

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Silvia Borges Pimentel de Oliveira

**Isolamento e caracterização de células endoteliais prostáticas e a
modulação do seu comportamento por células musculares lisas**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Silvia Borges Pimentel de Oliveira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

OP
09.08.07

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

Orientadora: Profa. Dra. Laurecir Gomes

Campinas, 2007.

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

OL43i	<p>Oliveira, Silvia Borges Pimentel de Isolamento e caracterização de células endoteliais prostáticas e a modulação do seu comportamento por células musculares lisas / Silvia Borges Pimentel de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadora: Laurecir Gomes. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Próstata. 2. Isolamento imunomagnético. 3. Matrigel. I. Gomes, Laurecir. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/lib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Characterization and isolation of prostatic endothelial cells and modulation of your behavior by smooth muscle cells.

Palavras-chave em inglês: Prostate; Immunomagnetic isolation; Matrigel.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Laurecir Gomes, Catarina Segreti Porto, Francisco Eduardo Martinez, Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, Cristina Pontes Vicente.

Data da defesa: 09/08/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 09 de agosto de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laurecir Gomes (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Catarina Segreti Porto



Assinatura

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez



Assinatura

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente



Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos



Assinatura

Prof. Dr. Athanase Billis

Assinatura

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

“A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, certa grandeza emergirá.”

(Aristóteles, 350 AC)

Agradecimentos

Antes de qualquer pessoa a DEUS, agradeço por tudo, pela vida, pela família, pelas oportunidades e amizades.

Difícil conviver com alguém, pois viemos cada um de um lado, cada qual com suas diferenças, porém dezessete anos juntos, aprendemos um pouquinho de cada um, convivemos com dias alegres e outros nem tanto, e aqueles dias... Obrigada por me apoiar e respeitar, dando palpites ou ficando calado, além de meu esposo, Ediéverson você é um grande amigo e companheiro, e se não fosse você (e eu é claro) não teríamos nosso amado filho Eduardo, um presente divino, realmente um anjo que Deus colocou em nossas vidas.

A família é nosso alicerce, onde tudo começa, aprendemos a viver e conviver, vó Antonina, mãe Ivone, irmãs Nê e Lú, cunhado Rê e sobrinhos Letícia e Guilherme, a minha sogra Marilene, meu pai, avô e sogro (*in memoriam*), agradeço a minha família pelo que sou e por tudo que vivemos juntos, pelo apoio, pelo carinho, amo todos vocês.

Aos meus amigos Rogério, Gi, Baú, Tati aos seus pequeninos Henrique, Léo e Enzo, por momentos agradáveis e descontraídos que passamos juntos quando nos reunimos, para conversar, comer, beber e ver nossos filhos crescendo e brincando juntos, não tem nada melhor.

A querida Lillian, amigas para sempre.

Em especial gostaria de agradecer aos meus amigos e colegas de laboratório (e confidentes)

Eliane e Manuel, obrigada por vocês me ajudarem na fase mais difícil que passei (que passamos), pelo apoio, pelo ombro amigo, achamos que não conseguiríamos, mas chegamos.

A professora Dra. Laurecir Gomes, se não fosse ela, talvez não estivesse aqui hoje, defendendo esta tese, obrigada pelo apoio, pela orientação, pela ajuda em concluir este trabalho e por sua amizade.

Ao professor Dr. Hernandes F Carvalho, obrigada por tudo.

A secretária do curso de Pós-graduação Lillian Alves Senne Panagio, por todos os esforços e cuidados que ela tem com nós alunos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro, sem o qual tudo ficaria mais difícil.

Aos professores da pré-banca, Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente e a Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, pela atenciosa leitura e importantes sugestões para conclusão deste trabalho.

Aos Professores que aceitaram o convite para fazer parte desta banca de tese, inclusive os que ficaram como suplentes.

Aos Coordenadores do curso de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. Em especial a professora Maria Júlia Marques, que hoje não é mais coordenadora, mas que me ajudou muito.

Aos Professores do departamento de Biologia Celular, pela formação, pelo uso de laboratórios, equipamentos e reagentes.

Aos funcionários do departamento de Biologia Celular, que sempre me atenderam gentilmente Francisco, Mário, Beatriz e Sidney.

À professora Dra. Silvia Gatti pelos seus ensinamentos sobre culturas celulares, e a sua técnica Ana Lúcia, que ensinou muita coisa sobre cultura celular.

A professora Dra. Carla Beatriz Collares Buzatto, por gentilmente ceder espaço em seu container de nitrogênio para que eu pudesse guardar as minhas células congeladas, e as suas alunas Carol, Júnia e a técnica Marta, pelos favores, obrigada.

Aos colegas de laboratório que passaram por aqui, e deixaram saudades: Daniela Covizi, Sérgio, Paty, Jussara Kiya, Helene Peters, Heloísa, Rosabel, Guilherme, Mariana, Daniele, Adriana, Sheila, Esdras, Manuel... Espero não ter esquecido ninguém

Aos colegas que ainda estão aqui Alexandre, Danilo, Eliane, Elusa, Henrique, Lítian, Taíze, e a técnica Fabiana, obrigada pela ajuda e amizade de vocês.

Alexandre muito obrigado por me ajudar a mexer no photoshop, até aprendi.

Aos colegas do departamento Tatiana, Cláudia, Klélia, Aninha, Karina, Andréa, Adriano e tantos outros que aqui passaram não dá para escrever o nome de todos. O bom da Pós-graduação é a quantidade de pessoas que você conhece e faz amizade, conhecendo mesmo que rapidamente porque precisa de algum reagente emprestado ou utilizar um equipamento em outro laboratório, ou em congressos, o ruim é que tudo passa muito rápido e chega o dia de dizer tchau, e, quem sabe um dia a gente se cruza por aí...

De tudo ficam três coisas:

A certeza que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos

Antes de terminar...

Portanto, devemos:

fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

(Fernando Pessoa)

Sumário

Resumo.....	10
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
O desenvolvimento prostático.....	13
Composição da próstata.....	15
Efeitos da castração: regressão prostática e célula endotelial.....	19
2. Objetivo.....	29
3. Artigos.....	30
3.1. Isolation and <i>In Vitro</i> Characterization of Prostatic Endothelial Cells.....	32
3.2. Prostatic endothelial cell behavior is modulated by smooth muscle cells.....	44
4. Conclusão final.....	65
5. Referências bibliográficas.....	66
6. Anexos.....	76

Resumo

Interações entre o epitélio e o mesênquima/estroma são importantes em diversos estágios da morfogênese, na diferenciação celular e na função geral de diversas glândulas. Na próstata, a função secretora do epitélio nos animais adultos é regulada por andrógenos que tem participação direta na manutenção do estado ativo da glândula. Sabe-se que o endotélio é um dos primeiros elementos prostáticos a responder à eliminação do estímulo androgênico e a responder à sua reposição. Entretanto, a célula endotelial não apresenta receptor para andrógenos, o que leva a crer que a modulação do seu comportamento ocorra indiretamente pela ação de fatores locais produzidos por diferentes tipos celulares. Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e cultivar células endoteliais prostáticas, assim como avaliar a possível regulação do seu comportamento por células musculares lisas que correspondem ao principal tipo celular do estroma prostático. Culturas primárias de células endoteliais da próstata de ratos foram obtidas e caracterizadas a partir de sua morfologia e expressão do fator von Willebrand e dos receptores Flk-1 (VEGFR-1) e Flt-1 (VEGFR-2) marcadores específicos de células endoteliais, e de sua habilidade em formar estruturas parecidas com capilares quando cultivadas sobre Matrigel. Não foi observado efeito sobre a proliferação celular quando estas células foram cultivadas na presença de meio condicionado por células musculares lisas, sobre diferentes substratos (plástico, colágeno, matrigel). Entretanto, o meio condicionado pelas células musculares lisas reforçou o efeito de indução da diferenciação em

estruturas similares a capilares. Foi também detectado que o meio condicionado inibe a secreção de angiopoietina-1 pelas células endoteliais quando cultivadas sobre colágeno e estimula a secreção de angiopoietina-2 quando as células foram cultivadas sobre Matrigel. Os dados obtidos demonstram que o protocolo utilizado resultou em uma população homogênea de células endoteliais prostáticas e que, as células musculares lisas, produzem fatores solúveis capazes de regular diferencialmente o comportamento das células endoteliais, de acordo com o substrato.

Abstract

Interactions between the epithelium and mesenchyme/stroma are important in different stages of morphogenesis, differentiation and function of most glands. In the prostate, the secretory function of the epithelium in adult animals is regulated by androgens, which have direct roles in maintaining prostate activity. It is well known that the endothelium is the first prostatic compartment to respond to androgen deprivation and to its reposition after castration. However, the endothelial cell does not express the androgen receptor and this led us to believe that the altered behavior in response to androgen is modulated by soluble factors produced by other cell types that can sense androgen levels. The objective of this work was to isolate, characterize and culture prostatic endothelial cells, as well as to evaluate its possible regulation by smooth muscle cells, which are the predominant cell type in the prostate stroma. Primary cultures of rat ventral prostate endothelial cells were isolated, maintained in culture and characterized by their morphology, expression of von Willebrand factor, Flk-1 (VEGFR-1) and Flt-1 (VEGFR-2) receptors, and ability to form capillary-like structures on Matrigel. When these cells were cultured in the presence of smooth muscle cell conditioned medium, on different substrata (plastic, collagen, matrigel) there was no variation in cell proliferation. However, the smooth muscle cell conditioned medium reinforced the formation of capillary-like structures in Matrigel. It was also observed that the smooth muscle cell conditioned medium inhibited the secretion of angiopoietin-1 when the cells were cultured on collagen and stimulated the secretion of angiopoietin-2 when the cultured on Matrigel. Altogether, our data indicate that the protocol employed here resulted in a highly homogenous population of prostate-derived endothelial cells and that smooth muscle cells produce soluble factors capable of differentially regulating the behaviour of endothelial cell, as a function of the substratum.

Introdução

A próstata é uma glândula sexual acessória do aparelho reprodutor masculino que produz um líquido leitoso e alcalino, contendo ácido cítrico, cálcio e outras substâncias, que se junta à secreção da vesícula seminal e aos espermatozóides produzidos nos testículos. Esse líquido contribui para o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozóides, assim como para a neutralização da acidez da vagina, assumindo um papel importante no processo da fertilização (Guyton 1984).

Essa glândula prostática é foco de muitos estudos, sendo que ela pode originar diversas complicações patológicas como hiperplasia prostática benigna, prostatites e câncer da próstata, que ocorrem principalmente com o envelhecimento (Men e cols. 2001).

O desenvolvimento prostático

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 e cols. 1994) sendo que seu desenvolvimento finaliza-se na maturidade sexual (Hamilton e cols. 1959).

O SUG, uma subdivisão da cloaca embrionária, é estruturado por uma camada epitelial derivada do endoderma, envolvida por uma camada mesenquimal oriunda do mesoderma. Em camundongos, machos e fêmeas, o SUG surge 13 dias após a concepção (Marker e cols. 2003). Entretanto, os SUG de ambos os sexos são indistinguíveis morfológicamente até aproximadamente 17,5 dias após a concepção, quando a morfogênese

prostática se inicia, esta depende do andrógeno circulante que é produzido pelos testículos fetais (Wilson e cols. 1981; Marker e cols. 2003).

O evento inicial da morfogênese prostática é o crescimento de brotos epiteliais sólidos oriundos do epitélio do SUG em direção ao mesênquima (Aümuller e cols. 1979). Esses cordões invadem o mesênquima como resultado de uma intensa atividade proliferativa (Sugimura e cols. 1986). Os passos subseqüentes são a morfogênese ductal, a canalização (surgimento do lúmen) e a citodiferenciação epitelial, que também necessitam de estimulação androgênica e ocorrem frente a um aumento perinatal transitório na concentração de testosterona (Corbier e cols. 1995).

Em roedores, a maioria dos cordões epiteliais prostáticos não é ramificada ao nascimento. Entretanto, no período perinatal, conforme esses cordões crescem, invadem o mesênquima do SUG, bifurcam-se em ramos laterais e, finalmente, dão origem aos três diferentes pares de lóbulos prostáticos bilateralmente simétricos. Estes pares de lóbulos são denominados: próstata ventral (PV), próstata dorsolateral (PDL) e glândula de coagulação ou próstata anterior (GC ou PA) (Aümuller e cols. 1979) (Fig. 1).

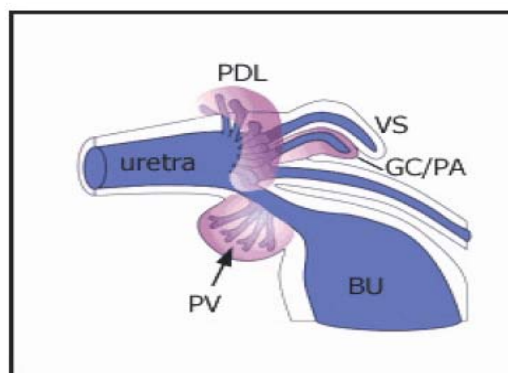


Fig. 1. Esquema do trato urogenital de rato macho ao nascimento. (PV) próstata ventral, (PDL) próstata lateral, (GC/PA) glândula de coagulação ou próstata anterior e (VS) vesícula seminal e (BU) bexiga urinária (modificado de Thomson e cols. 2002).

Tanto o epitélio do SUG como os brotos prostáticos não apresentam 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 SUG, 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 e cols. 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, que é 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 luminiais colunares altas (Hayward e cols. 1996). As células mesenquimais diferenciam-se em uma camada de célula muscular lisa que envolve as estruturas epiteliais (Hayward e cols. 1996).

Composição da próstata

A próstata é composta por um conjunto de estruturas epitelial túbulos-alveolares, nas quais as estruturas epiteliais encontram-se envolvidas por um denso estroma fibromuscular (Aümuller e cols. 1979; Hayward & Cunha 2000) (Figura 2).

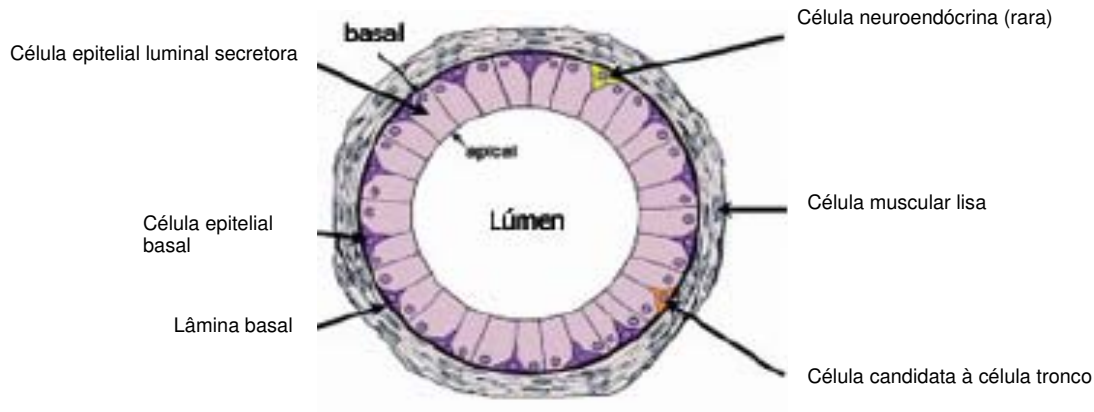


Fig.2. Corte transversal de um ducto prostático indicando os tipos celulares que estão presentes nos ácinos e seus respectivos marcadores. Modificado de Marker e cols. (2003).

A matriz extracelular da próstata é composta de colágeno, elastina, proteoglicanos (PGs), fibronectina, laminina e outras proteínas não colagênicas (Labat-Robert e cols. 1990). As microfibrilas de colágeno tipo VI e fibras do sistema elástico parecem estar envolvidas no controle de alguns aspectos do comportamento celular e desempenhar um papel estrutural para a manutenção da integridade do órgão, apresentando modificações durante a involução da próstata (Carvalho & Line 1996; Carvalho e cols. 1997a; 1997b). A matriz extracelular também é composta por fibras de colágeno tipo I e tipo III. Os pares de lóbulos prostáticos em roedores diferem morfologicamente e bioquimicamente, expressando diferentes grupos de proteínas secretoras (Hayashi e cols. 1991; Cunha e cols. 2004; Berquin e cols 2005) (Figura 3).

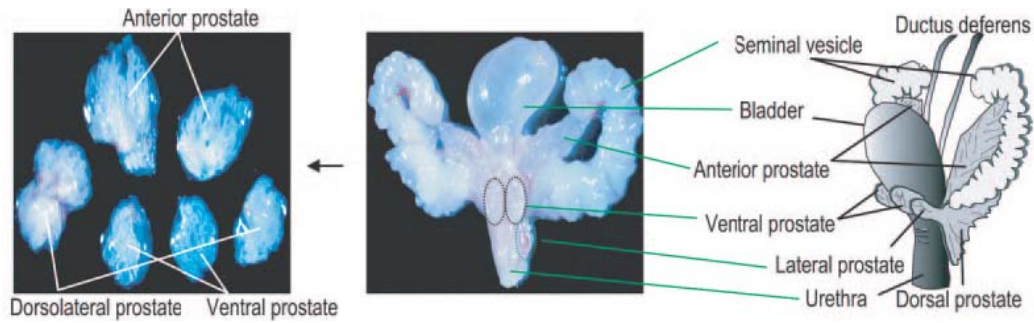


Fig.3. Diagrama da próstata de camundongo (Berquin e cols 2005.)

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 morfológicas e funcionalmente distintas: distal, intermediária e proximal, de acordo com sua posição em relação à uretra (Lee e cols. 1990; Shabsigh e cols. 1999).

Na região distal, são encontradas células epiteliais colunares altas capazes de produzir os componentes da secreção prostática e com atividade proliferativa. As células epiteliais são circundadas por células musculares lisas, as quais formam uma camada esparsa e descontínua, associadas a um grande número de fibroblastos (Nemeth & Lee 1996). Essa distribuição das células estromais pode estar associada ao crescimento da população de células epiteliais (Lee & cols. 1990; Prins e cols. 1991; Nemeth & Lee 1996). Existem algumas células que apresentam características intermediárias entre células epiteliais basais e luminais, denominadas células intermediárias em trânsito. Essas células que antecedem a diferenciação terminal em células luminais secretoras, ainda apresentam capacidade proliferativa e simultaneamente alguns marcadores tanto para células basais como para células luminais (Flórez & Carvalho 2005).

Nemeth & Lee 1996 demonstraram um arranjo diferenciado das células do estroma prostático considerando os diferentes níveis de diferenciação dos lóbulos. Esse arranjo associado ao crescimento da população de células epiteliais sendo observada uma maior quantidade de fibroblastos e poucas células musculares lisas nas porções distal dos lóbulos. Nas porções proximais e intermediárias há uma menor quantidade de fibroblastos e uma maior quantidade de células musculares lisas.

A célula muscular lisa (CML) é o principal componente celular do estroma prostático que além de ocupar um grande volume nesse estroma, pode ser responsável pela contração da glândula durante a ejaculação. Essa célula desempenha função importante, criando um ambiente propício para a manutenção do epitélio em situações normais ou patológicas estando envolvida na estruturação e reorganização do estroma frente à castração (Vilamaior e cols. 2000), atuando provavelmente nas interações epitélio-estroma (Cunha e cols. 1996; Thomson e cols. 2002).

As interações entre o epitélio e o mesênquima/estroma são importantes em diversos estágios da morfogênese, na diferenciação celular e na função geral dos epitélios. Em vários sistemas foi demonstrada a ação de células mesenquimais e/ou a participação de vários componentes da matriz extracelular na diferenciação celular e na manutenção do estado diferenciado de células mamárias de camundongos, hepatócitos de ratos e queratinócitos humanos (Hall 1978; Hay 1981; Hay 1983; Trelstad 1987; Lin & Bissel 1993).

Foi demonstrada a ação de diferentes fatores de crescimento, isolados ou em combinações, produzidos por células estromais prostáticas (Story e cols. 1989; Sutkowski e cols. 1992; Kassen e cols. 1996), capazes de estímulos autócrinos e, sobre o epitélio, onde foi proposta uma densa rede de inter-relações entre diferentes fatores de crescimento

(Davies & Eaton 1991).

Existe também a possibilidade da atuação da matriz extracelular na ligação de fatores de crescimento concentrando-os em micro ambientes específicos, reduzindo sua susceptibilidade à proteólise e aumentando sua afinidade aos receptores celulares de superfície (Roberts e cols. 1988; Massagué 1991), isto se considerado a possível ação de outros fatores solúveis sobre o desenvolvimento prostático, uma vez que este mecanismo não se aplica aos hormônios androgênicos.

Efeitos da castração: regressão prostática e célula endotelial

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 seguir ocorre a diminuição do tamanho das células epiteliais 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 e cols. 1994; Hu e cols. 1998). A castração leva ainda a um declínio na síntese de DNA e de proteínas, no conteúdo e na complexidade do RNA e uma diminuição de receptores de andrógenos (Aümuller & Seltz 1990).

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 e cols. 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 24 horas (Shabsigh e cols. 1998). Essa apoptose precoce em células endoteliais corresponde a algumas mudanças degenerativas no sistema vascular da glândula, como um extravasamento não trombogênico das proteínas do plasma para as regiões periglandulares

do tecido (Shabsigh e cols., 1999) e uma drástica vasoconstrição dos vasos revestidos por uma camada de CML (Hayek e cols. 1999). Essas células são afetadas com a ausência de andrógenos, principalmente na primeira semana, já que o volume total ocupado por esta célula é diminuído (Antonioli e cols. 2004).

A castração causa atrofia nos lobos prostáticos (Antonioli e cols. 2004) e alterações nos níveis qualitativos e quantitativos dos glicosaminoglicanos (GAGs), que podem ser revertidos com a reposição de andrógenos (Fernandes 2000). Observou-se um aumento no conteúdo de PGs após a privação androgênica pela castração, acompanhado também de um aumento na concentração de ácido hialurônico (Kofoed e cols. 1990, Della Coletta e cols. 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, sendo esta revertida com a administração de testosterona. Comparando os diferentes lobos, os autores observaram também 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. O dermatam sulfato (DS) foi o GAG mais abundante e sua predominância foi mantida após a castração, sendo responsável pelo aumento na concentração dos GAGs. A proporção de condroitim sulfato (CS) diminuiu após a castração e o conteúdo de heparam sulfato (HS) aumentou sua marcação na membrana basal, e teve uma redução no compartimento epitelial (Carvalho & Line 1996; Fernandes 2000). Com relação às análises do conteúdo relativo, houve um aumento acentuado no conteúdo de HS após sete dias de castração, enquanto que houve diminuição nos outros GAGs identificados.

O controle do fluxo sanguíneo teria importância na dinâmica da próstata, visto que com a redução do suprimento vascular que ocorre devida à morte das células endoteliais e de algumas células estromais, a produção de fatores angiogênicos é diminuída, como por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Neufeld e cols. 1999). Quando o andrógeno é retirado, ocorre uma rápida diminuição da densidade do vaso sanguíneo, devido à baixa nos níveis de VEGF. Com a readministração da testosterona em ratos castrados, a síntese de VEGF é induzida nas células epiteliais da próstata ventral (Levine e cols. 1998; Sordello e cols. 1998; Häggström e cols. 1998).

Em organismos desenvolvidos, a vasculatura linfática e sanguínea é formada por dois processos distintos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação de um novo vaso a partir de células precursoras hematopoiéticas e ocorre no desenvolvimento do embrião. A angiogênese é a formação de vasos da vasculatura pré-existente por processos como o brotamento (Cébe-Suarez 2006). A angiogênese envolve a degradação proteolítica da membrana basal ao redor das células endoteliais do vaso, seguida pela migração e proliferação das células endoteliais. A diferenciação e maturação das células endoteliais, formação do lúmen, recrutamento de pericitos, e coalescência de tubos completam a formação de um novo vaso sanguíneo.

O endotélio vascular tem um papel crítico nos processos patológicos e fisiológicos, como homeostasia, resposta imune, tráfego de leucócitos, inflamação, tumor, metástase e angiogênese (Hewett & Murray 1993). Além disso, envolvem alguns fatores de crescimento, moléculas da matriz extracelular, enzimas e alguns tipos celulares *in vivo* (Bishop e cols. 1999).

Os sinais que iniciam e sustentam a angiogênese são vários e complexos. Fatores de crescimento e citocinas pró-angiogênicas que incluem VEGF, fatores de crescimento do

fibroblasto -1 e -2 (FGF-1,-2), fatores de crescimento transformantes α e β (TGF α e β), fator necrosante tumoral α (TNF- α), angiopoietinas, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fator de crescimento epidermal (EGF), interleucina-8 (IL-8) e angiogenina, são secretados por células inflamatórias (ex. macrófagos e mastócitos), queratinócitos e pericitos (durante reparos em ferimentos da epiderme), ou células tumorais. A ação de alguns destes fatores é ligada diretamente aos receptores nas células endoteliais e induzem a proliferação e migração enquanto outras agem sobre o estroma local ou células inflamatórias para estimular a angiogênese (Rundhaug 2005).

Algumas moléculas podem ser reguladoras negativas, ou seja, são moléculas anti-angiogênese como: a angiostatina, a endostatina, o fragmento de 16kDa da prolactina, trombospondina, e fator plaquetário-4 (PDGF-4) (Petrova e cols. 1999).

Portanto, a angiogênese é controlada por um balanço entre fatores pró-angiogênese e anti-angiogênese. De todos estes fatores o VEGF é o mais potente facilitador da angiogênese, porque tem influência na proliferação, motilidade, permeabilidade vascular, na regulação e desenvolvimento embrionário e na manutenção de organismos adultos. Os VEGFs são polipeptídeos que pertencem à família PDGFs e fatores de crescimento. Em mamíferos os VEGFs são codificados por uma família de genes que incluem VEGF -A, -B, -C, -D e fator de crescimento da placenta (PlGF), e também o VEGF-E codificadas por vírus e VEGF-F que são isolados de veneno de cobra. A função biológica dos polipeptídeos de VEGF são mediadas através da ligação aos receptores de tirosina kinase (RTKs), VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) e VEGFR-3 (Flt-4) (Petrova e cols. 1999; Cêbe-Suarez e cols. 2006). O VEGF tem alta afinidade em se ligar aos receptores de tirosina kinase Flt-1 e Flk-1 expressos pela célula endotelial durante o desenvolvimento normal ou não (Jackson e cols. 2002).

A função do VEGF na formação dos vasos é complementada por fatores adicionais, como o fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento transformante β (TGF β), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) e angiopoietinas.

A testosterona estimula o crescimento do próstata ventral, de ratos adultos castrados precedidos pelo aumento da síntese de VEGF epitelial, proliferação de células endoteliais, crescimento vascular e aumento do fluxo sanguíneo. Estas observações sugerem que o crescimento da próstata é estimulado pela testosterona e pode ser dependente de angiogênese, e que o VEGF pode ter um papel central neste processo (Lissbrandt e cols. 2004). A produção de VEGF foi modulada por andrógenos em células musculares lisas e células epiteliais luminiais da próstata, porém não nas células epiteliais basais (Richard e cols. 2002).

A cinética de resposta do VEGF e o complicado processo de coordenação vascular e regressão do tecido na próstata normal após a castração sugere que outros fatores são também importantes.

As angiopoietinas constituem uma família de fatores de crescimento que se ligam ao receptor Tie-2. O Tie-1 e Tie-2 são receptores de tirosina kinase expressos principalmente nas células endoteliais. As características das angiopoietinas são resumidas na tabela 1 (Eklund e cols. 2006).

A angiopoietina-1 (ang-1) estabiliza os vasos sanguíneos por recrutar pericitos e CML para a parede celular endotelial e ativar o receptor Tie-2. A angiopoietina-2 (ang-2) que é um antagonista da ang-1, desestabiliza a vasculatura e estimula a angiogênese ou a regressão do vaso dependendo do alto ou baixo nível de VEGF, respectivamente (Caine e cols. 2003; Johansson e cols. 2004). Porém trabalhos recentes descrevem que a ang-2 pode ser antagonista ou agonista, ela foi encontrada sendo expressa em sítios de remodelação

vascular, incluindo trato reprodutivo de fêmeas e tumores. Nestes tecidos a ang-2 é regulada junto com o VEGF-A em sítios de brotamento angiogênico, entretanto a redução da expressão do VEGF-A está associada com regressão vascular (Eklund e cols. 2006).

Tabela 1. Características das angiopoietinas.

Características	Ang1	Ang2
Ligadas ao Tie-2	Sim	Sim
Ativação da Tie-2	Obrigatório	Dependente do contexto
Ativação do Tie-1	Sim	Não
Padrão de expressão em adultos	Muitos tecidos	Sítios de remodelação vascular
Origem celular primária	Células não endoteliais	Células endoteliais
Expressão ectópica em células tumorais	Redução do tamanho do tumor	Aumento do tumor
Associação com a MEC	Incorporado	Secretado, mas não incorporado
Ligadas a HSPGs da superfície celular	Não	Não
Estocadas no corpos Weibel-Palade	Não	Sim

MEC matriz extracelular; HSPGs proteoglicanos de heparan sulfato.

*Tabela modificada de Eklund e cols. (2006).

A remodelação do estroma prostático após castração provavelmente envolve a participação de metaloproteinases de matriz (MMP). As MMPs formam uma família de endopeptidases dependentes de metais, principalmente zinco e cálcio, capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, elastina, laminina, fibronectina e PGs (Alexander & Werb 1991; Parks & Mecham 1998). Esse amplo espectro de substratos dá a essas enzimas um papel central em processos fisiológicos normais, tais como o desenvolvimento e remodelação da matriz e em estados patológicos como inflamações e a progressão tumoral (McCawley & Matrisian 2000).

As MMPs constituem uma família multigênica de mais de 25 enzimas secretadas ou associadas à membrana que processam e degradam principalmente proteínas da MEC (Matrisian 1990; Llano e cols. 1997; Giambenedi e cols. 1998; Grant 1999; Velasco e

cols. 1999; Llano e cols. 1999; Park e cols. 2000; Lohi e cols., 2000; Marchenko & Strongin 2001; Sternlicht & Werb 2001), sendo divididas em 5 grupos principais:

- a.** as colagenases intersticiais (MMPs 1, 8 e 13),
- b.** as gelatinases (MMPs 2 e 9),
- c.** as estromelinas (MMPs 3, 10 e 11),
- d.** as metaloproteinases de membrana (MMPs 14, 15, 16, 17, 24 e 25) e
- e.** MMPs que não se enquadram em nenhum dos grupos anteriores (MMPs 7, 12, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27 e 28).

Sabe-se que as MMPs participam do remodelamento da membrana basal da matriz extracelular, contribuindo mais com a angiogênese do que com a degradação de componentes dessa matriz (Alexander e cols. 1991). Porém recentemente tem tornado-se claro que o papel da MMPs é mais complexo que uma simples degradação da matriz extracelular para facilitar a invasão das células endoteliais. Várias MMPs são também necessárias para a liberação de fatores pró-angiogênicos seqüestrados pela matriz extracelular, processando os fatores de crescimento e receptores incluindo integrinas e receptores de adesão e por gerar componentes antiangiogênicos endógenos. As MMPs contribuem em muitas vias em ambos os processos pro- e anti-angiogênese (Figura 4a-b). O VEGF induz a expressão de MMP-1 nas células endoteliais (Rundhaug 2005). As células endoteliais produzem MMPs incluindo MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9, sendo que a MMP-2 é a mais abundante e é expressa constitutivamente pelas células endoteliais (Silletti & Cheresh 1999).

Ações pró-angiogêneses

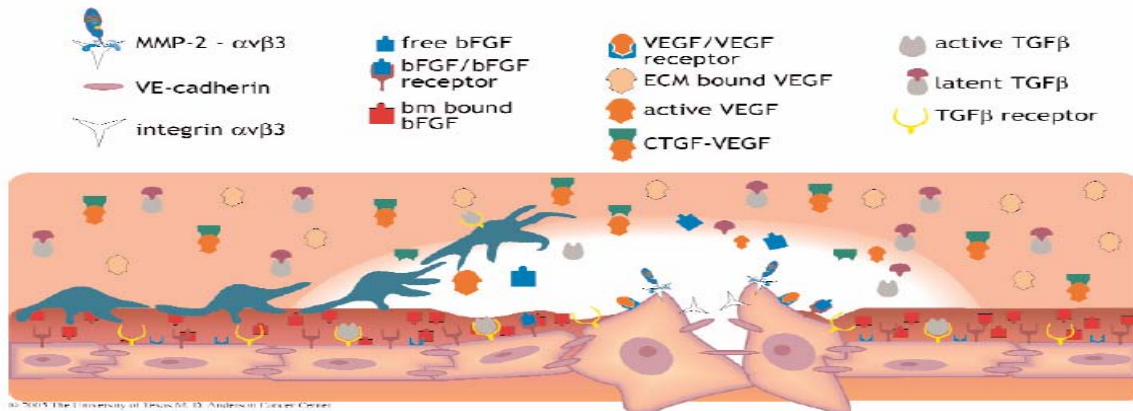
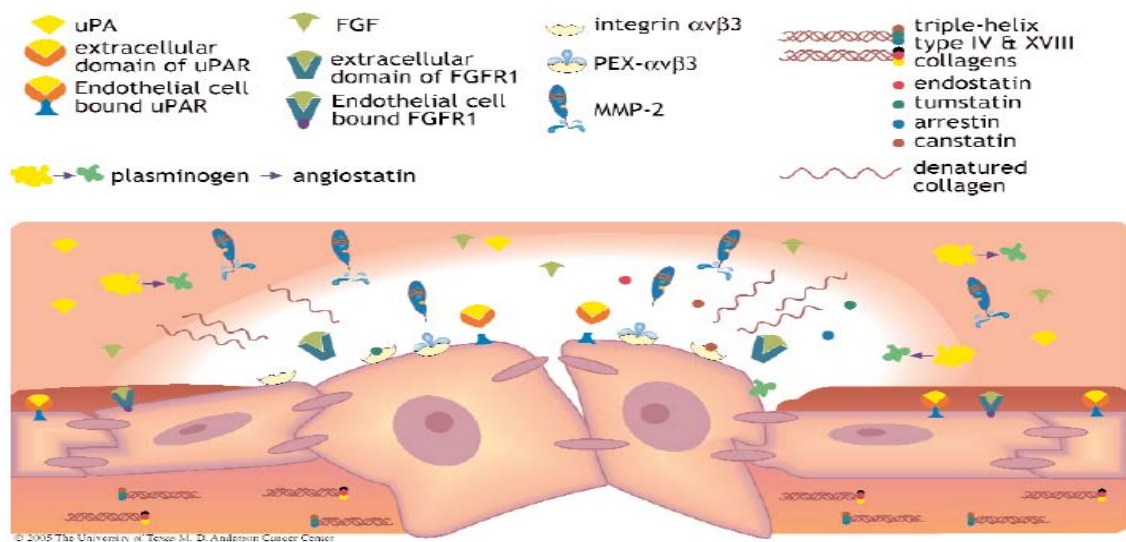


Fig.4a. Ilustração esquemática onde estão apresentadas ações das MMPs pró-angiogêneses. Efeitos pró angiogêneses incluem a degradação da membrana basal vascular e componente da matriz extracelular para permitir a separação dos pericitos e migração da célula endotelial; clivagem da **VE-caderina** (via **endotelial vascular-caderina**) proteína de adesão célula-célula endotelial; localização da **MMP-2** (**metalo-proteína de matriz**) na superfície celular para invasão das células endoteliais via ligação da **integrina $\alpha v \beta 3$** ; exposição de sítios de ligação da integrina para clivagem de moléculas da matriz extracelular (MEC); liberação de **VEGF** (**fator de crescimento endotelial vascular**) ativo da MEC e do **CTGF** (**fator de crescimento do tecido conjuntivo**) armazenado; clivagem do perlecan da membrana basal para liberação do **bFGF** (**fator de crescimento de fibroblastos básico**) e liberação e ativação de **TGF- β** (**fator de crescimento transformante β**). A bioatividade do VEGF, bFGF e TGF- β induz a angiogênese pela sinalização através de seus respectivos receptores nas células endoteliais (Modificado de Rundhaug, 2005).

Ações anti-angiogêneses



*Fig.4b. Ilustração esquemática apresentando ações das MMPs anti-angiogênese. Efeitos anti-angiogênese das MMPs incluem clivagem de domínios de ligantes de ligação do **FGFR1** (receptor de fator de crescimento de fibroblasto) e **uPAR** (receptor ativador plasminogênio tipo uroquinase) inibindo a sinalização do **FGFR1** e sinalização/localização **uPA** na superfície da célula endotelial, respectivamente; inibição da ligação **MMP-2** a integrina $\alpha\beta3$ pela liberação de **MMP-2** solúvel domínio **PEX** (domínio hemopexina); e geração de fatores anti-angiogênicos, angiostatina do plasminogênio e endostatina, tumstatina, arrestina, e canstatina de domínio C-terminal não-colagenoso 1 (NCl) do tipo XVIII e IV de cadeias de colágeno (Modificado de Rundhaug, 2005).*

A angiogênese ocorre através de uma cascata de eventos, que envolve células endoteliais e junções aderentes, pela via de reorganização do citoesqueleto como da actina e proteólise da membrana basal e matriz intersticial. A remodelação de ambos é facilitada pela expressão e ativação de MMPs. As MMPs participam de vários passos da resposta angiogênica, incluindo regulação da célula endotelial, permeabilidade, migração, invasão e formação do tubo capilar (Ispanovic & Haas 2005).

As MMPs são controladas por vários inibidores, incluindo o inibidor tecidual de metaloproteinases-1-4 (TIMPs-1-4; Baker e cols. 2002). Foi demonstrado que as TIMPs regulam a angiogênese e a migração das células endoteliais (Oh e cols. 2004). O balanço entre MMPs e TIMPs parece ser crítico durante estes eventos. Também existe a possibilidade de que a TIMP-2 derivada da célula endotelial e a TIMP-3 derivada do pericito co-regulam a estabilização do tubo capilar pela inibição de marcadores da célula endotelial como as metaloproteinase de membrana plasmática-1 (MT1-MMP); ADAM-15 (uma desintegrina e metaloproteinase-15), MMP-1, e MMP-10, que normalmente controla a célula endotelial na formação ou regressão do tubo (Saunders e cols. 2007).

O estudo das células endoteliais em cultura tem contribuído para um melhor entendimento da biologia vascular. Para isso pesquisadores têm isolado células através de técnicas que utilizam esferas magnéticas ligadas a um anticorpo específico para o tipo

celular que se quer isolar. Em 1990 Jackson e cols. demonstraram o uso de esferas magnéticas cobertas com a lectina Ulex europeans (UEA-1), específicas para isolar células endoteliais de microvasos humanos. Esta técnica de isolamento magnético é hoje muito utilizada para isolar células endoteliais microvasculares de órgãos humanos normais e de tumores, facilitando o estudo destas células *in vitro*. A contaminação por fibroblastos e outros tipos celulares é pequena, com o uso desta técnica.

Como não foram identificados receptores para andrógenos nas células endoteliais prostáticas, podemos supor que a modulação do comportamento das células endoteliais seja regida, indiretamente, por fatores locais produzidos pelos diferentes tipos celulares presentes na próstata. Por isso a importância de estudar alguns destes fatores que estariam envolvidos no comportamento das células endoteliais.

Objetivo

Como parte do estudo das interações celulares que ocorrem na próstata, este trabalho teve como principais objetivos:

1. Estabelecer um protocolo de isolamento e cultivo primário das células endoteliais da próstata ventral de ratos;
2. Investigar e descrever como as células musculares lisas modulam a proliferação, diferenciação e, formação de estruturas semelhantes a capilares *in vitro*;
3. Identificar o papel de angiopoietinas-1 e -2 no comportamento das células endoteliais, procurando identificar a participação destes fatores na comunicação entre as células endoteliais e musculares lisas.

Os experimentos desenvolvidos nesta tese são apresentados na forma de artigos:

Isolation and *In Vitro* Characterization of Prostatic Endothelial Cells

&

Prostatic endothelial cell behavior is modulated by smooth muscle cells

Isolation and *In Vitro* Characterization of Prostatic Endothelial Cells

Silvia B Pimentel and Hernandes F Carvalho*

Department of Cell Biology – Institute of Biology – State University of Campinas

Campinas SP, Brazil

***Address for correspondence:**

Department of Cell Biology – Institute of Biology – State University of Campinas;

CP6109; 13083-863 Campinas SP, Brazil

Tel. 55 19 3521 6118; **Fax** 55 19 3521 6111; **E-mail** hern@unicamp.br

ABSTRACT

Background: Considering the importance of vascular biology on prostatic regression after castration and on cancer progression, and the great variation in endothelial cell phenotypes according to their location in the body, we propose a method to isolate and culture prostate gland derived endothelial cells.

Methods: Cells were isolated using magnetic beads coupled to anti-CD31 antibodies, maintained in vitro and characterized using specific endothelial cell markers.

Results: Primary cell cultures enriched in endothelial cells were obtained as determined by the characteristic morphology and expression of von Willebrand factor (vWF), VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (Flk-1).and by the ability to form capillary-like structures when cultured on Matrigel.

Conclusions: The proposed protocol resulted in homogenous primary culture of prostatic endothelial cells.

KEY WORDS: immunomagnetic isolation, primary culture, von Willebrand factor

INTRODUCTION

The study of endothelial cells in culture contributes to a better understanding of vascular biology [1]. The isolation of organ specific endothelial cells seems necessary, especially considering the existence of organ-specific characteristics of these cells. Techniques using magnetic beads coupled to specific antibodies for the isolation of bone marrow cells, peripheral blood cells or cells of other organs [2] have contributed to the widespread use of cell cultures since, once selected and characterized, these cells can be employed in the study of different aspects of their normal function and of their role in some diseases that affect humans.

Castration is known to drastically reduce blood flow to the prostate gland, which is associated with the death of endothelial cells [3-6]. Although androgens are essential for the development, differentiation and maintenance of the prostate gland, various aspects of these mechanisms are still poorly understood. *In vivo* studies on the prostate mainly conducted on rodents have shown that androgens stimulate prostatic cell proliferation and repress the process of programmed cell death. The death of endothelial cells observed after castration is also poorly understood.

We developed a simple protocol for the isolation of prostatic endothelial cells (PEC) based on modified methods [7-10] using magnetic beads coupled to an anti-CD31 antibody. The cells were then characterized using specific endothelial cell markers such as von Willebrand factor (vWF), VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (Flk-1). We describe here the phenotypic and functional characterization of cells obtained by this technique, which can be applied to the study of the role and function of PEC in different situations.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Prostatic Endothelial Cells

The ventral prostates were dissected from *Wistar* male rats aged 3 to 4 months. All procedures were conducted according to the guidelines on animal experimentation of the State University of Campinas (Protocol nr. 1282-1). The glands were immersed in Earl's balanced salt solution (EBSS) containing 1.5% penicillamine (1000 U/ml) and 250 µg/ml streptomycin (Nutricell, Campinas, SP, Brazil). The tissue was cut into 5 mm³ fragments and washed in EBSS. After incubation with collagenase D (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) diluted in HAM-F12 medium (Nutricell) for 3 h at 37°C under mild shaking, the suspension was centrifuged at 515 g for 10 min. The collagenase solution was discarded, new medium was added and the suspension was again centrifuged. The pellet was resuspended in 0.25% trypsin/EDTA (Nutricell) and incubated for 30 min in an oven at 37°C under mild shaking. After centrifugation, the pellet was washed under the same conditions as described above. The cells obtained were then transferred to 75-cm² flasks (Sarstedt, Newton, NC, USA) containing HAM-F12 growth medium for endothelial cells supplemented with L-glutamine and 10% fetal bovine serum. Next, the cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and the medium was changed every 48 h. When reaching 90-95% confluence, the cells were removed from the flask with trypsin and selected using immunomagnetic beads (Dynal ASA, Oslo, Norway), which had been previously washed according to manufacturer instructions. The Falcon tubes containing the cells were incubated at 4°C under constant rotation for 30 min and then double the volume of sterile 0.1% phosphate-buffered saline (PBS) bovine serum albumin (BSA) solution was added to the tubes. The tubes were placed in a magnetic particle concentrator MCP-1 (Dynal

ASA, Oslo, Norway) for 2 min, and the supernatant was then discarded. The cells removed from the tube were washed in medium and the procedure described above was repeated four times according to manufacturer instructions. CD31-positive cells were transferred to 25-cm² flasks (Sarstedt) covered with type I collagen (obtained in our laboratory from rat tails) and containing growth medium for endothelial cells. The endothelial cells were subcultured until the 8th passage. Cell viability and proliferation was determined after Trypan blue staining (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Cells were counted in triplicates.

Immunocytochemistry

Cells were cultured on coverslips until reaching 80-90% confluence. The cells were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min before subjected to immunofluorescent detection of von Willebrand factor with a anti-vWF antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:100 in a humid chamber overnight at 4°C. Secondary antibody was a FITC-conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:200 and incubated for 1 h. Nuclei were stained with DAPI. Negative control using secondary antibody was done (data not show).

Western Blotting

Cells were collected by centrifugation after trypsin dissociation, resuspended in 100 µl buffer (10 mM imidazole, 4 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.4, 200 µM PMSF, 0.03 mg/ml aprotinin, 200 µM DTT, 2.5 µg/ml leupeptin, 0.5 µg/ml pepstatin, and 30 µg/ml trypsin inhibitor) and disrupted with three 10-s sonication pulses on ice. Protein content was determined (Bio-Rad protein assay) and a 75 µg protein was applied to a 7.5% SDS-PAGE. After electrophoresis and electrical transfer to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), the

membranes were blocked with 5% skimmed milk in TBS-T (20 mM Tris, 0.137 M NaCl and 0.2% Tween) for 1 h and incubated overnight with the primary antibody (Flk-1 or Flt-1, Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100 in 1% skimmed milk in TBS-T. Reaction was developed after incubation with proper peroxidase-conjugated antibody using the Luminol system (Santa Cruz Biotechnology) using Kodak X-Omat film.

Formation of capillary-like structures

The capacity of PEC to form capillary-like structures was investigated by culture on Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) according to the protocol [11].

RESULTS

PEC presented the typical phenotype of endothelial cells defined by the authors as “cobblestone” (Fig. 1). The viability or growth of endothelial cells did not change with culture time as determined by Trypan blue staining (Fig. 2). More than 95% of the cells presented immunofluorescent staining for vWF characterized as cytoplasmic granulations (Fig. 3), a feature of endothelial cells. These cells were shown to express Flk-1 and Flt-1 (VEGF) receptors (Fig. 4). When the isolated cells were cultured on Matrigel, the formation of structures resembling capillary tubes was observed (Fig. 5), with PEC being more elongated and emitting large prolongations. These parameters remained unchanged until the 8th passage.

DISCUSSION

Our results demonstrated that the cells isolated with Dynabeads coupled to an anti-CD31 antibody were endothelial cells from the rat ventral prostate. This was confirmed by immunofluorescent staining for vWF and by Western blotting for its receptors Flk-1 and Flt-1. The procedure permitted the isolation of monotypic cultures containing more than 95% endothelial cells which can be used in studies investigating the role and function of these cells under physiological and pathological conditions.

The morphological characteristics of the vascular and ductal systems of the rat ventral prostate define the relationship between cell types, for example, pericytes found on the side of small vessels play a critical role in blood flow regulation of the gland, and smooth muscle cells play a role in the control of blood flow in the prostatic ducts [12].

Studies investigating the modulation of endothelial cells by stromal and epithelial cells present in the organ and factors that regulate angiogenesis in the prostate are of extreme importance since they will permit the design of an experimental model of tumor development regarding angiogenesis and specific factors that influence angiogenesis in the prostate and in prostatic tumors. In addition, it is known that castration induces involution of the prostate gland and reduces vascular supply [5], and that testosterone replacement therapy stimulates endothelial cell proliferation and normalizes the prostatic vasculature. The lack of androgen receptors on PEC suggests that these events depend on specific paracrine mechanisms of the prostate.

In conclusion, we developed a simple and efficient protocol for the isolation of PEC, which will permit more detailed studies on the regulation of prostate vasculature and the behavior of endothelial cells, with investigation of the mechanisms responsible for the growth and regression of this gland.

REFERENCES

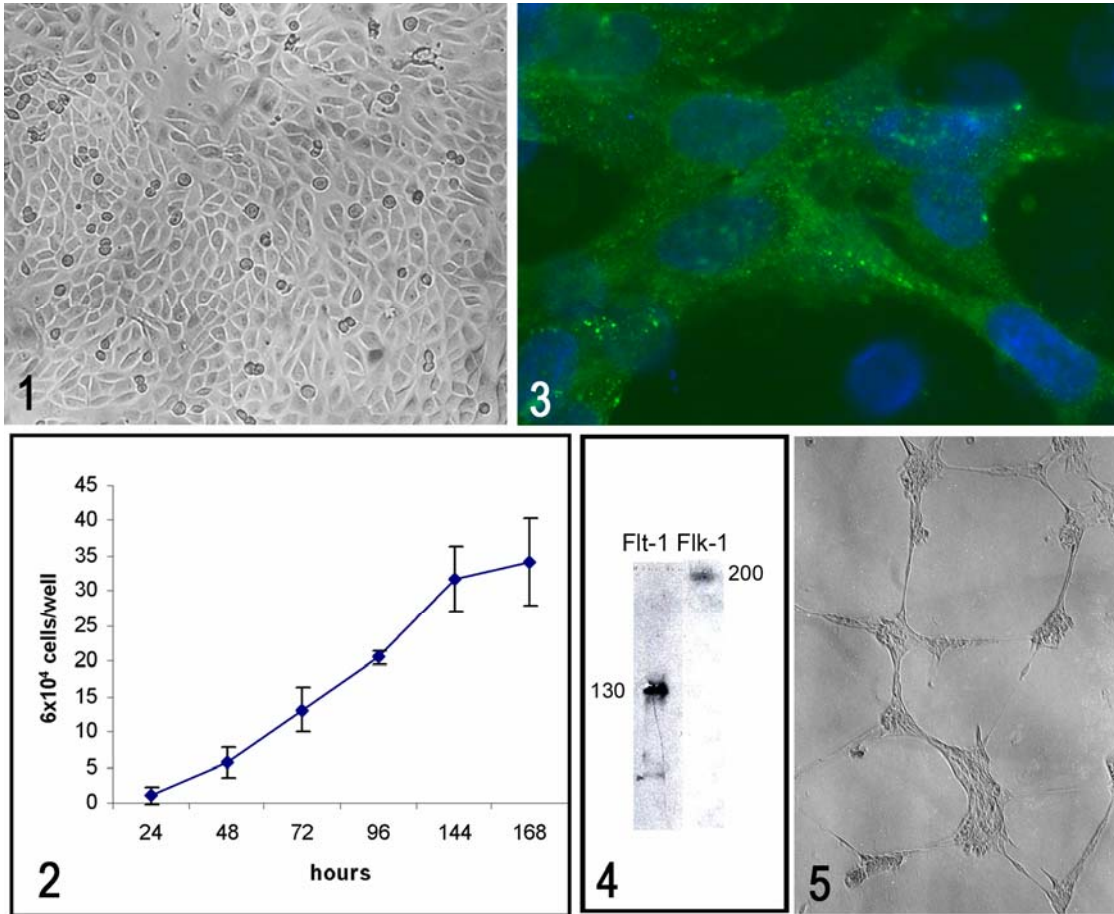
1. Lang I, Pabst MA, Hiden U, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, Desoye G. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *European Journal Cell Biology* 2003; 82: 163-173.
2. Richard L, Velasco P, Detmar M. A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Experimental Cell Research* 1998; 240: 1-6.
3. Hayek OR, Shabsigh Ahmad, Kaplan SA, Kiss AJ, Chen MW, 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* 1999; 162:1527-1531.
4. Shabsigh A, Tanji N, D'Agati V, Burchardt M, Rubin M, Goluboff ET, Heitjan D, Kiss A, and Buttyan R. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* 1999; 140:1920-1926.
5. Shabsigh A, Chand DT, Heitjan DF, Kiss A, Olsson CA, Puchner PJ and 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. *The Prostate* 1998; 36: 201-206.
6. Lekås E, Johansson M, Widmark A, Bergh A, Damber J-E. Decrement of blood flow precedes the involution of the ventral prostate in the rat after castration. *Urology Research* 1997; 25:309-314.
7. Oxhorn BC, Hirzel DJ, Buxton ILO. Isolation and characterization of large numbers of endothelial cells for studies of cell signaling. *Microvascular Research* 2002; 64: 302-315.

8. Hannum RS, Ojeifo JO, Zwiebel JÁ, McLeskey SW. Isolation of tumor-derived endothelial cells. *Microvasc Res* 2001; 61:287-290.
9. Richard L, Velasco P, Detmar M. A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Experimental Cell Research* 1998; 240: 1-6.
10. Hewett PW, Murray JC. Immunomagnetic purification of human microvessel endothelial cells using Dynabeads coated with monoclonal antibodies to PECAM-1. *European Journal of Cell Biology* 1993; 62:451-454.
11. Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *The Journal of cell Biology* 2000; 148: 343-351.
12. Shabsigh A, Tanji N, D'Agati V, Burchardt T, Buchardt M, Hayek O, Shabsigh R, and Buttyan R. Vascular anatomy of the rat ventral prostate. *The Anatomical Record* 1999; 256: 403-411.

Figure legends

Fig. 1. Phase-contrast microscopy of prostatic endothelial cells (PEC) isolated with Dynabeads coupled to an anti-CD31 antibody and grown to confluence in a monolayer which show the typical “cobblestone” morphology. **Fig. 2.** Cell proliferation kinetics of CD31-positive prostatic endothelial cells seeded onto 24-well plates. The number of viable cells was determined at 24-h intervals by Trypan blue staining. The experiment was carried out in triplicate. Values are the mean \pm 0,5 SD. **Fig. 3.** Immunofluorescent characterization of CD31-positive cells regarding the expression of von Willebrand factor (vWF) (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). More than 95% of the cells presented staining of

cytoplasmic granules. **Fig. 4.** Characterization of the expression of the Flt-1 (130-180 kDa) (A) and Flk-1 (200-220 kDa) (B) receptors by CD31-positive cells in culture during the 4th passage. **Fig. 5.** Functional characteristics of CD31-positive cells. These cells formed capillary-like structures when cultured on Matrigel. **Fig. 1** 110x, **3** 925x, **5** 296x.



Prostatic endothelial cell behavior is modulated by smooth muscle cells

Silvia Borges Pimentel, Laurecir Gomes and Hernandes F. Carvalho*

Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP) - Campinas SP, Brazil

*Address for correspondence:

Department of Cell Biology – Institute of Biology
State University of Campinas (UNICAMP)
CP6109
13083-863 Campinas SP Brazil
Tel. 55 19 3521 6118
Fax. 55 19 3521 6111
E-mail hern@unicamp.br

Abstract

It has been determined that prostatic endothelial cells respond to androgen-deprivation as early as 18 hours after castration. However, these cells express no androgen receptor and so, there must be a signaling system, likely involving paracrine factors, that mediate the endothelial cell response to androgen-deprivation. We decided to investigate whether smooth muscle cells could play a role in signaling the endothelial cells for changes in the androgen simulation, since these cells are the predominant cell type in the prostatic stroma and express the androgen receptor. Pursuing this task, one have established primary cultures of prostatic endothelial and smooth muscle cells and tested the effects of the conditioned medium produced by the latter on the proliferation, differentiation and secretion of Ang-1 and Ang-2 (angiogenesis regulators) by the former. The results indicate that smooth muscle cell conditioned medium showed no effect on the growth of endothelial cells cultured on plastic, type I collagen or Matrigel, except 100% SMC conditioned medium was tested on cells grown on type I collagen. It was also determined that the SMC conditioned medium reinforced the effect of Matrigel in differentiating the endothelial cells on capillary-like structures. Since we found no Ang-1 or Ang-2 in the SMC medium, we decided to investigate whether the SMC conditioned medium was able to modulate the autocrine secretion of these angiogenesis regulators. As a matter of fact, the results demonstrated that the SMC conditioned medium inhibited the production of Ang-1 when cells where cultured on type I collagen and stimulated the secretion of Ang-2 when the cells were cultured on Matrigel. Taken together, the present data confirm the hypothesis that prostatic smooth muscle cells produce soluble factors that regulate endothelial cell behavior depending on the extracellular matrix substratum reflecting variations on blood vessel integrity.

Introduction

Cell interactions through paracrine signals seems important for prostatic physiology. It has long been suggested that stromal-derived factors are responsible for the maintenance of epithelial function in the normal gland. It has been proposed that tumor progression is based on different balance between the epithelium and stromal cells (Cunha et al. 1996). It has also been suggested that tumor progression and stromal invasion would involve changes in the stromal cell behavior. Lately, much attention has been devoted to the smooth muscle cells, which are the major stromal cell in the prostate gland. It was suggested that tumor cell extravasation and colonization of the stromal compartment would depend on active response of the stromal cells in a process named stromal reaction (Tuxhorn et al 2001). In this phenomenon, the smooth muscle cells undergo a series of phenotypical modifications which are collectively associated with a dedifferentiation process as they assume more myofibroblast-like characteristics. However, analysis of the SMC in the castration induced prostatic regression suggested that these cell undergo phenotype modulation with no compromise of the differentiation status (Antonioli et al. 2004).

Several modifications of the prostate gland also occurs in response to androgen deprivation. The most prominent of these changes is unquestionably epithelial regression, resulting from reduced synthetic machinery, elimination of the accumulated secretion and massive apoptosis. This latter peaks by 72 hours after castration, which though is delayed with respect to the apoptotic death of endothelial cells, which can be detected as early as 18 hours after castration in association with a marked reduction in blood flow to the organ (Lekås et al 1997; Shabsigh et al 1998). On the other hand, if the castrated animals are given testosterone, the endothelial cells proliferate back (Franck-Lissbrant et al, 1998), and

this proliferation is important for the organ to re-grow (Folkman et al (1998). As a matter of fact, androgen-treatment causes an increase in the overall expression of VEGF, a well known regulator of angiogenesis (Hägström et al, 1999). Furthermore, Johansson et al (2005) concluded that androgen regulate endothelial cell behavior by stimulating the production of angiopoietins by mural cells.

In spite of responding to androgen stimulation, the endothelial cells express no androgen receptor (Prins et al. 1991) and it is most likely that they are regulated by paracrine factors produced by other prostatic cell types through androgen-regulated mediators of vessel physiology.

It has been shown before that prostatic epithelial cells produce and secrete apically VEGF protein in response to androgen and that smooth muscle cells (SMC) express VEGF mRNA and angiopoietin-1 (Ang-1) mRNA (Richard et al. 2002). In the same study, the authors suggested the epithelium to be the major source of angiopoietin-2 (Ang-2) in the prostate (Richard et al, 2002). It is thus likely that epithelial and smooth muscle cells regulate prostatic angiogenesis in response to androgens, through a balance between the production of VEGF, Ang-1 and Ang-2 (Caine et al, 2003).

In this study we worked with cultured endothelial and smooth muscle cells isolated from the rat ventral prostate in an attempt to determine whether SMC regulate the behavior of endothelial cells, in terms of proliferation, secretory activity and differentiation. Using SMC conditioned medium, we have shown that SMC produce soluble factors reducing cell proliferation and promoting endothelial cell differentiation in capillary-like structures when cultured on Matrigel, and that this is due to the stimulation of production of Ang-2 and inhibition of production of Ang-1 by endothelial cells, clearly affecting the autocrine regulation of these cells.

Materials and Methods

Primary prostatic endothelial cell culture

Rat ventral prostates were dissected out wistar rats. The tissue was cut into 5 mm³ fragments and washed in EBSS and digested with 1mg/mL collagenase D (from *Clostridium histolyticum*; Roche, Mannheim, Germany) diluted in HAM-F12 medium (Nutricell, Campinas SP, Brasil) for three hours. After collection by centrifugation and washing in EBSS, the cells were incubated with 0.25% trypsin/EDTA for 30 min at 37°C. The dissociated cells were washed, collected by centrifugation and seeded on culture flasks until they reached 90% confluence. The cells were then dissociated with trypsin/EDTA and isolated by the use of immunomagnetic beads conjugated with anti-CD31 antibody (DynaL ASA, Oslo, Norway). After 30 min incubation at 4°C, the CD31-positive cells were immobilized with a magnet (DynaL ASA, Oslo, Norway), while the unbound cells were discarded. CD31-positive cells were resuspended, seeded on culture flasks covered with rat type I collagen and maintained in Ham-F12 medium (Nutricell) containing 10% fetal bovine serum, 0.5% L-glutamine (10%) and 0.3% sodium bicarbonate at 37°C and 5% CO₂ and 95% air.

Primary prostatic smooth muscle cell culture

Smooth muscle cell (SMC) were obtained from explants of rat the ventral prostate according to the procedure described by Gerdes et al. (1996) as employed before (Antonioli et al. 2007) and maintained in phenol red free DMEM, containing 4.5g/L glucose (Nutricell), 10% fetal bovine serum, 0.1% testosterone and 1.4U/mL insulin at 37°C and 5% CO₂ and 95% air.

Preparation of SMC Conditioned Medium

When the SMC reached 80-90% confluence the medium was aspirated, and cells washed twice with EBSS (Earl's balanced salt solution), replenished with serum free DMEM and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. After 48hr the conditioned medium was collected, centrifuged at 515g for 10 min, and sterilized using a Millipore filter (0.22µm) and stored at -20°C until used.

Effect of SMC conditioned media on endothelial cells

To examine the effects of soluble factors from SMC on endothelial cells, 8x10⁴ cells/well were seeded onto 96-well plates and cultured with serum free HAM-12 medium (Nutricell). Alternatively the plates were previously covered with rat type I collagen or Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, USA). After overnight incubation, the medium was discarded and replaced with SMC conditioned medium at proportions of 0% (only DMEM), 25%, 50% 75% and 100% (only conditioned medium). After 72h incubation the medium were discarded, and 90µL fresh phenol red free medium plus 10µL of 1mg/mL MTT [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium](Sigma Chemical Co. Saint Louis MO, USA) was added to the cells and incubated at 37°C for 3 hours. The medium was then aspirated and 200µL isopropyl alcohol were added to the wells before the absorbance at $\lambda = 595\text{nm}$ was measured with an micro plate reader (BioRad). Experiments were done in quadruplicates and repeated twice. Statistical differences between groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's multiple comparison test. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Formation of capillary-like structures on Matrigel

Capillary-like tube formation assay was carried out with 6×10^4 prostatic endothelial cells seeded on 96 well plates previously covered with Matrigel, in serum-free HAM-F12 medium with varying concentrations of SMC conditioned medium. Capillary-like structure formation was monitored after 24, 48 and 72h incubation, and examined for the presence of characteristic arrangements of endothelial cells.

Immunoblotting

Protein concentration in the conditioned medium was determined using Bradford's assay (Bio Rad). When necessary the medium was concentrated in speed vacum and fifty microgram of protein were separated in 12% SDS-PAGE, under reducing conditions and subsequently blotted to the Hybond-P polyvinylidene difluoride membrane (GE Amersham Biociences). The membrane was blocked for 1 h in TBST (0.1M Tris pH 7.4, 1.5M NaCl, 0.5% Tween 20 0.2%) in 1% non fat dry milk followed by goat polyclonal anti-Ang-1 or anti-Ang-2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA), overnight at 4°C. After extensive washing, the membranes were incubated with secondary peroxidase-conjugated anti-goat (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA). Peroxidase reaction was visualized using enhanced chemiluminescent Luminol (Santa Cruz Biotechnology) and X-Ray film (Kodak). The experiment was repeated at least three times.

Results

Cell cultures

The cells employed in this study were characterized as endothelial and SMC, according to characteristic morphology and current differentiation markers. In brief, endothelial cells

expressed von Willebrandt factor, Flk-1 and Flt-1 receptors and formed capillary like structures when grown on Matrigel (Pimentel and Carvalho, 2007), while SMC expressed smooth muscle myosin heavy chain, smooth muscle α -actin, calponin, smoothelin and SM22 (Antonioli et al. 2007).

Effect of SMC conditioned medium on endothelial cell viability

When the endothelial cells were cultured on plastic either type I collagen in the presence of different proportions of the DMEM, a positive effect on MTT incorporation was noted (Fig. 1A and 1B). As a matter of fact it was not possible to distinguish between the effects of the conditioned medium from that of the culture medium, with the only exception of 100% conditioned medium on cells grown in type I collagen substratum (Fig. 1B). The same stimulatory effect was noted when cells were grown on Matrigel in the presence of 25% and 50% DMEM or conditioned medium (Fig. 1C). However, at 75% and 100% DMEM or conditioned medium, no distinction from the control cultures was observed.

Capillary-like tube formation

The isolated prostatic endothelial cells were observed to form tube-like structures when grown on Matrigel, but not on plastic or type I collagen (Fig. 2A-C). This phenomenon was reinforced when the cells were in the presence of 100% SMC conditioned medium (Fig. 2C). This was manifested as more distinct capillary-like structures, with 100% recruitment of the cells, while in the control individualized cells could be found. Lesser proportions of the conditioned medium or 100% DMEM were not different from the controls.

Determination of the relative amount of Ang-1 and Ang-2 production by endothelial cells cultured in the presence of SMC conditioned medium

Since Ang-1 and Ang-2 could not be detected in the SMC conditioned medium even after concentration and use of 75 μ g protein in the immunoblottings (data not shown), the presence of Ang-1 and Ang-2 was examined using the same procedure in the culture medium of stimulated endothelial cells. It was found that prostatic endothelial cells produce either Ang-1 or Ang-2, depending on the culture conditions (Fig. 3A-F). The production of Ang-1 was stimulated by culturing on type I collagen substrate (Fig. 3B) and surpassed the little production of Ang-2 in the same condition (Fig. 3E), while the production of either Ang-1 or Ang-2 was very reduced when cells were cultured on plastic or Matrigel (Fig. 3A and 3C). On the other hand, under the effect of the SMC conditioned medium the endothelial cells exhibited a marked decrease in the production of Ang-1, when cultured on type I collagen (Fig. 3B), and a equally marked increase in the production of Ang-2, when cultured on Matrigel (Fig. 3F), but not on plastic (Fig. 3D) or type I collagen (Fig. 3E), even though some Ang-2 was detected in this latter condition. Table I summarizes the relative effects of the conditioned medium on the production of Ang-1 and Ang-2 by the endothelial cells grown on different substrata.

Discussion

The angiogenesis capacity of a given tissue is one of the major determinants of organ final size. This is particularly true for tumors, as the ability to recruit and stimulate the growth of blood vessels is directly related to growth capacity. Lately, the inhibition of

angiogenesis has been taken as the major marker of tumor regression in response to different therapies (Huss et al 2001; Weigand et al 2005).

The prostatic endothelial cells are the first to undergo apoptosis in response to androgen deprivation, thus contributing to prostatic involution (Lekås et al 1997; Shabsigh et al 1998). Likewise, they are also the first to proliferate in response to androgens in the prostate of castrated animals (Franck-Lissbrant et al 1998, Shabisgh et al 1999). Some authors have demonstrated that castration-induced prostatic regression are associated with a significant decrease in the levels of VEGF (Haggstrom et al 1999; Lissbrant et al 2004; Franck-Lissbrant et al 1998). On the other hand, the levels of Ang-1 and tie 2 receptor are upregulated during testosterone stimulated prostatic regrowth (Johansson et al 2005). Even though VEGF is a major regulator of angiogenesis, its function is modulated by different factors such as the angiopoietins.

The present investigation aimed at identifying whether prostatic smooth muscle cells could regulate endothelial cell behavior, thus contributing to the understanding of how the vascular endothelium responds to androgens, since smooth muscle cells are major components of the prostatic stroma and express the androgen receptor.

In the present conditions it was not possible to distinguish the effect of the SMC conditioned medium from that of the SMC culture medium, which was supplemented with testosterone, insulin and high glucose on the MTT test. It is so because each of these components would increase metabolic rates in different cell types and are required for maintaining the differentiation state of smooth muscle cells in culture. One indication for the presence of regulatory factors appeared though when 100% conditioned medium was used on endothelial cells cultured on type I collagen substratum. In addition, the lack of effect of 75% and 100% medium and conditioned medium combinations when cells were

cultured on Matrigel, might result from the fact that cells were stimulated to differentiate (i.e. to form capillary-like structures).

Endothelial cell differentiation into capillary-like structures on Matrigel can be induced by a variety of stimuli. The present results demonstrated that the SMC conditioned medium potentiates the formation of capillary structures, when compared to the controls (i.e. endothelial cells alone or DMEM). Though not quantitated, this was determined by the consistency of the capillary-like structures formed as well as for the absence of isolated cells, which were frequent on the control conditions (data not show).

Since we could not detect Ang-1 or Ang-2 on the SMC conditioned medium, we decided to investigate whether the endothelial cells cultured in the presence of SMC conditioned medium could produce these endothelial cell regulators, based on the hypothesis that they could be produced by endothelial cells, in a autocrine mechanism of regulation (Eklund and Olsen 2006).

Surprisingly, the endothelial cells were shown to produce Ang-1 or Ang-2 depending on the culture condition (data not shown). Type I collagen and Matrigel substrata were especially capable of inducing endothelial cells to produce Ang-1, in contrast to plastic and the SMC conditioned medium modified this behavior, particularly inhibiting the production of Ang-1 by cells cultured on type I collagen and stimulating the production of Ang-2 by cells cultured on Matrigel.

It was evident that the stimulatory effect of the SMC conditioned medium on endothelial cell differentiation is associated with an increase in the autocrine production of Ang-2 by the endothelial cells. The function of Ang-2 is still, it could compete with Ang-1 for the Tie-1 receptor pathway and thus modulate its function (Eklund and Olsen, 2006). In spite of the regulatory molecule or molecules produced by SMC being unknown at the moment

(though Ang-1 and Ang-2 can be excluded) one concludes that SMC regulates endothelial cell differentiation and might mediate the prostatic vascular response to androgen deprivation.

Another important finding is that the SMC conditioned medium caused a marked drop in the production of Ang-1 by endothelial cells grown in type I collagen. Since angiopoietin I is a positive regulator of blood vessel stabilization but not endothelial cell proliferation (Rundhaug 2005), this result would be compatible with stimulation of endothelial cells when they are exposed to the sub-endothelial layers in a clear attempt to repair the endothelial structure.

Together, the results allow the conclusion that prostatic SMC produce soluble factors that modulate the behavior of prostatic endothelial cells *in vitro* and that the endothelial cell is dependent on the microenvironment. Contrasting Matrigel and type I collagen, one might associate the former with intact blood vessels basement membrane and the latter with vascular injury causing the exposure of the sub-endothelial layer.

The present work will certainly stimulates the search for the molecules produced by smooth muscle cells that regulate endothelial cell behavior. It has been determined before that prostatic smooth muscle cell produce androgen independent VEGF mRNA (Richard et al. 2002). However, the authors showed no evidence if these cells produce and secrete VEGF protein or, if this would be affected by androgen stimulation. Furthermore, they did not confirm the differentiation status of the SMC in culture nor considered that the source for Ang-2 in the prostate might be the endothelial cells themselves. Despite of these concerns, and considering that VEGF acts as a survival factor for endothelial cells *in vivo* and *in vitro* (Grosjean J. et al. 2006), VEGF is a potential SMC-derived candidate to regulate endothelial cell behavior.

Acknowledgments

S.B.P. was recipient of a CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) fellowship. This work was partly funded by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq grants for H.F.C.

References

- Antonioli E, Della-Colleta HHM, Carvalho HF. Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *Journal of Andrology* 25: 50-56, 2004.
- Antonioli E, Inada N, Vercesi A, Marin T, Franchini K, Carvalho HF. Cyclic but not static mechanical stretching induces prostatic smooth muscle cell hypertrophy. Submitted, 2007.
- Caine GJ, Blann AD, Stonelake OS, Ryan P Lip GYH. Plasma angiopoietin-I, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer : a comparison with VEGF and Flt-I. *European Journal of Clinical Investigation* 33: 883-890, 2003.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat* 155: 63-72, 1996.
- Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 312: 630-641, 2006.
- Franck-Lissbrant I, Häggström S, Damber JE, Bergh A. 1998. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology* 139: 451-456.

- Gerdes MJ, Dang TD, Lu B, Melinda L, McBride L, Rowley DR. Androgen regulated transcription in a prostate smooth muscle cell line (PS-1). *Endocrinology* 137: 864-872, 1996.
- Grosjean J, Kiriakidis S, Reilly K, Feldmann M, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cell survival: A role for NFkB. *Biochemical and Biophysical Communications* 340: 984-994, 2006.
- Hägström S, Lissbrandt IF, Bergh A, Damber JE. Testosterone induces vascular endothelial growth factor synthesis in the ventral prostate in castrated rats. *The Journal of Urology* 161: 1620-1625, 1999.
- Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, and Greenberg NM. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression Switch. *Cancer Research* 61:2736-2743, 2001.
- Johansson A, Rudolfsson HS, Wikström P, Bergh A. Altered levels of Angiopoietin 1 and Tie 2 are associated with androgen regulated vascular regression and Growth in the ventral prostate in adult mice and rats. *Endocrinology* 146:3463-3470, 2005.
- Lekås E, Johansson M, Widmark A, Bergh A, Damber J-E. Decrement of blood flow precedes the involution of the ventral prostate in the rat after castration. *Urology Research* 25:309-314, 1997.
- Lissbrant IF, Hammarsten P, Lissbrant E, Ferrara N, Rudolfsson SH, Bergh A (2004). Neutralizing VEGF Bioactivity with a soluble chimeric VEGF-receptor protein flt (1-3) IgG inhibits testosterone-stimulated prostate growth in castrated mice. *Prostate* 58: 57-65.
- Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nature Rev* 1: 169-178, 2002.

- Pimentel SB, Carvalho HF. Isolation and in vitro characterization of prostatic endothelial cells. Submitted, 2007.
- Prins GS, Birch L, Greene GL. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129:3187-3199, 1991.
- Richard C, Kim G, Koikawa Y, Salm SN, Tsujimura A, Wilson EL, and Moscatelli. Androgens Modulated the balance between VEGF and Angiopoietin expression in prostate epithelial and smooth muscle cells. *The Prostate* 50: 83-91, 2002.
- Rundhaug JE Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267-285, 2005.
- Shabsigh A, Tanji N, D'Agati V, Burchardt M, Rubin M, Goluboff ET, Heitjan D, Kiss A, and Buttyan R. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* 140:1920-1926, 1999.
- Shabsigh A, Chand DT, Heitjan DF, Kiss A, Olsson CA, Puchner PJ, and 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. *The Prostate* 36: 201-206, 1998.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol* 166: 2472-2483, 2001.
- Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis* 8: 197-204, 2005.

Figure Legends

Figure 1. Effects of SMC conditioned medium (grey bars) in different concentrations as compared to the same proportions of SMC culture medium (white bars) and with respect to the substratum (plastic, type I collagen and Matrigel) on prostatic endothelial cell viability after 72hs of culture evaluated by MTT reaction. The control condition (i.e. endothelial cells cultured in HAM-F12 medium) is indicated by the black bars. The asterisk indicates the only situation where the conditioned medium differed from the DMEM (i.e. 100% conditioned medium on type I collagen substratum). It is also noticed that both the DMEM and SMC conditioned medium showed positive (+) stimulation in MTT test on both plastic and type I collagen. The effect was though distinct when cells were cultured on Matrigel and the same stimulatory effect (+) was seen for 25% and 50% combinations but not at 75% and 100% DMEM or conditioned medium. Results are the mean \pm SD. ANOVA and Tukey's test, p values for the differences between groups are indicated; DMEM, CondM = SMC conditioned medium. Significance was achieved when $p \leq 0.05$.

Figure 2. Morphology of endothelial cells cultured on plastic, collagen and Matrigel. However, the structures formed in the presence of SMC conditioned medium 100% showed more distinct morphology and also involved the recruitment of almost every cell in the culture, apparently reinforcing the effect of Matrigel. **Fig. 2A-F** 92,5x.

Figure 3. Ang-1 and Ang-2 production by endothelial cells cultured on plastic, type I collagen or Matrigel under the effect of DMEM or conditioned medium. It can be seen that collagen substratum stimulated the production of Ang-1 by cultured endothelial cells (**B**),

and that this effect was abolished by the SMC conditioned medium. On plastic or Matrigel, the production of Ang-1 by endothelial cells was minimal and appeared not affected by the SMC conditioned medium (**A** and **C**). The production of Ang-2 by endothelial cells was neglectible irrespective of the substratum (**D-F**). However, it was greatly stimulated by the SMC conditioned medium when the cells were cultured on Matrigel (**F**) and just minimal if the substratum was type I collagen (**E**). The results are summarized in terms of relative secretion of Ang-1 and Ang-2 in Table I.

Table 1. Summary of the effects of conditioned media on the relative expression of Ang-1 and Ang-2 by prostatic endothelial cells.* The remarkable effects of the SMC conditioned medium to inhibit the expression of Ang-1 by endothelial cells grown on collagen substratum and to stimulate the expression of Ang-2 by endothelial cells grown on Matrigel are highlighted.

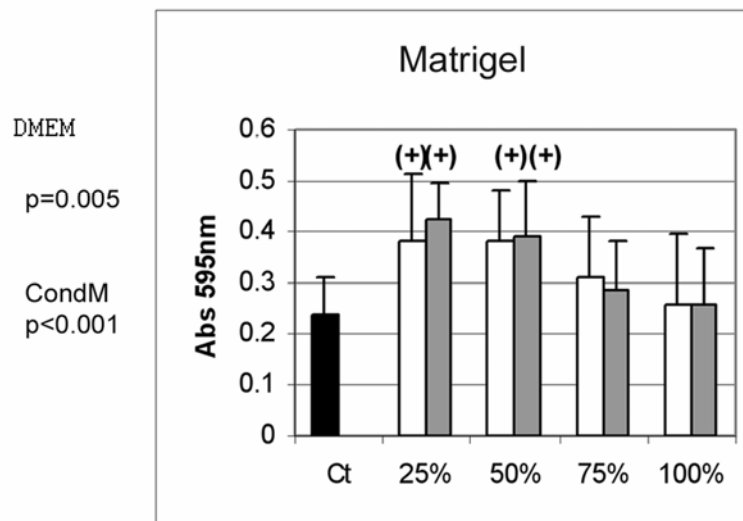
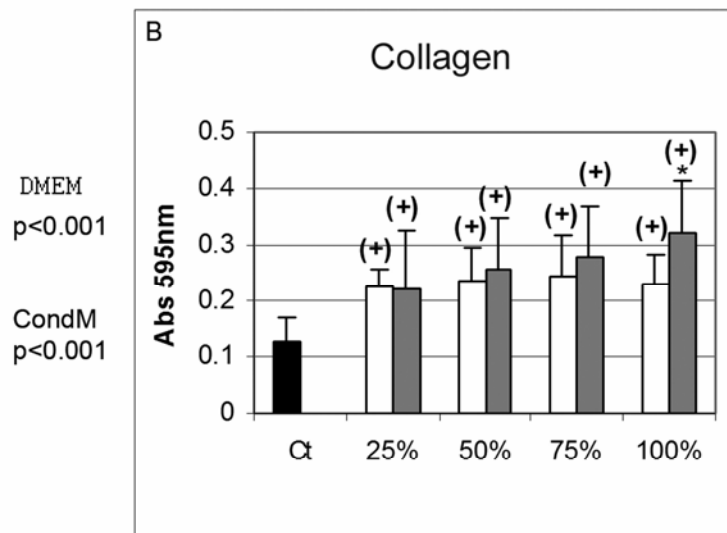
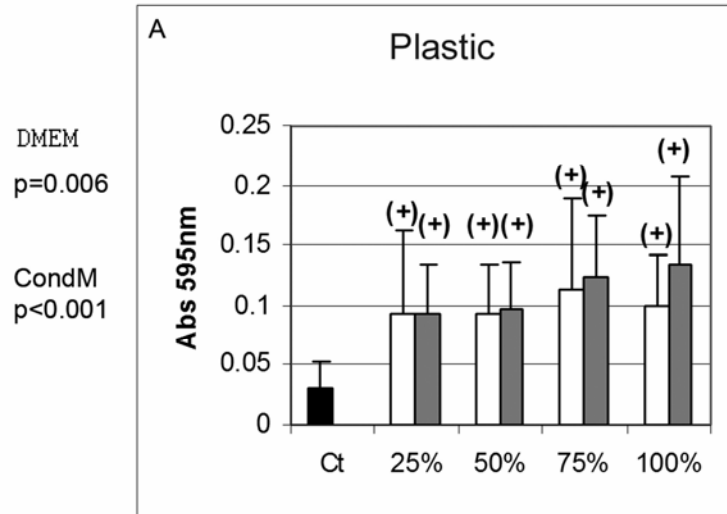


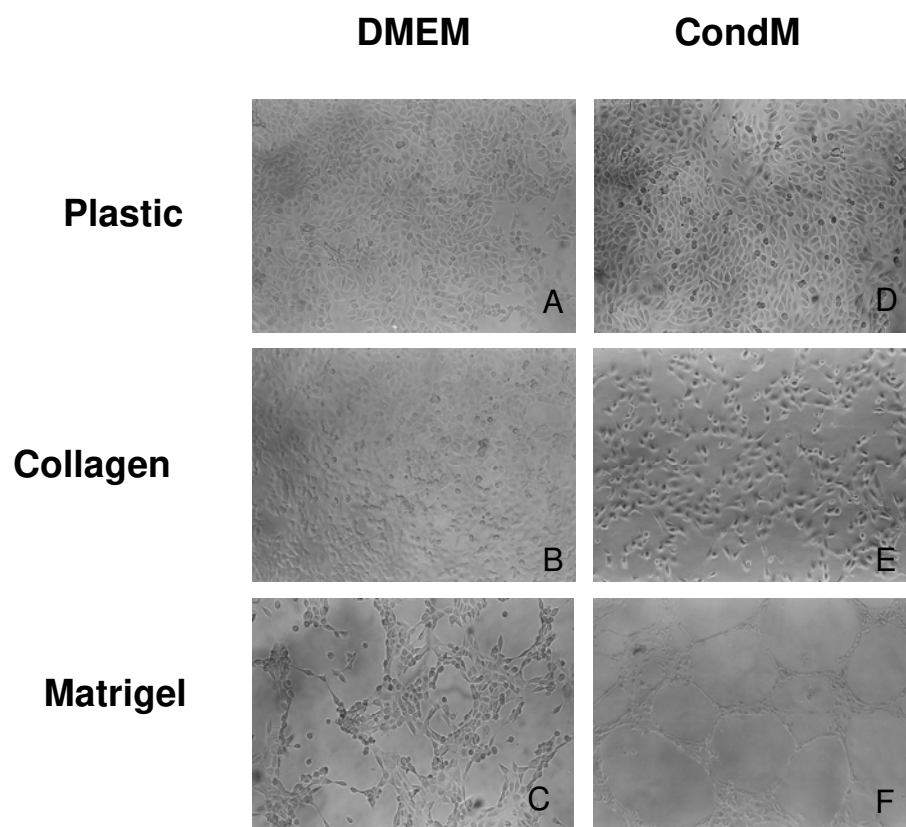
Figure 2.

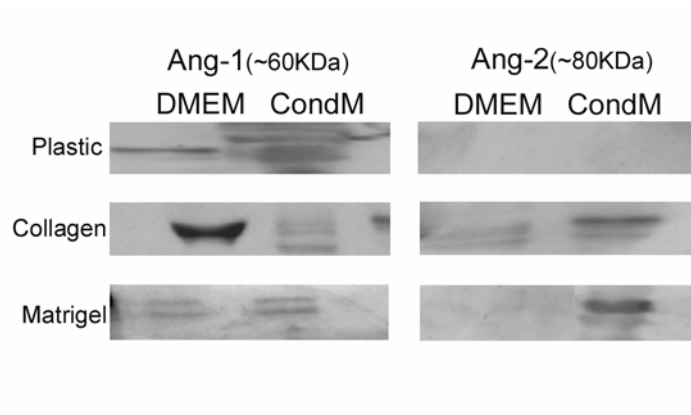
Figure 3.

Table 1.

	Cells	Ang-1	Ang-2
	Substrata		
Plastic	Conditioned Medium	±	-
	DMEM	±	-
Collagen	Conditioned Medium	±	++
	DMEM	++++	-
Matrigel	Conditioned Medium	±	++++
	DMEM	±	-

*The negative signal indicates no expression; ± indicates very little expression. Positive signs (+ to +++) represent progressively more intense expression.

Conclusão final

As células musculares lisas participam da regulação do comportamento das células endoteliais prostáticas potencializando a formação de estruturas parecidas com capilares. A modulação dependente do substrato pode estar relacionada com a integridade do leito vascular.

Referências bibliográficas

- Alexander CM, Werb Z (1991) Extracellular Matrix Degradation. In Hay ED. *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York. p. 225-302.
- Antonioli E, Della-Colleta HH, Carvalho HF (2004) Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* 25:50-6.
- Aümuller G (1979) Prostate gland and seminal vesicles. In: *Handbuch edr mikrscoischen Anatomie des Menschen*. Edited by LA okche and L. Vollrath. /berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, vol VII/6.1, 1979
- Aümuller G, Seitz J (1990). Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol*. 121:127-231.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G (2002). Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Science* 115:3719-27.
- Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ (2005). Expression Signature of the Mouse Prostate. *J. Biol. Chem.* 280 (43): 36442-36451.
- Bishop ET, Graham TB, Bloor S, Broom IJ, Hendry NFK, Wheatley DN (1999). An in vitro model of angiogenesis: Basic features. *Angiogenesis* 3: 335-344.
- Brandes D (1966). The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int Rev Cytol* 20: 207-276.
- Brändströn A, Westin P, Bergh A, Cajander S, Damber J-E (1994). Castration induces apoptosis in the ventral prostate but not in androgen sensitive prostatic adenocarcinoma in the rat. *Cancer Res* 54: 3594-3601.

- Caine GJ, Blann AD, Stonelake PS, Ryan P, Lip GYH (2003). Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1. *European Journal of Clinical Investigation* 33: 883-890.
- Carvalho HF, Line SRP (1996). Basement membrane associated changes in the rat ventral following castration. *Cell Biol Int.* 20:809-819.
- Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior PSL (1997a). Collagen type VI is a component of the microfibrils of the prostatic stroma. *Tissue Cell* 29:163-170.
- Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR (1997b). The elastic system of the rat ventral prostate and its modification following orchidectomy. *Prostate* 32: 27-34.
- Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman, Ballmer-Hofer K (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 601-615.
- Corbier P, Martikainen P, Pestis J, Harkonen P (1995). Experimental research on the morphofunctional differentiation of the rat ventral prostate: roles of the gonads at birth. *Arch Physiol Biochem* 103, 699-714.
- Cunha GR, Bigsby RM, Coole PS (1985). Sugimura Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Diff* 17: 137-148.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrinol Rev* 8: 338-362.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA (1996). Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat.* 155: 63-72.

- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurit T (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development *Steroid Biochem Mol Biol. Nov*; 92(4):221-36.
- Davies P, Eaton CL (1991). Regulation of prostate growth. *J Endocrinol* 131: 5-17.
- Della Colleta HHM (2005). Conteúdo, biossíntese e degradação do ácido-hialurônico na próstata ventral de ratos: efeito da castração e papel das células musculares lisas. Tese de Doutorado. UNICAMP.
- Donjacour AA, Cunha GR (1988). The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Dev Biol* 128: 1-14.
- Donjacour AA, Cunha GR (1993). Assessment of protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology* 132: 2342-2350.
- Eklund L & Olsen BR (2006). Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental Cell Research* 312: 630-641.
- Fernandes, JKH (2000). Caracterização dos glicosaminoglicanos da próstata ventral, glândula de coagulação e vesícula seminal de ratos: efeitos da castração. Tese de Doutorado. UNICAMP.
- Flórez MG, Carvalho HF (2005). Célula epitelial prostática. In *Células: Uma abordagem Multidisciplinar*. Edited by Carvalho HF and Collares-Buzato. Manole, Barueri-SP. P. 335-338.

- Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ, Klebe RJ (1998) Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol* 16: 483-496.
- Grant GM, Giambernardi TA, Grant AM, Klebe RJ (1999) Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. *Matrix Biol* 18: 145-148
- Guyton AC (1984). *Tratado de Fisiologia Médica*. 6°ed. Interamericana. Rio de Janeiro, p. 926.
- Häggström S, Wikström P, Bergh A, Damber J-E (1998). 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.
- Hall BR. (1978). *Developmental and Cellular Skeletal Biology*. Academic, New York.
- Hamilton, W, Boyd J, Mossman H (1959). *Human Embriology* Williams and wilkins Co., Baltimore.
- Hay ED. (1981) *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. Plenum, New York.
- Hay ED.(1983). Extracellular matrix alters epithelial differentiation. *Curr Biol* 5: 1029-1035.
- Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR (1991). Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod* 45:308-321.
- Hayek OR, Shabsigh A, Kaplan SA, Kiss AJ, Chen MW, Burchardt T, Burchardt M, Olsson CA, Buttyan R (1999). 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.

- 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.
- Hayward SW, Cunha GR (2000). The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am* 38(1):1-14.
- Hewett PW, Murray JC. (1993). Immunomagnetic purification of human microvessel endothelial cells using Dynabeads coated with monoclonal antibodies to PECAM-1. *European Journal of Cell Biology* 62:451-454.
- Hu Z, Ito T, Yuri K, Xie C, Ozawa H, Kawata M. (1998). *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.
- Ispanovic E e Hass T L (2006). JNK and PI3K differentially regulate MMP-2 and MT1-MMP mRNA and protein in response to actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells. *Am J Physiol* 291:C579-C588.
- Jackson CJ, Garbett PK, Nissen B, Schrieber L. (1990). Binding of human endothelium to Ulex europaeus-1 coated dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *J. Cell Science* 96:257-262.
- Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Horsfall DJ, Tilley WD. (2002). A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Research* 62: 854-859.
- Johansson A, Rudolfsson SH, Wikström P, Bergh A (2004). Altered levels of angiotensin II and Tie 2 are associated with androgen regulated vascular regression and growth in the ventral prostate in adult mice and rats. *Endocrinology* 146:(8)3463-3470.

- Kassen A, Sutkowski DM, Ahn H, Sensibar JA, Koslowski JM, Lee C. (1996). Stromal cells of the human prostate: initial isolation and characterization. *Prostate* 128: 89-97.
- Kerr JFR, Searle J (1973). Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch Abt [B] Zellpathol* 13: 187-192.
- Kofoed JA, Tumilasci OR, Curbelo HM, Fernandez Lemos SM, Aarias NH, Houssay AB. (1990). Effects of castration and androgens upon prostatic proteoglycans in rats. *Prostate*. 16: 93-102.
- Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L (1990). Extracellular matrix. *FEBS Lett* 268:386-393.
- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA, Liao S (1990). Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod* 43: 1079-1086.
- Lekås E, Johansson M, Widmark A, Bergh A, Damber JE (1997). Decrement of blood flow precedes the involution of ventral prostate in the rat after castration. *Urol Res* 25:309-314.
- Levine AC, Liu XH, Greenberg PD, Eliaschvili M, Schiff JD, Aaronson SA, Holland JF, Kirschenbaum A (1998). Androgens induce the expression of vascular endothelial growth factor in human fetal prostatic fibroblasts. *Endocrinology* 139: 4672-4678.
- Lin CQ, Bissel MJ (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* 7: 737-743.
- Lissbrant IF, Hammarsten P, Lissbrant E, Ferrara N, Rudolfsson SH, Bergh A (2004). Neutralizing VEGF Bioactivity with a soluble chimeric VEGF-receptor protein flt (1-3)

IgG inhibits testosterone-stimulated prostate growth in castrated mice. *Prostate* 58: 57-65.

Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C (1999). Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 59: 2570-2576.

Lohi J, Lehti K, Valtanen H, Parks WC, Keski-Oja J (2000). Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene* 242: 75-86.

McCawley LJ, Matrisian LM (2000). Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6: 149-56.

Marchenko GN, Strongin AY (2001). MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 265: 87-93.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 253: 165-74.

Massagué J. (1991). A helping hand from proteoglycans. *Current Biol* 1: 117-119.

Matrisian LM (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6: 121-125.

Men S, Cakar B, Conkbayir I, Hekimoglu B (2001) Detection of prostatic carcinoma: the role of TRUS, TRUS guided biopsy, digital rectal examination, PSA and PSA density. *J Exp Clin Cancer Res* 4: 473-80.

Nemeth JA, Lee C (1996). Prostatic ductal system in rats: regional variation in stroma organization. *Prostate* 28: 124-128.

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.
- Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M, Stevenson WGS (2004). Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Research* 64:9062-9069.
- Parks WC, Mecham RP (1998) *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press, San Diego
- Petrova TV, Makinen, Alitalo K. (1999). Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Experimental Cell Research* 253:117-130.
- Prins GS, Birch L, Greene GL (1991). Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129:3187-3199.
- Richard C, Kim G, Koikawa Y, Salm SN, Tsujimura A, Wilson EL, Moscatelli D (2002). Androgens modulate the balance between VEGF and Angiopoietin expression in prostate epithelial and smooth muscle cells. *The Prostate* 50:83-91.
- Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F, Dexter TM. (1988). Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stroma cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332: 376-378.
- Rundhaug JE (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.* 9:(2)267-285.
- Saunders WB, Bohnsack BL, Faske JB, Anthis NJ, Bayless KJ, Hirschi KK, Davis GE (2007). Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *The Journal of Cell Biology* 175:(1)179-191.

- Shabsigh A, Chang DT, Heitjan DF, Kiss A, Olsson CA, Puchner PJ, Buttyan R (1998). Rapid reduction in blood flow to the prostate gland after castration and prostatic endothelial cell survival. *Prostate* 36: 201-206.
- Shabsigh A, Tanji N, D'agati V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O, Shabsigh R, Buttyan R (1999) Vascular anatomy of the rat ventral prostate. *Anat Rec* 256: 403-411.
- Silletti S & Cheresch DA (1999). A link between integrins and MMPs in angiogenesis. *Fibrinolysis & Proteolysis* 13:(6)226-238.
- Sordello S, Bertrand N, Plouet J (1998). Vascular endothelial growth factor is up-regulated in vivo by androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 287-290.
- Sternlicht MD & Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
- Story MT, Livingston B, Baeten L, Swartz SJ, Jacobs SC, Begun FP, Lawson RK (1989). Cultured human prostate-derived fibroblasts produce a factor that stimulates their growth with properties indistinguishable from basic fibroblast growth factor. *Prostate* 15: 355-365.
- Sutkowski DM, Fong JC, Sensibar JA, Rademaker AW, Sherwood ER, Koslowski JM, Lee C (1992) Interaction of epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human epithelial cells in culture. *Prostate* 21: 133-143.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA, Bigsby RM, Brody JR (1986). Whole –mount autoradiography study of DNA synthetic activity during postnatal development and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34: 985-995.
- 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.

- Tanney DC, Feng L, Pollok AS, Lovett DH (1998) Regulated expression of matrix metalloproteinases and TIMP in nephrogenesis. *Dev Dyn* 213:121-129.
- Terry DE, Clark AF (1996). Glycosaminoglycans in the three lobes of the rat prostate following castration and testosterone treatment. *Biochem Cell Biol.* 74(5): 653-658.
- Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC (2002). The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development* 129: 1905-12.
- Tresltad R. (1987). *Developmental Biology of the Extracellular Matrix*. Allan Liss, New York.
- Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem* 274: 4570-4576.
- Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF (2000). Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for the smooth muscle cells. *Prostate* 45:253-258.
- Wilson JD, Griffin JE, Leshin M, George FW (1981) Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes *Hum Genet* 58: 78-84

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de mestrado/doutorado intitulada "Isolamento e caracterização de células endoteliais prostáticas e a modulação do seu comportamento por células musculares lisas".

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

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

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1282-1).

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

Alice Damasceno de Almeida

Aluno(a)

James

Orientador(a)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Nome: Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO
Função: Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEMIB - UNICAMP