específicas ao fenótipo (Doevendans & van Eys, 2002).

A *smoothelin* é uma proteína considerada um marcador específico da célula muscular lisa em estado tardio de diferenciação, é uma proteína altamente conservada entre os vertebrados e é expressa exclusivamente pelas CMLs contráteis (van der Loop et al., 1996; van Eys et al., 1997). Está associada com as fibras de *stress* de actina, mas não interage com a desmina (van Eys et al., 1997). Duas isoformas da *smoothelin* são produzidas por *splicing* alternativo (van Eys et al., 1997). Uma isoforma de 59 kDa, denominada *smoothelin A*, é expressa em CML do tecido muscular visceral. A outra, de 110 kDa, denominada *smoothelin B*, é expressa exclusivamente por CMLs vasculares.

Além da *smoothelin*, outras proteínas do citoesqueleto, como a calponina e a SM22, são consideradas marcadores altamente específicos para o músculo liso diferenciado, pois estas proteínas representam quase 2% da massa da proteína total da célula em adulto e estão relacionadas com a execução das funções específicas de músculo liso relacionadas aos processos contráteis dependentes de actina (Gimona et al., 2003).

A calponina é uma proteína de 28-34 kDa que interage com a actina filamentar. Szymanski & Tao (1993) demonstraram que a calponina liga-se aos filamentos de miosina não fosforilados *in vitro*. Também foi demonstrado que a calponina estimula, embora ligeiramente, a Mg^{+2} ATPase de miosina não fosforilada na ausência de actina (Lin et al., 1993). A calponina é considerada uma proteína reguladora de cálcio. Itoh et al. (1994) relataram que um fragmento central da calponina (resíduos dos aminoácidos 146-171) estimula a geração de força isométrica em fibras de músculo liso permeabilizados, aumentando a sensibilidade ao Ca^{+2} pelo aparelho contrátil.

Danninger & Gimona (2000) demonstraram a habilidade da calponina em estabilizar filamentos de actina em células vivas. O efeito estabilizante do filamento de actina revela a função da calponina como um supressor do tumor (Leinweber et al., 1999; Horiuchi et al., 1999), pois ela está relacionada com a formação de podossomos. A redução dos níveis endógenos de calponina favoreceria a formação dos podossomos e isto amplificaria o potencial para a migração da célula (Gimona et al., 2003).

SM22 é uma proteína do citoesqueleto de 22-kDa que é expressa abundante e exclusivamente em CMLs viscerais e vasculares durante o desenvolvimento pós-natal. SM22 tem sido variavelmente designada SM22 α (Lees-Miller et al., 1987; Shanahan et al., 1993), *transgelin*

(Lawson et al., 1997), WS3-10 (Thweatt et al., 1992), e p27 (Almendral et al., 1989). Estudos sugerem que a SM22 pode desempenhar um importante papel na organização do citoesqueleto, direta ou indiretamente, regulando a morfologia das CMLs e/ou outros processos que envolvam o citoesqueleto. Zhang et al. (2002) demonstraram que a SM22 decora os filamentos de actina no músculo liso, indicando um papel fisiológico para SM22 na regulação fina do filamento.

Alfa-actina de músculo liso é um excelente marcador de diferenciação das CMLs. Ela é a primeira proteína expressa durante a diferenciação das CMLs durante o desenvolvimento (Frid et al., 1993; Hungerford et al., 1999) e é altamente seletiva para CML em animais adultos sob circunstâncias normais. É uma das proteínas mais abundantes em CMLs diferenciadas, atingindo até 40% das proteínas celulares totais (Fatigati et al., 1984). Entretanto, não é um marcador definitivo de linhagem de CML, pois também é expresso em uma variedade de tipos celulares em determinadas circunstâncias, como durante o desenvolvimento do músculo esquelético e cardíaco (Woodcock-Mitchell et al., 1988), em fibroblastos (ou miofibroblastos) em situações de reparo (Sartore et al., 2001), em células endoteliais durante a remodelação vascular e/ou em resposta ao estímulo do TGF β (Arciniegas et al., 1992; Basson et al., 1992) e em células tumorais (Cintorino et al., 1989; Cintorino et al., 1991).

A expressão da proteína cadeia pesada de miosina de músculo liso (SM-MHC) tem sido extensivamente analisada. A miosina é altamente conservada. Trata-se de uma proteína que interage com actina para gerar a força para o movimento celular (Cheney et al., 1993). Miosinas convencionais são proteínas hexaméricas consistindo de duas subunidades de cadeia pesadas, um par de subunidades de 17 kDa de cadeia leve não fosforilada e um par de subunidades de 20 kDa cadeias leves fosforiladas (Owens, 1995). Três classes de miosinas já foram clonadas: miosinas de músculo liso, miosinas de músculo estriado e miosinas não-musculares (Weiss & Leinwand, 1996). A atividade contrátil no músculo liso é regulada pela fosforilação dependente de cálcio/calmodulina da miosina de cadeia leve pela quinase da miosina de cadeia leve (Horowitz et al., 1996). As cadeias pesadas da miosina contém atividade ATPásica ativada pela actina, a qual gera uma função motora da miosina (Weiss & Leinwand, 1996). As duas isoformas de cadeia pesada de miosina de músculo liso, SM1 e SM2 são geradas por *splicing* alternativo do mesmo gene. SM1 é uma proteína de 204 kDa e SM2, é truncada na extremidade carboxi-terminal, apresentando massa de 200 kDa (Nagai et al., 1989).

Esta plasticidade celular também é observada em CMLs prostáticas de ratos castrados, que se tornam atroficas (Zhao et al., 1992; Holterhus et al., 1993; Vilamaior et al., 2000), sugerindo assim que o fenótipo das CML pode ser modulado por andrógenos.

Smith et al. (1998; 1999; 2000) demonstraram que a norepinefrina e noradrenalina induzem um fenótipo contrátil em células estromais prostáticas, e que esta modulação não é afetada pelos hormônios testosterona e estrógeno. Contrariamente, Zhang et al. (1997) afirmaram que o estradiol acrescentado ao meio de cultura aumenta a expressão de alguns marcadores de músculo liso (miosina e desmina) pelas células estromais prostáticas, que assumem um fenótipo de CML. Por outro lado, Song et al. (1998) sugeriram que o efeito regulador do crescimento pelo estrógeno é dependente do fenótipo das CMLs vasculares. O fenótipo das CMLs também pode ser modulado pela doxazosina, um inibidor alfa-adrenérgico, pois quando adicionado em cultura de células estromais, induz um aumento na expressão de marcadores de CMLs (Boesch et al., 1999; 2000).

Além dos fatores mencionados acima, o fenótipo das CMLs pode ser modulado também por componentes da MEC. Hayward et al. (1995) demonstraram que a CML vascular expressa mais miofilamentos característicos de célula diferenciada quando cultivadas na presença de colágeno IV e laminina. Os glicosaminoglicanos (GAGs) heparam sulfato (HS) e condroitim sulfato (CS) estão em íntimo contato com as CMLs vasculares, participando da modulação fenotípica destas células (Bingley et al., 1998). Há também informações de que o proteoglicano (PG) perlecan (um proteoglicano de HS presente na lâmina basal e a heparina inibem a proliferação das CMLs vasculares *in vitro* (Paka et al., 1999), enquanto outros PGs contendo HS mantêm as CMLs vasculares num estado quiescente, inibindo mudanças fenotípicas e a síntese de DNA (Bingley et al., 1998; Wang and Kovanen, 1999; Paka et al., 1999).

1.3.2. A célula muscular lisa prostática e hormônios esteróides

Em estudos, Prins et al. (1991) identificaram as CMLs como as principais células estromais que expressam receptor de andrógeno (AR), sugerindo sua atuação sobre outras células do estroma prostático de forma parácrina. Segundo estes autores, a expressão de AR por alguns fibroblastos é pouco significativa em relação às CMLs.

A descrição da expressão de AR pelas CML já está bem definida na literatura, porém, as respostas aos andrógenos nas células estromais em cultura são contraditórias. Gerdes et al (1996) isolaram as CMLs (denominada PS1) da próstata ventral de ratos e demonstraram que as mesmas possuem AR e que a proliferação celular é estimulada pelos andrógenos (dihidrotestosterona (DHT) e testosterona). Os autores também observaram uma influência do soro fetal bovino (SFB) em relação ao estímulo hormonal e à localização do AR, pois células cultivadas na presença de SFB não demonstraram aumento de proliferação quando tratadas com andrógenos, além de apresentarem a localização citoplasmática do AR. Estas células quando cultivadas na ausência de SFB apresentaram a localização do AR nuclear independente da presença de andrógenos. Os autores sugeriram que provavelmente um componente do SFB, um possível fator de crescimento, era responsável por esta alteração na localização do AR e sua ação. Investigando estes prováveis fatores de crescimento e sua influência neste tipo celular, Gerdes et al. (1998) demonstraram que o TGF β induz a translocação do AR do núcleo para o citoplasma, sugerindo que há um mecanismo de *cross-talk* entre TGF β e AR, podendo ser importante no direcionamento de eventos regulados por andrógenos no estroma.

Diferentemente, Kassen et al. (1996), estudando células estromais prostáticas humanas, obtidas de amostras de ressecção transuretral, não observaram a influência dos andrógenos na proliferação celular quando as células foram cultivadas na ausência de SFB. Os autores sugeriram que a necessidade de SFB e a influência hormonal observada, está relacionada com a presença de fatores presentes no SFB que, provavelmente, estão relacionados com a produção de sítios para os receptores de dihidrotestosterona (DHT), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento transformante beta (TGF β). Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o TGF β apresentou um efeito inibitório em relação à proliferação celular, quando administrado na presença de SFB, sugerindo que o TGF β pode ter um importante papel no controle do crescimento prostático relacionado com o envelhecimento.

Janssen et al. (2000) identificaram receptor de andrógeno (AR) e receptor de estrógeno (ER) nas células estromais prostáticas humanas isoladas de amostras obtidas de ressecção transuretral. Porém, os autores não observaram influência da administração de DHT, estrógeno e flutamida (inibidor do AR) na proliferação celular, o que pode ser resultado da influência do SFB no meio de cultivo.

Recentemente, Gerdes et al. (2004), em estudo com as células citadas acima, demonstraram que a adição de DHT e TGF β separadamente promove a miodiferenciação destas células, reforçando a idéia de que possa existir um mecanismo de *cross-talk* entre andrógenos e TGF β afetando a proliferação e miodiferenciação das células musculares lisas prostáticas.

Em estudo sobre a ação do estrógeno nas CMLs, Victorio (2006) demonstrou que o tratamento com estrógeno causa alterações nos níveis de expressão protéicos do AR, sem apresentar alteração nos níveis de RNAm e sugeriu-se que o efeito do estrógeno na proteína é causado pelo aumento de proteólise, não alterando a expressão ou ativação do AR.

A expressão de ER, bem como sua influência nas células estromais prostáticas ainda é contraditória, pois alguns autores demonstraram a ausência destes receptores e/ou respostas frente ao estrógeno (Takeda et al, 1990; Levine et al, 1992; Janssen et al, 2000) enquanto outros demonstraram efeitos estimulatórios em relação à proliferação (Collins et al, 1994) e outros efeitos, como a influência na expressão de marcadores de CML como já descrito acima (Zhang et al, 1997).

1.4. Contração do músculo liso

A atividade contrátil do músculo liso é dependente de Ca⁺², podendo ser controlada por inúmeros fatores incluindo hormônios, nervos autonômicos e uma variedade de drogas. Porém, os potenciais de ação no músculo liso são altamente variáveis e nem sempre necessários para iniciar a contração. Além disto, vários agentes podem aumentar a concentração do Ca⁺² intracelular, e consequentemente contrair o músculo liso, sem alterar o potencial da membrana.

As contrações do músculo liso são determinadas pelas atividades das quinases, das miosinas de cadeia leve e de fosfatase miosina de cadeia leve (MLCP), as quais são reguladas pelos níveis de Ca⁺² citosólico das CMLs (Somlyo et al., 1999). A estimulação adrenérgica do músculo liso promove a liberação de Ca⁺², formando um complexo com calmodulina ativando as quinases da miosina de cadeia leve, que fosforilam miosinas de cadeia leve, culminando com a contração. A diminuição dos níveis de Ca⁺² leva ao início do relaxamento do músculo liso, o qual é mediado pela defosforilação da miosina de cadeia leve induzida pela fosfatase da miosina de cadeia leve (MLC).

Porém, não somente as mudanças nos níveis de Ca^{+2} resultam em contração do músculo liso (Bradley & Morgan, 1987). Outros fatores são capazes de modular a contração na presença de níveis constantes de Ca^{+2} . Contrações adrenérgicas do músculo liso podem ser potencializadas pelo GTP, enquanto os níveis de Ca^{+2} permanecem constantes, sugerindo assim um papel para as proteínas ligadas ao GTP (*G-proteins*) como geradoras de força (Nishimura et al., 1988). A pequena proteína-G p21 Rho, efetora da quinase associada a Rho (ROCK- *Rho-associated coiled-coil forming kinases*) foi identificada como uma das principais reguladoras da sensibilidade no músculo liso (Hirata et al., 1992). MLCP fosforila a ROCK, prevenindo a desfosforilação da MLC, resultando na sustentação/aumento da contração da CML (Somlyo, 1997). A figura 8 ilustra a complexa via de sinalização intracelular que desencadeiam a contração do músculo liso.

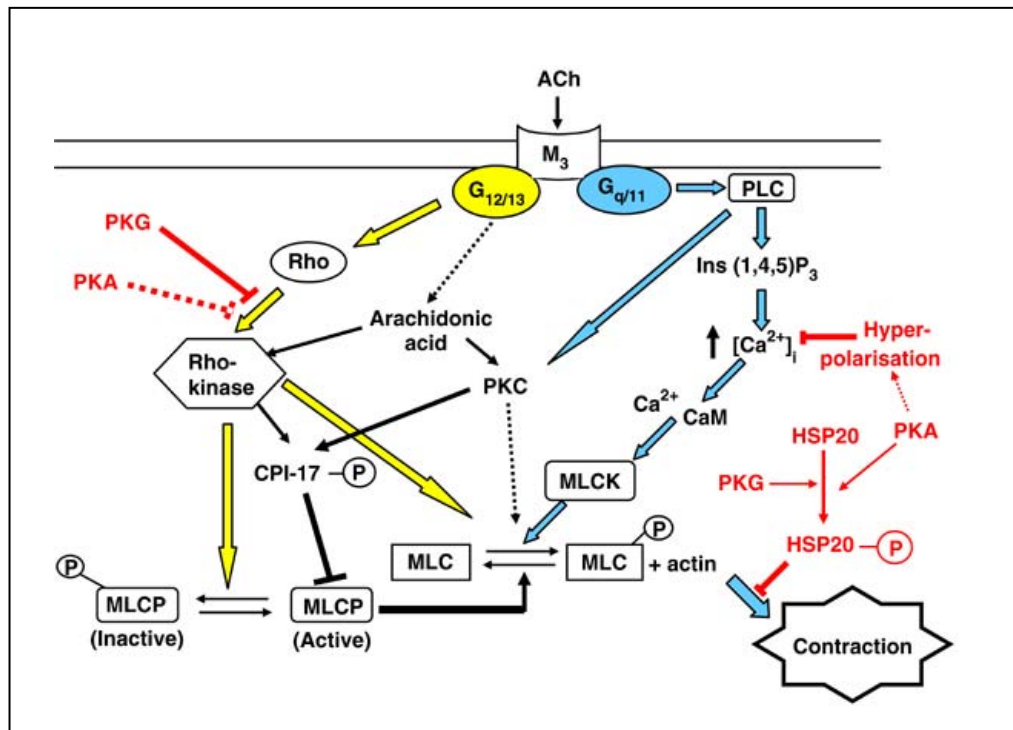


Fig. 8. Vias de sinalização intracelular que desencadeiam a contração do músculo liso. Setas em azul indicam componentes principais da via, setas amarelas indicam componentes que influenciam a resposta celular. Setas vermelhas exercem inibição de determinados componentes. Ach, acetilcolina; M_3 , receptor muscarínico de acetilcolina; PLC, fosfolipase C; PKC, proteína quinase C; PKA, proteína quinase A; PKG, proteína quinase G; $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, inositol trifosfato (1,4,5); CaM- calmodulina; CPI-17, fosfopeptídeo específico de músculo liso; MLC, miosina de cadeia leve; MLCK, quinase de miosina de cadeia leve; MLCP, fosfatase da miosina de cadeia leve; HSP-20, proteína heat shock 20. Adaptado de Pfitzer (2001).

1.5. Atividade contrátil da próstata

A próstata é um órgão contrátil que responde a estimulação alfa-adrenérgica (Furuya et al., 1982). A secreção prostática é primariamente uma função da atividade androgênica e secundariamente de uma estimulação neural e química (Huggins, 1945), sendo que as atividades secretoras e proliferativas da próstata são reguladas pelos andrógenos, enquanto as propriedades contráteis das células estromais são mediadas por α -adrenoceptores, sendo o α_{1a} -adrenoceptor o predominante (Boesch et al., 1999; 2000; Kyprianou et al., 2000a,b).

A próstata recebe inervação simpática e parassimpática (Dixon et al., 2000; Pennefather et al., 2000; Untergasser et al., 2005). O sistema parassimpático aumenta a taxa de secreção, enquanto o sistema simpático tem como ação expelir o fluído prostático na uretra durante a ejaculação. Foi demonstrado que o sistema neuronal, α -adrenérgico, β -adrenérgico, colinérgico, encefalinérgico, peptidérgico e nitrinérgico regulam a função e o crescimento da próstata, contribuindo para a manutenção do desenvolvimento do músculo liso, sendo o receptor α -adrenérgico o fator causal mais importante da resistência ao fluxo urinário (Untergasser et al., 2005; Haynes & Ventura, 2005).

Estudos neuroanatômicos demonstraram que, no compartimento estromal, há uma predominância de neurônios adrenérgicos, enquanto os nervos colinérgicos estão relacionados com o epitélio glandular. Resultados da denervação da próstata ventral de rato demonstraram que grande parte da inervação aferente está localizada nos nervos sensoriais dos segmentos L₅ e L₆, com uma menor contribuição do T₁₃-L₂ (McVary et al., 1998).

A eliminação da secreção prostática não é um processo descontínuo, que ocorre somente após a estimulação. Foi demonstrado em ratos que há um fluxo retrógrado contínuo para a bexiga (Farnsworth & Lawrence, 1965; Huggins, 1945), sugerindo que as CML exercem uma contração tônica na glândula prostática.

Alguns autores demonstraram que a próstata apresenta contrações espontâneas, como por exemplo, Exintaris et al. (2002) que demonstraram que “faixas” de próstatas normais exibem contrações rítmicas com amplitude irregular, variando entre 0.2 a 2 mN. Hib & Magarinos (1989) também demonstraram este evento ao descreverem que as próstatas normais apresentam uma atividade contrátil rítmica, numa média de 7 contrações/hora e com uma amplitude média de 79 μ m.

Esta atividade contrátil permanece mesmo quando as CML são isoladas e mantidas em cultura (Corvin, et al., 1998; Boesch et al., 2000), sugerindo um bom modelo experimental para investigação de tal atividade.

1.6. Efeito da castração sobre as células prostáticas

Muitos trabalhos têm mostrado os efeitos da castração na próstata, os quais são caracterizados principalmente por uma significativa diminuição do tamanho e peso da glândula. A grande redução do tamanho e peso do órgão é atribuída inicialmente a uma parada na síntese e uma acelerada liberação da secreção luminal, seguida pela diminuição do tamanho das células epiteliais e sua perda por processos de apoptose e degeneração celular e de mecanismos de autofagocitose, resultando em lóbulos menores formados por um epitélio cúbico baixo (Brandes, 1966; Kerr & Searle, 1973; Brandstrom et al., 1994; Hu et al., 1998). Foram observados também um declínio na síntese de DNA e de proteínas, no conteúdo e na complexidade do RNA e uma diminuição de receptores de andrógenos (Aumuller e Seltz, 1990).

A apoptose das células epiteliais pode estar associada com a expressão de vários componentes como o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (Freeman et al., 1990) e a catepsina D, sendo que essa última provavelmente exerce um papel importante na fagocitose dos corpos apoptóticos e na formação dos mesmos (Sensibar et al., 1990; Wilson et al., 1991).

A diminuição do tamanho e do peso da próstata devido à privação de testosterona é antecedida pela diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido prostático (Lekas et al., 1997). As células endoteliais e algumas estromais entram em apoptose 12 horas após a orquiectomia, enquanto as células epiteliais iniciam a apoptose somente depois de 72 horas (Shabsigh et al., 1998). Esse início da apoptose adiantado em células endoteliais corresponde a algumas mudanças no sistema vascular da glândula, como um extravasamento não trombogênico das proteínas do plasma para as regiões periglandulares do tecido (Shabsigh et al., 1999) e uma drástica restrição do leito dos vasos revestidos por uma camada de CML (Hayek et al., 1999).

Como esse processo degenerativo do sistema vascular da próstata precede ao início da apoptose em células epiteliais, é provável que a diminuição do fluxo sanguíneo da próstata seja

uma das bases da subsequente perda das células epiteliais e do processo regressivo da próstata induzido pela castração (Buttayan et al., 1999; Shabsigh et al., 1998; 1999).

Em estudos que observando a marcação para catepsina D nas diferentes regiões da próstata ventral de ratos, Lee et al. (1990) demonstraram que após quatro dias de castração existe um aumento da marcação para catepsina das células epiteliais da região distal D. Já na região proximal existe uma diminuição no número dessas células, demonstrando uma inversão na distribuição das células epiteliais em apoptose de animais adultos não castrados. Já sete dias após a castração, as células epiteliais da região proximal, embora atrofiadas, são destituídas de marcação para catepsina D.

Outros estudos observaram o comportamento da próstata em animais que tiveram privação e uma posterior reposição de testosterona. Nesses modelos, as células endoteliais proliferam, o volume vascular e o fluxo sanguíneo normalizam alguns dias antes da recuperação da próstata quando os animais castrados são submetidos à reposição hormonal (Häggström et al., 1998). A função contrátil normal da próstata também parece ser recuperada em modelos experimentais semelhantes (Hib & Magarinos, 1989). Na próstata ventral de camundongos, a reposição androgênica após sete dias de castração, faz com que a glândula retorne ao seu tamanho original com uma leve distensão dos dutos (Sugimura et al., 1986).

Como existe uma grande resposta da próstata a variações hormonais, no caso de tumores em pacientes sem condições à cirurgia devido à idade, eles são tratados por terapia hormonal ou radiação. A terapia hormonal mais comum para o câncer de próstata é a privação androgênica. Isto se deve ao fato de que a maioria dos tumores de próstata origina-se nas células epiteliais glandulares da região periférica da próstata, as quais são dependentes de andrógenos para sobreviver e proliferar (Cunha et al., 1987).

Durante a regressão prostática, existe um aparente aumento na área seccional ocupada por MEC e células estromais (Kerr & Searle, 1973). Dentre estas últimas, as mais proeminentes são as CMLs ao redor das estruturas epiteliais, que assumem um fenótipo mais sintético, com uma fração miofibrilar reduzida (Zhao et al., 1992; Vilamaior et al., 2000).

Antonioli et al. (2004) mostraram que as CMLs tiveram seu volume total diminuído e fenótipo alterado frente à privação androgênica. A mudança fenotípica das CMLs está ligada a modificações gerais do estroma e, parece ser responsável por algumas delas, incluindo a

reorganização das fibras de colágeno com as quais elas estão intimamente associadas após a castração (Vilamaior et al., 2000).

Hayward et al. (1996) descreveram uma perda de feixes de músculo liso na próstata após a castração, acompanhada de um ordenado e seqüencial desaparecimento de um dos marcadores da diferenciação de CML diferenciada. Porém em trabalhos recentes nós demonstramos que não há diminuição marcante das CMLs e que as mesmas continuam expressando dois marcadores específicos de célula diferenciada, SM-MHC e *smoothelin* após 21 de castração (Antonioli et al., 2004).

Homma et al. (2000) observaram que, após castração, ocorre um aparente aumento na contratilidade prostática. Porém, segundo os autores, isto se dá devido à mudança na quantidade dos componentes celulares prostáticos, pois após a castração, há uma diminuição do epitélio, enquanto os componentes do estroma permanecem preservados. Eles concluem que a privação androgênica suprime a contratilidade $\alpha 1$ -adrenérgica e esta supressão está associada com uma diminuição dos receptores.

Hib & Magarinos (1989) demonstraram que a castração resulta em um rápido desaparecimento da atividade contrátil espontânea da próstata e uma progressiva diminuição das respostas prostáticas a estímulo elétrico ou aplicações de drogas (norepinefrina e acetilcolina). Estes resultados indicam que os níveis circulantes de andrógenos estão envolvidos na manutenção da atividade espontânea e da contração tônica observada no momento da ejaculação. A diminuição das contrações induzidas após a castração provavelmente está relacionada com a redução no número e tamanho das CMLs após a cirurgia.

Dado o envolvimento das CMLs nas funções prostáticas e sua participação na estruturação do estroma e reorganização frente a castração (Vilamaior et al., 2000) e seu provável papel nas interações epitélio-estroma (Thomson et al., 2002; Cunha et al., 1996), o estudo dos mecanismos de regulação da função destas células parece ser fundamental para um melhor entendimento das funções do estroma em diversos processos relacionados com a modulação do crescimento e da função prostática.

1.6.1. A matriz extracelular prostática e sua remodelação frente à castração

A MEC é composta por componentes protéicos, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas que interagem de uma forma bastante complexa. Além de proporcionar um suporte mecânico para células e tecidos, ela pode também regular uma ampla variedade de processos celulares através da atuação conjunta desses componentes (Pupa et al., 2002).

Os componentes da MEC participam ativamente de vários processos fisiológicos e patológicos na próstata. Tuxhorn et al. (2001) descreveram que na cicatrização as células estromais exibem uma produção aumentada de componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento e enzimas remodeladoras da matriz, criando assim um ambiente que permite a sobrevivência, proliferação e migração dos tipos celulares envolvidos no reparo tecidual.

A castração causa atrofia nos lobos prostáticos e alterações nos níveis qualitativos e quantitativos dos glicosaminoglicanos (GAGs), mas que podem ser revertidos com a reposição de andrógenos (Kofoed et al., 1990). Observou-se um aumento no conteúdo de proteoglicanos (PGs) após a privação androgênica pela castração, acompanhado também de um aumento na concentração de ácido hialurônico (DellaColetta, 2005)

Terry e Clark (1996), estudando a influência hormonal nos GAGs dos três lobos prostáticos de ratos, observaram uma diminuição no conteúdo de GAGs após a castração que foi revertido com a administração de testosterona. Comparando os diferentes lobos, os autores observaram uma mudança no conteúdo de GAGs mais pronunciada para a próstata ventral do que para os lobos dorsais e laterais, sugerindo com isso, que esses dois últimos lobos podem apresentar um mecanismo regulatório distinto em comparação com a próstata ventral.

Foram identificados três tipos de GAGs sulfatados na próstata ventral, sendo que o dermatam sulfato (DS) foi o GAG mais abundante. Sua predominância foi mantida após a castração, sendo o principal responsável pelo aumento na concentração dos GAGs. A proporção de CS diminuiu após a castração e o conteúdo de HS foi consistente com um aumento de membrana basal (Fernandes, 2000; Carvalho & Line, 1996). Com relação às análises do conteúdo relativo, houve um aumento acentuado no conteúdo de HS sete dias após a castração, enquanto nos outros GAGs identificados, houve diminuição.

Variações no conteúdo de CS são aparentemente devidas a uma maior expressão de um PG de CS/DS durante a hiperplasia prostática e atrofia glandular (Walden et al., 1998; Goulas et al., 2000).

DeKlerk et al. (1985) mostraram que ocorrem significativas alterações quantitativa e qualitativas de GAGs, no estroma, durante o desenvolvimento da próstata. Na idade adulta, o conteúdo de DS e de HS parece aumentar, sugerindo que a proliferação epitelial pode estar associada a mudanças nos níveis de GAGs durante a puberdade. As mudanças no conteúdo de GAGs no lobo dorsal de próstata em cobaias durante o desenvolvimento também foram estudadas (Horsfall et al., 1994), sendo dependentes da regulação hormonal.

Kerr & Searle (1973) demonstraram um aumento na quantidade de colágeno após castração. Nakada et al. (1994) detectaram um aumento no conteúdo de elastina, de colágeno e de glicoproteínas estruturais decorrentes da castração. Esta reorganização do estroma prostático e a provável síntese de componentes da matriz extracelular devem ser destacadas como funções das células estromais. Dentre elas citamos novamente a contribuição das CMLs, uma vez que foi demonstrada a íntima participação destas células na remodelação das fibras de colágeno após a castração (Vilamaior et al., 2000; Antonioli, 2003) e uma provável contribuição na síntese de alguns componentes da MEC, o que foi sugerido pela demonstração de um aumento na quantidade de organelas secretoras nestas células após a privação androgênica (Vilamaior et al., 2005).

Da mesma forma, a reativação da glândula pela aplicação de testosterona deve envolver remoção e/ou síntese *de novo* de componentes da matriz extracelular. Estas alterações parecem criar um microambiente apropriado para a manutenção do órgão frente a uma nova situação hormonal.

A remodelação do estroma prostático após castração provavelmente envolve a participação de metaloproteinases (MMP), as quais pertencem a uma família de proteases que compreende 26 tipos de enzimas com a habilidade de degradar componentes da MEC, como colágeno, elastina e constituintes da membrana basal, como laminina e colágeno tipo IV.

Outra enzima atuante na remodelação da MEC é a heparanase (HPSE), que é uma endo- β -glucuronidase de mamífero que degrada tanto cadeias de heparam sulfato quanto heparina em sítios específicos. Esta atividade é fortemente implicada na disseminação celular associada com

metástase, vascularização e inflamação; sendo preferencialmente expressa em tumores humanos (Ilan et al., 2006). Existem descritos na literatura dois tipos de RNAm que codificam a HPSE. A expressão do RNAm da heparanase 2 demonstrou uma grande distribuição em tecidos normais (Mckenzie et al., 2000). Já a expressão da heparanase 1 foi verificada em tecidos como placenta, pele e em células oriundas da medula óssea (Vlodavsky & Friedmann, 2001; Vlodavsky et al., 1992; Bartelett et al., 1995; Dempsey et al., 2000; Vaday & Líder, 2000; Bernard et al., 2001; Parish et al., 2001; Matzner et al., 1985; Mollinedo et al., 1997).

Estudos recentes demonstraram a existência e a localização da HPSE 1 na próstata ventral de ratos normais e castrados, sendo que, nestes últimos, foi verificado um pico de expressão aos sete dias após castração. A razão provável para esta expressão aumentada aos sete dias após castração é dupla, podendo estar relacionada a uma segunda onda de morte das células epiteliais ou a um evento relacionado à remodelação tecidual subsequente. Obviamente, estas duas possibilidades não são exclusivas (Augusto & Carvalho, 2006).

Essa regulação, descrita anteriormente, é possível pela capacidade que a MEC funciona como um reservatório de fatores solúveis (como fatores de crescimento), seqüestrando e liberando esses fatores para o meio onde células estão inseridas (Roberts et al., 1988; Massagué, 1991). Além disso, a composição multicelular dos tecidos, a forma celular e a organização tecidual também pode influenciar na resposta celular a esses fatores solúveis, pois os diversos tipos celulares possuem receptores específicos para os componentes da MEC, respondendo de formas diferentes conforme a interação entre esses receptores e a MEC (Lin e Bissel, 1993). Por isso, a modulação da composição e do rearranjo da MEC é essencial para regular o comportamento celular em vários níveis, já que a modificação física do substrato onde as células estão apoiadas pode indicar qual comportamento a célula deverá adotar através da transmissão de sinais bioquímicos e biofísicos que as direcionem para a migração, proliferação, sobrevivência ou modificação no seu padrão de expressão gênica. Assim, as perturbações na secreção e renovação da MEC junto com a perda da propriedade de resposta das células a esses sinais extracelulares estão associadas com estados patológicos tais como osteoporose, artrite reumatóide e câncer (Radisky et al., 2001; Werb, 1997).

II. Objetivos

A célula muscular lisa é o tipo celular de maior importância no estroma prostático e está envolvida em vários processos que garantem o desenvolvimento e a manutenção do estado funcional da glândula, bem como tem participação em processos patológicos. Buscando uma melhor compreensão do comportamento destas células, o presente estudo teve por objetivos:

1. Caracterizar o fenótipo das células musculares lisas prostáticas *in vivo* após um longo período de privação androgênica.
2. Avaliar o comportamento das células musculares lisas prostáticas *in vitro* frente ao estiramento mecânico cíclico e estático.

III. Artigos

3.1. Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate. *Journal of Andrology*, Vol. 28, No. 5, September/October 2007.

3.2. Cyclic but not static mechanical stretch induces prostatic smooth muscle cell hypertrophy. (Submetido para publicação na revista *Journal of Physiology*, agosto de 2007).

Effects of Long-Term Castration on the Smooth Muscle Cell Phenotype of the Rat Ventral Prostate

ELIANE ANTONIOLI, ALEXANDRE BRUNI CARDOSO, AND HERNANDES F. CARVALHO

From the Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas SP, Brazil.

1

ABSTRACT: Smooth muscle (SM) is an important component of the prostatic stroma. We previously showed that, despite extensive morphologic changes, smooth muscle cells (SMCs) of the rat ventral prostate preserve some differentiation markers 21 days after castration. In the present study, we investigated whether the expression of SMC markers is preserved in the rat ventral prostate after long-term castration. Adult Wistar rats were castrated and sacrificed 100 days after surgery. The ventral prostates were processed for histology, stereology, immunocytochemistry (SM α -actin and SM-myosin heavy chain [MHC]), transmission electron microscopy (TEM), and reverse transcription polymerase chain reaction (smoothelin, sm22, and calponin). The prostates of castrated rats showed significant weight reduction, corresponding to only 5.6% of the control. Stereology showed that SMCs occupied the same proportion of the prostate volume but suffered a significant

reduction in absolute volume (5.5% of control). The SMCs were retracted and showed spinous outlines. TEM revealed the presence of an abundant myofibrillar component, dense plaques, and an external lamina in these cells. SMCs were reactive to antibodies against SM α -actin and SM-MHC and expressed mRNA for smoothelin, sm22, and calponin. The results confirmed that rat prostatic SMCs are affected by androgen deprivation. Although showing marked phenotypic changes, these cells expressed SMC markers at the protein (SM α -actin and SM-MHC) and mRNA (smoothelin, sm22, and calponin) levels. These observations support the idea that SMCs may modulate their phenotypes (contractile vs synthetic) without changing their differentiation states.

Key words: Calponin, myosin heavy chain, sm22, smoothelin.

J Androl 2007;28:000-000

The prostate gland largely depends on androgens for its embryonic and pubertal development and for the maintenance of adult activity (Isaacs et al, 1994). Surgical or chemical castration causes a marked involution of the organ, which is mainly attributed to a decrease in epithelial cell activity and apoptosis. The stroma is also subjected to marked changes after androgen deprivation, occupying a growing fraction of the organ volume. In the stroma, in addition to a reduction in blood vessels, increase in vascular permeability (Shabsigh et al, 1998, 1999), and extracellular matrix reorganization, mainly related to elastic fibers (Carvalho et al, 1997), basement membrane (Carvalho and Line, 1996), and collagen fibers (Vilamaior et al, 2000), the functions of cellular components are also reprogrammed. Among these components, smooth muscle cells (SMCs) are prominently affected. Previous studies have suggested that prostatic SMCs

progressively dedifferentiate after castration. This suggestion arose from the observation that the myofibrillar fraction is reduced in favor of an increase in the volume fraction occupied by organelles of the secretory pathway, indicating that these cells undergo a contractile to synthetic phenotypic change (Zhao et al, 1992; Niu et al, 2001, 2003). It was also shown that SMCs sequentially lose some molecular markers, mirroring their appearance during morphogenesis, suggesting that the phenotypic modulation is coupled to dedifferentiation (Hayward et al, 1996).

More recently new markers have been proposed to be specific for SMCs (Doevendans and van Eys, 2002). Using some of these markers, we showed that, in addition to extensive morphologic changes including an increase in the volume density of organelles of the synthetic secretory pathway (Vilamaior et al, 2005), SMCs exhibit many of the morphologic landmarks of differentiated cells and preserve SM myosin heavy chain (MHC) and smoothelin expression up to 21 days after castration (Antonioli et al, 2004). This finding led us to propose that the contractile to synthetic phenotypic change does not involve dedifferentiation.

We further argued that the discrepancy between our results and those reported by Hayward et al (1996) might be attributable to the length of the androgen

Supported by FAPESP (grants 99/11365-1 and 03/08653-8), CAPES and CNPq.

Correspondence to: Hernandes F Carvalho, Department of Cell Biology, UNICAMP, CP6109, 13083-863 Campinas SP, Brazil (e-mail: hern@unicamp.br).

Received for publication March 26, 2007; accepted for publication May 21, 2007.

DOI: 10.2164/jandrol.106.002873

0

deprivation period (21 vs 100 days, respectively) and/or the use of distinct differentiation markers (myosin, vinculin, desmin, and laminin vs smoothelin and MHC) and then decided to investigate whether long-term castration results in the loss of these newer and more specific markers of SMC differentiation. Pursuing this task, we investigated the expression of SM α -actin and SM-MHC (at the protein level) and smoothelin, sm22, and calponin (at the mRNA level), as well as morphologic, ultrastructural, and stereologic alterations, to determine the effects of long-term androgen deprivation on the differentiation state of SMCs in the rat ventral prostate. The results allowed us to confirm that, despite showing morphologic changes, SMCs preserve their differentiated state after long-term castration.

Materials and Methods

Animals and Histologic Processing

Fifteen 3-month-old male Wistar rats were used. Ten animals were subjected to orchietomy by means of a scrotal incision under chloral hydrate anesthesia. Ventral prostates were removed 100 days after surgery. Five age-matched rats were used as controls. The protocol was approved by the Committee of Ethics on Animal Experimentation from the State University of Campinas (protocol 1223-1).

The ventral prostates were dissected out, weighed, and immediately fixed by immersion in 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline for 24 hours. The samples were then washed, dehydrated, cleared in xylene, and embedded in Paraplast Plus embedding medium for immunocytochemistry. Some fragments were partially dehydrated and embedded in Historesin (Leica Microsystems) for general morphology. Stereology was performed as described previously (Antonoli et al, 2004; Garcia-Florez et al, 2005). Volume density (V_v) was calculated as the percent of points in Weibel grid falling on SMC. The total SMC volume was calculated as a product of volume density per prostatic weight, considering the specific gravity of the prostatic tissue as 1.0 (Huttunen et al, 1981). The results were compared using the Student's two-sample *t*-test.

Transmission Electron Microscopy

Tissue fragments ($\sim 1 \text{ mm}^3$) were processed for transmission electron microscopy. In brief, the fragments were fixed for 24 hours in a solution containing 0.25% tannic acid and 3% glutaraldehyde in Millonig buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 hour, and then incubated in 0.5% uranyl acetate in maleate buffer overnight before dehydration in a graded acetone series and embedding in Araldite (Poly-science Inc, Warrington, Pa). Ultrathin sections were contrasted with lead citrate. Analysis and documentation were carried out with a Leo 906 transmission electron microscope.

Immunocytochemistry

Five-micrometer sections were mounted on silanized glass slides, dewaxed with xylene, and rehydrated in a decreasing ethanol series. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide in water for 30 minutes. Non-specific protein-protein interactions were blocked by incubation with 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 hour. Monoclonal antibodies against SM α -actin (A2547; Sigma-Aldrich) and SM-MHC (sc-6956; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif) were diluted 1:50 and 1:100, respectively, in TBS-T containing 1% BSA and applied to sections for 1 hour at room temperature. After three 5-minute washes with TBS-T, the sections were incubated with a peroxidase-conjugated antibody against mouse polyvalent immunoglobulins (Sigma-Aldrich) diluted 1:100 in 1% BSA in TBS-T for 1 hour. Sections were washed again, and peroxidase activity was developed with 3,3'-diaminobenzidine followed by counterstaining with methyl green, air drying, and mounting in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). For SM-MHC immunocytochemistry, sections were pretreated with 0.4% pepsin in 0.01 N HCl for 30 minutes at 37°C before endogenous peroxidase blocking. The specimens were observed under a Zeiss Axioskop microscope and photographed using Kodak 100 Proimage film.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

The prostates were dissected out, weighed, and immediately homogenized with a Polytron in TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Calif). Total RNA was then extracted according to the instructions provided by the manufacturer. The amount of RNA was determined by measuring the absorbances at 260 and 280 nm using a correspondence factor of 40. For cDNA synthesis, reverse transcription (RT) was performed using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) for 60 minutes at 50°C and for 15 minutes at 70°C. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out with 150 ng of cDNA in a final volume of 25 μL containing Taq polymerase PCR master mix (Promega Corporation, Madison, Wis) and 0.6 pmol of the following primer sets (Invitrogen) under the following reaction conditions: β -actin forward 5'-TCACCCACACTGTGCC CATCTACG-3', reverse 5'-CAGXGGAACCGCTCATTGC CAATGG-3', annealing temperature 64°C, 30 cycles; smoothelin forward 5'-GTCGACATCCAGAACTTCCTCC-3', reverse 5'-CGCAGGTGGTTGTACAGCGA-3', annealing temperature 94°C, 35 cycles (Rensen et al, 2002); calponin forward 5'-GAAGATCAATGAGTCAACCG-3', reverse 5'-CCTTG AGGCATCCATGAAG-3', annealing temperature 61.5°C, 30 cycles; and sm22 forward 5'-AGGTCTGGCTGAAGAA TGGC-3', reverse 5'-TTCAAAGAGGTCAACAGTCTGG -3', annealing temperature 60°C, 30 cycles. The sizes of the reaction products for β -actin, smoothelin, calponin, and sm22 were 64, 440 (visceral) and 330 (vascular), 150, and 200 bp, respectively. PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis in Tris-acetate-EDTA buffer and visualized by ethidium bromide staining. The 50-bp DNA step ladder (Promega Corporation) was used as a marker.

Table 1. Body and prostatic weight variation 100 days after castration (means ± SD)

	Control (n = 5)	Castrated (n = 10)
Body weight, g	449.0 ± 36.3	420.5 ± 35.9
Ventral prostate weight, g*	0.421 ± 0.046	0.021 ± 0.006
Relative weight*†	0.089 ± 0.016	0.005 ± 0.002
Percent variation	...	-94.4

* Statistically significant at $P < .001$.

† Calculated by dividing prostatic weight by total body weight.

Results

Table 1 shows the body and prostate weights and the effect of androgen deprivation for 100 days on these parameters. There was no variation in body weight, whereas prostate weight showed a 20-fold reduction. Accordingly, the relative weight of the ventral prostate was reduced to just 5.5% of the control.

Androgen deprivation resulted in marked remodeling of the rat ventral prostate. In addition to marked epithelial modifications, hematoxylin and eosin staining revealed that control SMCs were elongated and

Table 2. Stereologic analysis of smooth muscle cells in the rat ventral prostate 100 days after castration (means ± SD)

	Control	Castrated
Volume density, %	9.92 ± 2.70	11.05 ± 3.67
Absolute volume, mL x 10 ⁻²	4.18 ± 1.13	0.23 ± 0.08*

* $P < .001$.

flattened against the epithelial basement membrane, showing slightly irregular outlines. Following castration, shortening of the cell was observed accompanied by a pleating of the cell surface, leading to a spinous aspect (Figure 1A and B). The SMCs apparently lost the contact between each other and presented with wider extracellular spaces. Usually more than 1 layer of SMCs was found below the epithelial structures after castration.

Stereologic analysis showed that androgen deprivation for 100 days did not result in any modification of the prostatic volumetric fraction (Vv) occupied by SMCs (Table 2). However, considering the large reduction in prostatic weight, long-term castration caused a significant decrease in absolute SMC volume, ie, SMC

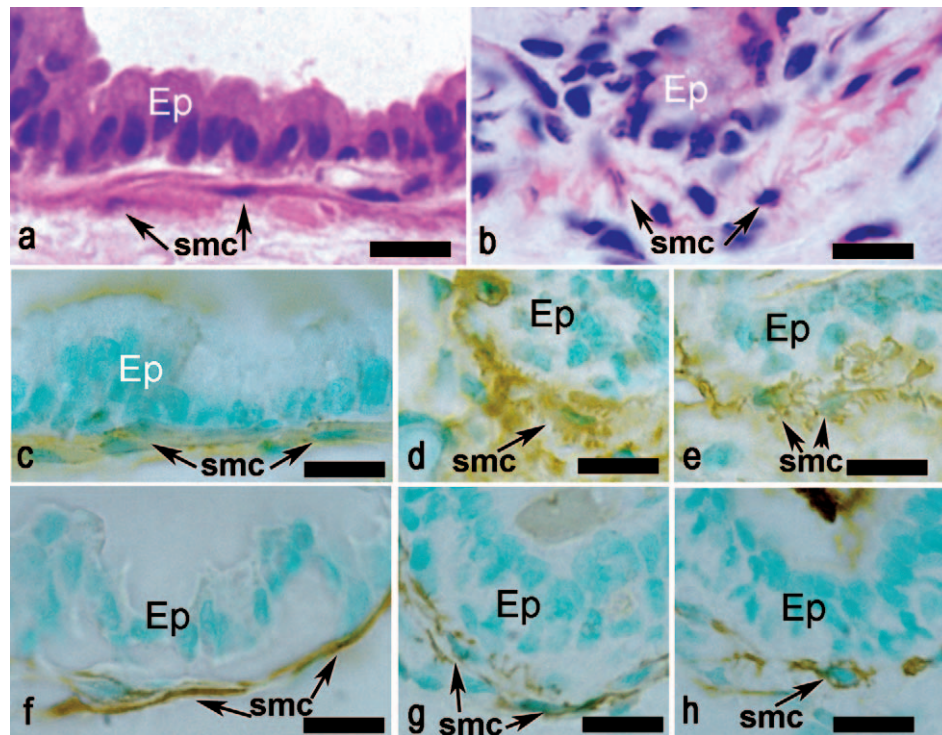
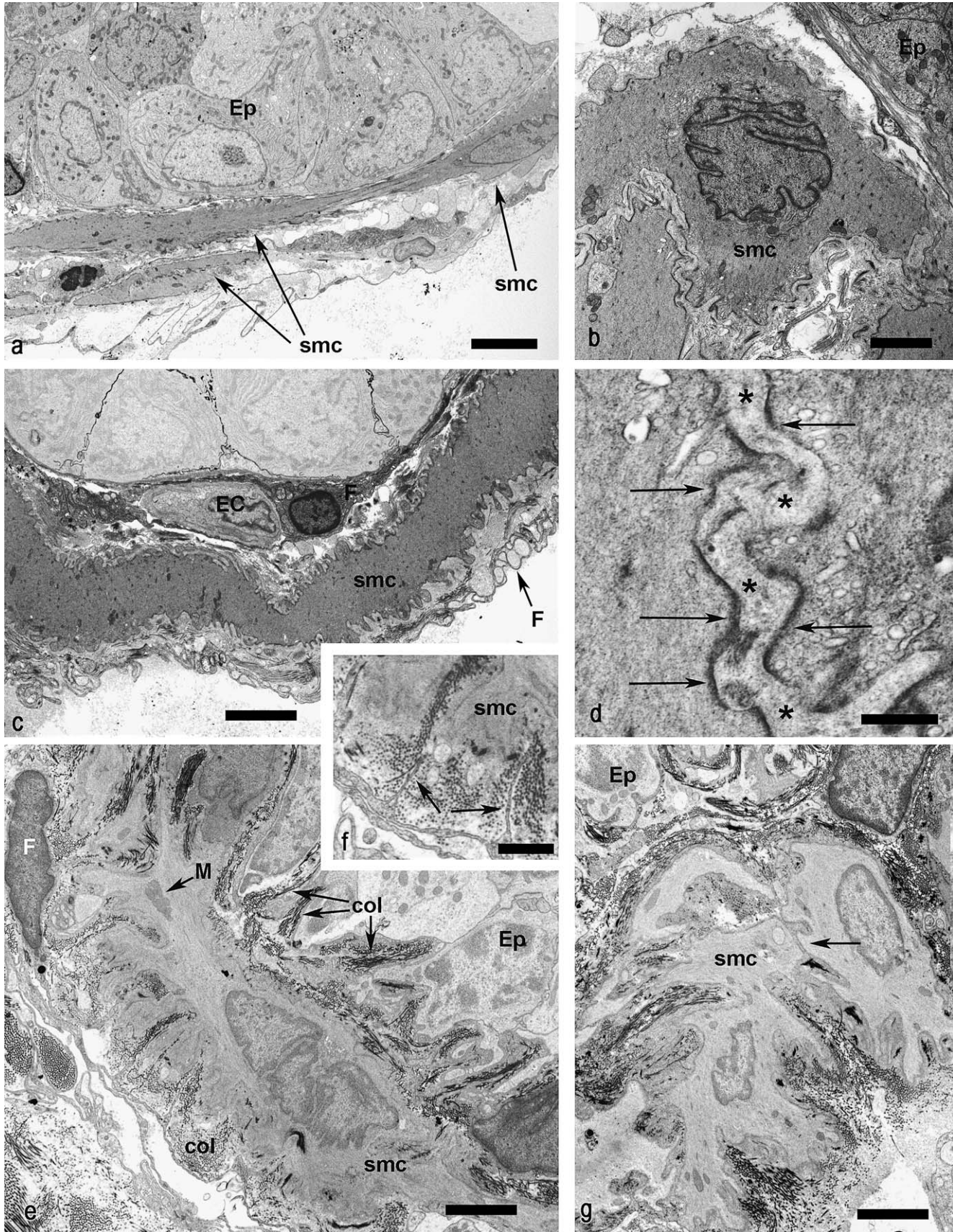


Figure 1. Hematoxylin and eosin (H & E) staining of a Historesin section and immunocytochemistry for smooth muscle α -actin and myosin heavy chain. H & E staining of the ventral prostates of control animals (a) showed elongated smooth muscle cells (smc) usually present as a single layer below the epithelium (Ep), with apparent contacts between each other. In contrast, in castrated rats, the smooth muscle cells were markedly retracted and atrophic, showing a spinous aspect with very thin processes and forming multiple layers below the epithelium, and were mainly separated from each other by the presence of extracellular matrix (b). Smooth muscle α -actin (c-e) and myosin heavy chain (f-h) were detected in smooth muscle cells of control (c and f) and castrated rats (d, e and g, h). Whereas the staining for actin was more diffuse throughout the cells, that for myosin heavy chain was more concentrated in some regions of the cell, especially around the nucleus. Bar = 10 μ m.



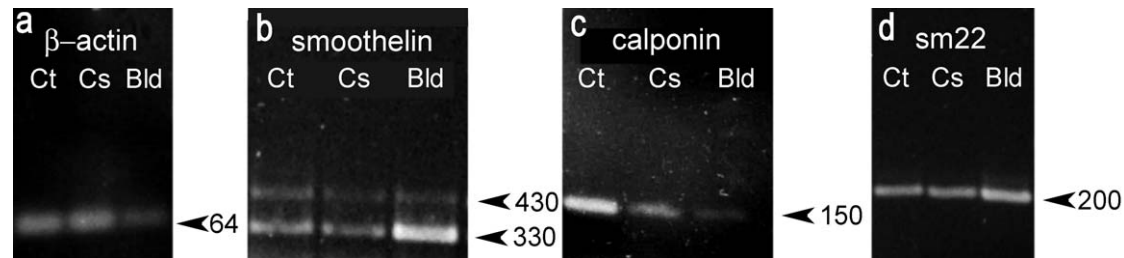


Figure 3. Reverse transcription polymerase chain reaction using mRNA extracted from the prostates of control and castrated rats. The integrity of the cDNA preparation was confirmed with a primer set for β -actin. A 64-bp amplicon was identified in control and castrated rats and in the urinary bladder. The reaction for smoothelin amplified 2 bands, a vascular (430 bp) and visceral (330 bp) isoform from both control and castrated animals. The same was observed for calponin and sm22, which were detected in control and castrated rats, and presented amplicons of 150 bp and 200 bp, respectively. Smoothelin mRNA was identified even 100 days after castration. Ct indicates control; Cs, 100 days after castration; and Bld, bladder.

volume corresponded to only 5.5% of that calculated for the age-matched control (Table 2).

Transmission electron microscopy revealed important aspects of the SMCs, which were elongated and exhibited slightly irregular outlines (Figure 2A through C). In cross sections, the irregular outline of the cell nucleus, scarcity of organelles, dense plaques, and presence of an external (basal) lamina were noted (Figure 2B and D). The SMCs were separated from the epithelium by a single fibroblast layer (Figure 2C). Androgen deprivation promoted marked SMC reorganization, the most prominent change being retraction of the cytoplasm, which resulted in marked irregular outlines. Myofilaments were the predominant element of the cytoplasm (Figure 2E). Collagen fibrils were closely encrusted in the grooves of the SMC surface (Figure 2E through G). Fibroblasts were also found to extend thin processes among the collagen fibrils in the SMC infoldings (Figure 2F). The external lamina, subplasmalemmal dense plaques, and abundant caveoli, 3 major structural components of SMCs, were preserved after castration (Figure 2G). Although most SMCs were separated from one another, close contacts were maintained at certain points (Figure 2G).

In addition to the morphologic and ultrastructural characterization of the effects of long-term androgen deprivation, we also investigated the expression of some SMC markers. Immunocytochemistry revealed that SM

α -actin (Figure 1C through E) and SM-MHC (Figure 1F through H) were present in the SMCs of control rats (Figure 1C and F, respectively) and that androgen deprivation for 100 days had no effect on this expression pattern (Figure 1D and E, and 1G and H, respectively). Moreover, RT-PCR showed that smoothelin, calponin, and sm22 were expressed at the mRNA level in the ventral prostate of control and castrated rats (Figure 3). The expression of the visceral isoform of smoothelin (Figure 3B) was identified.

Discussion

SMCs exert a common contractile function throughout the body. These cells differ in terms of contractility, part of them showing a phasic contraction pattern and the remaining ones are tonic. Furthermore, in contrast to cardiac and skeletal muscle, these cells do not terminally differentiate, ie, they might be recruited for further proliferation and moreover for performing different functions. These complex patterns of functioning might result from the intricate embryonic origins of SMCs (Gittenberger-de-Groot et al, 1999).

Vascular SMCs have received more attention than the prostatic ones. However, prostatic SMCs are also important because of their central role in benign prostatic hyperplasia (Shapiro et al, 1992) and because

←

Figure 2. Transmission electron microscopy of smooth muscle cells (SMCs) in the ventral prostates of control and castrated rats. SMCs are flat and elongated, showing slightly undulated outlines in noncastrated rats (a). In cross sections, further morphologic aspects, such as the irregular outline of the cell nucleus, predominance of myofibrils in the cytoplasm, and presence of dense plaques and an external lamina, are readily observed (b). In control animals, the cells were elongated and separated from the base of the epithelium by a single fibroblast layer (c). The detail in (d) shows the presence of an external lamina (asterisks) surrounding the SMCs, subplasmalemmal dense plaques (arrows), and abundant caveoli. In castrated rats, the SMCs are retracted and exhibit highly folded surfaces, contributing to the spinous aspect, and a cell nucleus preserving the irregularity of the nuclear surface. Collagen fibrils are intimately associated with the grooves of the cell surface (e). The detail in (f) shows that, in addition to collagen, fibroblast processes dig deep into the grooves on the SMC surface. Although usually separated, the SMCs of castrated rats (g) show some points of cell-cell adhesion (arrows). EC indicates endothelial cell; Ep, epithelium; F, fibroblasts and/or fibroblast processes; smc, smooth muscle cell; col, collagen fibrils; and M, mitochondria. Bars: a = 10 μ m; b = 2 μ m; c, e, and g = 5 μ m; d = 0.5 μ m; f = 1 μ m.

they seem to be important in regulating epithelial function and behavior, including in cancer (Cunha et al, 1996; Hayward and Cunha, 2000). The primary response of prostatic SMCs to castration is related to the fact that they express the androgen receptor (Prins et al, 1991; Hayward and Cunha, 2000).

We previously examined the behavior of prostatic SMCs in castrated rats and observed that these cells undergo extensive morphologic changes (Antonioli et al, 2004) and present an increase in secretory organelles (Vilamaior et al, 2005) after androgen deprivation for 21 days. We also showed that these cells express SM-specific actin, MHC, and smoothelin (Antonioli et al, 2004), suggesting that these cells undergo marked phenotypic modifications in association with distinct functions (Vilamaior et al, 2000) but preserve their differentiation states. This assumption is in perfect agreement with the idea of Owens et al (2004) on vascular SMC phenotype modulation (or switching). On the other hand, this proposal contradicts a previous report by Hayward et al (1996), who studied the differentiation of SM during prostatic development as well as changes related to androgen deprivation and concluded that the modifications reported for the latter reproduced the developmental acquisition of differentiation markers. This discrepancy might be attributed to the use of different differentiation markers, as well as to the investigation of different periods of androgen deprivation.

The present study was then idealized to reproduce the long-term castration experiment of Hayward et al (1996) using the same markers as employed before (Antonioli et al, 2004), in addition to a detailed morphologic study of SMCs. We showed that SMCs occupy a volume twice that of the prostate in these aged animals as compared with 90-day-old animals (Antonioli et al, 2004) and that they became markedly atrophic after 100 days of androgen deprivation. Although SMCs occupied the same volume fraction of the organ (~10%) with respect to the age-matched controls, they showed a marked reduction in the total volume, considering the extreme reduction in prostatic weight. At the ultrastructural level, SMCs were readily recognized by the presence of abundant myofilaments, external lamina (basal membrane) and subplasmalemmal dense plaques. These cells were also reactive to anti-SM actin and anti-SM-MHC, in addition to expressing smoothelin, sm22, and calponin. While the last 2 markers might reflect the presence of vascular SM, the expression of the visceral (or urogenital) isoform of smoothelin (Rensen et al, 2002) is probably restricted to prostatic SMCs.

It is possible that a fraction of the SMCs do indeed dedifferentiate and contribute to the reduction in the total SMC volume in the prostate of castrated animals,

in addition to the death of some and the atrophy of the remaining differentiated cells. This question will require precise methods for labeling and counting SMCs for different periods after castration.

It is not well known to what extent prostatic SMCs are comparable to vascular SMCs. However, it has been shown for the latter that the quiescent (and contractile) state is due to the expression and activation of cAMP response element-binding protein (CREB) and that the transition to a proliferative and migratory phenotype involves CREB inactivation (Reusch and Watson, 2004). Other transcription factors probably involved in this transition are GATA6 and GAX (favoring the quiescent state) and basic transcription element-binding protein 2 and Egr-1 (favoring the proliferative state), whereas serum response factor and myocyte enhancer factor 2 would have dual effects on SMC behavior (Walsh and Takahashi, 2001). Myocardin is another important factor regulating the expression of SMC-specific molecules (Owens et al, 2004). Furthermore, the specific arrangement of CArG elements (CC[AT]₆GG motif) and their variations within the promoter region of genes encoding *sm22*, *MHC*, and α -actin are likely to be responsible for setting the cell type specificity and temporal expression of SMC-specific genes (Owens et al, 2004). The expression and function of these transcription factors have not been investigated in prostatic SMCs and thus deserve future study.

Another important question in the biology of prostatic SMCs is whether the alterations in SMC phenotype observed after androgen deprivation are comparable to those seen in cancer invasion. Researchers have studied the modifications in SMC behavior during stromal activation in response to cancer progression and emphasized that SMCs undergo progressive dedifferentiation to myofibroblasts (Cunha et al, 1996; Tuxhorn et al, 2001, 2002; Wong and Tam, 2002). Whereas the use of cell cultures is of limited applicability since the mere placement of SMCs in culture is sufficient to promote phenotypic changes, the lack of appropriate experimental models limits the progress in this area.

In conclusion, we demonstrated that prostatic SMCs undergo phenotypic modulation (or switching) upon androgen deprivation while preserving major differentiation markers. It should be emphasized that the phenotypic modulation of SMCs upon androgen deprivation cannot be seen as a passive response but should be considered to be an active adaptation to the new hormonal condition as well as to the changing stromal (and organ) microenvironment, with possible contributions of altered levels of transforming growth factor β and basic fibroblast growth factor (Niu et al, 2003).

References

- Antonioli E, Della Colleta HHM, Carvalho HF. Smooth muscle cell behavior in prostate of castrated rats. *J Androl*. 2004;25:135–141.
- Boesch ST, Corvin S, Zhang J, Rogastsch H, Bartsch G, Klocker H. Modulation of the differentiation status of cultured prostatic smooth muscle cells by an α 1-adrenergic receptor antagonist. *Prostate*. 1999;39:226–233.
- Carvalho HF, Line SRP. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int*. 1996;20:809–819.
- Carvalho HF, Vilamaior PS, Taboga SR. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate*. 1997;32:27–34.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat*. 1996;155:63–72.
- Doevendans PA, van Eys G. Smooth muscle cells on the move: the battle for actin. *Cardiovasc Res*. 2002;54:499–502.
- Garcia-Florez M, Oliveira CA, Carvalho HF. Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:487–497.
- Gittenberger-de-Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M, Poelmann RE. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1589–1594.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat*. 1996;155:94–103.
- Hayward SW, Cunha GR. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am*. 2000;38:1–14.
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ. Testosterone action on the ventral prostate lobe of the castrated rat as assessed with a stereologic morphometric method. *Am J Anat*. 1981;165:199–209.
- Isaacs JT, Furuya Y, Berges R. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. *Semin Cancer Biol*. 1994;5:391–400.
- Niu YJ, Ma TX, Zhang J, Xu Y, Han RF, Sun G. Androgen and prostatic stroma. *Asian Androl*. 2003;5:19–26.
- Niu Y, Xu Y, Zhang J, Bai J, Yang H, Ma T. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. *BJU Int*. 2001;87:386–393.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84:767–801.
- Prins GS, Birch L, Greene GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*. 1991;129:3187–3199.
- Rensen SSM, Thijssen VLJL, DeVries C, Doevendans P, Detera-Wadleigh S, van Eys G. Expression of the smoothelin gene is mediated by alternative promoters. *Cardiovasc Res*. 2002;55:850–863.
- Reusch JEB, Watson PA. Loss of CREB regulation of vascular smooth muscle cell quiescence in diabetes. *Rev Endocr Metabol Dis*. 2004;5:209–219.
- Shabsigh A, Tanji N, D'Agati V, Burchardt M, Rubin M, Goluboff ET, Heitjan D, Kiss A, Buttyan R. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology*. 1999;140:1920–1926.
- Shabsigh A, Chang DT, Heitjan DF, Kiss A, Olsson CA, Puchner PJ, Buttyan R. Rapid reduction in blood flow to the rat ventral prostate gland after castration: preliminary evidence that androgens influence prostate size by regulating blood flow to the prostate gland and prostatic endothelial cell survival. *Prostate*. 1998;36:201–206.
- Shapiro E, Hartanto V, Becich MJ, Lepor H. The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic BPH. *J Urol*. 1992;147:1293–1297.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*. 2001;166:2472–2483.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2912–2923.
- Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for the smooth muscle cells. *Prostate*. 2000;45:253–258.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int*. 2005;29:809–816.
- Walsh K, Takahashi A. Transcriptional regulation of vascular smooth muscle cell phenotype [in German]. *Z Kardiol*. 2001;90(Suppl 3):12–16.
- Wong YC, Tam NNC. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation*. 2002;70:633–645.
- Zhao GQ, Holterhus PM, Dammshäuser I, Hoffbauer G, Aumüller G. Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate*. 1992;21:183–199.

ERRATA:

Na versão final do artigo “Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate”, constam as seguintes alterações:

Item “RT-PCR”

Primer para β -actina: (f: 5'-CTGGCCTCACTGTCCACCTT-3'; r: 5'-AGTACGATGAGTCCGGCCC-3');

Temperatura de anelamento do primer para smoothelin: 54°C.

Cyclic but not static mechanical stretch induces prostatic smooth muscle cell hypertrophy

Eliane Antonioli¹, Natalia M. Inada², Anibal E. Vercesi², Talita Marin³, Kleber Franchini³ and
Hernandes F. Carvalho^{1*}

¹ Department of Cell Biology (Institute of Biology)

² Department of Clinical Pathology (School of Medicine)

³ Department of Internal Medicine, (School of Medicine), State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Grant sponsor: FAPESP (grant number 03/08653-1), CAPES, CNPq, FAEPEX-UNICAMP

Running title: Prostatic smooth muscle cell response to mechanical load

Keys words: cell hypertrophy, mechanical stretch, myosin heavy chain, prostate, smooth muscle cell

Word Count: 3207

*** Correspondence to:** Hernandes F Carvalho

Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of

Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

PO Box 6109

13083-863 Campinas SP, Brazil

E-mail: hern@unicamp.br

Fax: 0055 – 19 – 3521 – 6111

Phone: 0055 – 19 – 3521 – 6118

Abstract

Smooth muscle cells (SMC) are important components of the prostate gland stroma which are able to contract during ejaculation. These cells are the major factor responsible for benign prostatic hyperplasia, whose most significant symptom is the obstruction of urinary flow. The purpose of this study was to investigate the effect of static and cyclic stretch on the morphology, proliferation and size of SMC measured by the *in vitro* expression of smooth muscle marker proteins. Primary cultures were obtained using SMC isolated from the ventral prostate of adult rats. Cells were mechanically stretched on flexible silicone surfaces at varying intensities and times. Proliferation was assessed by immunocytochemistry for Ki67 antigen. Size cell was determined by measuring the intensity of F-actin staining with fluorescein isothiocyanate-phalloidin by flow cytometry. Immunoblotting for smooth muscle α -actin and smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) was used to evaluate variations in SMC specific markers. Both static and cyclic stretch inhibited cell proliferation (32% versus 7.5% after 15% deformation). Immunoblotting showed intense and progressive time-dependent increases in SM-MHC and smooth muscle α -actin (95% and 40% increases after 15% deformation, respectively) in cultures after cyclic stretch. Flow cytometry demonstrated an increase in F-actin content on a per cell basis. These results indicate that SMC respond to cyclic stretch by increasing cytoskeletal protein synthesis which causes cell hypertrophy and might be associated with stronger contractile force.

1. Introduction

Cells are subjected to compression, tension, and/or shear in the body and undergo specific phenotypical changes in response to deformation in order to adapt to new physiological requirements. Mechanical forces can affect cell structure, function, and survival, thereby altering the rates and pattern of tissue growth (Chicurel, 1998).

A variety of cell types have been shown to respond to mechanical load. Smooth muscle cells (SMC) are particularly responsive to overload stress under different pathological conditions. For example, hypertrophy or hyperplasia has been observed for prostatic SMC in benign prostatic hyperplasia (Haynes & Ventura, 2005) and for vascular SMC in hypertension (Yu *et al.*, 2003). Morphometric analysis has demonstrated an increase in the stroma to epithelium ratio from 2:1 to 5:1 in hyperplastic tissue (Bartsch *et al.*, 1989; Shapiro *et al.*, 1992) and SMC are the main factor responsible for benign prostatic hyperplasia which causes urethral obstruction (Cunha *et al.*, 1996).

Although the most evident function of prostatic SMC in adults is contraction during ejaculation, these cells exhibit marked plasticity and respond to a variety of physiological and/or pathological stimuli. SMC usually exhibiting contractile activity might be recruited for new functions, mainly the synthesis of extracellular matrix molecules and other soluble factors. Antonioli *et al.* (2004) and Vilamaior *et al.* (2005) suggested that SMC of the rat ventral prostate are able to shift from a predominantly contractile to a more synthetic phenotype without changing their differentiation state as demonstrated by the expression of specific cytoskeletal markers. In addition, a progressive increase in the number of organelles involved in secretory processes in these cells has been observed after castration. Although the response to androgen deprivation and estrogen exposure has long been known to cause changes in the phenotype of SMS (Hayward *et al.*, 1996; Kofoed *et al.*, 1990), this response is usually attributed to de-differentiation.

Cytoskeletal and contractile proteins are used to characterize the differentiation state of SMC. Changes in the expression of several proteins are closely associated with SMC phenotypic modulation. These proteins include smooth muscle (SM) α -actin, smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC), caldesmon, SM22, calponin, and smoothelin (Doevendans & van Eys, 2002; Owens *et al.*, 2004).

Several authors have described spontaneous contraction in cultured prostatic SMC and have reported that this contraction is modulated by drugs such as phenylephrine and noradrenaline (Corvin *et al.*, 1998; Boesch *et al.*, 2000). Smith *et al.* (1998; 1999) showed that exposure of prostatic SMC to noradrenaline physiologically induces an increased expression of cytoskeletal filament protein. Furthermore, experiments demonstrated that mechanical stretch of bladder SMC influenced many events such as apoptosis, proliferation and cell size (Hjalmas, 1988; Galvin *et al.*, 2002).

In this study we investigated the effect of mechanical stretch on prostatic SMC. We demonstrated that cyclic but not static mechanical stretch regulates cell characteristics such as proliferation, expression of cytoskeletal proteins and cell size, demonstrating hypertrophy.

2. Materials and Methods

2.1. Primary culture of rat prostatic SMC

SMC were cultured as described by Gerdes *et al.* (1996), with some modifications. In brief, the ventral prostates of young adult (90 days old) Wistar rats were minced into 1-2 mm³ fragments and placed in DMEM (Nutricell, Campinas SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin solution, 5 µg/mL insulin (BioBrás, Belo Horizonte MG, Brazil), and 0.5 µg/mL testosterone cypionate (Novaquímica-Sigma Pharma, Hortolândia SP, Brazil) in 24-well culture plates. The medium was changed every 48 h.

At 80% confluence, SMC were replated using trypsin/EDTA (Nutricell) and cultured in 25-cm² culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells at passage 8 were used for the experiments. To confirm the SMC nature of the cells, light microscopy and cell staining for SM-MHC were used to assess morphological and differentiation characteristics of the cells.

2.2. Mechanical stretching

Prostatic SMC were seeded onto 6-well silicone culture plates coated with type I collagen (Culture Plate, Flexcell Co., Lexington, KY, USA) and grown in DMEM supplemented with 10%

FBS. After achieving confluence (48 h), the medium was changed to medium supplemented with 0.2% FBS and the cells were incubated for 12 h and then submitted to mechanical stretch.

Cells were subjected to various degrees of stretch (5, 10 and 15%) for 30, 60 and 90 min. Cyclic and static stretch was applied. The cyclic stretch cycle consisted of 5 s of stretch plus 5 s of relaxation (0.1 Hz) and the static cycle consisted of continuous stretch without relaxation. Stretch was applied using a computer-controlled, vacuum-operated strain-inducing device (Flexcell Strain Unit FX-3000, Lexington, KY, USA). At the end of stretching, cells were left undisturbed for 6 h.

Control cells were incubated in parallel under identical conditions but were not submitted to mechanical stretch. At the end of the experimental protocols, the cells were scraped from the membranes, fixed for immunocytochemistry, enzymatically removed for FACS, or lysed for immunoblotting.

2.3. Morphology of SMC

Photographic documentation of cell cultures after mechanical stretch was performed with a phase-contrast microscope (Axioskop, Carl Zeiss, Jena, Germany) using Kodak 100 ASA color films.

2.4. Immunoblotting

SMC were lysed in 600 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM norleucine, 5 mM benzamidine, 5 mM NEM, 10 mM EDTA, 0.1% Triton and 1 mM PMSF, and homogenized in an ultrasonic cell disruptor (Catel, Campinas, SP, Brazil). The homogenates were centrifuged for 20 min at 11,000 *g* at 4°C and the soluble fraction was collected. Total protein in the extracts was quantified according to the method of Bradford using Bio-Rad protein assay reagent (BioAgency, São Paulo, SP, Brazil).

Fifty microgram of protein from the extracts was electrophoresed on 6% and 12% polyacrylamide gel, followed by electric transfer (Hoefer, San Francisco, CA, USA) onto nitrocellulose membranes (Amersham, Buckinghamshire, England). The membranes were

blocked for 1 h with 1% non-fat milk in TBS-T, followed by overnight incubation with 0.1% non-fat milk in TBS-T with monoclonal IgG1 anti-SM-MHC (cat. sc-6956, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or monoclonal anti-SM α -actin (cat. A2547, Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The membranes were washed in TBS-T and incubated for 1 h with bovine anti-mouse IgG-HRP (cat. sc-2371, Santa Cruz), followed by detection with the ECL system (Amersham).

2.5. Immunocytochemistry

For Ki67 immunocytochemistry, cells were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde in PBS. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ in methanol for 15 min. Cells were washed thrice in PBS and incubated overnight at 4°C with monoclonal anti-Ki67 antibody (Clone MM1; cat. NCL-ki67-MM1, Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK) diluted 1:100. Immunoperoxidase staining was performed with the Novostain Super ABC kit (Novocastra) according to manufacturer instructions. Peroxidase activity was developed using 3,3'-diaminobenzidine and then counterstained with methyl green. At least 230 cells were counted per experimental condition.

2.6. Flow cytometry

The method of F-actin staining with fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin was used for the determination of cell size. Once the stretch protocol was completed, cells were enzymatically dissociated (0.05% trypsin) and collected by centrifugation at 300 g for 10 min. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, washed three times in PBS and incubated with FITC-phalloidin (cat. 1951, Sigma Chemical Co.) in staining buffer (100 mM Tris, pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40) for 30 min. Analyses were carried out using a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA). A minimum of 5,000 events were collected and analyzed for each experimental point.

2.7. Statistical analysis

Differences between groups were evaluated by analysis of variance (ANOVA) using a trial version of the MINITAB 14 program. Statistical significance was considered for p values ≤ 0.05 . For immunoblots, data are reported as the mean band intensity ± 1 SD (n = 3).

3. Results

3.1. Characterization of prostatic SMC

Cultured cells were examined to confirm their smooth muscle origin and their differentiated state. Cell morphology demonstrated SMC characteristics, such as an ellipsoid shape with tapered ends and a single, centrally located nucleus. Cells were tightly packed and showed the typical “hill and valley” appearance in culture. SM-MHC staining revealed that more than 95% of the cells were SMC (data not shown).

3.2. Mechanical stretch of SMC induces morphological changes

SMC showed morphological changes after mechanical stretch. Both static and cyclic stretch produced morphological alterations in SMC 6 h after the end of loading. After stretching, the SMC showed long and fine processes with characteristic adhesion points at the extremities. The cell nucleus became more evident, probably as a result of cell elongation. These alterations became more marked with increasing stretch intensity. Cell adhesion to each other, but not to the substrate, seemed to be reduced (Fig. 1).

3.3. Cyclic but not static mechanical stretch increases the amount of SM-MHC and SM α -actin

SMC responded differently to cyclic or static stretch. Western blotting demonstrated a time-dependent increase in SM-MHC and SM α -actin concentrations. When subjected to cyclic stretch, the main difference was observed after 90 min of stretching. This period was then used to analyze the influence of stretch intensity (Figs. 2 and 3). Since SM-MHC is an important

cytoskeletal and contractile protein associated with reduced cell proliferation, these results suggest an increase in contractile function after cyclic stretch (Fig. 2A). A similar behavior was observed in SM α -actin assays, with cyclic stretch increasing protein levels (Fig. 3A) However, while a 95% increase in SM-MHC was observed after 15% elongation during cyclic stretching, the increase in SM-MHC was only 40% under similar conditions during static stretching. No difference in the expression of SM-MHC or SM α -actin levels was observed after static stretch (Figs. 2B and 3B).

3.4. Mechanical stretch affects cell proliferation

Proliferating cells were identified using Ki67, a nuclear marker protein that is expressed throughout the cell cycle (G1, S, G2 and mitosis), but is absent in resting cells (G0) (Lopez *et al.*, 1991; Schluter *et al.*, 1993).

Both dynamic and static mechanical stretch inhibited SMC proliferation. A decrease in the number of proliferating cells was observed during dynamic stretch (32% in controls versus 7.5% in mechanically stretched cells) at deformation rates of 10 and 15% (Fig. 4A). Static stretch caused a similar drop in cell proliferation only after 15% deformation (Fig. 4B).

3.5. Cyclic mechanical stretch increases cell size

Further evidence suggesting that mechanical stretch increases cell size was provided by quantifying F-actin by FACS analysis. Phalloidin specifically binds at the interface between F-actin subunits, connecting adjacent subunits. Phalloidin is a bicyclic heptapeptide that binds much more tightly to actin filaments than to actin monomers, leading to a decrease in the rate constant for the dissociation of actin subunits from filament ends, which essentially stabilizes actin filaments through the prevention of filament depolymerization (Cooper, 1987). Staining with phalloidin followed by FACS was applied to determine whether individual cells accumulated cytoskeletal components. The results demonstrated that cyclic stretch caused a 70% increase in F-actin staining intensity on a per cell basis after 15% elongation (Fig. 5A). No such effect was induced by static stretching (Fig. 5B).

4. Discussion

The results obtained in this study demonstrated that prostatic SMC respond to cyclic but not to static mechanical stretch with increases in the levels of SM α -actin, SM-MHC contractile protein and F-actin content per cell, in addition to compromising cell proliferation. These results suggest that the brief stretch stimulus caused a physiological adaptation, resulting in cell hypertrophy.

SMC account for 22% of the total area of the human prostate (Shapiro *et al.*, 1992) and are predominant around the ducts, where they are in close contact with the basal lamina of epithelial cells. In the rat ventral prostate, SMC occupy 5% of the total volume of the gland and 14% of the stroma (Antonioli *et al.*, 2004). In addition to being responsible for contraction of the gland during ejaculation, SMC play a predominant role in the control of prostate morphogenesis (Chrisman & Thomson, 2006) and in the mechanisms of paracrine stimulation, especially in the epithelium (Cunha *et al.*, 1996; Farnsworth, 1999). SMC exhibit great functional plasticity and are able to modulate their phenotype by changing the expression of specific proteins in response to different physiological and pathological stimuli (Owens, 1995; Worth *et al.*, 2001; Owens *et al.* 2004).

SM α -actin is a good differentiation marker of SMC. It is the first protein expressed by differentiating SMC during development (Frid *et al.*, 1992; Hungerford & Little, 1999) and is highly selective for SMC in adult animals under normal conditions. This protein is abundant in differentiated SMC, accounting for up to 40% of total protein content in the cells (Fatigati *et al.*, 1984).

The expression of SM-MHC has been extensively studied. Myosin is a highly conserved protein that interacts with actin to generate the force necessary for cellular movement (Cheney *et al.*, 1993). Conventional myosins are hexameric proteins that consist of two heavy chain subunits, one light non-phosphorylated 17-kDa subunit pair and one light phosphorylated 20-kDa subunit pair (Owens, 1995). Three myosin genes have been cloned: smooth muscle, skeletal and non-skeletal myosins (Weiss & Leinwand, 1996).

The contractile activity of SMC is regulated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of the myosin light chain mediated by its kinase (Horowitz *et al.*, 1996). The myosin heavy chains contain actin-activated ATPase activity that generates the motor function of

myosin (Weiss & Leinwand, 1996). The two smooth muscle myosin heavy chain isoforms, SM1 and SM2, are generated by alternative splicing. SM1 is a 204-kDa protein and SM2 is a 200-kDa protein that is truncated in its carboxy-terminal region (Nagai *et al.*, 1989).

Since the increase in SM-MHC concentration (95% increases) was higher than those observed for SM α -actin (~40%) and F-actin (~70%), one may suppose that the contractile force of SMC is enhanced after mechanical stimulation.

Prostatic secretion is not a discontinuous process and the existence of a continuous retrograde flow to the bladder has been demonstrated (Farnsworth & Lawrence, 1965; Huggins, 1945), indicating that prostatic SMC mediate tonic contraction of the prostatic gland. Spontaneous contractions have been demonstrated by some investigators. Exintaris *et al.* (2002) showed that strips of normal prostates exhibit rhythmic contractions with an irregular amplitude ranging from 0.2 to 2 mN. Hib & Magarinos (1989) observed that control prostates exhibited a rhythmic contractile activity with a mean frequency of 7 contractions/60 min and a mean amplitude of 79 μ m. Spontaneous contractions have also been demonstrated in isolated prostatic SMC maintained in culture (Corvin *et al.*, 1998; Boesch *et al.*, 2000).

Our results showed that SMC modify their morphology after mechanical stretching and lose contact with each other. Cell adhesion to the substratum was more frequently seen at the extremity of cell processes and the nucleus was more evident, probably because of a decrease in cell width.

Galvin *et al.* (2002), using human bladder SMC, showed that cyclic mechanical stretch applied at an intensity of 12.37% for 48 h increased cell proliferation and size, but reduced the rate of apoptosis. These results are in agreement with those reported by Yu *et al.* (2003), who demonstrated an increase in cell proliferation using rat bladder SMC subjected to 10, 20 and 30% degrees of stretch for 24 h. Hubschmid *et al.* (2005) investigated the influence of cyclic mechanical stretch on the proliferation of human urinary tract (bladder and ureter) SMC subjected to 20% stretch for 10 days. These authors showed that mechanical stretch reduced cell growth, but had no influence on the expression of differentiation markers. Su *et al.* (2006) demonstrated that cyclic mechanical stretch at 1 Hz and 10% elongation for 24 h induced apoptosis of vascular SMC and that this apoptosis resulted from increased BAD levels, in contrast to decreases in Bcl-2 expression. The apparent discrepancies in the above results might

reflect methodological peculiarities, as well as differences in the cell type, intensity and periods of stretching.

Our study demonstrated that cyclic stretch loading caused a significant increase in SM-MHC and SM α -actin concentrations, suggesting that alternating stretch-relaxation cycles stimulate cytoskeletal protein accumulation by increasing protein synthesis and/or decreasing protein degradation.

The results were time and intensity dependent. The fact that proliferation was impaired suggests that SMC preserved their differentiation state and became hypertrophic. To confirm this assumption, we measured the amount of F-actin on an individual cell basis by FACS after staining with FITC-labeled phalloidin. The results showed a significant increase in fluorescence intensity and support the idea that SMC became hypertrophic.

The fact that these results were not observed in cells submitted to static stretch led us to suppose that cells are not adapted to respond to continuous stimuli and detach from the substratum if subjected to strenuous loading. These findings led us to speculate that, apart from elongation, stretch and relaxation frequency may also play an important role in the control of cell phenotype.

The present study contributed to the understanding of the physiological regulation of prostatic SMC and raised questions regarding the molecular pathways underlying loading. This study will certainly encourage further research using this model system. Although it is widely believed that benign prostatic hyperplasia results from hormonal (androgens) and neural (α -adrenergic) stimulation, one might end up finding that this condition has a mechanical etiological component.

References

- Antonioli E, Della Colleta HHM & Carvalho HF (2004). Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* **25**:135-141.
- Bartsch GJ., Frick I, Ruegg M, Bucher O, Holliger M, Oberholzer & Rohr HP (1989). Electron microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* **122**:481-486.
- Boesch ST, Dobler G, Ramoner R, Corvin S, Thurnher M, Bartsch G & Klocker H (2000). Effects of α 1-adrenoceptor antagonists on cultured prostatic smooth muscle cells. *Prostate* (Suppl.) **9**:34-41.
- Cheney RE, Riley MA & Mooseke MS (1993). Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motil Cytoskelet* **24**:215-223.
- Chicurel ME, Chen CS & Ingber DE (1998). Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol* **10**:232-240.
- Chrisman H & Thomson AA (2006). Regulation of urogenital smooth muscle patterning by testosterone and estrogen during prostatic induction. *Prostate* **66**:696-707.
- Cooper JA (1987). Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J Cell Biol* **105**:1473-1478.
- Corvin S, Bosch ST, Eder I, Thurnher M, Bartsch G & Klocker H (1998). Videomicroscopy of prostatic stromal-cell contraction: an in vitro model for studying drug effects. *Prostate* **37**:209-214.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R & Foster BA (1996). Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat* **155**:63-72.
- Doevendans PA & van Eys G (2002). Smooth muscle cells on the move: the battle for actin. *Cardiovasc Res* **54**:499-502.
- Exintaris B, Klemm MF & Lang RJ (2002). Spontaneous slow wave and contractile activity of the guinea pig prostate. *J Urol* **168**:315-322.
- Farnsworth WE & Lawrence MH (1965). Regulation of prostate secretion in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **119**:373-376.
- Farnsworth WE (1999). Prostate stroma: Physiology. *Prostate* **38**:60-72.

- Fatigati V & Murphy RA (1984). Actin and tropomyosin variants in smooth muscles: Dependence on tissue type. *J Biol Chem* **259**:14383-14388.
- Frid MG, Shekhonin BV, Koteliansky VE & Glukhova MA (1992). Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: Late expression of heavy caldesmon and calponin. *Dev Biol* **153**:185-193.
- Galvin DJ, Watson RW, Gillespie JI, Brady H & Fitzpatrick JM (2002). Mechanical stretch regulates cell survival in human bladder smooth muscle cells *in vitro*. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**:F1192-F1199.
- Gerdes MJ, Dang Truong D, Lu B, Larsen M, McBride L & Rowley DR (1996). Androgen-regulated proliferation and gene transcription in a prostate smooth muscle cell line (PS -1). *Endocrinology* **137**:872-876.
- Haynes JM & Ventura S (2005). Current models of human prostate contractility. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**:797-804.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS & Cunha GR (1996). Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* **155**:94-103.
- Hib J & Magarinos GA (1989). Effects of castration, androgen replacement and flutamide treatment on the contractile function of the rat prostate. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* **39**:281-287.
- Horowitz A, Menice CB, LaPone R & Morgan KG (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* **76**:967-1003.
- Hubschmid U, Leong-Morgenthaler P-M, Basset-Dardare A, Ruault S & Frey P (2005). *In Vitro* Growth of Human Urinary Tract Smooth Muscle Cells on Laminin and Collagen Type I-Coated Membranes under Static and Dynamic Conditions. *Tissue Eng* **11**:161-171.
- Huggins C (1945). The physiology of the prostate gland. *Physiol Rev* **25**:281-295.
- Hungerford JE & Little CD (1999). Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* **36**:2-27.
- Kofoed JA, Tumilasci OR, Curbelo HM, Fernandez Lemos SM, Arias NH & Houssay AB (1990). Effects of castration and androgens upon prostatic proteoglycans in rats. *Prostate* **16**:93-102.

- Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P & Boisseau MR (1991). Modalities of synthesis of Ki-67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* **12**:42-49.
- Nagai R, Kuro-O M, Babij P & Periasamy M (1989). Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J Biol Chem* **264**:9734-9737.
- Owens GK (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* **75**:487-517.
- Owens GK, Kumar MS & Wamhof BR (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**:767-801.
- Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD & Gerdes J (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* **123**:513-522.
- Shapiro E, Hartanto V, Becich MJ & Lepor H (1992). The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic BPH. *J Urol* **147**:1293-1297.
- Smith P, Rhodes NP, Beesley C, Ke Y & Foster CS (1998). Prostatic stromal cell phenotype is directly modulated by norepinephrine. *J Urol* **51**:663-670.
- Smith P, Rhodes NP, Ke Y & Foster CS (1999). Influence of the alpha1-adrenergic antagonist, doxazosin, on noradrenaline-induced modulation of cytoskeletal proteins in cultured hyperplastic prostatic stromal cells. *Prostate* **38**:216-227.
- Su BY, Shontz KM, Flavahan NA, Nowicki PT (2006). The effect of phenotype on mechanical stretch-induced vascular smooth muscle cell apoptosis. *J Vasc Res* **43**:229-237.
- Vilamaior PSL, Taboga SR & Carvalho HF (2005). Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int* **29**:809-816.
- Weiss A & Leinwand LA (1996). The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**:417-439.

Worth NF, Rolfe BE, Song J & Campbel GR (2001). Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **49**:130-145.

Yu G, Bo S, Xiyu J & Enqing X (2003). Effect of bladder outlet obstruction on detrusor smooth muscle cell: an *in vitro* study. *J Surg Res* **114**:202-209.

Figure legends

Figure 1. Both cyclic (a) and static (b) stretch altered smooth muscle cell morphology. Cells became less spread, but preserved the adhesion to the substratum through cell processes containing adhesion points at their ends.

Figure 2. Effect of cyclic (A) and static (B) stretch on SM-MHC levels determined by immunoblotting. After cyclic stretch (A) SM-MHC concentration was dependent on stretch intensity. After static stretch (B) no difference was observed for the different intensities. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups. Results are the mean \pm SD after normalization to control (100%). Representative blots are shown.

Figure 3. Effect of cyclic (A) and static (B) stretch on smooth muscle alpha-actin levels determined by immunoblotting. After cyclic stretch (A) an increase in protein levels was observed at 10% and 15% deformation. After static stimulation (B) no difference was observed for the different stretch intensities. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups. Results are the mean \pm SD after normalization to control (100%). Representative blots are shown.

Figure 4. Effect of mechanical stretch on cell proliferation. Percentage of Ki67-stained cells after cyclic (A) and static stretch (B). Cyclic stretching was more efficient in reducing cell proliferation, with 5% stretching causing a significant drop. More intense stretching (10% and 15% deformation) was even more effective. Only maximum (15%) static stretching reduced cell proliferation. Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$). Results are the mean \pm SD.

Figure 5. FACS analysis of FITC-phalloidin staining intensity after mechanical stretch. Cyclic stretch (**A**) induced an increase of cytoskeletal F-actin mass. This was not observed after static stretch (**B**). Note the mechanical stretch intensity-dependent increase in fluorescence intensity (arbitrary units, AU). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Results are the mean \pm SD after normalization to control (100%).

Figure 1.

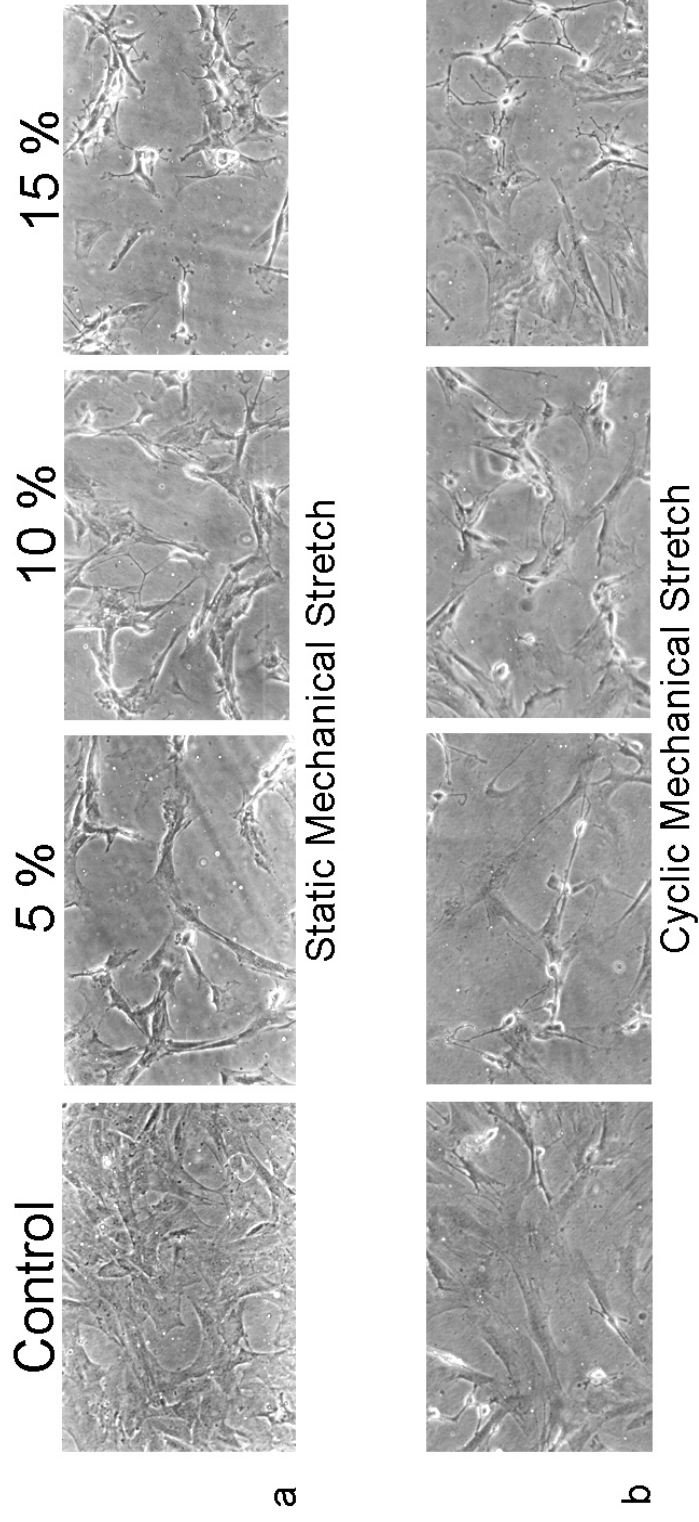


Figure 2.

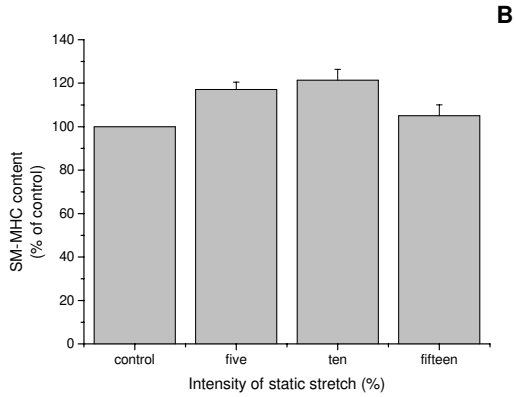
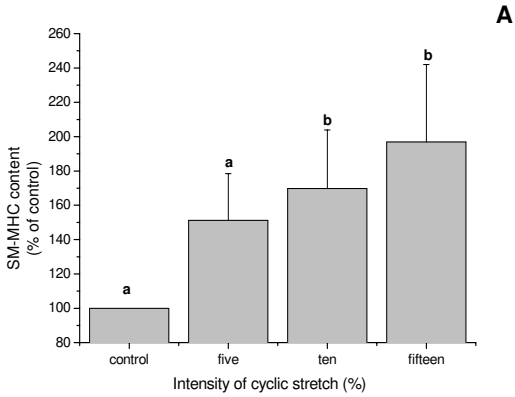
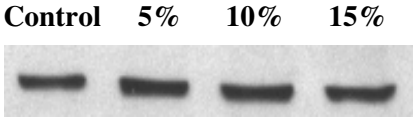
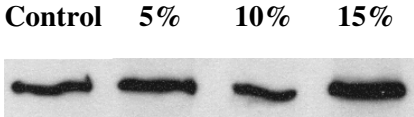


Figure 3.

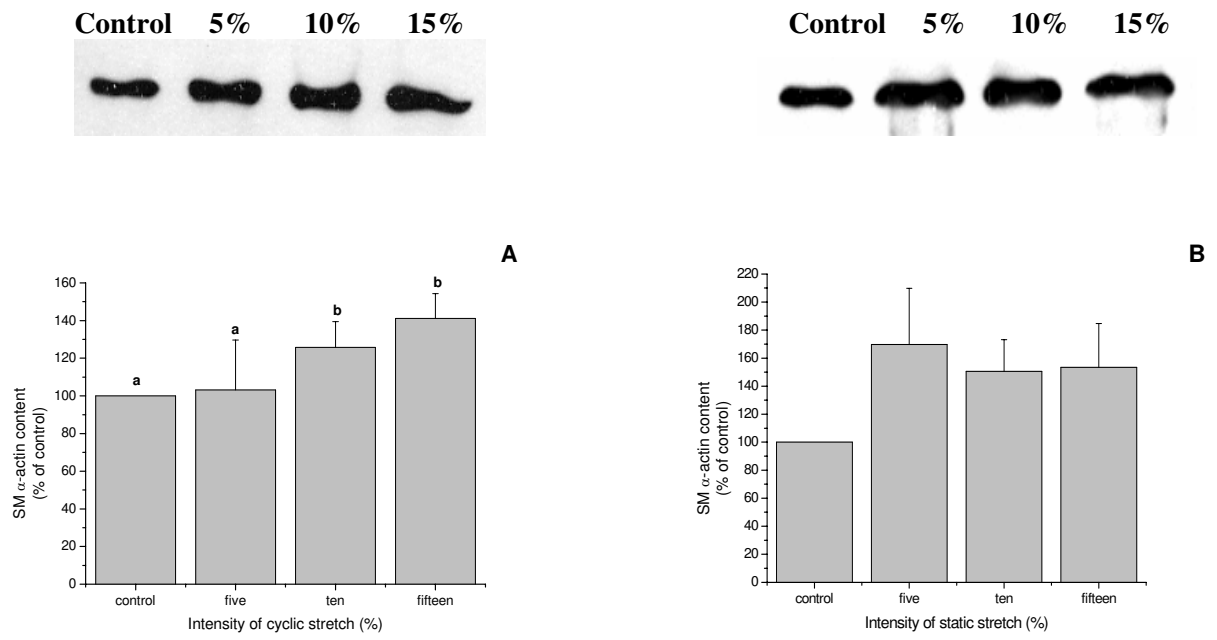


Figure 4.

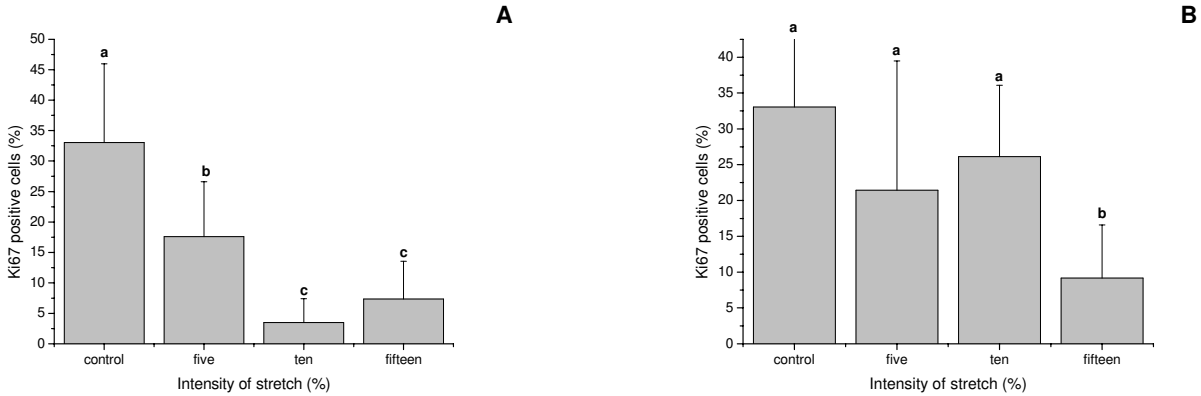
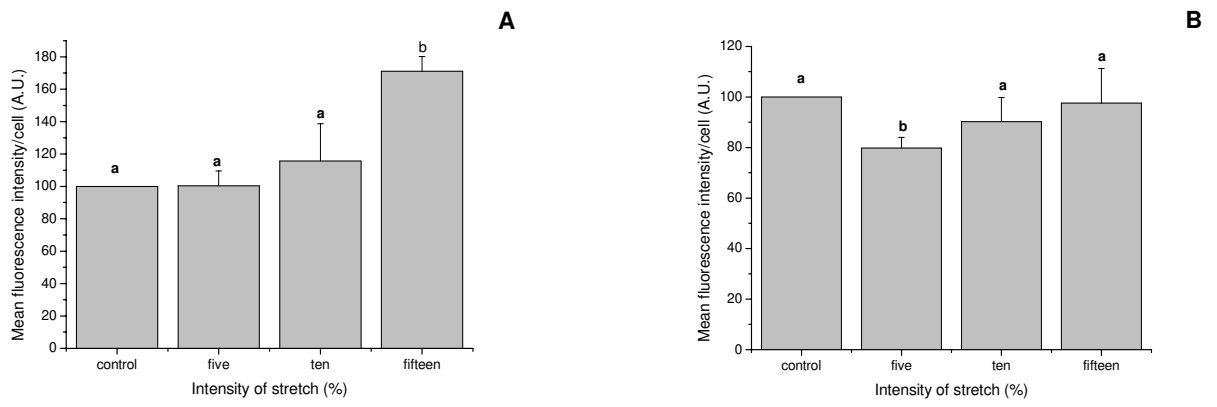


Figure 5.



IV. Considerações Finais

1. Demonstrou-se que as CML prostáticas preservam os principais marcadores de diferenciação de músculo liso, detectados por imunocitoquímica (α -actina de músculo liso e cadeia pesada de miosina) e RT-PCR (*smoothelin*, calponina e sm22) mesmo 100 dias após castração.

2. A próstata ventral de ratos após 100 dias de castração, demonstra uma significativa redução no peso relativo, correspondendo a apenas 5,6% dos controles.

3. Análises estereológicas da próstata ventral de ratos após 100 dias de castração, demonstraram que o procedimento não resulta em nenhuma modificação da fração volumétrica prostática (“volume density”) ocupada pelas CML. Entretanto, considerando a grande redução do peso da próstata, o longo período de privação androgênica está associada a uma significativa diminuição do volume prostático ocupado por CML.

4. Análises em microscopia eletrônica de transmissão das próstatas ventrais de rato após 100 dias de castração demonstraram uma marcante reorganização das CML, sendo proeminente a retração do citoplasma. Foram observadas características estruturais de CML diferenciadas, como a presença de abundantes componentes miofibrilares, placas densas, lâmina externa e cavéolas.

5. O conjunto dos resultados apresentados neste estudo suporta a idéia de que as CML são capazes de modular o seu fenótipo (contrátil vs. sintético) sem alterar o seu estado diferenciado.

6. As CML prostáticas sofrem modulação fenotípica frente à privação androgênica. Esta modulação fenotípica das CML não pode ser tomada como uma resposta passiva, mas deve ser considerada como uma adaptação ativa para a nova condição hormonal da próstata.

7. O estiramento mecânico afeta a proliferação celular e o acúmulo das proteínas SM-MHC, α -actina de músculo liso e actina filamentar pelas CML isoladas de próstatas ventrais de rato e cultivadas *in vitro*.

8. As CML prostáticas respondem de maneira diferente ao estiramento cíclico e estático. O estiramento cíclico causa um aumento na quantidade das proteínas contráteis SM-MHC, α -actina de músculo liso e na actina filamentar, enquanto o estiramento estático não produz tal alteração.

9. O aumento na quantidade de proteínas contráteis observado nas CML prostáticas após o estiramento cíclico, provavelmente é o resultado de uma adaptação fisiológica resultando na hipertrofia celular.

10. A diferença entre os resultados obtidos com o estiramento estático e cíclico sugere que os ciclos de estiramento-reposo consistem num estímulo para o acúmulo de proteínas do citoesqueleto.

11. Em conclusão, os presentes resultados confirmam que as CML apresentam grande versatilidade fenotípica, respondendo não somente a variações nos estímulos hormonais, mas também na demanda funcional.

V. Referências Bibliográficas

- Almendral JM, Santaren J F, Perera J, Zerial M, Bravo R. Expression, cloning and cDNA sequence of a fibroblast serum-regulated gene encoding a putative actin-associated protein (p27). *Exp Cell Res* 181:518–530, 1989.
- Antonioli E. Modulação hormonal do comportamento das células musculares lisas prostáticas in vitro e in vivo. Tese de mestrado. UNICAMP, 2003.
- Antonioli E, Della Colleta HHM, Carvalho HF. Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* 25:135-141, 2004.
- Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, and Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 103:521–529, 1992.
- Augusto TM, Carvalho HF Prostatic remodeling after castration involves heparanase activation (manuscrito em preparação).
- Aümuller G. Prostate gland and seminal vesicles. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Edited by A okche and L. Vollrath. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, vol VII/6.1, 1979.
- Bartlett MR, Underwood PA, Parish CR. Comparative analysis of the ability of leucocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: evidence for cytokine dependence and detection of a novel sulfatase. *Immunol Cell Biol* 73:113-124, 1995.
- Basson CT, Kocher O, Basson MD, Asis A, and Madri JA. Differential modulation of vascular cell integrin and extracellular matrix expression in vitro by TGF-beta 1 correlates with reciprocal effects on cell migration. *J Cell Physiol* 153:118–128, 1992.
- Bernard D, Mehul B, Delattre C, Simonetti L, Thomas-Collignon A, Schmidt R. Purification and characterization of the endoglycosidase heparanase 1 from human plantar stratum corneum: a key enzyme in epidermal physiology? *J Invest Dermatol* 117:1266-1273, 2001.

- Bingley JÁ, Hayward IP, Campbel JH, Campbel GR. Arterial heparan sulfate proteoglycans inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and phenotype change in vitro and neointimal formation in vivo. *J Vasc Surg* 28(2):308-318, 1998.
- Boesch ST, Corvin S, Zhang J, Rogastsch H, Bartsch G, Klocker H. Modulation of the differentiation status of cultured prostatic smooth muscle cells by an α 1-adrenérgic receptor antagonist. *Prostate* 39:226-233, 1999.
- Boesch ST, , Dobler G, Ramoner R, Corvin S, Thurnher M, Bartsch G, Klocker H. Effects of α 1-adrenoceptor antagonists on cultured prostatic smooth muscle cells. *Prostate (Suppl.)* 9:34-41, 2000.
- Bradley AB, Morgan KG. Alterations in cytoplasmatic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol* 385:437-440, 1987.
- Brandes D. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int Rev Cytol* 20:207-276, 1966.
- Brändströn A, Westin P, Bergh A, Cajander S, Damber J-E. Castration induces apoptosis in the ventral prostate but not in androgen sensitive prostatic adenocarcinoma in the rat. *Cancer Res* 54:3594-3601, 1994.
- Buttayan R. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* 140:1920-1926, 1999.
- Carvalho HF, Line SRP. Basement membrane associated changes in the rat ventral following castration. *Cell Biol Int* 20:809-819, 1996.
- Cheney RE, Riley MA, Mooseke MS. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motil Cytoskelet* 24:215-223, 1993.
- Chrisman H, Thomson AA. Regulation of urogenital smooth muscle patterning by testosterone and estrogen during prostatic induction. *Prostate* 66(7):696-707, 2006.
- Cintorino M, Vindigni C, Dell Vecchio MT, Tosi P, Frezzotti R, Hadjistilianou T, Leoncini P, Silvestri S, Skalli O, Gabbiani G. Expression of actin isoforms and intermediate filament proteins in childhood orbital rhabdomyosarcomas. *J Submicrosc Cytol Pathol* 21(3):409-419, 1989.

- Cintorino M, Bellizzi de Marco E, Leoncini P, Tripodi SA, Xu LJ, Sappino AP, Schmitt-Graff A, Gabbiani G. Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes. *Int J Cancer* 47(6):843-846, 1991.
- Collins AT, Zhiming B, Gilmore K, Neal DE. Androgen and oestrogen responsiveness of stromal cells derived from the human hyperplastic prostate: oestrogen regulation of the androgen receptor. *J Endocrinol* 143:269-277, 1994.
- Corbier P, Martikainen P, Pestis J, Harkonen P. Experimental research on the morphofunctional differentiation of the rat ventral prostate: roles of the gonads at birth. *Arch Physiol Biochem* 103:699-714, 1995.
- Corvin S, Bosch ST, Eder I, Thurnher M, Bartsch G, Klocker H. Video imaging of prostatic stromal-cell contraction: An in vitro model for studying drug effects. *Prostate* 37:209-214, 1998.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrinol Rev* 8:338-362, 1987.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat* 155:63-72, 1996.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker P.C, Risbridger G, Hayward S. W, Wang Y.Z, Donjacour A.A, Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 92:221-236, 2004.
- Danninger C, Gimona M. Live dynamics of GFP-calponin: isoform-specific modulation of the actin cytoskeleton and autoregulation by C-terminal sequences. *J Cell Sci* 21:3725-3736, 2000.
- Davies P, Eaton CL. Regulation of prostate growth. *J Endocrinol* 131:5-17, 1991.
- DeKlerk DP, Lee, DV, Human HJ. Glycosaminoglycans of human prostatic cancer. *J. Urol* 131:1008-12, 1984.

- Della-Coletta HHM. Conteúdo, biossíntese e degradação de ácido hialurônico na próstata ventral de ratos: efeito da castração e papel das células musculares lisas. Tese de doutorado. UNICAMP, 2005.
- Dempsey LA, Plummer TB, Coombes SL, Platt JL. Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage. *Glycobiol* 10:467-75, 2000.
- Dixon JS, Jen PY, Gosling JA. The distribution of vesicular acetylcholine transporter in the human male genito-urinary organs and its co-localization with neuropeptide Y and nitric oxide synthase. *Neurourol Urodyn* 19:185-192, 2000.
- Doevendans PA, van Eys G. Smooth muscle cells on the move: the battle for actin. *Cardiovascular Research* 54:499-502, 2002.
- Donjacour AA, Cunha GR. The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Dev Biol* 128:1-14, 1988.
- Exintaris B, Klemm MF, Lang RJ. Spontaneous slow wave and contractile activity of the guinea pig prostate. *J Urol* 168:315-322, 2002.
- Farnsworth WE and Lawrence MH. Regulation of prostate secretion in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 119:373-376, 1965.
- Farnsworth WE. Prostate stroma: Physiology. *Prostate* 38:60-72, 1999.
- Fatigati V and Murphy RA. Actin and tropomyosin variants in smooth muscles: Dependence on tissue type. *J Biol Chem* 259:14383-14388, 1984.
- Fernandes JKH. Caracterização dos glicosaminoglicanos da próstata ventral, glândula de coagulação e vesícula seminal de ratos: efeitos da castração. Tese de Mestrado, UNICAMP, 2000.
- Freeman SN, Rennie PS, Chao J, Lund LR, Andreasen PS. Urokinase- and tissue-type plasminogen activators are suppressed by cortisol in the involuting prostate of castrate rats. *Biochem J* 269:189-193, 1990.

- Frid MG, Shekhonin BV, Koteliansky VE, Glukhova MA. Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: Late expression of heavy caldesmon and calponin. *Dev Biol* 153:185-193, 1992.
- Furuya S, Kumamoto Y, Yokoyama E, Tsukamoto T, Izumi T, Abiko Y. Alpha-adrenergic activity and urethral pressure in prostatic zone in benign prostatic hypertrophy. *J Urol* 128:836-839, 1982.
- Gerdes MJ, Dang Truong D, Lu B, Larsen M, McBride L, Rowley DR. Androgen-regulated proliferation and gene transcription in a prostate smooth muscle cell line (PS -1). *Endocrinology* 137:872-876, 1996.
- Gerdes M.J, Dang T.D; Larsen M; Rowley.R.D. Transforming Growth Factor- β 1 Induces Nuclear to Cytoplasmic Distribution of Androgen Receptor and Inhibits Androgen Response in Prostate Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 139:3569-3577, 1998.
- Gerdes MJ, Larsen M, Dang TD, Ressler SJ, Tuxhorn JA, Rowley DR. Regulation of rat prostate stromal cell myodifferentiation by androgen and TGF-beta1. *Prostate* 58(3):299-307, 2004.
- Gimona M, Kaverina I, Resch GP, Vignal E, Burgstaller G. Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* (6):2482-2491, 2003.
- Goulas A, Hatzichristou DG, Karakiulakis G, Mirtsou-Fidani V, Kalinderis A, Papakonstantinou E. Benign hyperplasia of the human prostate is associated with tissue enrichment in chondroitin sulphate of wide size distribution. *Prostate* 44:104-110, 2000.
- Hägström S, Wikström P, Bergh A, Damber J-E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rat ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration. *Prostate* 36:71-79, 1998.
- Hamilton, W, Boyd J, Mossman H. *Human Embriology* Williams and wilkins Co., Baltimore, 1959.
- Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod* 45:308-321, 1991.

- Hayek OR, Shabsigh A, Kaplan SA, Kiss AJ, Chen MW, Burchardt T, Burchardt M, Olsson CA, Buttyan R. Castration induces acute vasoconstriction of blood vessels in the rat prostate concomitant with a reduction of prostatic nitric oxide synthase activity. *J Urol* 162:1527-1531, 1999.
- Haynes JM, Ventura S. Current models of human prostate contractility. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:797-804, 2005.
- Hayward IP, Bridle KR, Campbel GR, Underwood PA, Campbel JH. Effect of extracellular matrix proteins on vascular smooth muscle cell phenotype. *Cell Biol Int* 19(10):839-846, 1995.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS Cunha GR. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 155:94-103, 1996.
- Hayward SW and Cunha GR. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am* 38:1-14, 2000.
- Hib J, Magarinos GA. Effects of castration, androgen replacement and flutamide treatment on the contractile function of the rat prostate. *Acta Physiol Pharmacol Latioam* 39(3):281-287, 1989.
- Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 267:8719-8723, 1992.
- Holterhus PM, Zhao GQ, Aumüller G. Effects of androgen deprivation and estrogen treatment on the structure and protein expression of the rat coagulation gland. *Anat Rec* 235:223-232, 1993.
- Homma Y, Hamada K, Nakayama Y, Tsujimoto G, Kawabe K. Effects of castration on contraction and α 1-adrenoceptor expression in rat prostate. *Br J Pharmacol* 131:1454-1460, 2000.
- Horiuchi A, Nikaido T, Taniguchi S, Fujii S. Possible role of calponin h1 as a tumor suppressor in human uterine leiomyosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 91(9):790-796, 1999.

- Horowitz A, Menice CB, LaPone R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 76:967-1003, 1996.
- Horsfall DJ, Mayne K, Skinner JM, Saccone GT, Marschall VR, Tilley WD. Glycosaminoglycans of guinea pig prostate fibromuscular stroma: influence of estrone and androgen on levels and location of chondroitin sulfate. *Prostate* 25:320-332, 1994.
- Hu Z, Ito T, Yuri K, Xie C, Ozawa H, Kawata M. In vivo time course of morphological changes and DNA degradation during the degeneration of castration-induced apoptotic prostate cells. *Cell Tiss Res* 294:153-160, 1998.
- Huggins C. The physiology of the prostate gland. *Physiol Rev* 25:281-295, 1945.
- Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* 36(1):2-27, 1999.
- Ilan N, Elkin M, Vlodaysky I. Regulation and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *IJBCB* 38:2018-2039, 2006.
- Itoh T, Suzuki S, Suzuki A, Nakamura F, Naka M, Tanaka T. Effects of exogenously applied calponin on Ca(2+)-regulated force in skinned smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *Pflugers Arch* 427(3-4):301-304, 1994..
- Janssen M, Albrecht M, Moschler O, Renneberg H, Fritz B, Aumuller G, Konrad L. Cell lineage characteristics of human prostatic stromal cells cultured in vitro. *Prostate* 43:20-30, 2000.
- Kassen A, Sutkowski DM, Ahn H, Sensibar JA, Koslowski JM, Lee C. Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *Prostate* 128:89-97, 1996.
- Kerr JFR, Searle J. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch Abt [B] Zellpathol* 13:187-192, 1973.
- Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice. *Exp Toxic Pathol* 55:413-431, 2004.
- Kofoed JA, Tumilasci OR, Curbelo HM, Fernandez Lemos SM, Aarias NH, Houssay AB. Effects of castration and androgens upon prostatic proteoglycans in rats. *Prostate* 16:93-102, 1990.

- Kyprianou N, Benning CM. Supresion of human prostate cancer cell growth by α 1-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis. *Cancer Res* 60:4550-4555, 2000a.
- Kyprianou N, Chon J, Benning CM. Effects of alpha1-adrenoceptor (α 1-AR) antagonists on cell proliferation and apoptosis in the prostate: therapeutic implications in prostatic disease. *Prostate* 9:42-46, 2000b.
- Lawson D, Harrison M, Shapland C. Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22 α are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell Motil Cytoskel* 38:250-257, 1997.
- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA, Liao S. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod* 43:1079-1086, 1990.
- Lees-Miller J P, Heeley D H, Smillie L B. An abundant and novel protein of 22 kDa (SM22) is widely distributed in smooth muscles. Purification form bovine aorta. *Biochem J* 244:705-709, 1987.
- Leinweber B, Tang JX, Stafford WF, Chalovich JM. Calponin interaction with alpha-actinin-actin: evidence for a structural role for calponin. *Biophys J* 77(6):3208-3217, 1999.
- Lekås E, Johansson M, Widmark A, Bergh A, Damber JE. Decrement of blood flow precedes the involution of ventral prostate in the rat after castration. *Urol Res* 25:309-314, 1997.
- Levine AC, Ren M, Hubber GK, Kirschenbaum A. The effect of androgen, estrogen, and growth factors on the proliferation of cultured fibroblasts derived from human fetal and adult prostates. *Endocrinology* 130:2413-2419, 1992.
- Lin Y, Ye L-H, Ishikawa R, Fujita K and Kohama F. Stimulatory effect of calponin on myosin ATPase activity. *J Biochem* 113:643-645, 1993.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253: 165-174, 2003.
- Massagué J. A helping hand from proteoglycans. *Current Biol* 1:117-119, 1991.

- Matzner Y, Bar-Ner M, Yahalom J, Ishai-Michaeli R, Fuks Z, Vlodavsky I. Degradation of heparan sulfate in the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. Possible role in invasion through basement membranes. *J Clin Invest* 76:1306-1313, 1985.
- McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, et al. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun* 276:1170-1177, 2000.
- McVary KT, McKenna KE, Lee C. Prostate innervation. *Prostate Suppl* 8:2-13, 1998.
- Men S, Cakar B, Conkbayir I, Hekimoglu B. Detection of prostatic carcinoma: the role of TRUS, TRUS guided biopsy, digital rectal examination, PSA and PSA density. *J Exp Clin Cancer Res* 4:473-480, 2001.
- Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, Barbosa E, Callejo S, Gajate C, Fabra A. Major colocalization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem J* 327:917-23, 1997.
- Nagai R, Kuro-O M, Babij P, Periasarny M. Vertebrate smooth muscle myosin heavy chain (MHCs) exist as two isoforms with molecular masses of 204 and 200 kDa (MHC204 and MHC200) that are generated from a single gene by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem* 264:9734-9737, 1989.
- Nakada T, Kubota Y, Sasagawa I, Suzuki H, Watanabe M, Suzuki Y. The effect of oestradiol-17beta on connective tissue protein in rat prostate. *Int Urol Nephrol* 26:327-335, 1994.
- Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stroma organization. *Prostate* 28: 124-128, 1996.
- Nishimura J, Kolber M, van Breemen C. Norepinephrine and GTP-gamma-S increase myofilament sensitivity in alpha-toxin permeabilized arterial smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 157:677-684, 1988.
- North A J, Gimona M, Lando Z, Small J V. Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. *J Cell Sci* 107:445-455, 1994.

- Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75(3):487-517, 1995.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhof BR. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev* 84:767–801, 2004.
- Paka L, Goldberg IJ, Obunikes JC, Choi SY, Saxena U, Goldberg ID, Pillarisetti S. Perlecan mediates the antiproliferative effect of apolipoprotein E and smooth muscle cells (An underlying mechanism for the modulation of smooth muscle cell growth?). *J Biol Chem* 274(5):36403-36408, 1999.
- Parish CR, Freeman C, Hullet MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta* 1471:M99-M108, 2001.
- Pennefather JN, Lau WA, Mitchelson F, Ventura S. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *J Auton Pharmacol* 20:193-200; 2000.
- Prins GS, Birch L, Greene GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129:3187-3199, 1991.
- Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol* 192(3):259-67, 2002.
- Rasdisky D, Hagios C, Bissel MJ. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol* 11(2):87-95, 2001.
- Roberts R, Gallagher J, Spooner E, Allen TD, Bloomfield F, Dexter TM. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stroma cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332:376-378, 1988.
- Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, Franch R, Puato M, Ausoni S, and Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 89:1111–1121, 2001.

- Sensibar JA, Liu XX, Patai B, Alger B, Lee C. Characterization of castration-induced cell death in the rats prostate by immunohistochemical localization of cathepsin D. *Prostate* 16:263-276, 1991.
- Shabsigh A, Chang DT, Heitjan DF, Kiss A, Olsson CA, Puchner PJ, Buttyan R. Rapid reduction in blood flow to the prostate gland after castration and prostatic endothelial cell survival. *Prostate* 36:201-206, 1998.
- Shabsigh A, Tanji N, D'agati V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O, Shabsigh R, Buttyan R. Vascular anatomy of the rat ventral prostate. *Anat Rec* 256:403-411, 1999.
- Shanahan C M, Weissberg P L, Metcalfe J C. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 73:193-204, 1993.
- Shapiro E, Hartanto V, Becich MJ, Lepor H. The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic BPH. *J Urol* 147:1293-1297, 1992.
- Small J V, Sobieszek A. Studies on the function and composition of the 10-nm (100-A) filaments of vertebrate smooth muscle. *J Cell Sci* 23:243-268, 1977.
- Small J V. Geometry of actin-membrane attachments in the smooth muscle cell: the localisations of vinculin and α -actinin. *EMBO J* 4:45-49, 1985.
- Smith P, Rhodes NP, Beesley C, Ke Y, Foster CS. Prostatic stromal cell phenotype is directly modulated by norepinephrine. *Urology* 51:663-670, 1998.
- Smith P, Rhodes NP, Ke Y, Foster CS. Influence of the alpha1-adrenergic antagonist, doxazosin, on noradrenaline-induced modulation of cytoskeletal proteins in cultured hyperplastic prostatic stromal cells. *Prostate* 38:216-227, 1999.
- Smith P, Rhodes NP, Ke Y, Foster CS. Modulator effect of estrogen and testosterone on prostatic stromal cell phenotype differentiation induced by noradrenaline and doxazosin. *Prostate* 44:111-117, 2000.
- Somlyo AP. Signal transduction. Romantic interludes raise blood pressure. *Nature*, 389:990-998, 1997.

- Somlyo AP, Wu X, Walker LA, Somlyo AV. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134:201-211, 1999.
- Song J, Wan Y, Rolfe BE, Campbel JH, Campbel GR. Effect of estrogen on vascular smooth muscle cells is dependent upon cellular phenotype. *Atherosclerosis* 140(1):97-104, 1998.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA, Bigsby RM, Brody JR. Whole-mount autoradiography study of DNA synthetic activity during postnatal development and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34:985-995, 1986.
- Sugimura Y, Sakurai M, Hayashi N, Yamashita A, Kawamura J (1994) Age-related changes of the prostate gland in the senescence-accelerated mouse. *Prostate* 24:24-32, 1994.
- Szymanski PT and Tao T. Interaction between calponin and smooth muscle myosin. *FEBS Lett* 331:256–259, 1993.
- Taketa S, Nishi N, Takasuga H, Okutani T, Takenaka I, Wada F. difference in growth requirements between epithelial and stromal cells derived from rat ventral prostate in serum-free primary culture. *Prostate* 17:207-218, 1990.
- Terry DE, Clark AF. Glycosaminoglycans in the three lobes of the rat prostate following castration and testosterone treatment. *Biochem Cell Biol* 74:653-658, 1996.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development* 129:1905-1912, 2002.
- Thweatt R, Lumpkin C K, Goldstein S. A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Commun* 187:1–7, 1992.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166:2472-2483, 2001.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: Age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 40:121-128, 2005.
- Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol* 67:149-59, 2000.

- van der Loop FTL, Schaart G, Timmer EDJ, Ramaekers FCS, van Eys GJJM. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific smooth muscle cells. *JCell Biol* 134(2):401-411, 1996.
- van Eys GJ, Voller MC, Timmer ED, Wehrens XH, Small JV, Schalken JA, Ramaekers FC, van der Loop FT. Smoothelin expression characteristics: development of a smooth muscle cell in vitro system and identification of a vascular variant. *Cell Struct Funct* 22(1):65-72, 1997.
- Victorio SCS. Regulação da expressão e atividade do receptor de andrógeno em células musculares lisas prostáticas in vitro. Tese de mestrado. UNICAMP, 2006.
- Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for the smooth muscle cells. *Prostate* 45:253-258, 2000.
- Vilamaior PSL, Taboga SR and Carvalho HF. Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Int* 29:809-816, 2005.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288(8):885-892, 2006.
- Vlodavsky I, Eldor A, Haimovitz-Friedman A, Matzner Y, Ishai-Michaeli R, Lider O, Naparstek Y, Cohen IR, Fuks Z. Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation. *Invasion Metastasis* 12:112-127, 1992.
- Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* 108:341-347, 2001.
- Walden PD, Lefkowitz GK, Ficazzola M, Gitlin J, Lepor H. Identification of genes associated with stromal hyperplasia and glandular atrophy of the prostate by RNAm differential display. *Exp Cell Res* 245:19-26, 1998.
- Wang Y, Kovanen PT. Heparin proteoglycans released from rat serosal mast cell inhibit proliferation of rat aortic smooth muscle cell in culture. *Circ. Res.* 84(1):74-83, 1999.

- Weiss A, Leinwand LA. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:417-439, 1996.
- Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91(4):439-442, 1997.
- Wilson JD, Griffin JE, Leshin M, George FW (1981) Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes *Hum Genet* 58:78-84, 1981.
- Wilson MJ, Whitaker JN, Sinha AA. Immunocytochemical localization of cathepsin D in rat ventral prostate: evidence for castration-induced expression of cathepsin D in basal cells. *Anat Rec* 229(3):321-333, 1991.
- Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O, Jackson B, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 39(3):161-166, 1988.
- Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbel GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 49(3):130-145, 2001.
- Zhang J, Hess MW, Thurnher M, Hobisch A, Radmayr C, Cronauer MV, Hittmair A, Culig Z, Bartsch G, Klocker H. Human prostatic smooth muscle cells in culture: estradiol enhances expression of smooth muscle cell-specific markers. *Prostate* 30:117-129, 1997.
- Zhang J, Jung K, Lein M, Kristiansen G, Rudolph B, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Lichtinghagen R. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human primary cultured prostatic cells and malignant prostate cell lines. *Prostate* 50:38-45, 2002.
- Zhao GQ, Holterhus PM, Dammshäuser I, Hoffbauer G, Aumüller G. Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* 21:183-199, 1992.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de mestrado/doutorado intitulada "Comportamento da célula muscular lisa da próstata ventral de ratos após privação androgênica *in vivo* e sob estiramento mecânico *in vitro*":

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1283-1). *Aprov. 28/5/2007*

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).

Eliane Antonioli

Eliane Antonioli
Aluno(a)

Hernandes F. Carvalho

Hernandes F. Carvalho
Orientador(a)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aguiar Guinaldo
Nome: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Função: Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAI/IB - UNICAMP