



MAURÍCIO MOREIRA DA SILVA JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO NO
CÂNCER DE PRÓSTATA: Envolvimento dos
Fatores de Crescimento, Metaloproteinases da Matriz,
Receptores de Hormônios Sexuais e Células-Tronco
Prostáticas**

**Campinas
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Mauricio Moreira da Silva Júnior

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO NO CÂNCER DE
PRÓSTATA: Envolvimento dos Fatores de Crescimento,
Metaloproteinases da Matriz, Receptores de Hormônios Sexuais e Células-
Tronco Prostáticas**

Orientador: Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Co-orientador: Prof. Dra. Ubirajara Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO MAURICIO MOREIRA DA SILVA JUNIOR E ORIENTADO PELO PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Silva Junior, Mauricio Moreira, 1978-
Si38c Caracterização do estroma reativo no câncer de
próstata : envolvimento de fatores de crescimento,
metaloproteinases de matriz, receptores de hormônios
sexuais e células-tronco prostáticas / Mauricio Moreira da
Silva Junior. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Wagner José Fávaro.

Coorientador : Ubirajara Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da próstata.

2. Marcadores biológicos.

3. Prognóstico. I. Fávaro, Wagner José. II. Ferreira,
Ubirajara, 1956-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Reactive stroma in prostate cancer : involvement of growth factors, matrix metalloproteinases, receptors, sex hormones and prostatic stem cells

Palavras-chave em inglês:

Prostatic neoplasms Biological
markers Prognosis

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Wagner José Fávaro [Orientador]

Marcelo Lopes Lima

Rodolfo Borges dos Reis

Data de defesa: 28-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

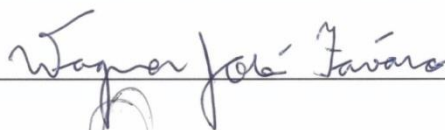
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MAURÍCIO MOREIRA DA SILVA JUNIOR

Orientador PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

MEMBROS:

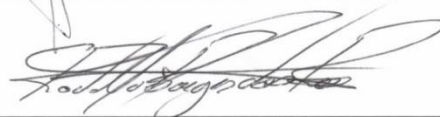
1. PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO



2. PROF. DR. MARCELO LOPES DE LIMA



3. PROF. DR. RODOLFO BORGES DOS REIS



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 28 de agosto de 2014

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que pudesse superar mais uma etapa de minha vida.

A minha esposa, Ana Paula Tasso Moreira da Silva e minha filha, Ana Laura Tasso Silva (que vinha tentar brincar comigo enquanto escrevia); a primeira é um exemplo e tudo para mim, aquela que me apoia nos momentos difíceis e que suportou comigo a construção desta Tese de Mestrado; amo muito as duas e não seria ninguém sem elas.

Aos meus pais, Mauricio Moreira da Silva e Maria Elizabeth Pessoto da Silva que, com todo esforço puderam me proporcionar a formação médica e pessoal. Sou o que sou hoje graças a eles. Amo vocês, meus pais.

Ao grande Prof. Dr. Wagner J. Favaro que, mesmo com a agenda tumultuada, orientou-me e contribuiu muito para a realização desta etapa. Sem ele, não seria possível esta Tese. Ao Dr. Patric pela ajuda e apoio, muito obrigado.

Aos meus sócios e professores, Dr. Ubirajara Ferreira, Dr. Wagner Matheus, Dr. Rafael Mamprim e Dr. Phillipe Hackler que me aturam praticamente todos os dias... ; principalmente o Dr. Ubirajara Ferreira, um exemplo de vida que admiro muito e com quem divido muitas vezes até os problemas pessoais.

A todas as pessoas que trabalham comigo, minhas secretárias, Deise, Adriana, Bruna e Débora, que tiveram até, de aturar o mau humor de alguns dias, em detrimento do contexto exaustivo de atividades.

Aos meus amigos, não tenho como relacioná-los todos aqui, moram inteiramente no meu coração. Mario Sergio, Romulo Zaque, Marcos Bosoni, Nadia, Prof. Odail Pagliardi, Dr. Marcelo Lopes Lima, obrigado.

A todos, minha permanente gratidão.

Caracterização do Estroma Reativo na Progressão do Câncer de Próstata: Envolvimento dos Fatores de Crescimento, Metaloproteinases da Matriz, Receptores de Hormônios Sexuais e Células-Tronco Prostáticas

RESUMO

A contribuição do estroma para a progressão do câncer de próstata (CaP) ainda é pouco conhecida. As células neoplásicas podem alterar seu componente estromal adjacente para formar um ambiente que possibilita e suporta a progressão tumoral. A modificação desse estroma é denominado de estroma reativo (EstR), o qual ocorre em muitos tipos de cânceres humanos relacionando-se à progressão e recidiva tumorais. Os fatores de crescimento e as metaloproteinases da matriz (MMP) são altamente expressos no CaP e podem atuar como fatores de crescimento parácrinos e/ ou autócrinos. As relações entre os hormônios sexuais esteróides e seus receptores com os fatores de crescimento e MMPs são cruciais reguladores da homeostase prostática, sendo fundamental o entendimento dessas relações com o desenvolvimento do EstR e progressão do CaP. Além disso, a ocorrência das células-tronco prostáticas cancerosas representam um passo importante na patogênese glandular. Assim, os objetivos principais do presente trabalho foram caracterizar morfológica e molecularmente o microambiente do EstR em amostras com CaP, bem como encontrar alguma associação dos fatores de crescimento, MMPs, receptores de hormônios sexuais esteróides e células-tronco cancerosas na sua patogênese. Além disso, verificou-se a relevância da reatividade estromal e de seus marcadores moleculares na progressão do CaP. O presente trabalho baseou-se em estudo retrospectivo, o qual utilizou 40 amostras prostáticas de pacientes, na faixa etária de 60 a 80 anos, com diagnóstico de CaP. Tais amostras foram divididas em 2 grupos (20 amostras por grupo): **Grupo 1:** amostras de CaP sem estroma reativo; **Grupo 2:** amostras de CaP com intensa reatividade estromal; e posteriormente submetidas à análises histopatológicas e imunohistoquímicas. Os resultados demonstraram que o EstR foi caracterizado morfollogicamente pela significativa diminuição das fibras musculares lisas e pela abundante quantidade de fibras colágenas no estroma adjacente aos ácinos neoplásicos. Intensa reatividade estromal foi verificada nos tumores de graus intermediário (*Gleason 7, 3+4*) e alto (*Gleason 7, 4+3*). Com relação à caracterização

molecular do EstR, os presentes resultados demonstraram imunorreatividades aumentadas para vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2 e C-Myc nas amostras com intensa reatividade estromal quando comparadas às amostras sem reatividade estromal. As imunorreatividades para AR e ER α foram aumentadas nas amostras prostáticas com intensa reatividade estromal. Em contraste, a imunorreatividade para o ER β foi aumentada nas amostras sem reatividade estromal. Com relação à ocorrência das células-tronco prostáticas cancerosas, estas ocorreram com maior frequência no estroma com intensa reatividade estromal. Considerando os dados em conjunto, pode-se concluir que o EstR pode ser considerado um marcador preditivo da progressão do CaP, uma vez que este foi mais frequente nos tumores de intermediário e alto grau. As imunorreatividades aumentadas para vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2 e C-Myc foram fundamentais para a ativação do EstR e tornaram o microambiente prostático favorável à progressão do câncer, devido a potencialização do desequilíbrio da interação epitélio-estroma. Finalmente, a ocorrência de células-tronco prostáticas cancerosas indicou um possível envolvimento dessas células na sinalização para o desenvolvimento do EstR e progressão do CaP.

Characterization of Reactive Stroma in the Progression of Prostate Cancer: Involvement of Growth Factors, Matrix Metalloproteinases, Receptors, Sex Hormones and Prostatic Stem Cells

ABSTRACT

The contribution of the stroma to the progression of prostate cancer (CaP) cancer is still unknown. The cancer cells can alter their adjacent stromal component to form an environment that enables and supports tumor progression. A modification of this is called the stroma reactive stroma (EstR), which occurs in many types of human cancers relating to the progression and tumor recurrence. Growth factors and matrix metalloproteinases (MMP) are highly expressed in CaP and can act as a paracrine and / or autocrine growth factors. The relationship between sex steroid hormones and their receptors with growth factors and MMPs are crucial regulators of prostatic homeostasis, a fundamental understanding of these relationships with the development and progression of EstR of CaP. Moreover, addition, the occurrence of prostate stem cells cancer represent an important step in the pathogenesis glandular. Thus, the main objectives of this study were to characterize the morphological and molecular microenvironment EstR in samples with CaP as well as find some association of growth factors, MMPs, sex steroid hormone receptors and cancer stem cells in its pathogenesis. Furthermore, we verified the relevance of stromal reactivity and its molecular markers in the progression of CaP. The present work was based on a retrospective study, which used 40 prostate samples from patients, aged 60-80 years, diagnosis of CaP. These samples were divided into 2 groups (20 samples per group): Group 1: CaP samples without reactive stroma; Group 2: CaP samples with intense stromal reactivity; and subsequently subjected to histopathological and immunohistochemical analyzes. The resulted showed that EstR was morphologically characterized by the significant reduction of smooth muscle fibers and the abundant amount of collagen fibers in the stroma adjacent to the neoplastic acini. Intense reactivity was observed in stromal tumors of intermediate grades (Gleason 7, 3 +4) and high (Gleason 7, 4 +3). With respect to the molecular characterization of EstR, our results showed increased vimentin immunoreactivity, IGF-1, MMP-2, FGF-2 and C-Myc in samples with intense stromal reactivity when compared to samples without stromal reactivity. The immunoreactivity for AR and ER α were elevated in prostatic stromal

samples with intense reactivity. In contrast, immunostaining for ER β was increased in samples with no stromal reactivity. With regard to the occurrence of prostate cancer stem cells, they occurred more frequently in the stroma with intense stromal reactivity. Considering the data together, we can conclude that the EstR can be considered a predictive marker of the progression of CaP, since this was more common in tumors intermediate, and high grades. The immunoreactivity increased vimentin, IGF-1, MMP-2, FGF-2 and C-Myc were essential for the activation of rd and made a favorable microenvironment for prostate cancer progression due to the potentiating imbalance of epithelial-stromal interaction. Finally, the occurrence of prostate cancer stem cells indicated a possible involvement of these cells in signaling for EstR development and progression of CaP.

LISTA DE ABREVEATURAS

AR- Receptor Androgênico
CAF- Carcinoma Associado a Fibroblasto
CaP - Câncer de Próstata
CK- Citoqueratinas
CTP- Células Tronco Prostáticas
CTC- Células Tronco Cancerosas
CTM- Célula Tronco Multipotente
DES- Dietilestilbestrol
DHT- Dehidrotestosterona
EstR - Estroma Reativo
FGF- Fator de Crescimento Fibroblástico
HPB- Hiperplasia Prostática Benigna
IGF-1 - Fator de Crescimento Homólogo à Insulina
IR- Receptor Insulinico
MEC- Matrix Extracelular
PAP- Fosfatase Ácida Prostática
PIA- Atrofia Inflamatória Proliferativa
PSA- Antígeno Prostático Específico
PSCA- Antígeno das Células Tronco Prostáticas
MMP- Matriz Metaloproteinase
NIP - Neoplasia Intraepitelial Prostática
RE α - Receptor Estrogênico α
RE β - Receptor Estrogênico β
TGF- Fator de Crescimento Tumoral
TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral β
VEGF- Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Divisão anatômica da Próstata Proposta por *McNeal 1968*. Retirado do site <http://www.unidadurologia.es/portalluu/portal?content=1:56>.

Figura 2:A: Esquema dos componentes celulares da próstata humana. Células epiteliais secretoras estão situados em uma lâmina basal e seus produtos são secretados para o lúmen acinar. As células basais e células neuroendócrinas esparsas também estão presentes no epitélio deste compartimento. O compartimento do estroma circundante de ácinos epitelial é complexo e consiste de músculo liso, fibroblastos vestigiais, vasos sanguíneos, fibras nervosas autonômicos, células inflamatórias e componentes da matriz extracelular (*Barron & Rowley, 2012*). B: Fotomicrografia da zona periférica prostática humana normal; aumento X200 (Anatomopatologia da UNICAMP, retirado do site anatpat.unicamp.br).

Figura 3 :A: Glândula prostática humana normal, com células epiteliais, lâmina basal, matriz extracelular (MEC), célula muscular lisa (CML), vasos sanguíneos e fibroblastos. B: Desenvolvimento e progressão do câncer de próstata e formação do estroma reativo (Figura retirada de *Tuxhorn et al., 2001*).

Figura 4: Marcadores de fibroblasto, miofibroblasto e músculo liso (Figura retirada de *Tuxhorn et al., 2001*).

Figura 5: Esquema da subdivisão externa da glândula prostática. PZ= zona periférica, CZ= zona central (*McNeal apud Blacklock, 1977*).

Figura 6: Esquema da vista posterior da localização de retirada de amostras prostáticas. Os números 1, 2, 3 e 4, 5, 6 correspondem aos fragmentos coletados da

Figura 7: Fotomicrografias da zona periférica prostática dos grupos 1 (a, b) e 2 (c, d). (a) e (b) Estroma sem reação desmoplásica constituído por abundantes fibras musculares lisas (ML) e delgadas fibras colágenas (**Col**) subjacentes aos ácinos prostáticos; Colorações: Hematoxilina-Eosina (a) e Tricrômico de Masson (b). (c) e (d) Estroma com

intensa reatividade desmoplásica constituído por espessas e abundantes fibras colágenas (Col) e escassas fibras musculares lisas (ML); Colorações: Hematoxilina-Eosina (c) e Tricrômico de Masson (d). a – d:Ep – epitélio secretor, Es – estroma.

Figura 8: Imunomarcação dos antígenos α -actina, Vimentina, IGF-1, MMP-2 e FGF-2 na zona periférica prostática dos Grupos 1 e Grupos 2

Figura 9: Imunomarcação dos antígenos C-Myc, PSCA, AR, ER α e ER β na zona periférica prostática dos Grupos 1 e Grupos 2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcacão.

Tabela 2: Distribuição da escala de *Gleason* e reatividade estromal nos adenocarcinomas prostáticos sem reatividade estromal (Grupo 1) e com intensa reatividade estromal (Grupo 2).

Tabela 3: Intensidade da imunomarcacão dos diferentes antígenos nas células epiteliais e estromais dos adenocarcinomas prostáticos sem reatividade estromal (Grupo 1) e com intensa reatividade estromal (Grupo 2).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Arquitetura Prostática e Células-Tronco Prostáticas (CTP).....	1
1.2. Regulação Hormonal na Próstata.....	6
1.3. Câncer de Próstata (CaP).....	11
1.4. Fatores de Crescimento e Estroma Reativo no Câncer / de Próstata.....	14
 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	 19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Amostras Humanas e Análises Histopatológicas do Estroma Reativo.....	20
3.2. Imunomarcacão dos Antígenos: α -actina, Vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2, C-Myc, PSCA, AR, ER α e ER β	22
3.3. Análises Estatísticas.....	24
 4. RESULTADOS	 25
4.1. Análises Histopatológicas do Estroma Reativo.....	25
4.2. Imunomarcacão dos Antígenos: α -actina, Vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2, C-Myc, PSCA, AR, ER α e ER β	28
 5. DISCUSSÃO.....	 34
 6. CONCLUSÕES	 42
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 43

1. INTRODUÇÃO

1.1-Arquitetura Prostática e Células-Tronco Prostáticas (CTP)

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina a qual secreta diversos nutrientes, que compoem o líquido seminal, fluido esse essencial para a nutrição e motilidade dos espermatozóides, sendo portanto, fundamental ao processo reprodutivo^{1,2,3}. Na espécie humana, essa encontra-se localizada ao redor da uretra inferiormente à bexiga urinária. Segundo a Nômina Internacional Anatômica de 1989, as regiões prostáticas são: base, ápice, lobos médio direito e esquerdo e istmo⁴. Estudos clínicos utilizam a divisão em zonas da próstata sendo essas: central, fibromuscular, periférica, de transição e periuretral. Figura 1^{4,5}.

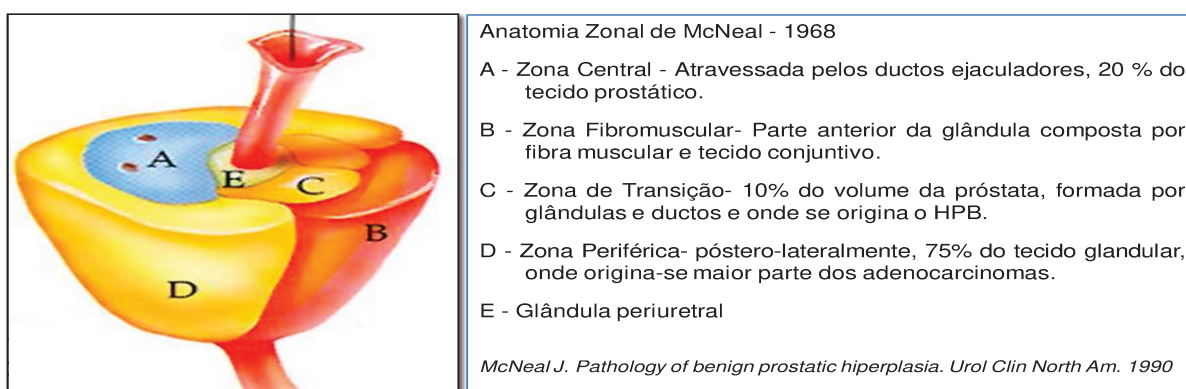


Figura 1. Divissão anatômica da Próstata Proposta por *McNeal* 1968. (Imagem retirado do site <http://www.unidadurologia.es/portalluu/portal?content=1:56>.

A zona central é relativamente resistente ao desencadeamento de carcinomas. Por outro lado, a zona de transição é apontada como principal alvo da ocorrência de hiperplasia benigna prostática⁴. A zona periférica é a maior subdivisão anatômica, contendo 75% do total de tecido glandular e o local de ocorrência da maioria dos carcinomas⁶. As diferenças morfológicas entre as zonas central e periférica podem ser vistas microscopicamente, sendo que a zona central possui estroma fibromuscular bem desenvolvido, com ácidos largos e proeminente área intra-luminal, revestidos por epitélio com diferentes camadas. Já a zona periférica tem delgado estroma fibromuscular e epitélio regular⁷.

O epitélio prostático é constituído por três tipos celulares, a saber: luminal ou colunar, basal e neuroendócrino⁸ (Figuras 2A e 2B). As células epiteliais luminais representam o mais freqüente tipo celular tanto no epitélio normal quanto no hiperplásico, constituindo o compartimento exócrino da próstata, o qual secreta proteínas como o antígeno específico da próstata (PSA) e fosfatase ácida prostática (PAP) nos humanos⁹. As células luminais expressam receptor androgênico (AR) e são andrógeno-responsivas e andrógeno-dependentes¹⁰. Também, essas expressam citoqueratinas (CK) CK8 e CK18, porém não há ocorrência de expressão das CK5 e CK14^{11,12}. Tais biomarcadores, como antígeno específico prostático (PSA), fosfatase ácida prostática (PAP), receptor de andrógeno (AR), citoqueratinas (CK) 8 e 18, são comumente usados para identificar as células epiteliais luminais^{9,13,14}. Já as células neuroendócrinas são identificadas pela expressão de neurofisina, cromogranina A, sinaptofisina e calcitonina, mas não expressam PSA e/ou AR. Este tipo celular também é diferenciado, mas não-responsivo à andrógeno^{8,15,16}. Estas populações de células diferenciadas podem tornar-se modificadas no câncer de próstata apresentando alterações do número, da histologia e da função, sugerindo papel regulatório nessa patologia^{17,18}.

Por outro lado, as células basais são relativamente indiferenciadas não demonstrando atividade secretora, formando o compartimento basal da glândula⁵. As células basais são distintas por apresentarem morfologia variável, ocorrendo desde células pequenas e achatadas, com cromatina condensada e pequena quantidade de citoplasma, a células cúbicas com amplo citoplasma⁵. Na próstata humana, as células basais formam uma camada contínua adjacente à membrana basal, sendo que a relação de células basal/luminal é de cerca de 1:1. As células basais são andrógeno-independentes, mas andrógeno-responsivas, sendo que essas são independentes de andrógenos para sua manutenção e sobrevivência, crescimento e diferenciação, mas podem ser estimuladas por ação androgênica via fatores de crescimento derivados do estroma, os quais agem sobre as células basais para o repovoamento do compartimento celular luminal^{9,10}. Com relação aos biomarcadores, as células basais são normalmente identificadas por falta de expressão das principais proteínas secretoras da próstata, como o PSA e a PAP¹⁹, expressando ao mesmo tempo CK5 e CK14, mas não as CK8 ou CK18^{12,20}. O biomarcador p63 é o mais comum na identificação das células basais além de ser utilizado como diferenciador celular entre

glândulas prostáticas com características benignas e neoplásicas^{21,22}. A expressão de AR em células basais é relativamente baixa se comparada às células luminais^{13,14}. Contudo, as células basais expressam focalmente os receptores estrogênicos e podem proliferar quando submetidas à terapia com estrógenos²³. O papel exato das células epiteliais basais durante o desenvolvimento, funcionamento e carcinogênese ainda não é claro^{8,10}.

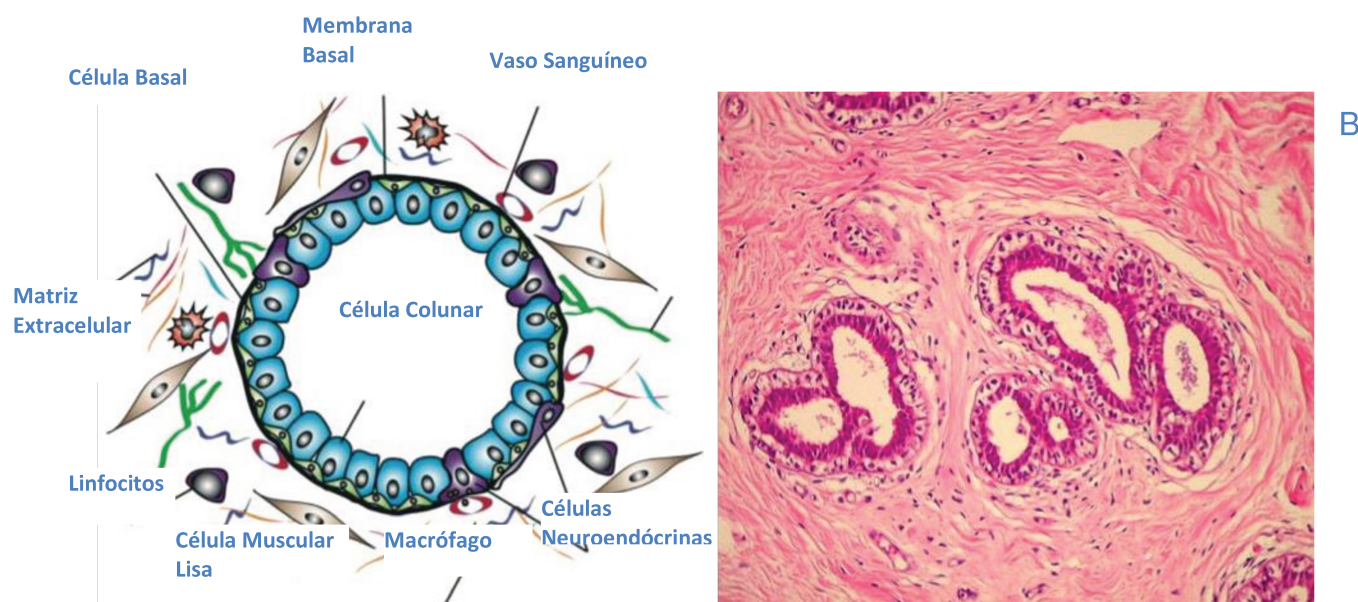


Figura 2:A: Esquema dos componentes celulares da próstata humana. Células epiteliais secretoras estão situados em uma lâmina basal e seus produtos são secretados para o lúmen acinar. As células basais e células neuroendócrinas esparsas também estão presentes no epitélio deste compartimento. O compartimento do estroma circundante de ácinos epitelial é complexo e consiste de músculo liso, fibroblastos vestigiais, vasos sanguíneos, fibras nervosas autonômicos, células inflamatórias e componentes da matriz extracelular²⁴. **B:** Fotomicrografia da zona periférica prostática humana normal; aumento X200 (Anatomopatologia da UNICAMP, retirado do site anatpat.unicamp.br).

Ainda, no compartimento basal sugere-se a localização de outro tipo celular conhecido como células-tronco epiteliais ou progenitoras^{10,25}. As células-tronco têm a

capacidade de auto-renovação e regeneração durante a vida adulta, residindo em um local específico ou "nicho" no órgão de interesse²⁶.

Diversos modelos têm sido propostos para identificar e isolar as células-tronco prostáticas (CTP). O nicho das CTP ainda não foi completamente caracterizado, devido às dificuldades para identificar tais células, uma vez que essas possuem um ciclo de auto-renovação muito lento²⁶. O primeiro e respeitado modelo experimental sugere que as CTP localizam-se no compartimento basal e geram células epiteliais luminais altamente diferenciadas²⁵. Outros estudos questionaram a idéia de que as CTP localizam-se unicamente no compartimento epitelial basal. Experimentos em camundongos onde as CTP foram identificadas por BrdU, ou Htimidina, que resumidamente é um método para caracterizar as células de ciclagem lenta, sugeriram que as CTP não estão restritas ao compartimento basal, podendo estar na camada celular luminal como uma população de células de proliferação lenta na parte proximal dos ductos da próstata²⁷. Outro estudo utilizando camundongos Knockout para o gene p63, o qual é considerado um biomarcador de células basais prostáticas, avaliaram o papel desse gene no desenvolvimento da próstata. De acordo com esses estudos, o p63 foi essencial para o desenvolvimento da próstata, e a perda de células basais p63-positivas resultou na agenesia prostática quando avaliada no final do período gestacional²⁸. No entanto, quando rudimentos de sistema urogenital foram coletados de embriões de camundongos negativos para o gene p63 e cultivados por mais de um mês, evidenciou-se a formação de ductos ramificados, bem como a expressão de AR e proteínas secretoras na camada de células colunares secretoras desses ductos²⁹. Ainda, nesse mesmo experimento, células neuroendócrinas também se desenvolveram na ausência de células basais p63-positivas. Assim, postulou-se que as células tronco são células multipotentes no compartimento basal e que as células luminais e neuroendócrinas podem se diferenciar na ausência total de células basais. Assim sendo, o compartimento basal pode não ser o nicho exclusivo das CTP²⁹.

A existência de CTP provavelmente é melhor ilustrada quando se investiga os efeitos de andrógeno na próstata. A castração leva a involução da glândula, entretanto, quando são restaurados os níveis deste hormônio, a glândula regenera completamente. Este ciclo de involução-regeneração pode ser repetida várias vezes, supondo que uma população de células capaz desta regeneração deva existir, supostamente as CTP³⁰. Na próstata humana estas células podem ser identificadas a partir de níveis mais

elevados de integrinas de superfície $\alpha 2 \beta 1$, e são células filhas que tem capacidade proliferativa mais limitada, porem com capacidade de auto renovação e multipotentes³¹. Outro estudo correlaciona estas integrinas com o antígeno CD133, demonstrando um elevado potencial proliferativo de um pequeno grupo de células dentro de epitélio prostático³².

O termo CTP é normalmente usado para se referir às células tronco epiteliais. No entanto, a próstata contém tanto os compartimentos epitelial e estromal com suas supostas populações de células progenitoras²⁶.

O estroma prostático é formado por um arranjo complexo de células estromais e matriz extracelular associado a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, as quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais^{33,34,35}. Também, vasos sanguíneos, terminações nervosas e células imunes constituem partes integrais do estroma³³. Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático. A principal função destas é sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos^{33,36}, sendo reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes^{33,35}. Além disso, componentes estruturais, como colágeno e fibras elásticas, proporcionam rigidez mecânica e flexibilidade ao tecido. Os proteoglicanos regulam a estrutura e a permeabilidade da matriz extracelular, ligando-se a fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases, modulando a atividade destes^{33,35,36}.

Em humanos, apesar da relação estroma/epitélio se manter constante desde o nascimento até à idade de 40 anos nas glândulas não-hiperplásicas, acima dessa idade essa relação aumenta de 2:1 em condições normais para 5:1 na hiperplasia benigna prostática (HBP)³⁷. Assim, devido à hiperatividade proliferativa do estroma estar relacionada com o desenvolvimento da HBP, especula-se a existência de células-tronco adultas no estroma prostático em resposta a estímulos durante a patogênese da HBP³⁸. Células-tronco mesenquimais ou células estromais multipotentes (CTM) foram inicialmente isoladas a partir da medula óssea de indivíduos adultos, e identificadas no interior do tecido conjuntivo da maior parte dos órgãos³⁹. As CTM podem se diferenciar em tecidos mesenquimais como ossos, tecido adiposo, e cartilagem e contribuir para a regeneração de tecidos mesenquimais⁴⁰, e comumente expressam vários marcadores

de superfície, incluindo CD29, CD44, CD49f, CD51, CD71, CD73 (SH3/ 4), CD90, CD105, CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), ICAM-1²². Contudo, ausência na expressão de outros marcadores superficiais é verificada, incluindo CD11b, CD14, CD18 (LFA-1), CD31 (PECAM-1), CD34, CD45, CD40, CD56, CD80, e CD86²². Outros autores, *Lin et al.*³⁸ demonstraram em cultura de células estromais de pacientes com HBP, a ocorrência de diferentes marcadores para CTM, incluindo CD30, CD34, CD44, CD54, CD133 (5% células)³⁸. Essas células também apresentaram a capacidade de se diferenciar em linhagens miogênicas, adipogênicas e osteogênicas. Recentemente, *Ceder et al.* relataram uma possível existência de células estromais progenitoras na próstata adulta humana. Esta população de células estromais expressou vimentina e CD133⁴¹.

Apesar da identificação e caracterização das CTP permanecer difícil, é preciso considerar o microambiente ou nicho ocupado por essas células. Assim, a proximidade física das CTP no compartimento basal adjacente à membrana basal implica em importante interação com proteínas da matriz extracelular incluindo integrinas e proteínas juncionais que são conhecidas na regulação da diferenciação das células tronco¹³.

1.2. Regulação Hormonal na Próstata

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos^{42,43,44}. Os andrógenos expressam seus efeitos biológicos através da interação com receptores intracelulares específicos, sendo que o complexo receptor-hormônio associado à cromatina nuclear regula a expressão do gene específico⁴⁵.

A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática⁴⁶. A DHT é resultante da conversão da testosterona através da enzima 5 α -redutase^{44,46}. O papel dos receptores androgênicos (AR) na regulação da homeostase das células do estroma prostático não é muito bem

entendido. Recentes estudos sugerem que receptores androgênicos são expressos nos fibroblastos e regulam alguns fatores de crescimento. Entretanto, a estimulação dos receptores androgênicos no estroma prostático pode resultar na estimulação de células do estroma prostático, como também diminuição da proliferação de células epiteliais, alteração na deposição de colágeno e diminuição da expressão de fatores de crescimento⁴⁷. A ação androgênica funciona como mioidiferenciação dos fibroblastos prostáticos pela ação do fator de crescimento de transformação do tipo β (TGF- β), podendo os AR serem importantes na formação do estroma reativo no câncer prostática⁵⁸.

A castração é um dos métodos mais utilizados para o estudo dos mecanismos envolvendo a testosterona na manutenção e funcionamento da glândula prostática. A partir desses estudos, sabe-se que a deficiência androgênica leva a involução da próstata, ativação da apoptose e intensa remodelação da matriz extracelular desse órgão⁴⁹.

Os andrógenos e outros hormônios como os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais da próstata quanto às alterações patológicas^{43,50}. Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gonada, com redução da produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático⁵¹.

A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse hormônio pela enzima aromatase^{52,53}. Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desses hormônios em receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente^{43,53}. Segundo *Risbridger*⁵³, utilizando tecido prostático recombinante de animais adultos *knockout* para os receptores estrogênicos α e ou β , demonstraram que a resposta estrogênica completa no tecido prostático requer mecanismos parácrinos, tanto mediados por receptores α do estroma bem como receptores β do epitélio.

Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver tanto ações diretas, através dos receptores, como indiretas, através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal⁴³. Estudos epidemiológicos consideraram os hormônios estrogênicos como tendo papel fundamental na carcinogênese prostática⁵⁴. É conhecido que, excessiva exposição aos estrógenos em diferentes etapas do desenvolvimento pode

levar à neoplasia prostática⁵⁰. Outro estudo confirmou a relação de estrógenos e andrógenos usando modelo canino e demonstraram que os estrógenos podem causar o desenvolvimento de hiperplasia glandular⁵⁵. Por estes motivos é importante o estudo e relação dos andrógenos e estrógenos com o estroma reativo.

As ações diretas de estrógenos na próstata foram avaliadas através de um modelo de camundongos hipogonadal (hpg), os quais têm deficiência pós-natal em gonadotrofinas e testosterona, mas são sensíveis a hormônios. Nesse estudo, verificou-se resposta proliferativa direta aos estrógenos nos lobos ventral e anterior da próstata e vesícula seminal desses animais. Tais alterações aberrantes foram demonstradas através de proliferação de fibroblastos no estroma e metaplasia das células epiteliais basais, além de processo inflamatório. Contudo, evidenciou-se redução das células musculares lisas e das células epiteliais secretora⁵⁶. Outro estudo utilizando camundongos estrógeno-modulados, os quais eram *Knockout* para enzima aromatase, demonstrou que doses elevadas de andrógenos têm efeitos morfológicos similares a doses elevadas de estrógenos. Os resultados exibiram doses periféricas e intraprostáticas elevadas de andrógenos, aumento dos receptores androgênicos, além da expansão dos volumes dos compartimentos estromal, epitelial e luminal indicando efeito proliferativo glandular⁵⁷. Assim sendo, esses trabalhos evidenciaram que tanto os estrógenos como os andrógenos são elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes caminhos.

Adicionalmente, a testosterona representa importante estimulador da proliferação da célula prostática, principalmente quando a sua forma mais potente, a DHT, liga-se à receptores androgênicos de células tanto do compartimento epitelial quanto estromal⁵⁸. De maneira inesperada, a adição de DHT a meios de cultura contendo exclusivamente células epiteliais da próstata não estimula a atividade mitogênica nem a proliferação destas células, mostrando assim que é importante a interação do epitélio com o estroma⁵⁹. Além disso, os fatores de crescimento (*Growthfactors*) estão sob influência direta dos andrógenos, bem como do estrógeno e seus receptores estrogênicos alfa (ER α) e beta (ER β)⁶⁰.

A administração crônica de estrógenos como 17 β -estradiol ou dietilestilbestrol (DES) leva a metaplasia escamosa, caracterizada por mudança na histodiferenciação que surge a partir do compartimento celular basal, o qual é considerado suposto nicho das CTP¹⁰. Administração exógena de estrógenos altera o eixo hipotálamo-hipófise-

gonadal e, portanto, reduz os níveis de andrógenos, o que leva à regressão do epitélio da próstata, sendo considerada como uma ação indireta do estrógeno sobre a próstata¹⁰. A metaplasia das células epiteliais é uma resposta direta aos estrógenos caracterizada por camadas múltiplas de células epiteliais basais¹⁰. Contudo, é pouco provável que a proliferação de todas as células basais seja proveniente de uma amplificada população de células tronco, pois as CTP são raras ao longo dos ductos epiteliais¹⁰.

Também, é importante destacar os mecanismos diferenciais através dos dois receptores estrogênicos. Estudos envolvendo os ER β estrogênicos têm adicionado mais um nível de complexidade nos mecanismos de ações dos estrógenos na próstata⁵¹. Experimentos caracterizaram importante envolvimento dos ER β nos mecanismos prostáticos, conjuntamente as ações exercidas pelos ER α , sendo os efeitos estrogênicos produto de um balanço dinâmico entre ER α e ER β ^{51,61}. Os ER β são expressos especialmente nas células epiteliais basais da próstata normal e essa subpopulação de células mostra importante propriedade biológica, com potencial efeito proliferativo sobre as células epiteliais além de envolvimento na carcinogênese^{44,51,62,63}. Também, o efeito antiproliferativo dos ER β na glândula prostática tem sido postulado em diferentes estudos⁴⁸. Segundo *Weihua et al.*⁵¹, camundongos *Knockout* para os ER β demonstraram focos de hiperplasia epitelial celular no lobo ventral da próstata aos 5 meses de idade, confirmando a capacidade antiproliferativa da próstata relacionada aos ER β . Em adição, outros estudos destacaram que ER β podem estar envolvidos não só à um processo antiproliferativo epitelial mas também à diminuição do processo apoptótico epitelial glandular⁶⁹. Segundo *Adams et al.*⁶¹, os receptores estrogênicos β em conjunto com os hormônios androgênicos podem mediar diversos efeitos sobre a proliferação epitelial prostática, primeiramente promovendo a proliferação celular em períodos iniciais gestacionais e após isso agir de forma a limitar o crescimento celular em períodos tardios gestacionais em fetos humanos. Ainda, diversos estudos demonstraram que o ER β é supra-regulado por andrógenos^{61,64}.

Outro ponto importante a ser considerado no desenvolvimento da glândula prostática é a idade. Após o pico da idade reprodutiva, a arquitetura histológica da próstata começa a sofrer mudanças relacionadas à idade que continuarão ao longo da vida²⁴. Nas diferentes espécies animais, incluindo a humana, o desbalanço hormonal é

fator comum que leva a muitas alterações morfofuncionais na glândula prostática^{49,65}. *Banerjee et al.*⁴⁹ demonstraram que os níveis de DHT epitelial foram decrescidos com a idade. Inversamente, os níveis de estradiol e estrona foram elevados tanto no epitélio quanto no estroma prostático. Dessa forma, as alterações nos níveis endógenos de hormônios esteróides relacionados ao envelhecimento contribuem fortemente para o desequilíbrio glandular. Em adição, é conhecido que a redução dos níveis de testosterona na senescência leva à regressão do crescimento prostático tanto de origem benigna quanto maligna. No entanto, homens com carcinoma prostático avançado, quando submetidos à administração de testosterona verificou-se freqüente exacerbação da doença⁶⁶. Também, *Cordeiro et al.*⁶⁷ revelaram que gerbilos senis apresentaram menor taxa de receptores androgênicos em relação a gerbilos jovens e adultos. Os mesmos autores verificaram que a distribuição dos receptores androgênicos pode ser regulada tanto geneticamente quanto por outros fatores ainda não estabelecidos.

Várias hipóteses têm sido correlacionadas à manifestação do carcinoma prostático. Estudos epidemiológicos consideraram os hormônios estrogênicos como tendo papel fundamental na carcinogênese prostática⁵⁴. É conhecido que, excessiva exposição aos estrógenos em diferentes etapas do desenvolvimento pode levar à neoplasia prostática⁵⁰. *Walsh & Wilson*⁵⁵ confirmaram a relação de estrógenos e andrógenos usando modelo canino e demonstraram que os estrógenos podem causar o desenvolvimento de hiperplasia glandular.

Segundo *Bianco et al.*⁵⁶, estudando experimentalmente as ações de andrógenos e estrógenos, verificaram que as atuações independentes de andrógenos e estrógenos têm potencial para iniciar mudanças na próstata, incluindo a hiperplasia e displasia, mas não a malignescência no órgão. Por outro lado, como esses dois hormônios agem em sinergismo para induzir a carcinogênese não é conhecido⁵⁶. Também, *Risbridger et al.*⁶⁸, através de estudos com animais knockout para a enzima aromatase demonstraram que as alterações malignas na próstata são dependentes tanto das respostas estrogênicas como androgênicas e que nenhum desses hormônios isoladamente é capaz de deflagrar aberrantes modelos de crescimento, resultando em malignescência.

Segundo *Prins et al.*⁶⁹, a regulação hormonal do RNA mensageiro para a expressão dos ER β , sugere que ER β no epitélio prostático pode influenciar na

regulação do crescimento glandular. Estudos anteriores têm destacado que não há correlação entre a expressão dos ER β na HBP⁵¹. Contudo, quando há ocorrência de câncer prostático verificou-se decréscimo do mesmo, com aumento da expressão em estágios avançados da patologia incluindo metástase⁵¹.

Os papéis dos AR e ER α / ER β no câncer de próstata foram focadas principalmente em células epiteliais, enquanto seus papéis em células do estroma têm sido muito menos estudado. Os ER α e ER β são expressos em células do estroma, porém não há estudos que demonstrem a relação desses receptores com o câncer de próstata⁷⁰.

1.3. Câncer de Próstata (CaP)

O câncer de próstata (CaP) é a primeira doença maligna mais comum do trato urogenital. A Sociedade Americana do Câncer estima que serão diagnosticados 233.000 novos casos de CaP nos Estados Unidos em 2014 e cerca de 29.480 homens morrerão como resultado dessa doença⁷¹. O CaP é considerado uma doença epitelial e, frequentemente, estende-se além dos limites normais do órgão^{72,73}. O desenvolvimento do CaP é de natureza endócrina e a possibilidade de ocorrência desta doença aumenta com o envelhecimento⁷⁴. Cerca de 6 em cada 10 casos são diagnosticados em homens com 65 anos ou mais de idade, e é raro antes dos 40 anos. A média de idade no momento do diagnóstico é de cerca de 66 anos⁷¹.

A etiologia do CaP é ainda desconhecida, entretanto, presume-se que alguns fatores possam influenciar seu desenvolvimento. Ultimamente, tem se dado muita atenção à alimentação, uma vez que dietas ricas em gordura predispõem ao câncer e as ricas em fibras reduzem o risco de seu aparecimento. Os fatores genéticos e ambientais são alvo, também, de investigação⁷⁵. Fumaça de automóveis, cigarros, fertilizantes e outros produtos químicos estão sob suspeita⁷⁶. No que se refere aos fatores ambientais, muitas relações com desenvolvimento do CaP são possíveis, entretanto, destaca-se a capacidade etiopatogênica de substâncias químicas utilizadas na indústria de fertilizantes, como ferro, cromo, cádmio, borracha e chumbo⁷⁶. Recentemente, a exposição ao arsênico inorgânico, um contaminante ambiental, também tem sido responsabilizado pela iniciação e/ou progressão do CaP⁷⁷. Populações que vivem em locais de baixa incidência de CaP, quando migram para áreas de alta incidência, apresentam um aumento na ocorrência de casos⁷⁶.

Assim, os eventos associados ao início do CaP não são completamente compreendidos, mas algumas evidências sugerem que, além de alterações genéticas e ambientais, o CaP se desenvolve a partir de um microambiente inflamatório⁷⁸. Assim, tem sido sugerido que o CaP se desenvolve a partir de uma atrofia inflamatória proliferativa (PIA), que é caracterizada pelo aumento da proliferação das células epiteliais com a presença de grandes infiltrados inflamatórios. Na glândula prostática normal tanto de humanos quanto de roedores, o epitélio é composto pela camada luminal de células secretoras colunares e pela camada basal de células cuboidais revestidas pela membrana basal. As células epiteliais altamente proliferativas da PIA começam a perder a estrutura colunar e passam a exibir células em formato cuboidal. Além disso, os ácinos começam a perder as suas invaginações características. Diversas evidências sugerem que a PIA pode ser precursora da neoplasia intraepitelial prostática (NIP)⁷⁹. A NIP é caracterizada por células de formas variadas e aumento no tamanho do núcleo das células dos ductos e ácinos. A progressão da NIP dá origem então ao CaP localizado, caracterizado principalmente pela perda da camada de células basais e da arquitetura normal da glândula. O CaP avança para a doença metastática, caracterizada por ausência de membrana basal, grande invasão do estroma e formação glandular inexistente. Todas essas alterações histopatológicas são acompanhadas por mudanças na expressão de muitos genes e também de perdas genéticas, que contribuem para a progressão do tumor de próstata^{78,80}.

Mutações somáticas das células tronco/ progenitoras, acumuladas ao longo de um período de várias décadas pode afetar genes envolvidos na regulação do crescimento, sinalização celular, diferenciação terminal e reparação^{81,82}. A frequência das mutações somáticas está aumentada nos processos inflamatórios. A inflamação da próstata é um evento comum observado na tumorigênese e atrofia glandular⁹. As mutações nos genes responsáveis pelo desenvolvimento, diferenciação e crescimento da próstata normal são alvos para o início, progressão e metástase do câncer de próstata⁸³. Como as células tumorais expressam características similares às de células luminas, células luminas mutadas foram consideradas como precursoras do adenocarcinoma. No entanto, após o início da terapia hormonal de ablação de andrógenos em casos de adenocarcinomas prostáticos andrógeno-dependentes, tumores altamente agressivos andrógeno-independentes reincidem e podem manifestar características de células basais^{84,85}.

Portanto, a hipótese de que células de câncer de próstata podem ser derivadas a partir de células tronco ou células de fenótipo intermediário é reforçada, pois as células tronco possuem muitas características em comum com as células tumorais, incluindo a auto-renovação, pluripotência na diferenciação e alto potencial replicado^{84,85}. Apesar de uma variedade de fatores ambientais e genéticos, a idade é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento do tumor maligno. Com o envelhecimento as células tronco/progenitoras acumulam várias mutações que favorecem à transformação neoplásica^{81,82}. Estas células transformadas dão origem a células-filha de trânsito amplificado que, por sua vez, não são capazes de se diferenciarem em células colunares secretoras normais e formam lesões pré-cancerosas associadas com a inflamação proliferativa crônica^{9,20}. A maior parte destas células danificadas de trânsito amplificado podem se diferenciar em células de fenótipo luminal intermediário que utiliza andrógenos e fatores derivados do estroma para proliferação, mas não para a diferenciação terminal.

O antígeno para Célula-Tronco Prostática (PSCA) tem sido utilizado como possível marcador de CTP maligna. O PSCA é uma glicoproteína de superfície celular, constituída por 123 aminoácidos, a qual foi identificada principalmente no CaP (específica no tecido prostático), podendo ocorrer também nos cânceres gástrico, urotelial e pancreático^{86,87}. Existem vários trabalhos sobre o estudo do PSCA, incluindo o de Gu et al.⁸⁶ que mostrou que nove em nove amostras de metástase óssea apresentaram PSCA positivo, juntamente com *Dannull et al.*⁸⁸ demonstrando que todos os tecidos metastáticos prostáticos foram positivos para PSCA. *Ross et al.*⁸⁷ estudou a marcação do PSCA em tecido urogenital, Hiperplasia Prostática, NIP e Câncer de próstata localizado e metastático, mostrando que o PSCA foi estatisticamente maior no Câncer de Próstata metastático e quando comparado o câncer prostático metastático com o localizado, os resultados foram 64% e 48% respectivamente de positividade. Um outro estudo importante sobre o PSCA foi o de *Han et al.*⁸⁹, através da análise de 246 espécimes de prostatectomia radical, mostrou que o PSCA está relacionado à maior pontuação de Gleason, invasão de vesícula seminal e envolvimento linfonodal. Considerando estes estudos, entre outros, o PSCA caracteriza-se como um alvo potencial para o Câncer de Próstata metastático e de alto risco.

1.4. Fatores de Crescimento e Estroma Reativo no Câncer de Próstata

Na próstata diferentes processos biológicos tais como regulação da proliferação e diferenciação celular, atividade mitogênica, processos secretores e crescimentos tumorais são regulados e/ou influenciados por diferentes polipeptídeos como os fatores de crescimento homólogos a insulina (IGF), fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e pelos fatores de crescimento transformadores (TGF)^{90,91,92,93,94,95}. Assim, em associação, células estromais e matriz extracelular (MEC) criam um microambiente que regula o crescimento e diferenciação funcional das células adjacentes, desempenhando cada um desses, importante papel na manutenção da forma e função tecidual^{33,96}.

O estroma é definido como o microambiente imediatamente adjacente ao epitélio capaz de coordenar diversas atividades como reparo de feridas, mudanças na homeostasia, além da interação com complexos neoplásicos. O estroma já foi visto como uma estrutura de apoio passiva que pouco contribuía para a função biológica dos tecidos. No entanto, é agora compreendido que o estroma é um ambiente dinâmico que diretamente influencia o comportamento de células epiteliais e executa o reparo tecidual em resposta à lesão²⁴. Modificações do estroma peritumoral inicia-se na NIP e incluem alterações como mudanças fenotípicas das células estromais, remodelação da matriz extracelular (MEC) e indução da angiogênese^{33,97,98,99}.

O estroma reativo (EstR) é definido como um novo microambiente estromal caracterizado em resposta ao carcinoma e que acompanha o crescimento tumoral, caracterizado pelo aumento de células inflamatórias, incremento da angiogênese e fatores de crescimento, com remodelação da MEC⁹⁷ (**Figura 3**). O EstR é composto por um complexo de fibroblastos e miofibroblastos associados ao tumor, sendo que a origem destas células ainda não são claramente compreendidas (**Figura 3**). Alguns autores sugerem que estas células se originam de células do estroma prostático ou de células da musculatura lisa ou até mesmo de células-tronco^{33,97,98,99}. O microambiente estromal é a chave para o crescimento e o desenvolvimento do câncer, com início após o desenvolvimento da NIP^{33,97,98,99}.

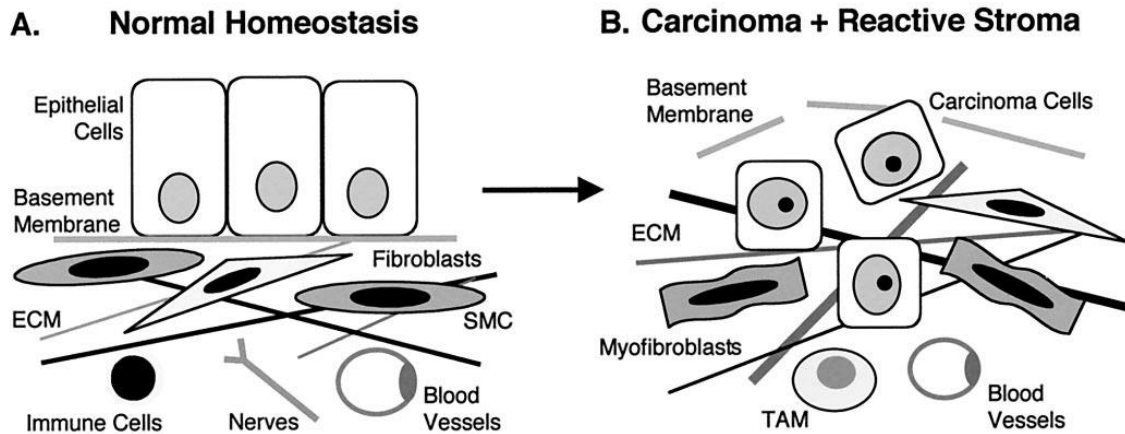


Figura 3 :A: Glândula prostática humana normal, com células epiteliais, lâmina basal, matriz extracelular (MEC), célula muscular lisa (CML), vasos sanguíneos e fibroblastos. **B:** Desenvolvimento e progressão do câncer de próstata e formação do estroma reativo (Figura retirada de *Tuxhorn et al.*³³).

Sendo o microambiente estromal a chave para o desenvolvimento e progressão tumoral, e suas principais células o fibroblasto e o miofibroblasto, sendo marcados pela alfa actina (α -actina) e vimentina, cabe definir ainda o real mecanismo desta interação (**Figura 4**)^{33,98,100,101}. Contudo, os fibroblastos podem exibir diferentes propriedades genotípicas e fenotípicas, associando-se à células neoplásicas e constituindo o carcinoma associado ao fibroblasto (CAF), sendo que sua ativação constitui um importante passo para o desenvolvimento tumoral^{98,102,103}.

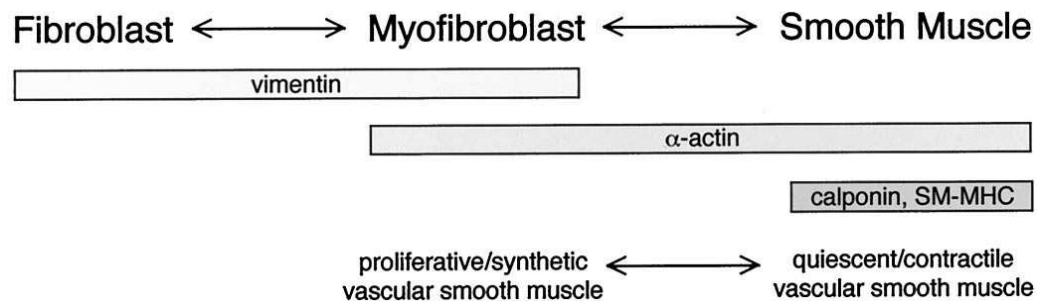


Figura 4: Marcadores de fibroblasto, miofibroblasto e músculo liso (Figura retirada de *Tuxhorn et al.*,³³).

Considerado o EstR como sendo formado principalmente por estes dois tipos celulares, fibroblastos e miofibroblastos, e seu principal marcador a vimentina, *Davor et*

al.¹⁰⁴ demonstraram a forte relação entre este marcador e tumores com menor tempo livre de doença, com o mesmo grau histológico tumoral (*Gleason*) e com maior taxa de recorrência bioquímica, concluindo que, somente a alta expressão de vimentina foi preditor significativo para recorrência bioquímica, portanto sendo relacionado a importância do estudo do estroma reativo.

O miofibroblasto, que são células geralmente encontradas no tecido de granulação e que apresentam características proliferativas e síntese de matriz fibrótica¹⁰⁵ é uma importante célula encontrada no processo de cicatrização de feridas e doenças fibróticas, sendo identificado pela marcação positiva para vimentina¹⁰⁶. Estudos comparando a quantidade destas células no CaP com *Gleason* 3, demonstraram 50 % de fibroblastos e 50% de miofibroblastos, sendo que no *Gleason* 4, foi observado um importante aumento de miofibroblasto, juntamente com a diminuição da musculatura lisa normal^{33,98}.

Os fibroblastos encontrados no tecido normal exercem principalmente a função de homeostase, porém, em associação à células tumorais (CAF) promovem a progressão tumoral através de sua ação reparadora e sua biologia³³. Ainda, dúvidas persistem quanto aos mecanismos de ativação destas células no complexo com o carcinoma, porém existem evidências que são importantes para a modulação da carcinogênese³³.

Embora o real papel dos AR no estroma prostático não seja ainda bem compreendido, recentes estudos sugerem que estes estão expressos nos fibroblastos e atuam na regulação e secreção de diversos fatores de crescimento. A ação androgênica promove a miodiferenciação dos fibroblastos prostáticos através dos efeitos dos TGFs⁴⁸ estando implicado no desenvolvimento tumoral e na síntese de outros fatores, como as metaloproteinases de matriz(MMP)¹⁰⁷.

A progressão tumoral é um processo complexo de transformação de células normais em células tumorais com características de invasão do tecido adjacente e metástase, sendo que para isto, um complexo estromal é formado para fornecer substrato para este desenvolvimento, com formação de novos vasos. As MMPs desempenham um papel importante na degradação de proteínas da matriz extracelular, incluindo aqueles da membrana basal, facilitando assim a invasão de células e de metástases, e tem sido amplamente implicadas neste papel em muitos tipos de câncer, incluindo o CaP¹⁰⁸. As células neoplásicas são capazes de degradar a MEC através de

enzimas, resultando na dissolução da membrana basal. As mais proeminentes entre estas enzimas são as MMPs¹⁰⁹. As MMPs estão associadas à diferentes processos biológicos, a saber: cicatrização de feridas, remodelação tecidual, angiogênese e progressão tumoral¹¹⁰. As diversas funções das MMPs as tornaram um alvo terapêutico promissor para prevenir a metástase em pacientes com câncer¹¹¹.

Neste contexto, também destacam-se os fatores FGF-2 e IGF-1. O FGF-2 controla uma variedade de processos celulares em diferentes cenários, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência e motilidade celulares. A expressão para FGF-2 foi encontrada no CaP, bem como em outras neoplasias malignas incluindo melanoma, astrocitoma, e carcinomas da mama, pulmão, bexiga, pâncreas e cabeça e pescoço. Também, FGF-2 desempenha papel crucial no desenvolvimento do câncer, servindo como fator indutor da angiogênese¹¹². Diversos estudos demonstraram que o FGF-2 foi expresso em níveis aumentados no CaP, sendo que tais níveis foram associados com a doença clinicamente mais agressiva¹¹³.

Com relação ao IGF, este atua como mitógeno em uma variedade de células e exerce sua ação aumentando a síntese de DNA, acelerando a progressão do ciclo celular e bloqueando a via apoptótica¹¹⁴. Suas ações são mediadas pelo receptor IGFR-1, sendo esse o único receptor de IGF expresso na glândula prostática, tanto em células epiteliais quanto estromais^{92,115}. Na próstata, o IGF-1 é produzido pelas células estromais e atua como fator de crescimento parácrino no epitélio prostático normal⁹². Os IGFs circulam associados a proteínas específicas (IGFBPs), as quais se ligam a eles com alta afinidade, sendo a IGFBP-3 a que possui maior capacidade carreadora e maior afinidade pelo IGF-1. Além disso, tem sido proposto que a IGFBP-3 tem efeitos independentes de seu ligante nas células epiteliais, estimulando a apoptose e suprimindo os efeitos mitogênicos do IGF-1¹¹⁵. Para que o IGF-1 possa ligar-se aos receptores e exercer suas atividades biológicas, as IGFBPs precisam ser clivadas de forma a alterar sua afinidade pelo IGF-1, permitindo a interação do mesmo com o receptor. Entre as proteínas que realizam essa clivagem, pode-se citar o antígeno específico da próstata (PSA)¹¹⁵. Além disso, outros fatores podem alterar a afinidade das IGFBPs pelo ligante, como por exemplo sua adesão à superfície da célula ou à matriz extracelular¹¹⁶. Assim, as IGFBPs possuem múltiplas funções que são essenciais para regular as atividades biológicas dos IGFs, podendo transportá-los, protegê-los da degradação e regular sua interação com o IGF-1R¹¹⁵.

A transformação neoplásica consiste em um processo multicausal no qual os controles normais da proliferação celular e da interação célula-célula são perdidos. A ativação aberrante dos proto-oncogenes em conjunto com a inibição não-regulada dos genes supressores tumorais representam os fundamentos desse processo¹¹⁷. Um conjunto de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação é responsável pelo estabelecimento do câncer, de modo que uma simples modificação numa célula normal raramente é suficiente para deflagrar o processo carcinogênico¹¹⁷. Todavia, a alteração de alguns genes com papel central em múltiplos canais regulatórios revela o potencial impacto de uma única desordem molecular para a promoção da neoplasia. Nesse contexto, destaca-se o proto-oncogene *C-MYC*. O papel do gene *C-MYC* no câncer foi inicialmente apontado por *Varmus & Bishop*, ganhadores do prêmio Nobel em 1989. Entretanto, tudo começou em 1911, quando *Peyton Rous* evidenciou que um sarcoma típico de aves poderia ser transmitido através de extratos tumorais não-celulares, sugerindo que vírus poderiam ser os possíveis agentes etiológicos dessas neoplasias¹¹⁸. Baseado nesse trabalho, Sheiness & Bishop, estudando um subgrupo de retrovírus causadores da mielocitomatose em aves, identificaram o oncogene *v-Myc* (*viral avian myelocytomatosis*)¹¹⁹. Subseqüentemente, o gene *C-MYC* (*cellmyelocytomatosis*) foi identificado como o homólogo celular desse oncogene retroviral, sendo sua superexpressão demonstrada em vários tumores humanos e animais¹²⁰.

O gene *C-MYC* está localizado na região cromossômica 8q24.1, compreendendo três exons, cujos produtos (p64 e p67) consistem em fosfoproteínas nucleares altamente conservadas¹²¹. A proteína *C-MYC* também é descrita como capaz de ativar os promotores de enzimas glicolíticas frente aos sinais de hipóxia tecidual. Nos tumores, a vascularização escassa e o alto perfil proliferativo resultam em um *status* hipóxico (conhecido como efeito *Warburg*) capaz de induzir a expressão do *C-MYC*, que atua promovendo o reforço energético através da glicólise¹²². Nessa perspectiva, surge a hipótese que *C-MYC* possa atuar adicionalmente na supressão de fatores antiangiogênicos, como a trombospondina, ativando a angiogênese na tentativa de contrapor a hipóxia e promover o suprimento metabólico exigido pela neoplasia¹²².

Embora a ligação entre *C-MYC* e câncer esteja bem estabelecida, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os mecanismos moleculares que promovem a transformação maligna mediada pelo *C-MYC* não são completamente conhecidos

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As interações entre as células estromais e as epiteliais são fundamentais para os mecanismos de desenvolvimento e diferenciação da glândula prostática. Contudo, a contribuição do estroma para a progressão do CaP ainda é pouco conhecida. O estroma tumoral apresenta uma constituição diferente da encontrada no estroma normal, fato que pode afetar as sinalizações da célula epitelial. As células neoplásicas podem alterar seu componente estromal adjacente para formar um ambiente que possibilita e suporta a progressão tumoral. A modificação desse estroma, denominado de estroma “reativo”, é uma característica de muitos tumores sólidos, incluindo o prostático.

A caracterização do estroma reativo na próstata é avaliada através de exames morfológicos baseados na coloração de Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson, o que traz pouca informação sobre a resposta tumoral na progressão do CaP. Assim, fica evidente a necessidade de aprofundar os estudos acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na formação do estroma reativo, bem como na elucidação do papel funcional desse estroma na progressão do CaP.

Ainda, as relações entre os hormônios sexuais esteróides e seus receptores com os fatores de crescimento e metaloproteinases da matriz são cruciais reguladores da homeostase prostática, sendo fundamental o entendimento dessas relações com o desenvolvimento do estroma reativo e progressão do CaP.

É importante destacar que, em diferentes tipos de cânceres uma população muito pequena de células tem sido reconhecida como células-tronco cancerosas, por apresentarem capacidade de auto-renovação e diferenciação. Muitos pesquisadores acreditam que os cânceres podem se originar de células-tronco cancerosas. Isto posto, ainda não há estudos que demonstraram a relação dessas células com o desenvolvimento do estroma reativo.

Assim, considerando os aspectos supracitados, os objetivos principais do presente estudo foram caracterizar morfológica e molecularmente o microambiente do estroma reativo em amostras com adenocarcinoma de próstata, bem como encontrar alguma associação dos fatores de crescimento, metaloproteinases da matriz, receptores de hormônios sexuais esteróides e células-tronco cancerosas na sua patogênese. Além disso, verificou-se a relevância da reatividade estromal e de seus marcadores moleculares na progressão do câncer de próstata.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras Humanas e Análises Histopatológicas do Estroma Reativo

O presente trabalho baseou-se em estudo retrospectivo, o qual utilizou 40 amostras prostáticas de pacientes, na faixa etária de 60 a 80 anos (média de 71 anos), com diagnóstico de adenocarcinoma prostático submetidos à prostatectomia radical retropúbica. As amostras utilizadas foram provenientes do acervo do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As amostras prostáticas foram coletadas da região periférica ^{5, 123}. (**Figura 5**) baseando-se na divisão da face posterior, orientados de basal para apical do órgão (**Figura 6**) .



Figura 5: Esquema da subdivisão externa da glândula prostática. PZ= zona periférica, CZ= zona central ^{5, 123}.

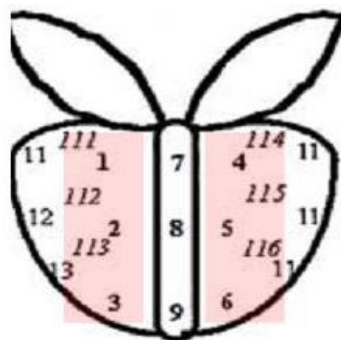


Figura 6: Esquema da vista posterior da localização de retirada de amostras prostáticas. Os números 1, 2, 3 e 4, 5, 6 correspondem aos fragmentos coletados da zona periférica, sentido basal para apical da próstata (modificado *De La Taille* ¹²⁴).

As amostras prostáticas foram fixadas por imersão em formaldeído tamponado 10% por doze horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em parafina. Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo *Leica RM 2165* (*Leica, Munique, Alemanha*) com espessura de 5 micrômetros, corados com Hematoxilina-Eosina (**Figuras 6a e 6c**) e fotografados no fotomicroscópio *Leica DM2500* (*Leica, Munique, Alemanha*) equipado com a câmera *DFC295* (*Leica, Munique, Alemanha*). O diagnóstico de CaP foi baseado em critérios morfológicos e classificados de acordo com o sistema de escala *Gleason* por um patologista sênior (*Prof. Dr. Athanase Billis*).

Para as análises do estroma reativo, as amostras prostáticas foram divididas em 2 grupos (20 amostras por grupo): **Grupo 1:** amostras de CaP sem estroma reativo (Grau 0); **Grupo 2:** amostras de CaP com intensa reatividade estromal (Grau 3).

A reatividade estromal foi determinada no Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia do Instituto de Biologia/ UNICAMP, o qual utilizou a coloração de Tricrômico de Masson. Através dessa técnica, o estroma é corado em vermelho para as fibras musculares lisas e em verde para as fibras colágenas (**Figuras 7b e 7d**). O estroma normal apresenta alta composição de fibras musculares lisas, sendo que o estroma reativo adjacente ao tumor apresenta alta composição de fibras colágenas e diminuição das fibras musculares lisas (**Figuras 7b e 7d**). A intensidade do

estroma reativo foi avaliada através da quantidade (em porcentagem) de fibras musculares lisas (coradas em vermelho pelo Tricrômico de Masson) adjacentes às áreas neoplásicas para cada amostra com aumento de x400. As imagens foram capturadas pelo fotomicroscópio *Leica DM2500* (*Leica, Munique, Alemanha*) equipado com a câmera *DFC295* (*Leica, Munique, Alemanha*) e analisadas através do programa de análise de imagens *LAS V3.7* (*Leica, Munique, Alemanha*). A porcentagem de fibras musculares lisas adjacentes às áreas neoplásicas foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como **0**: >50% de fibras musculares lisas adjacentes aos ácinos neoplásicos; **1**: 36-50% de fibras musculares lisas adjacentes aos ácinos neoplásicos; **2**: 15-35% de fibras musculares lisas adjacentes aos ácinos neoplásicos; **3**: 0 - 14% de fibras musculares lisas adjacentes aos ácinos neoplásicos^{99,125}.

Posteriormente, as amostras dos Grupos 1 e 2 foram submetidas às análises histopatológicas e imunohistoquímicas.

A permissão ética foi obtida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/ UNICAMP (número 0094.0146.000-08).

3.2. Imunomarcção dos Antígenos: α -actina, Vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2, C-Myc, PSCA, AR, ER α e ER β

Amostras prostáticas de todos os pacientes (n=40), as mesmas utilizadas para as análises histopatológicas, foram utilizadas para as imunomarcações. A seguir serão obtidos cortes com 5 μ m de espessura no micrótomo rotativo *Leica RM 2165* (*Leica, Munique, Alemanha*), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas em potência média. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos α -actina, Vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2, C-Myc, PSCA, AR, ER α e ER β foram localizados através dos anticorpos primários específicos (**Tabela 1**), diluídos em BSA (soro albumina bovino) 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O *kit MACH 4 Universal HRP-Polymer* (*Biocare Medical, EUA*) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP (*horseradish peroxidase*) conjugado proveniente do *kit MACH 4* por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e

avaliados no fotomicroscópio *Leica DM2500* (*Leica, Munique, Alemanha*) equipado com a câmera *DFC295* (*Leica, Munique, Alemanha*).

Para avaliar a intensidade das imunorreatividades dos antígenos, a porcentagem de células epiteliais e/ou estromais positivas foi examinada em dez campos para cada anticorpo com aumento de 400x. A intensidade da marcação foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células epiteliais e/ou estromais positivas¹⁵⁷.

Tabela 1: Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcação.

<i>Anticorpos Primários</i>	<i>Espécie hospedeira</i>	<i>Código</i>	<i>Fonte</i>
α -actina	Camundongo (monoclonal)	sc-32251	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
Vimentina	Camundongo(monoclonal)	ab8069	<i>abcam, EUA</i>
IGF-1	Coelho (policlonal)	sc-720	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
MMP-2	Camundongo (monoclonal)	ab86607	<i>abcam, EUA</i>
FGF-2	Coelho (policlonal)	sc-79	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
C-Myc	Coelho (policlonal)	ab32072	<i>abcam, EUA</i>
PSCA	Coelho (policlonal)	251249	<i>Abbiotec, EUA</i>
AR	Coelho (policlonal)	ab74272	<i>abcam, EUA</i>
ER α	Coelho (policlonal)	04-227	<i>Merck-Millipore, EUA</i>
ER β	Camundongo (monoclonal)	ab16813	<i>abcam, EUA</i>

3.3. Análises Estatísticas

As análises histopatológicas e as imunohistoquímicas para os diferentes antígenos foram avaliadas através do teste de proporção. Para essas análises, erro tipo-I de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Análises Histopatológicas do Estroma Reativo

O estroma sem reação desmoplásica (Grupo 1) foi caracterizado por grande quantidade de fibras musculares lisas, em mais de 50,0% dos ácinos adjacentes, além de delgadas fibras colágenas entremeadas às fibras musculares lisas (**Figuras 7a e 7b**).

Com relação ao estroma com intensa reação desmoplásica (Grupo 2), este foi caracterizado pelo aumento e espessamento das fibras colágenas, além da intensa redução (inferior a 14,0%) das fibras musculares lisas (**Figuras 7c e 7d**).

O grau histológico (*Gleason*) mais comum observado nos adenocarcinomas prostáticos foi o 6 (3+3), seguido dos *Gleasons* 7 (3+4) e (4+3) (**Tabela 2**). O estroma sem reação desmoplásica (Grupo 1) foi significativamente mais frequente nos *Gleasons* 4 (2+2), 5 (3+2) e 6 (3+3) (**Tabela 2**), sendo ausente nos tumores de alto grau (*Gleason* 7, 4+3) (**Tabela 2**).

O estroma com intensa reatividade desmoplásica foi significativamente mais frequente nos tumores de graus intermediário (*Gleason* 7, 3+4) e alto (*Gleason* 7, 4+3), sendo que nos tumores de baixo grau foi encontrado somente em 3 casos com *Gleason* 6 (3+3) (**Tabela 2**).

Tabela 2:Distribuição da escala de *Gleason* e reatividade estromal nos adenocarcinomas prostáticos sem reatividade estromal (Grupo 1) e com intensa reatividade estromal (Grupo 2).

*Significância estatística (teste de proporção, $P<0,0001$)

<i>Escala de Gleason</i>	<i>Número de Casos (%)</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>
<i>Gleason 4 (2+2)</i>	1 (2,5%)	1 (100,0%)*	0 (0,0%)
<i>Gleason 5 (3+2)</i>	2 (5,0%)	2 (100,0%)*	0 (0,0%)
<i>Gleason 6 (3+3)</i>	19 (47,5%)	16 (84,2%)*	3 (15,8%)
<i>Gleason 7 (3+4)</i>	10 (25,0%)	1 (10,0%)	9 (90,0%)*
<i>Gleason 7 (4+3)</i>	8 (20,0%)	0 (0,0%)	8 (100,0%)*
<i>Total</i>	<i>40 (100,0%)</i>	<i>20 (50,0%)</i>	<i>20 (50,0%)</i>

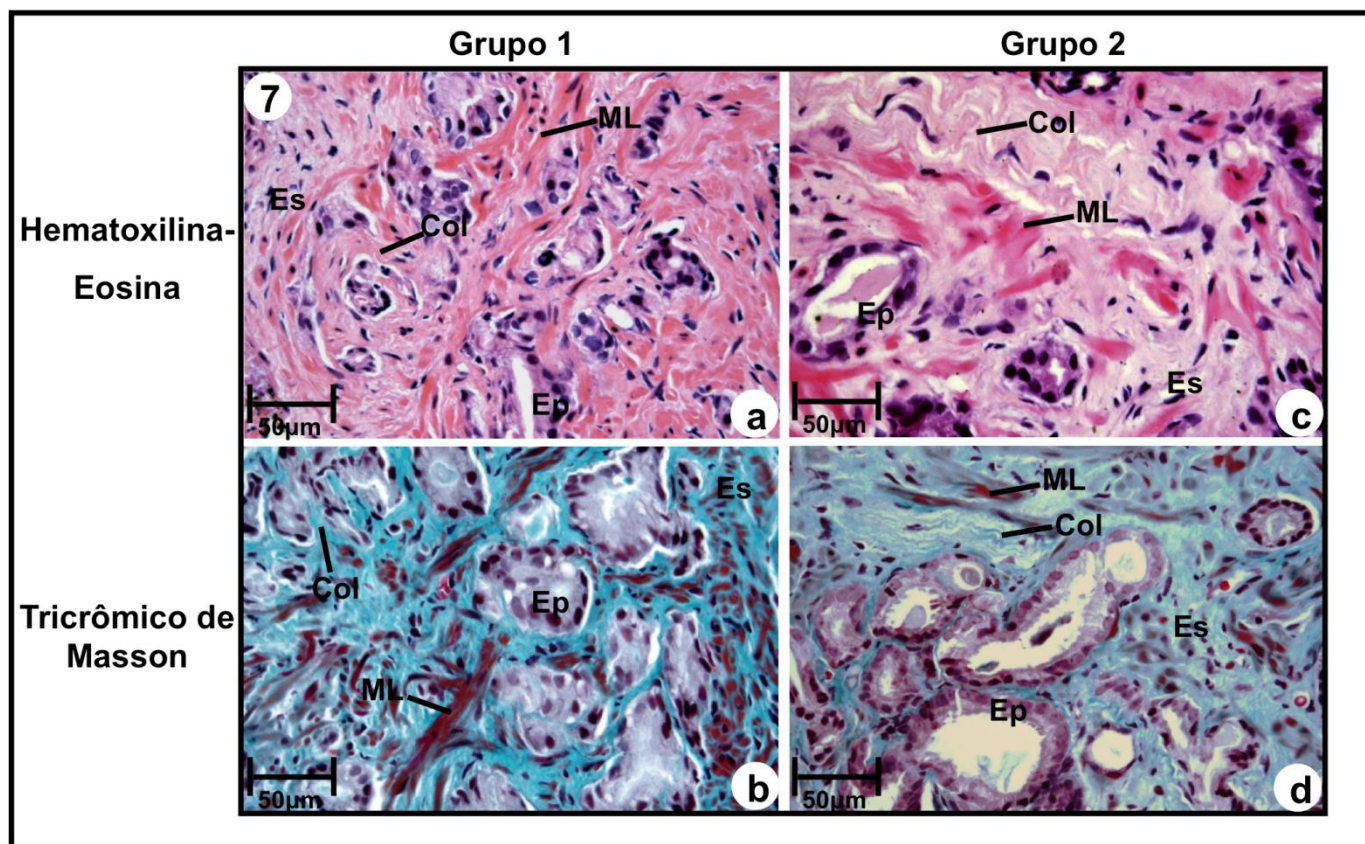


Figura 7: Fotomicrografias da zona periférica prostática dos grupos 1 (a, b) e 2 (c, d). (a) e (b) Estroma sem reação desmoplásica constituído por abundantes fibras musculares lisas (**ML**) e delgadas fibras colágenas (**Col**) subjacentes aos ácinos prostáticos; Colorações: Hematoxilina-Eosina (a) e Tricrômico de Masson (b). (c) e (d) Estroma com intensa reatividade desmoplásica constituído por espessas e abundantes fibras colágenas (**Col**) e escassas fibras musculares lisas (**ML**); Colorações: Hematoxilina-Eosina (c) e Tricrômico de Masson (d). **a – d:Ep** – epitélio secretor, **Es** – estroma.

4.2. Imunomarcacão dos Antígenos: α -actina, Vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2, C-Myc, PSCA, AR, ER α e ER β

A imunorreatividade para α -actina foi significativamente mais intensa nas células musculares lisas das amostras do Grupo 1 em relação ao Grupo 2, o qual apresentou moderada imunomarcacão (**Figuras 8a e 8f; Tabela 3**). Em contraste, a imunorreatividade para vimentina foi significativamente mais intensa nos miofibroblastos do Grupo 2 quando comparada ao Grupo 1, o qual apresentou moderada imunorreatividade (**Figuras 8b e 8g; Tabela 3**).

As imunorreatividades para IGF-1, MMP-2 e FGF-2 foram significativamente intensas tanto no epitélio quanto no estroma das amostras do Grupo 2 em relação ao Grupo 1, o qual apresentou moderada reatividade (**Figuras 8c, 8d, 8e, 8h, 8i e 8j; Tabela 3**).

A imunorreatividade para C-Myc foi significativamente mais intensa tanto no epitélio quanto no estroma das amostras do Grupo 2, enquanto que o Grupo 1 apresentou moderada imunorreatividade para esse antígeno (**Figuras 9a e 9f; Tabela 3**). Similarmente a imunorreatividade para o antígeno das células-tronco prostáticas cancerosas (PSCA) ocorreu tanto no compartimento epitelial quanto no estromal, sendo significativamente mais intensa nas amostras do Grupo 2 em relação ao Grupo 1, o qual apresentou moderada imunorreatividade (**Figuras 9b e 9g; Tabela 3**).

A imunorreatividade para AR foi moderada tanto no epitélio quanto no estroma das amostras do Grupo 2, enquanto que o Grupo 1 apresentou fraca imunorreatividade (**Figuras 9c e 9h; Tabela 3**). A imunorreatividade para ER α foi predominante no compartimento estromal de ambos os Grupos, sendo intensa no Grupo 2 e moderada no Grupo 1 (**Figuras 9d e 9i; Tabela 3**).

Em contraste, a imunorreatividade para ER β foi predominante no compartimento epitelial de ambos os Grupos, sendo que a imunomarcacão estromal foi presente apenas no Grupo 2 (**Figuras 9e e 9j**). A imunorreatividade para esse receptor hormonal foi moderada no Grupo 1 e fraca no Grupo 2 (**Figuras 9e e 9j; Tabela 3**).

Tabela 3: Intensidade da imunomarcaco dos diferentes antígenos nas células epiteliais e estromais dos adenocarcinomas prostáticos sem reatividade estromal (Grupo 1) e com intensa reatividade estromal (Grupo 2).

<i>Antígenos</i>	<i>Grupo 1 (n=20)</i>	<i>Grupo 2 (n=20)</i>
α -actina	3 (80,3%)*	2 (69,0%)
Vimentina	2 (61,4%)	3 (92,4%)*
IGF-1	2 (57,6%)	3 (96,8%)*
MMP-2	2 (67,3%)	3 (89,7%)*
FGF-2	2 (62,7%)	3 (91,5%)*
C-Myc	2 (65,5%)	3 (93,3%)*
PSCA	2 (56,5%)	3 (85,8%)*
AR	1 (30,9%)	2 (59,5%)*
ER α	2 (39,7%)	3 (77,9%)*
ER β	2 (38,6%)*	1 (26,5%)

0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células epiteliais e/ou estromais positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células epiteliais e/ou estromais positivas.

*Significância estatística (teste de proporção, $P<0,0001$)

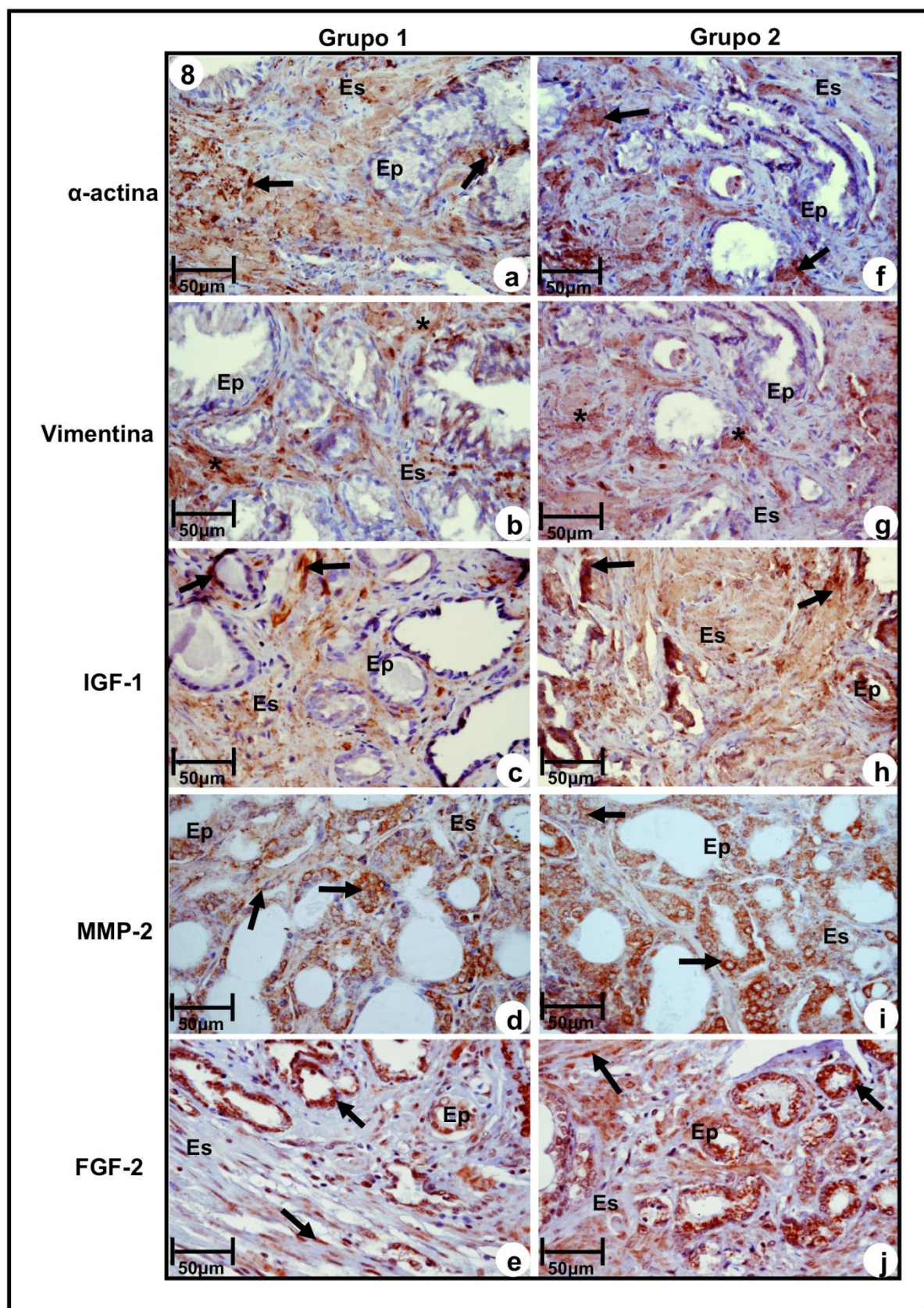


Figura 8: Imunomarcacão dos antígenos α-actina, Vimentina, IGF-1, MMP-2 e FGF-2 na zona periférica prostática dos Grupos 1 (a, b, c, d, e) e 2 (f, g, h, i, j). (a) e (f) Imunorreatividade para α-actina (**setas**). (b) e (g) Imunorreatividade para Vimentina

(**asteriscos**) nos miofibroblastos. (c) e (h) Imunorreatividade para IGF-1 (**setas**) nos compartimentos epitelial e estromal. (d) e (i) Imunorreatividade para MMP-2 (**setas**) nos compartimentos epitelial e estromal. (e) e (j) Imunorreatividade para FGF-2 (**setas**) nas células do epitélio secretor e fibroblastos do compartimento estromal. Em **a – j**, **Ep** – epitélio secretor, **Es** – estroma.

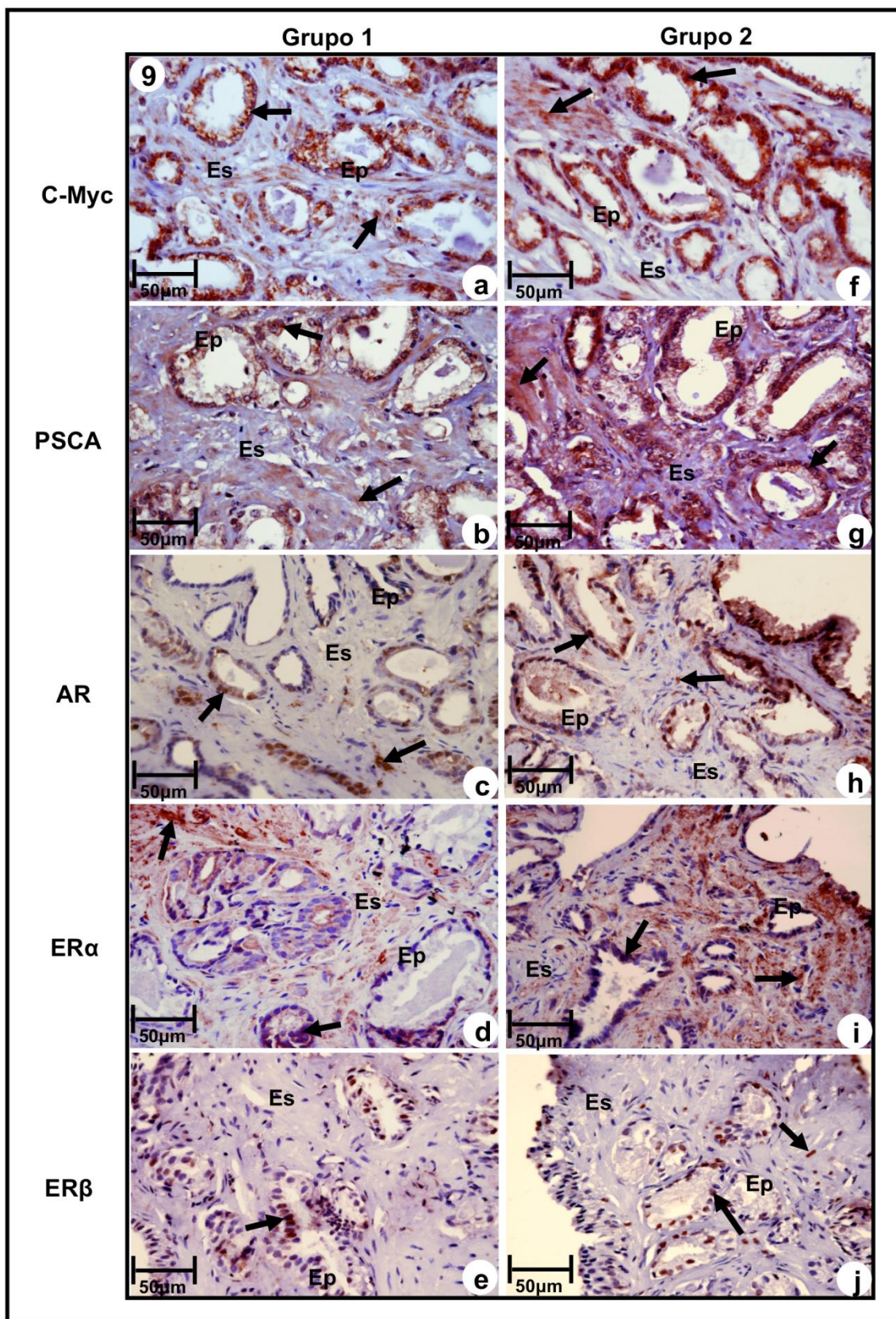


Figura 9: Imunomarcacão dos antígenos C-Myc, PSCA, AR, ER α e ER β na zona periférica prostática dos Grupos 1 (a, b, c, d, e) e 2 (f, g, h, i, j). (a) e (f) Imunorreatividade para C-MyC (**setas**) nos compartimentos epitelial e estromal. (b) e (g)

Imunorreatividade para PSCA (**setas**) nos compartimentos epitelial e estromal. (c) e (h)
Imunorreatividade para AR (**setas**) nos compartimentos epitelial e estromal. (d) e (i)
Imunorreatividade para ER α (**setas**) nos compartimentos epitelial e estromal. (e) e (j)
Imunorreatividade para ER β (**setas**) nos compartimentos epitelial e estromal. Em **a – j**,
Ep – epitélio secretor, **Es** – estroma.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta uma nova abordagem para o diagnóstico do CaP. Os nossos resultados demonstraram que o estroma reativo (EstR) pode ser considerado um marcador informativo da progressão do CaP. Ainda, este estudo caracterizou os marcadores moleculares envolvidos tanto na patogênese do EstR quanto na progressão do CaP.

No presente estudo, o EstR foi caracterizado morfollogicamente pela significativa diminuição das fibras musculares lisas e pela abundante quantidade de fibras colágenas no estroma adjacente aos ácinos neoplásicos. Intensa reatividade estromal foi verificada nos tumores de graus intermediário (*Gleason* 7, 3+4) e alto (*Gleason* 7, 4+3), sendo que nos tumores de baixo grau foi encontrada em apenas 3 casos com *Gleason* 6 (3+3), indicando que o EstR pode ser considerado um marcador preditivo da progressão tumoral.

Com relação à caracterização molecular do EstR, os presentes resultados demonstraram imunorreatividades aumentadas para vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2 e C-Myc nas amostras com intensa reatividade estromal quando comparadas às amostras sem reatividade estromal, sugerindo que tais marcadores moleculares foram fundamentais para a ativação do EstR e tornaram o microambiente prostático favorável à progressão do câncer, devido a potencialização do desequilíbrio da interação epitélio-estroma.

A interação epitélio-estroma tem papel primordial na manutenção da estrutura e funcionamento da glândula prostática ¹²⁶. Baseando-se em aspectos morfológicos, funcionais e embriológicos, esta interação pode ser considerada como única unidade funcional ^{127,128}. O desequilíbrio da interação epitélio-estroma na glândula prostática favorece a formação do carcinoma prostático ⁴³. As células estromais associadas às células tumorais respondem aos andrógenos e fatores de crescimento levando a interrupção da homeostase epitélio-estroma, o que desencadeia processos de crescimento, migração, angiogênese, apoptose e metástases tumorais ^{43,96,73,129}.

O estroma prostático tem sido considerado compartimento primordial no funcionamento da glândula devido ao seu papel na manutenção da homeostase da próstata e pelo seu envolvimento morfofisiológico em lesões como a HBP e o CaP ^{130,131}. As modificações do microambiente estromal, composto por células e MEC, são os passos iniciais no desenvolvimento do CaP ⁴³. Essa ativação tem sido descrita como

EstR e consiste em elevada produção da MEC, especialmente do colágeno, fatores de crescimento e reorganização dos componentes estromais criando um microambiente favorável ao crescimento do tumor^{97,98}.

Diversos estudos demonstraram que o EstR está associado com menor tempo de sobrevida livre de doença. *Yanagisawa et al.*¹²⁵ analisaram biópsias prostáticas de 205 pacientes e verificaram diferença significativa entre os EstR de baixa e alta reatividades, concluindo que a intensidade do EstR pode ser considerado um fator prognóstico independente da recorrência bioquímica. Também, *Ayala et al.*⁹⁹ analisando amostras provenientes de prostatectomia radical e *Billis et al.*¹³² analisando 266 biópsias prostáticas por agulha demonstraram que o EstR somente pode ser considerado como fator prognóstico independente da recorrência bioquímica quando este apresentar intensa reatividade estromal. Ainda, o EstR com intensa reatividade estromal foi encontrado nos estudos de *Ayala et al.*⁹⁹, *Yanagisawa et al.*¹²⁵ e *Billis et al.*¹³² em 8,0%, 6,7% e 5,3% das amostras prostáticas respectivamente, constatando-se frequências muito similares entre os três trabalhos. Contudo, as frequências de EstR com baixa reatividade estromal foram muito distintas entre esses trabalhos, sendo de 6,25% no trabalho de *Ayala et al.*, 0,5% no trabalho de *Yanagisawa et al.* e 53,8% no trabalho de *Billis et al.*, refletindo a falta de um critério mais uniforme, além do morfológico, para caracterizar o EstR.

Os marcadores moleculares como α -actina e vimentina são marcadores de fibras musculares lisas, miofibroblastos/ fibroblastos, respectivamente³³. *Tuxhorn et al.*⁹⁸ mostraram que o compartimento estromal reativo é composto de fibroblastos e mais de 50% de miofibroblastos, um fenótipo de célula estromal ativada que não é observado no estroma prostático normal. O miofibroblasto é descrito como um intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, conforme a expressão de proteína do citoesqueleto e aspectos estruturais¹⁰⁶. Fibroblastos no tecido lesado alteram seu fenótipo para o de miofibroblasto, o qual é caracterizado pela expressão da vimentina e α -actina³³. De acordo com *Salvatori et al.*¹³³, tumores prostáticos com alto grau de indiferenciação apresentaram elevada expressão de vimentina, sendo que altos níveis de vimentina podem ser correlacionados à capacidade invasiva das células neoplásicas. Também, *Salvatori et al.*¹³³ demonstraram que a redução da expressão de vimentina levou à redução da motilidade celular. Ainda, a inibição da vimentina reduziu significativamente o crescimento tumoral de uma linhagem celular prostática altamente

tumorigênica e metastática ¹³¹. *Tomas et al.* ¹³⁴ verificaram em pacientes submetidos à prostatectomia radical o valor prognóstico da vimentina e demonstraram que esse marcador foi preditor significativo de recorrência bioquímica.

Hayward et al. ¹³⁵ sugeriram que a sinalização anormal da interação célula muscular-epitélio durante a carcinogênese prostática pode levar a desdiferenciação da célula muscular lisa. Dessa forma, o EstR parece ser induzido nos estágios iniciais da tumorigênese, podendo estar envolvido com a progressão do CaP através da substituição do estroma fibromuscular normal ⁹⁸. Células com fenótipo de miofibroblastos aumentaram a expressão de vimentina e diminuíram a expressão de marcadores que identificaram células musculares lisas como a α -actina ⁹⁸.

Os FGFs estão conectados à MEC e uma variedade de proteases podem liberá-los da matriz extracelular. O FGF-2 age como agente mitogênico para as células estromais prostáticas e seu efeito se dá principalmente de maneira autócrina, além de contribuir para a angiogênese. Tem sido postulado que a expressão desse mitógeno é parcialmente regulada pelo AR. Embora a sinalização de AR e FGF seja importante no desenvolvimento prostático, seu exato mecanismo de interação ainda não é conhecido ¹³⁶. *Kwabi-Addo et al.* ¹³⁷ demonstraram que se as células neoplásicas requerem atuação do FGF para sobreviverem, deve haver um processo de seleção de células que têm alterações genéticas e epigenéticas que potencializem a sinalização para FGF. Baseado nessas observações, a ruptura da sinalização do FGF tem sido alvo terapêutico no CaP. Ainda, vale ressaltar que alguns tumores dependem do desequilíbrio na sinalização do FGF para o seu desenvolvimento e progressão ¹³⁸.

A MEC é o maior substrato para as metaloproteinases (MMPs), sendo essas de grande importância na mediação da função celular ¹³⁹. A sinalização parácrina entre as células estromais e células tumorais é crucial para a regulação da expressão das MMPs, as quais podem contribuir em vários estágios da progressão tumoral ¹⁴⁰. Segundo *Martin & Matrisian* ¹⁴⁰ as MMPs podem favorecer o crescimento tumoral através de forma direta ou indiretamente, sinalizando fatores de crescimento como o IGF. Além do papel na degradação da MEC, as MMPs estão envolvidas na liberação do IGF e dos seus ligantes inibitórios de crescimento (IGFBPs).

A expressão das MMPs tem sido caracterizada como baixa ou não-detectável na maioria dos tecidos benignos, mas é substancialmente aumentada nas malignescências humanas. Análises de tumores primários e metastáticos têm mostrado aumento relativo

da expressão das MMPs nos sítios metastáticos, indicando seu papel na migração tumoral ¹⁴¹. Níveis aumentados de MMPs têm sido relacionados ao desenvolvimento do CaP. Também, outros autores indicaram que as sinalizações ocorridas entre células tumorais e seu microambiente podem estimular a expressão das MMPs, sendo que essas tanto estariam contribuindo para a invasão tumoral como para a ocorrência de metástases através de diferentes mecanismos ^{139,142}. A MMP tem sido indicada para a ruptura da laminina, levando à motilidade celular pela exposição do sítio pró-migratório oculto ¹³⁹. Também, outros autores indicaram que o fragmento clivado da laminina é encontrado em áreas de remodelação tumoral, sugerindo outro mecanismo pelo qual as MMPs podem promover migração e invasão celular ¹³⁹.

IGF-1 e IGFR-1 apresentam tendência a aumentar com a idade na presença ou na ausência de hiperplasia, nas displasias e no CaP ⁹². Contudo, esses parecem ser os maiores estímulos para proliferação estromal, contudo há evidências que através deste caminho ocorre a inibição da apoptose. O IGF-1 está envolvido na estimulação ou ativação do receptor androgênico, levando à produção do antígeno específico da próstata (PSA). O PSA leva a clivagem da molécula IGFBP, a qual regula a interação de IGF-1 com IGFR-1, causando o aumento de IGF-1 livre, induzindo a resistência a apoptose nas células cancerosas, o aumento da mitose e da produção de PSA.

As vias de sinalização celular reguladas pelo gene C-Myc são importantes na carcinogênese de muitos órgãos. Ainda, não há relatos do envolvimento do C-Myc na patogênese do estroma reativo na próstata. A proteína C-MYC também apresenta importante papel na diferenciação celular. Demonstrou-se que a baixa expressão de C-MYC é acompanhada de diferenciação precoce e parada permanente da ciclagem celular ¹⁴³. Por outro lado, a expressão ectópica de CMYC é suficiente para bloquear os mecanismos de diferenciação celular ¹⁴⁴. Muitos genes envolvidos na morte celular programada, como o p53, p21 e BAX contêm regiões responsivas à C-MYC em seus promotores ¹⁴⁵. Entre as possíveis vias pró-apoptóticas mediadas pelo C-MYC destaca-se a ativação do p19arf que, em associação com a proteína Ras, atua reprimindo o MDM-2 (regulador negativo do p53), induzindo a disponibilização de p53 e, assim, desencadeando a promoção dos mecanismos apoptóticos.

Recentes pesquisas sugerem que superexpressão de C-MYC resultaria no aumento da expressão de genes codificadores de proteínas ribossomais que, por sua vez, contribuiriam para o crescimento celular ¹⁴⁶. A proteína C-MYC também é descrita

como capaz de ativar os promotores de enzimas glicolíticas frente aos sinais de hipóxia tecidual. Nos tumores, a escassa vascularização e o alto perfil proliferativo resultam em hipóxia, a qual é capaz de induzir a expressão do C-MYC, que atua promovendo o reforço energético através da glicólise ¹²². Nessa perspectiva, cogita-se que C-MYC possa atuar adicionalmente na supressão de fatores antiangiogênicos, como a trombospondina, ativando a angiogênese na tentativa de contrapor a hipóxia e promover o suprimento metabólico exigido pela neoplasia.

Com relação ao envolvimento dos receptores de hormônios sexuais esteróides no desenvolvimento do EstR e na sinalização da interação epitélio-estroma, os presentes resultados demonstraram imunorreatividades aumentadas do AR e ER α nas amostras prostáticas com intensa reatividade estromal, demonstrando o envolvimento desses receptores tanto na sinalização para o aumento dos fatores de crescimento e metaloproteinases da matriz quanto nos mecanismos de ativação do EstR, acarretando na formação de um microambiente favorável para a progressão tumoral. Em contraste, a imunorreatividade para o ER β foi aumentada nas amostras sem reatividade estromal, inferindo o papel inibitório desse receptor nos mecanismos de ativação do EstR.

O balanço entre os níveis circulantes de andrógenos e estrógenos mudam significativamente com o avançar da idade ¹⁴⁷. Os níveis plasmáticos androgênicos declinam enquanto os estrogênicos se mantêm constantes, sugerindo que os estrógenos também podem ter papel na carcinogênese prostática. A biossíntese estrogênica local pode ocorrer via aromatização dos andrógenos, sendo que a enzima aromatase pode agir como um regulador do balanço entre andrógenos e estrógenos tanto em nível tecidual quanto em nível plasmático ¹⁴⁸. Alguns autores demonstraram que animais tratados com andrógenos e estrógenos apontaram reserva estrogênica na próstata, levando eventualmente, ao desenvolvimento de displasia epitelial e adenocarcinoma. Já animais *knockout* para aromatase, expostos a doses elevadas de andrógenos, apresentaram hiperplasia prostática, embora mudanças malignas não foram detectadas ^{149,150}. Segundo *Ockrin* ¹⁵¹, os estrógenos podem regular o crescimento da célula tumoral prostática e até mesmo as células que se tornam andrógeno-resistentes, conforme resposta à administração sistêmica de estrógenos caracterizada em pacientes com câncer prostático que apresentaram metástases e doenças independentes de hormônio.

A HBP tem sido verificada em animais ER β *knockout*, porém tal lesão não foi caracterizada em camundongos knockout para ER α ⁵⁰. Tal evidência sugeriu que o ER β tem papel protetor para a ocorrência da proliferação anormal das células epiteliais prostáticas e sua ausência pode indicar um passo crucial na progressão de câncer. Por outro lado, a expressão de ER β foi identificada em lesões neoplásicas de baixo grau, porém essa foi ausente nas células com displasia de alto grau. Ainda, segundo *Weihua* ⁵¹, sendo ER β predominantemente localizado nas células basais, esse fato é consistente com a depleção dessas células receptor-positivas na maioria das displasias de alto grau. Portanto, o ER β pode ser expresso nas várias fases iniciais de displasia (baixo grau), possivelmente para supressão do estímulo proliferativo, mas a falta dessa expressão pode ser requerida nas lesões com atipia citológica de alto grau, as quais estão associadas com o carcinoma invasivo. Por outro lado, observou-se que o ER β é expresso na metástase de câncer prostático, o que indicou esse receptor como marcador de fenótipo altamente maligno ⁴². Já, a ausência de ER α levou ao desenvolvimento de hipertrofia da próstata, mas não à metaplasia epitelial escamosa, indicando que esta resposta específica é ER α dependente ¹⁵⁰.

Signoretti ²⁸ demonstraram que diferentes genes expressos pelas células basais, as quais dependem de andrógenos para sobreviver, foram identificadas também em avançados adenocarcinomas andrógeno-independentes, sendo que interessante, ER β parece apresentar tal comportamento. De acordo com *Carruba* ¹⁴⁸ células tumorais podem tornar-se resistentes ao andrógeno como consequência da mutação do AR ou da alteração da sinalização androgênica, após fase inicial responsiva a hormônio. Ainda, a ausência de ER β pode levar ao padrão estrógeno-sensitivo da célula, no qual o crescimento das células cancerosas é estimulado pelo estrógeno que é produzido localmente pela aromatase, agindo via ER α . Já *Latil* ¹⁵² indicaram que a super-expressão de AR pode estar envolvida no processo que leva a independência androgênica dos tumores prostáticos e, anormalidades na expressão ER α/β podem modular o crescimento da resposta do câncer à independência hormonal.

Ainda, no presente estudo foi feita uma importante relação entre o desenvolvimento do EstR e a ocorrência de células-tronco prostáticas cancerosas. Tais células ocorreram tanto nas amostras prostáticas sem reatividade estromal quanto nas amostras com intensa reatividade estromal, porém estas ocorreram com maior frequência no estroma com intensa reatividade estromal. Assim, a ocorrência de

células-tronco prostáticas cancerosas indicou uma importante sinalização para o desenvolvimento do EstR e progressão do CaP.

A resposta à manipulação hormonal, especialmente na ausência de andrógenos, foi reconhecida como prova da existência das CTP. A capacidade regenerativa tem sido atribuída a uma população de células de longa vida, as quais são designadas como células-tronco, que se localizam no epitélio prostático e são independentes de andrógeno para a sua sobrevivência, mas andrógeno-sensíveis e andrógeno-responsivas⁸³. Além disso, o processo de apoptose ocorre principalmente nas células luminais epiteliais andrógeno-dependentes, sendo que as células basais andrógeno-independentes permanecem inalteradas, provocando mudança na relação células luminais/basais¹⁵³. No entanto, as células basais remanescentes, após a castração, são sensíveis aos andrógenos, de tal forma que a reposição de andrógenos leva à proliferação e regeneração da estrutura prostática. Este processo regenerativo tem sido atribuído à proliferação e diferenciação das células tronco localizadas no compartimento basal.

A teoria da existência de células tronco é bastante recente e tem mudado com o conhecimento da biologia tumoral nas últimas décadas, especialmente no seu microambiente. A importância deste microambiente molecular é vital para se entender como sua mudança pode direcionar a diferenciação dessas células e possibilitar a carcinogênese¹⁵⁴.

Em diferentes tipos de cânceres, uma população muito pequena de células tem sido reconhecida como células-tronco cancerosas, por apresentarem capacidade de auto-renovação e diferenciação na carcinogênese¹⁵⁵. Algumas teorias postulam que os cânceres podem se originar de células-tronco cancerosas, tendo como hipótese que estas são responsáveis pela iniciação tumoral, bem como desenvolver propriedades invasivas dos tumores determinadas pela habilidade dessas células em interagir com o estroma, além de recidivas locais e metástase a distancia¹⁵⁶.

Diversos marcadores tem sido propostos para caracterizar as células-tronco cancerosas, dentre esses destaca-se o PSCA. *Dannull*⁸⁸ e *Gu*⁸⁶ demonstraram que todos os tecidos prostáticos metastáticos foram positivos para PSCA. *Ross*⁸⁷ estudaram amostras prostáticas com HBP, NIP, CaP localizado e CaP metastático e verificaram que o PSCA foi positivo em 64,0% dos tumores metastáticos e em 48,0% dos tumores localizados, e indicaram o PSCA como marcador da progressão tumoral.

Outro estudo analisou 246 amostras de prostatectomia radical e demonstrou que a reatividade do PSCA estava relacionada ao maior grau na escala de *Gleason*, invasão de vesicular seminal e comprometimento linfonodal⁸⁹.

6. CONCLUSÕES

O estroma reativo (EstR) pode ser considerado um marcador preditivo da progressão do CaP, uma vez que este foi mais frequente nos tumores de intermediário e alto graus. As imunorreatividades aumentadas para vimentina, IGF-1, MMP-2, FGF-2 e C-Myc podem tornar o microambiente prostático propício à progressão do câncer, devido a potencialização do desequilíbrio da interação epitélio-estroma.

Em contraste, a sinalização do ER β indicou papel inibitório desse receptor nos mecanismos de ativação do EstR. A ocorrência de células-tronco prostáticas cancerosas indicou um possível envolvimento dessas células na sinalização para o desenvolvimento do EstR e progressão do CaP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marker, P.C.; Donjacour, A.A.; Dahiya, R.; Cunha, G.R. Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. *Develop Biol.* 2003; v.253, p.165-174.
2. Untergasser, G.; Madersbacher, S.; Berger, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol.* 2005; v.40, p.121-128.
3. Taylor, R.A.; Risbridger, G.P. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation.* 2008; v.76, p.671-68.
4. Wendell-Smith, C. Terminology of the prostate and related structures. *Clin Anat.* 2000; v.13, pp.207-213.
5. Mcneal, J.E. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988; v.12, p.619-633.
6. Walsh, P.C.; Retik, A.B.; Vaughan, E.D.; Wein, A.J.; Campbell's Urology. 7 ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1998; p.1384-1473.
7. Blacklock, N.J. The morphology of the parenchyma of the prostate. *Urol Res.* 1977; v.5, p.155-56.
8. Berry, P.A.; Maitland, N.J.; Collins, A.T. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2008; v.288, p.30-7.
9. De marzo, A.M.; Marchi, V.L.; Epstein, J.I.; Nelson, W.G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999; v.155, p.1985-92.
10. Taylor, R.A.; Risbridger, G.P. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation.* 2008; v.76, p.668-71.
11. Yang, Y.; Hao, J.; Liu, X.; Dalkin, B.; Nagle, R.B. Differential expression of cytokeratin mRNA and protein in normal prostate, prostatic intraepithelial neoplasia, and invasive carcinoma. *Am J Pathol.* 1997; v.150, p.693-704.
12. Wang, Y.; Hayward, S.; Cao, M.; Thayer, K.; Cunha, G. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation.* 2001; v.68, p.270-9.
13. Bonkhoff, H.; Remberger, K. Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993; v.422, p.35-8.
14. Leav, I.; Mcneal, J.E.; Kwan, P.W.; Komminoth, P.; Merk, F.B. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate.* 1996; v.29, p.137-45.
15. Bonkhoff, H.; Wernert, N.; Dhom, G.; Remberger, K. Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate.* 1991; v.19, p.91-8.
16. Abrahamsson, P.A.; Dizeyi, N.; Alm, P.; Di Sant'agnese, P.A.; Deftos, L.J.; Aumuller, G. Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *Prostate.* 2000; v.44, p.181-6.
17. Nelson, E.C.; Cambio, A.J.; Yang, J.C.; OK, J.H.; Lara, JR., P.N.; Evans, C.P. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2007; v.10, p.6-14.
18. Ruscica, M.; Dozio, E.; Motta, M.; Magni, P. Role of neuropeptide Y and its receptors in the progression of endocrine-related cancer. *Peptides.* 2007; v.28, p.426-34.

19. Epstein, J.I. PSA and PAP as immunohistochemical markers in prostate cancer. *Urol Clin North Am.* 1993; v.20, p.757-70.
20. Van Leenders, G.; Dijkman, H.; Hulsbergen-Van de Kaa, C.; Ruiter, D.; Schalken, J. Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Lab Invest.* 2000; v.80, p.1251-58.
21. Yang L & Moses HL. Transforming growth factor b: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Research.* 20008; 68 p.9107–9111.
22. Farinola, M.A.; Epstein, J.I. Utility of immunohistochemistry for alpha-methylacyl-CoA racemase in distinguishing atrophic prostate cancer from benign atrophy. *Human Pathol.* 2004; v.35, p.1272-78.
23. Collins, A.T.; Maitland, N.J. Prostate cancer stem cells. *Eur. J. Câncer.* 2006 ; v.42, p.1213-18.
24. Barron, D.A.; Rowley, D.R. The reactive stroma microambient and prostate cancer progression. *Endocrine-related cancer.* 2012; , p.187-204.
25. Rizzo, S.; Attard, G.; Hudson, D.L. Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 2005; v.38, p.363-374.
26. Takao, T.; Tsujimura, A. Prostate stem cells: The niche and cell markers. *Int J Urol.* 2008; v.15; p.289-294.
27. Tsujimura, A. Koikawa, Y. Salm, S. , Takao, T., Coetzee, S., Moscatelli, D. et al. Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *J Cell Biol.* 2002 Jun 24; 157(7):1257-65.
28. Signoretti, S.; Pires, M.M.; Lindauer, M.; Horner, J.W.; Grisanzio, C.; Dhar, S.; et al. P63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA;* 2001 v.102, p.11355-60.
29. Kurita, T.; Medina, R.T.; Mills, A.A.; Cunha, G.R. Role of p63 and basal cells in the prostate. *Development.* 2004; v.131, p.4955-64.
30. Isaacs JT, Schulze H, Coffey DS. Development of androgen resistance in prostatic cancer. *Prog Clin Biol Res.* 1987; 243 p:21-31.
31. Collins, A. T., Habib, F. K., Maitland, N. J. and Neal, D. E.. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J. Cell Sci.* 2001. Nov; 114(Pt 21):3865-72.
32. Richardson, GD; Robson, CN; Lang, SH; Neal, DE; Maitland, NJ; Collins, AT, CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J. Cell Sci.* 2004; Jul 15; 117(Pt 16):3539-45.
33. Tuxhorn, J.A.; Ayala, G.E.; Rowley, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.* 2001; v.166, p.2472-83.
34. Cunha, G.R.; Matrisian, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation.* 2002; v.70, p.469-72.
35. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology.* 2003 Nov; 62(5 Suppl 1):55-62.
36. Kreis, T. and Vale, R.: Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins. New York: Oxford University Press, 1999

37. Shapiro, E.; Hartanto, V.; Perlman, E.J.; Tang, R.; Wang, B.; Lepor, H. Morphometric analysis of pediatric and nonhyperplastic prostate glands: evidence that BPH is not a unique stromal process. *Prostate*.1997; v.33, p.177-182.
38. Lin VK, Wang SY, Vazquez DV, C Xu C, Zhang S, Tang L. Prostatic stromal cells derived from benign prostatic hyperplasia specimens possess stem cell like property.*Prostate*. 2007; Sep 1;67(12):1265-76.
39. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views.*Stem Cells*.2007; Nov;25(11):2896-902.
40. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.*Stem Cells*.2007; Nov;25(11):2739-49.
41. Ceder, J.A.; Jansson, L.; Ehrnstrom, R.A.; Ronnstrand, L.; Abrahamsson, P.A. The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate. *Eur. Urol*.2008; v.53, p.524-532.
42. Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):79-92.
43. Cunha, G.R.; Hayward, S.W.; Wang, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate.*Differentiation*. 2002; v.70, p.473-485.
44. Imamov, O.; Shim, G.J.; Warner, M.; Gustafsson, J.A.Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol Reprod*.2005, v. 73, p. 866-71.
45. Prins, G.S.; Birsch, L.; Greene, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate.*Endocrinology*. 1991; v.129, p.3187-99.
46. Toorians, A.W.; Kelleher, S.; Gooren, L.J.; Jimenez, M.; Handelsman, D.J. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol Metab*.2003; v.88, p.5207-11.
47. Yu S, Yeh CR, Niu Y, Chang HC, Tsai YC, Moses HL,et al. Altered prostate epithelial development in mice lacking the androgen receptor in stromal fibroblasts.*Prostate*. 2012Mar;72(4):437-49.
48. Gerdes MJ, Larsen M, Dang TD, Ressler SJ, Tuxhorn JA, Rowley DR. Regulation of rat prostate stromal cell myodifferentiation by androgen and TGF-beta1.*Prostate*. 2004 Feb 15;58(3):299-307.
49. Banerjee, S.; Banerjee, P.P.; Brown, T.R. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology*; 2000 v.141, p.821-22.
50. Weihua, Z.; Makela, S.; Aandersson, L.C.; Salmi, S.; Saji, S.; Webster, J.I.;et al. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate.*Proc. Natl. Acad. Sci*. 2001; v. 98, p. 6330-35.
51. Weihua, Z.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell Endocrinol*. 2002; v.193, p.1-5.

52. O' Donnell, L.; Robertson, K.M.; Jones, M.E.; Simpson, E.R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001; v.22, p.289-318.
53. Risbridger, G.; Wang, H.; Young, P.; Kurita, T.; Wang, Y.Z.; Lubahn, D.; et al. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol.* 2001; v.231, p.289.
54. Montie, J.E.; Pienta, K.J. Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology*; 1994; v.43, p.892-99.
55. Walsh PC, Wilson JD. The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstenediol. *J Clin Invest.* 1976; Apr; 57(4):1093-7.
56. Bianco, J.J.; Handelsman, D.J.; Pedersen, J.S.; Risbridger, G.P. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology.* 2002; v.143, p.4922-33.
57. Jarred RA, McPherson SJ, Bianco JJ, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP. Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; May-Jun; 13(4):163-8.
58. Griffiths K, Morton MS, Nicholson RI. Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer. *Eur Urol.* 1997; 32 Suppl
59. Chaproniere DM, McKeegan WL. Serial culture of single adult human prostatic epithelial cells in serum-free medium containing low calcium and a new growth factor from bovine brain. *Cancer Res.* 1986; Feb; 46(2):819-24.
60. Cohen DW, Simak R, Fair WR, Melamed J, Scher HI, Cordon-Cardo C. Expression of transforming growth factor- α and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues. *J Urol.* 1994 Dec; 152(6 Pt 1):2120.
61. Adams, J.Y.; Leav, I.; Lau, K.M.; Ho, S.M.; Pflueger, S.M. Expression of estrogen receptor β in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate.* 2002; v.52, p.69-81.
62. McNeal, J.E.; Haillot, O.; Yemoto, C. Cell proliferation in dysplasia of the prostate: analysis by PCNA immunostaining. *Prostate*; 1995; v.2, p.258-268.
63. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am J Pathol.* 1999 Aug; 155(2):641-7
64. Asano, K.; Maruyama, S.; Usai, T.; Fujimoto, N. Regulation of estrogen receptor α and β expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocr.* 2003; v.50, p.281-287.
65. Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer.* 2004; Jun; 11(2):225-54.
66. Marks, L.S.; Mazer, N.A.; Mostaghel, E.; Hess, D.L.; Dorey, F.J.; Epstein, et al. Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006 ; v.296, p.2351-2361.
67. Cordeiro, R.S.; Scarano, W.R.; Campos, S.G.; Santos, F.C.; Vilamaior, P.S.; Góes, R.M.; et al. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation

- during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron*. 2008; Dec;39(8):1312-24.
68. Risbridger GP¹, Bianco JJ, Ellem SJ, McPherson SJ. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2003 Jun;10(2):187-91.
 69. Prins GS, Sklarew RJ, Pertschuk LP. Image analysis of androgen receptor immunostaining in prostate cancer accurately predicts response to hormonal therapy. *J Urol*. 1998 Mar;159(3):641-9.
 70. Daniels G, Gellert LL, Melamed J, Hatcher D, Li Y, Wei J, Wang J, Lee P. Decreased expression of stromal estrogen receptor α and β in prostate cancer. *Am J Transl Res*. 2014 Jan 15;6(2):140-6. eCollection.
 71. *American Cancer Society*, 2014; Cancer Facts & Figures 2014. Corporate Center: American Cancer Society Inc. 250 Williams Street, NW, Atlanta, GA 30303-1002.
 72. Droller MJ. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol*. 1997; Jan;171(1):419-25.
 73. Wong, Y.C.; Xie, W.; Tsao, S.W. Structural changes and alteration in expression of TGF-beta1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. *Prostate* . 2000; v.45, p.289-298.
 74. Davies P, Eaton CL. Regulation of prostate growth. *J Endocrinol*. 1991; Oct;131(1):5-17.
 75. Gomes R, Rebello LE, de Araújo FC, do Nascimento EF. Prostate cancer prevention: a review of the literature. *Cien Saude Colet*. 2008; Jan-Feb;13(1):235-46.
 76. Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E. Vitamin D deficiency: A global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006; Aug;50(4):640-6.
 77. Xu Y, Tokar EJ, Sun Y, Waalkes MP. Arsenic-transformed malignant prostate epithelia can convert noncontiguous normal stem cells into an oncogenic phenotype. *Environ Health Perspect*. 2012; Jun;120(6):865-71.
 78. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol*. 2007; Sep-Oct;25(5):398-400.
 79. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol*. 2004; Nov; discussion S11-2.
 80. De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA, Meeker AK, Nakayama M, Epstein JI, et al. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J Cell Biochem*. 2004 Feb 15;91(3):459-77.
 81. Bell DR, Van Zant G. Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene* . 2004; Sep 20;23(43):7290-6.
 82. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Nature. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; Nov 1;414(6859):105-11.
 83. Isaacs, W.B.; Bova, G.S.; Morton, R.A.; Bussemakers, M.J.; Brooks, J.D.; Ewing, C.M. Molecular biology of prostate cancer progression. *Cancer Surv*. 1995; v.23, p.19-32.

84. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; May;83(5):673-91.
85. Zenzmaier C, Untergasser G, Berger P. Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. *Exp Gerontol.* 2008; Nov; Epub 2008 Jul 2;
86. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, Witte ON, Said JW, Loda M, Reiter RE. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene.* 2000; Mar 2;19(10):1288-96.
87. Ross S, Spencer SD, Holcomb I, Tan C, Hongo J, Devaux B, et al. Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. *Cancer Res.* 2002; May 1;62(9):2546-53.
88. Dannull J, Diener PA, Prikler L, Fürstenberger G, Cerny T, Schmid U, et al. Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer. *Cancer Res.* 2000; Oct 1;60(19):5522-8.
89. Han KR, Seligson DB, Liu X, Horvath S, Shintaku PI, Thomas GV, et al. Prostate stem cell antigen expression is associated with gleason score, seminal vesicle invasion and capsular invasion in prostate cancer. *J Urol.* 2004; Mar;171(3):1117-21.
90. Ryan PD, Hilf R. EGF receptors in R3230AC rat mammary carcinomas: characteristics and regulation in vitro and in vivo. *Oncol Res.* 1992; 4(4-5):181-92.
91. Kerr DE, Schreiber GJ, Vruthula VM, Svensson HP, Hellström I, Hellström KE, et al. Regressions and cures of melanoma xenografts following treatment with monoclonal antibody beta-lactamase conjugates in combination with anticancer pro drugs. *Cancer Res.* 1995; Aug 15;55(16):3558-63.
92. Djavan, B.; Waldert, M.; Sitz, C.; Marberger, M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol.* 2001; v.19, p.225-233.
93. Takahashi K, Takahashi F, Hiramata M, Tanabe KK, Fukuchi Y. Restoration of CD44S in non-small cell lung cancer cells enhanced their susceptibility to the macrophage cytotoxicity. *Lung Cancer.* 2003; Aug;41(2):145-53.
94. Zhao WL, Mourah S, Mounier N, Leboeuf C, Daneshpouy ME, Legrès L, et al. Vascular endothelial growth factor-A is expressed both on lymphoma cells and endothelial cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related to lymphoma progression. *Lab Invest.* 2004, Nov;84(11):1512-9.
95. Marszalek M, Wachter J, Ponholzer A, Leitha T, Rauchenwald M, Madersbacher S. Insulin-like growth factor 1, chromogranin A and prostate specific antigen serum levels in prostate cancer patients and controls. *Eur Urol.* 2005; Jul;48(1):34-9.
96. Cornell, R.J.; Rowley, D.; Wheller, T.; Ali, N.; Ayala, G. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology.* 2003; v.61, p.870-5.
97. Rowley, D. R.: What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis*, 1998; Rev, 17: 411.

98. Tuxhorn, J.A.; Ayala, G.E.; Smith, M.J.; Smith, V.C.; Dang, T.D.; Rowley, D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin. Cancer. Res.* 2002; v.8, p. 2912-23.
99. Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Otori M, et al. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2003; 94792–801.
100. Rønnov-Jessen L, Petersen OW, Kotliansky VE, Bissell MJ. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1995; Feb;95(2):859-73.
101. Rønnov-Jessen L¹, Petersen OW. ADP-ribosylation of actins in fibroblasts and myofibroblasts by botulinum C2 toxin: influence on microfilament morphology and migratory behavior. *Electrophoresis*. 1996; Nov;17(11):1776-80.
102. Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD & Rowley DR. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Research*. 2005; 65 8887–95.
103. Kiskowski MA, Banerjee J, Li X, Kang M, Iturregui JM, Franco OE, et al. Role for stromal heterogeneity in prostate tumorigenesis. *Epub*. 2011; May 15;71(10):3459-70.
104. Davor T., Borislav S., Milan M., Alma D., Zlatko M. & Bozo, K.. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2010; Nov;44(5):284-90.
105. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. *American Journal of Physiology*. 1999; Jul;277, C1-9.
106. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971; May 15;27(5):549-50.
107. Kalluri R, Han Y. Targeting TGF-beta and the extracellular matrix in Marfan's syndrome. *Dev Cell*. 2008; Jul;15(1):1-2.
108. Lakshman M, Huang X, Ananthanarayanan V, Jovanovic B, Liu Y, Craft CS, et al. Endoglin supprime humana metástase de câncer de próstata. *Clin Exp Metástase*. 2011 Jan;28(1):39-53.
109. Freije JM, Balbin M, Pendas AM, Sanchez LM, Puente XS, López-Otín C. Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 532:91-107.
110. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*. 2001; 7(1):14-23.
111. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science*. 2002; Mar 29;295(5564):2387-92.
112. Dow JK, DeVere White RW. Fibroblast growth factor 2: Its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology*. 2000; Jun;55(6):800-6.

113. Murphy T, Darby S, Mathers ME, Gnanapragasam VJ. Evidence for distinct alterations in the FGF axis in prostate cancer progression to an aggressive clinical phenotype. *J Pathol.* 2010; Mar;220(4):452-60.
114. Andres SF, Simmons JG, Mah AT, Santoro MA, Van Landeghem L, Lund PK. Insulin receptor isoform switching in intestinal stem cells, progenitors, differentiated lineages and tumors: evidence that IR-B limits proliferation. *J Cell Sci.* 2013; Dec 15;126(Pt 24):5645-56.
115. Gennigens, C.; Menetrier-Caux, C.; Droz, J.P. Insulin-like growth factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; v.58, p.124-145.
116. Meinbach DS, Lokeshwar BL. Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: cause or consequence? *Urol Oncol.* 2006 Jul-Aug;24(4):294-306.
117. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Peter W, editors. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
118. Rous P. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA.* 1983; Sep 16;250(11):1445-9.
119. Sheiness D, Bishop JM. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol.* 1979 ;31:514-21.
120. Dang CV. C-MYC target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1-115.
121. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, et al. Translocation of the C-MYC gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; Dec;79(24):7837-41.
122. Frank SR, Schroeder M, Fernandez P, Taubert S, Amati B. Binding of C-MYC to chromatin mediates mitogeninduced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev.* 2001; Aug 15;15(16):2069-82.
123. Blacklock NJ, Bouskill K. The zonal anatomy of the prostate in man and in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Urol Res.* 1977;5(4):163-7.
124. De la Taille A, Antiphon P, Salomon L, Cherfan M, Porcher R, Hoznek A, et al . Prospective evaluation of a 21-sample needle biopsy procedure designed to improve the prostatecancer detection rate. *Urology.* 2003 Jun;61(6):1181-6.
125. Yanagisawa N, Li R, Rowley D, Liu H, Kadmon D, Miles BJ, et al.: Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after radical prostatectomy. *Hum Pathol.* 2007; Nov;38(11):1611-20.
126. Ekman, P. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *The Postate.* 2000; v.10, pp.14-18.
127. Aumuller, G.; Seitz, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex gland. *International Rev. Citol.* 1990; v.121, p.127-231.
128. Hayward, S.W.; Cunha, G.R. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am.* 2000; v.38, p.1-14.

129. Cunha, G.R.; Risbridger, G.; Wang, H.; Young, P. Evidence that epithelial mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Develop Biol.* 2001; v.229, p. 432-442.
130. Donjacour, A.A, Thomson, A.A, Cunha, G.R. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol.* 2003; v. 261, p. 39-54.
131. Zhang, Y.H.; Nojima, S.; Nakayama, H.; Jin, Y.L.; Enza, H. Characteristics of normal stromal components and their correlation with cancer occurrence in human prostate. *Oncol Rep.* 2003; v.10, p.207-211.
132. Billis A, Meireles L, Freitas LL, Polidoro A, Fernandes H, Padilha M, et al . Adenocarcinoma on needle prostatic biopsies: Does reactive stroma predicts biochemical recurrence in patient following radical prostatectomy? *Ibju*, 2013; May-Jun;39(3):320-7.
133. Salvatori L, Caporuscio F, Verdina A, Starace G, Crispi S, Nicotra MR, et al. Cell-to-cell signaling influences the fate of prostate cancer stem cells and their potential to generate more aggressive tumors. *Journal of urology*, 2012. 7(2):e31467.
134. Tomas D, Spajić B, Milosević M, Demirović A, Marusić Z, Kruslin B: Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol*, 2010; Nov;44(5):284-90.
135. Hayward SW¹, Cunha GR, Dahiya R. Normal development and carcinogenesis of the prostate. A unifying hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1996
136. Cotton LM¹, O'Bryan MK, Hinton BT. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocr Rev.* 2008 Apr;29(2):193-216.
137. Kwabi-Addo B¹, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2004. Dec;11(4):709-24.
138. Ahmad I, Iwata T, Leung HY. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012. Apr;1823(4):850-6.
139. Lynch, C.C; Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*, 2002; v.70, pp.561-73.
140. Martin, M.D.; Matrisian, L.M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2007.; v.26, p.717-724.
141. Ross, J.S.; Kaur, P.; Sheehan, C.E.; Fisher, H.A.; Kaufman, R.A., JR; Kallakury, B.V. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol* 2003; v.16, p.198-05.
142. Brennan PA¹, Jing J, Ethunandan M, Górecki D. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004. Aug;30(6):589-92.
143. Canelles M, Delgado MD, Hyland KM, Lerga A, Richard C, Dang CV, et al. Max and inhibitory C-MYC mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene*. 1997 Mar 20;14(11):1315-27.
144. Onclercq R, Babinet C, Cremisi C. Exogenous C-MYC gene overexpression interferes with early events in F9 cell differentiation. *Oncogene Res.* 1989., 4(4):293-302.
145. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by CMYC protein. *Cell.* 1992; Apr 3;69(1):119-28.

146. Gardner L, Lee L, Dang C. Myc oncogene. In: Bertino JR, editors. Encyclopedia of cancer. 2nd ed. Orlando: Academic Press; 2002.
147. Vermeulen, A.; Kaufman, J.M.; Goemaere, S.; Van Pottelberg, I. Estradiol in elderly men. *Aging Male*, 2002; v.5, p.98-102.
148. Carruba, G. Estrogen and prostate cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J Cell Biochem*.2007; v.102, p.899-911.
149. Mcpherson, S.J.; Ellen, S.J.; Simpson, E.R.; Patchev, V.; Fritzmeier, K.H.; Risbridger, G.P. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*;2001, v.148, p.566-74.
150. Härkönen PL, Mäkelä SI. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*.2004, Nov;92(4):297-305.
151. Ockrim, J.; Lalani, EL-N.; Abel, P. Therapy Insight: parenteral estrogen treatment for prostate cancer--a new dawn for an old therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006; v.3, p.552-63.
152. Latil, A.G.; Azzouzi, R.; Cancel, G.S.; Guillaume, E.C.; Cochan-Priollet, B.; Berthon, et al, O. Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways. *Cancer*. 2001; v.92, p.1130-37.
153. Verhagen, A.P.; Aalders, T.W.; Ramaekers, F.C.; Debruyne, F.M.; Schalken, J.A. Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate*, 1988; v.13, p.25-38.
154. Habuchi T. Origin of multifocal carcinomas of the bladder and upper urinary tract: molecular analysis and clinical implications. *Int J Urol*.2005, Aug;12(8):709-16 .
155. Tang Y, Hamburger AW, Wang L, Khan MA, Hussain A. Androgen deprivation and stem cell markers in prostate cancers. *Int J Clin Exp Pathol* .2010 ; v10, p 128-38.
156. Dimov, I., Visnjic, M. and Stenfanovic, V. Urothelial Cancer Stem Cells The Scientific Word Journal. Review . 2010 , Jul 20;10:1400-15.
157. Fávaro, W.J.; Hetzl, A.C.; Reis, L.O.; Ferreira, U.; Billis, A.; Cagnon, V.H. Periacinar retraction clefting in nonneoplastic and neoplastic prostatic glands: artifact or molecular involvement. *Pathol Oncol Res*.2011; v.18, pp.285-92.