



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**AMANDA CIA HETZL**

**“CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MOLECULAR DA  
PRÓSTATA DE HOMENS SENIS COM E SEM DIAGNÓSTICO  
DE DOENÇAS PROSTÁTICAS”**



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

Disertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título De  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural  
na área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

**Campinas, 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

H479c	<p>Hetzl, Amanda Cia Caracterização estrutural e molecular da próstata de homens senis com e sem diagnóstico de doenças prostáticas / Amanda Cia Hetzl. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Próstata – Ferimentos e lesões. 2. Velhice. 3. Hormônios esteróides. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
-------	--

**Titulo em inglês:** Structural and molecular characterization of elderly men's prostate with and without diagnosis of prostatic lesions.

**Palavras-chave em inglês:** Prostate – Wounds and injuries; Old age; Steroid hormones.

**Área de concentração:** Anatomia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, Isabel Cristina Cherici Camargo, Carlos Alberto Vicentini.

**Data da defesa:** 05/03/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 5 de março de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo



Assinatura

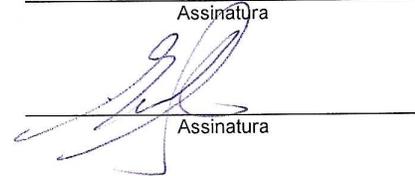
Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Martinez



Assinatura

## **DEDICATÓRIA**

### **A DEUS...**

“Meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus, eu confio em ti” (Salmo 91: 2)

### **AOS MEUS PAIS, ROSMARY E FÁBIO**

“A vocês devo tudo o que sou hoje. Nos ensinamentos da vida, foram mestres. Na minha caminhada, ensinaram-me a agir com dignidade, honestidade e respeito. Como lição, aprendi a ser responsável e humana. Com seus exemplos, aprendi a ser perseverante e justa. Com carinho, dedicação e amor, cresci. Sempre apoiada em vocês, aprendi a lutar e enfrentar os obstáculos. Amadureci. Dificuldades foram superadas, vitórias foram conquistadas e alegrias foram divididas. Acreditaram em mim, e hoje, sou fruto dessa confiança. Por isso, dedico este trabalho a vocês, pelo exemplo de perseverança, pelo amor e incentivo a mim dedicados e por sempre representarem meu porto seguro. Esta conquista é para vocês.”

### **AOS MEUS IRMÃOS, MEUS AMORES RAFAEL E PAMELLA**

“Por percorrerem junto comigo mais uma etapa do longo caminho de minhas conquistas. Muito obrigada por sempre acreditarem em mim.”

## **AGRADECIMENTOS**

À **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, pelo exemplo como pesquisadora, pela postura ética e intelectual, incentivando-me a prosseguir no caminho da ciência e contribuindo para meu crescimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Wagner José Favaro**, pelo apoio e disposição em ajudar durante toda a realização deste trabalho.

À **CAPES/PROEX, CNPq e FAPESP** pelos auxílios, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

Aos **Professores Dr. Humberto Santo Neto, Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Dra. Maria Júlia Marques e Dr. José Ângelo Camilli** pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

À **Prof. Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo, ao Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini e ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino**, pela indicação dos nomes, pelas contribuições e correções deste trabalho.

Aos **Professores Dr. Ubirajara Ferreira e Dr. Athanase Billis**, pelas valiosas contribuições durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução, **Eduardo Marcelo Cândido, Fábio Montico, Jéssica Gaelzer, Karoline de Barros Waitman, Leonardo Oliveira Reis, Leslie Cristina Pinto e Raísa Mistieri Lorencini**, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu namorado, **Rodrigo Gonçalves Dias Agostineto**, pelo amor, compreensão e incentivo.

Às **minhas amigas e aos familiares**, pelo apoio e carinho.

À **Sra. Liliam Alves Senne Panagio** que dispensou-me atenção durante todo o Mestrado.

Aos **Funcionários do Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica/Bloco A** pelo apoio e disposição em ajudar durante a realização deste trabalho.

Aos **colegas do Curso de Pós-graduação**, pelo carinho e amizade.

À todos do **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural**.

## ÍNDICE

RESUMO.....	02
ABSTRACT.....	04
I - INTRODUÇÃO.....	06
I.1- Generalidades e Estrutura da Próstata.....	06
I.2- Hormônios Esteróides e Próstata.....	11
I.3- Senescência e Doenças Prostáticas.....	15
II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	17
III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
III.1 - Microscopia de Luz.....	20
III.2 – Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	20
III.3 – Análises Morfométricas.....	21
III.3.1 – Morfometria em nível de Microscopia de Luz.....	21
III.3.2 – Morfometria em nível de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	21
III.4 - Imunomarcagem para os Receptores Androgênicos, Estrogênicos $\alpha$ e Estrogênicos $\beta$ , IGF-IR $\alpha$ , Ki-67, $\alpha$ -distroglicana, $\beta$ -distroglicana, laminina, metaloproteinase-2, metaloproteinase-9, e citoqueratina HMW (34 $\beta$ E12).....	22
III.5 - Extração de Proteínas e Western blotting.....	23
III.6 - Contagem de células Ki-67 positivas.....	24
III.7 – Detecção da Apoptose e Determinação do Índice Apoptótico.....	24
III.8 - Análises Estatísticas.....	24
IV - ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	25
IV.1 - “Structural and proliferative features in the prostate of elderly men: occurrence of prostatic intraepithelial neoplasia, benign prostatic hyperplasia and cancer”. Submetido ao Periódico <i>The Aging Male</i> ; setembro de 2009.....	26
IV.2 – “Senescência e Doenças Prostáticas: Caracterização dos Receptores Hormonais, IGFR-1, Metaloproteinases, Distroglicans e Laminina.....	50
V – CONCLUSÕES.....	75
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## RESUMO

A senescência é fator determinante para a ocorrência de alterações na biologia molecular da próstata, considerando-se tanto o desequilíbrio hormonal quanto o das interações epitélio-estroma. Assim, os objetivos desse estudo foram caracterizar e comparar a biologia celular e molecular da zona periférica prostática de homens senis, com e sem diagnóstico de lesões prostáticas, através da morfologia e imunolocalização dos receptores androgênicos (AR), estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP2, MMP9), distroglicanas  $\alpha$  e  $\beta$  (DG $\alpha$ , DG $\beta$ ), laminina e fator de crescimento homólogo à insulina (IGFR-1). Para tal, foram utilizadas 60 amostras das zonas periféricas prostáticas provenientes de necrópsias e/ou prostatectomias de homens (60-90 anos), as quais foram divididas em 4 grupos (15 amostras cada): Grupo Senil (sem lesões prostáticas); Grupo Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP); Grupo Hiperplasia Benigna Prostática (HBP); Grupo Câncer Prostático (CP). O diagnóstico das lesões prostáticas baseou-se em critérios morfológicos e por imunomarcção para citoqueratina de alto peso molecular. Os resultados foram avaliados por microscopias de luz e eletrônica de transmissão, métodos morfométricos, imunohistoquímicas e Western Blotting. Os resultados mostraram danos morfológicos no estroma e organelas celulares envolvidas no processo secretor da próstata de homens senis. As diferentes lesões prostáticas na senescência demonstraram desequilíbrio nas taxas de proliferação/apoptose, indicando predomínio do processo proliferativo. Além disso, a imunolocalização para AR se manteve similar em todos os grupos estudados, com predominância da imunolocalização no compartimento epitelial. Já o ER $\beta$  foi preferencialmente localizado no compartimento epitelial, sendo ausente no compartimento estromal do grupo CP. A imunolocalização do ER $\alpha$  foi preferencialmente no compartimento epitelial dos grupos estudados, sendo intensa nos grupos CP e NIP em relação aos demais. Também, intensa imunoreatividade para IGFR-1, MMP2 e MMP9 foi verificada nos grupos CP e NIP em relação aos demais grupos. As imunolocalizações para DG $\alpha$ , DG $\beta$  e laminina foram mais fracas nos grupos CP e NIP em relação aos grupos HBP e Senil. Assim, pode-se concluir que o desequilíbrio da interação epitélio-estroma prostático causado pelas mudanças

estruturais é fator decisivo para o desenvolvimento e progressão da carcinogênese na senescência. Ainda, a diminuição dos níveis protéicos do complexo das DGs e o aumento dos níveis das MMPs estão associados com a gravidade da lesão prostática e tem importante papel na manutenção do fenótipo maligno. A ocorrência de IGFR-1 sinalizou o grau de comprometimento glandular e a perda da imunolocalização da laminina provavelmente propiciou a progressão das lesões. Também, a localização diferencial dos receptores esteróides nas diferentes lesões prostáticas entre os compartimentos epitelial e estromal de homens senis certamente indicou diferentes sinalizações parácrinas para a dinâmica prostática, indicando ação diferencial desses receptores a partir dos compartimentos prostáticos e apontaram a importância das vias estrogênicas nos mecanismos de ativação dessas alterações. Finalmente, a interação do IGFR-1 com as MMP2 e MMP9 apontaram a relevância dessas moléculas nas investigações e tratamentos das doenças prostáticas.

## **ABSTRACT**

Senescence is a determining factor for the occurrence of morphological changes in the prostate, considering hormonal imbalance and paracrine signaling disturbance between the epithelium and the stroma. Thus, the objective of this work was to characterize and correlate the  $\alpha$  and  $\beta$ -dystroglycans ( $\alpha$ -DG,  $\beta$ -DG), androgen receptor (AR),  $\alpha$  and  $\beta$ -estrogen receptors ( $\alpha$ ER,  $\beta$ ER), matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2, MMP-9) and insulin-like growth factor receptor (IGFR-1) reactivities in both the stroma and epithelium compartments in the prostatic peripheral zone of elderly men showing Benign Prostatic Hyperplasia (BPH), Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) and Prostatic Cancer (PC). Sixty prostate samples from 60-90 year old patients were divided into 4 groups: The Senile Group (without prostatic lesions); The Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) Group; The Prostatic Cancer (PC) Group and The Prostatic Benign Hyperplasia (BPH) Group. The lesion diagnosis was based on architectural disturbance according to morphological criteria and by immunostaining for cytokeratin. The results were evaluated by light microscopy and transmission electron, morphometric methods, immunohistochemical and Western Blotting. The different prostatic lesions in senescence showed an imbalance in the rates of proliferation/apoptosis, indicating a predominance of proliferative process. The results showed more intense IGFR-1, MMP-2 and MMP-9 immunoreactivities in the PC and PIN groups than in the other groups. The  $\alpha$ -DG and  $\beta$ -DG immunolocalization were weaker in the PC and PIN groups than in the BPH and Senile groups. Intensified AR reactivity was verified in the epithelial compartment in all studied groups.  $\alpha$ ER immunoreactivity was more intense in the epithelial compartment in the PC and PIN groups than in the other groups.  $\beta$ ER immunoreactivity was weaker in the epithelial compartment of the PIN and PC groups than in the BPH and Senile groups. Also, this receptor was absent in the stromal compartment in the PC group. The different prostatic lesions showed abnormal epithelial-stromal interaction, due to decreased  $\alpha$ -DG and  $\beta$ -DG levels and increased IGFR-1, MMP-2 and MMP-9 levels, which are essential elements for the maintenance of glandular paracrine signaling, contributing to disease progression in the senescence. The differential steroid hormone receptor reactivity in the different lesions in both

prostatic compartments certainly indicated different paracrine signals to the dynamics of the prostate and pointed out the importance of estrogenic pathways in the activation mechanisms of these changes. Also, these findings indicated that there was a direct correlation between IGFR-1, MMPs and steroid hormone receptors, pointing towards IGFR-1 as a molecule target in prostate therapy, as well as being a possible factor for MMPs positive signaling.

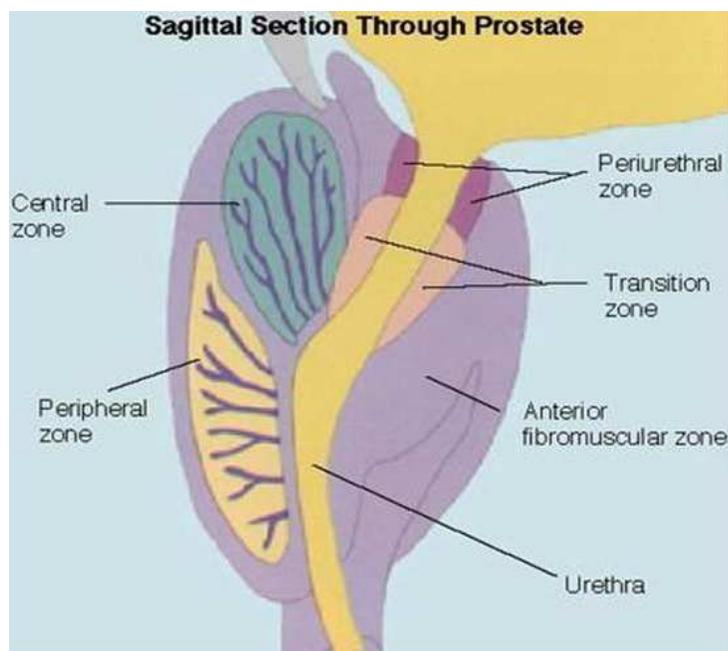
## **I-INTRODUÇÃO**

### **I.1- Generalidades e Estrutura da Próstata**

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina cuja secreção tem fundamental importância no processo reprodutivo (Price & Williams-Ashman, 1961; Cavazos, 1975; Mann & Lutwak-Mann, 1981). Na espécie humana, encontra-se localizada ao redor da uretra e inferiormente à bexiga urinária. Segundo a Nômina Internacional Anatômica de 1989, as regiões prostáticas são: base, ápice, lobos médio, direito e esquerdo e istmo (Wendell-Smith, 2000). Em estudos clínicos outros parâmetros como os zoneamentos glandulares também são utilizados, sendo conhecidas as zonas central, periférica, de transição e a periuretral, estando essa última completamente rodeada pelo esfíncter pré-prostático (Figura 1) (Wendell-Smith, 2000). 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 prostática (Wendell-Smith, 2000). A zona periférica é a maior subdivisão anatômica contendo 75% do total de tecido glandular e sendo o local de ocorrência da maioria dos carcinomas (Walsh et al., 1998). As diferenças morfológicas entre as zonas central e periférica podem ser identificadas microscopicamente, sendo que a zona central possui grande quantidade de estroma fibromuscular, além de ácinos largos e escassos. Já a zona periférica tem delgado estroma fibromuscular e grande quantidade de ácinos secretores (Blacklock, 1977).

O epitélio prostático no homem é composto de três tipos celulares: células epiteliais secretoras, células basais e células neuroendócrinas (Abrahamsson & Lilja, 1989). As células epiteliais secretoras são colunares altas, com grânulos secretores, núcleo basal e evidente zona clara supra-apical, correspondendo a região do complexo de Golgi. Esta camada de células constituem o compartimento exócrino da próstata, as quais secretam proteínas como o

antígeno específico da próstata (PSA) e fosfatase ácida prostática (PAP) (Abrahamsson & Lilja, 1989; De Marzo et al., 1999; Taylor & Risbridger et al., 2008). Já as células basais são menores, de menor frequência que as células epiteliais, compostas por núcleos irregulares e citoplasma escasso (Abrahamsson & Lilja, 1989). A perda da camada de células basais é uma importante característica de glândulas neoplásicas (Billis, 2003). Os diferentes lobos da próstata humana não apresentam diferenças marcantes ultra-estruturalmente. Por outro lado, mudanças regressivas no epitélio e na membrana basal são evidenciadas na deficiência de andrógenos durante a senescência (Aumüller et al., 1976).



**Figura 1:** Zonamento da próstata humana (<http://www.medscape.com>)

Em adição, as células neuroendócrinas estão distribuídas entre as células epiteliais secretoras da próstata normal, sendo encontradas tanto no epitélio glandular quanto nos ductos prostáticos. Existem três tipos de células neuroendócrinas, sendo que a maioria delas contém serotonina e hormônio estimulante da tireóide (TSH), enquanto que os outros dois tipos,

contêm calcitonina e somatostatina (Abrahamsson & Lilja, 1989).

A secreção prostática é formada por diferentes constituintes como ácido cítrico, ácido siálico, espermina e prostaglandinas, enzimas como amilase, fibrinogenase, aminopeptidase, transglutaminase, fosfatases ácida e alcalina, uma cascata de fibrinolisinases e zinco (Blandy & Lytton, 1986; Lin & Bissel, 1993; Bull et al., 2001), os quais propiciam condições favoráveis para a capacitação e sobrevivência dos espermatozoides (Guyton & Hall, 1996; Bull et al., 2001).

O estroma prostático é formado por um complexo arranjo 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 (Aumuller, 1983; Tuxhorn et al., 2001; Cunha & Matrisian, 2002; Dean & Nelson, 2008). Também, vasos sanguíneos, terminações nervosas e células imunes constituem partes integrais do estroma (Tuxhorn et al., 2001). Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático. A principal função destes é sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (Lin & Bissel, 1993; Kreis & Vale, 1999; Tuxhorn et al., 2001), sendo um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (Taipale & Keski-Oja, 1997; Tuxhorn et al., 2001). Além disso, componentes estruturais, como fibras colágenas e fibras elásticas, proporcionam rigidez mecânica e flexibilidade ao tecido.

Dessa forma, os processos biológicos da glândula prostática, tais como regulação da proliferação e diferenciação celular, atividade mitogênica, secretória e de crescimento tumoral 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) (Kerr et al., 1995; Djavan et al., 2001; Zhao et al., 2004; Marszalek et al., 2005). Os IGFs na próstata são produzidos pelas células estromais e atuam como fatores de crescimento parácrinos no epitélio prostático normal (Djavan et al., 2001). Existem dois tipos de

receptores transmembrana de IGF nos diferentes tecidos: o receptor tipo 1 (IGFR-1), expresso nas células epiteliais e estromais prostáticas, e o receptor tipo 2 (IGFR-2), não encontrado nos diferentes compartimentos prostáticos (Djavan et al., 2001). Os efeitos proliferativos e mitogênicos dos IGFs nas células prostáticas são modulados pelas proteínas ligantes de IGF (IGF-BPs) (Takahashi et al., 2003). A expressão acentuada dos IGFs e das IGF-BPs pode estimular a proliferação de células cancerosas e suas metástases (Denley et al., 2005; Neuvians et al., 2005). Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que a elevação dos níveis séricos de IGF-1 constitui um potente fator de risco para o início da hiperplasia benigna e da carcinogênese prostática (Djavan et al., 2001; Takahashi et al., 2003; Pandini et al., 2005; Pavelic et al., 2007).

Atualmente, as proteínas de adesão como as distroglicanas (DGs) vêm sendo apontadas como tendo importante participação nos diferentes tipos de cânceres, incluindo o prostático. A DG é um complexo formado por 2 subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , as quais se ligam a moléculas da matriz extracelular e ao citoesqueleto, respectivamente (Sgambato et al., 2007). Desta forma, as DGs conectam células epiteliais a lâmina basal, contribuindo para a troca de informações com a matriz extracelular adjacente, além de organizarem o citoesqueleto e participarem nos processos de sinalização (Brennan et al., 2004). Assim, as DGs têm papel fundamental na formação da membrana basal dos tecidos e a redução de sua expressão pode estar relacionada à progressão do câncer prostático devido à ruptura desta membrana, fato este que ocorre na invasão do câncer e na metástase (Henry et al., 2002; Brennan et al., 2004; Sgambato et al., 2007). Outro grupo importante de proteínas envolvido no desenvolvimento e progressão do tumor são as metaloproteinases (MMP2 e MMP9), as quais degradam a membrana basal e outros componentes da matriz extracelular, incluindo as DGs (Kamijima et al., 2005; Sgambato et al., 2007). As MMPs estão envolvidas na liberação de IGF através do mecanismo que o separa da proteína inibidora (IGFBPs) e passa a estimular o crescimento tumoral. As MMPs regulam indiretamente a proliferação através das integrinas como uma consequência da sua habilidade em alterar os constituintes da matriz extracelular, além de

regular a apoptose de células cancerosas (Martin et al., 2007).

Ainda, os proteoglicanos regulam a estrutura e a permeabilidade da matriz extracelular, ligando-se aos fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases, modulando a atividade destes (Taipale & Keski-Oja, 1997; Kreis & Vale, 1999 e Tuxhorn et al., 2001). Assim, a comunicação de células estromais e matriz extracelular 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 (Getzenberg et al., 1990; Labat-Robert et al., 1990; Tuxhorn et al., 2001; Cornell et al., 2003).

A interação epitélio-estroma tem papel primordial na manutenção da estrutura e funcionamento da próstata (Ekman, 2000). Baseando-se em aspectos morfológicos, funcionais e embriológicos, esta interação pode ser considerada como única unidade funcional (Aumuller & Seitz, 1990; Hayward & Cunha, 2000). A membrana basal é o ponto de união dessa interação oferecendo suporte mecânico e fisiológico ao epitélio secretor (Knox et al., 1994; Hayward & Cunha, 2000).

A membrana basal é uma estrutura complexa formada por diferentes elementos como colágeno IV, V, glicosaminoglicanos, complexo de polissacarídeos e glicolipídeos (Aumuller, 1983; Mawhinney, 1989). Como componente glicoprotéico da membrana basal, pode-se destacar a laminina produzida pelas células epiteliais, a qual interage com o colágeno IV da membrana basal e com receptores de integrina no interior da célula epitelial (Sinha et al., 1989). Durante a progressão tumoral da próstata ocorrem mudanças na composição da laminina e esta se mostrou um importante transformador de sinalização para a expressão do gene do câncer prostático (Calaluce, 2006). Desta forma, o desequilíbrio da interação epitélio-estroma na próstata favorece a formação do carcinoma prostático (Cunha et al., 2002). 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 (Wong et al., 2000; Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2003; Cornell et al., 2003).

## **I.2- Hormônios Esteróides e Próstata**

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos (Leav et al., 2001; Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005). 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 específico (Prins et al., 1991).

A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática (Hsing et al., 2002; Toorians et al., 2003). A DHT é resultante da conversão da testosterona através da enzima  $5\alpha$ -redutase (Prins et al., 1991; Toorians et al., 2003). Dois tipos de  $5\alpha$ -redutases são identificados nos tecidos. A  $5\alpha$ -redutase tipo I é encontrada na maioria dos tecidos, já a tipo II é predominante nos órgãos genitais incluindo a próstata (Hsing et al., 2002; Marker et al., 2003).

Através de estudos utilizando-se o método da castração, caracterizou-se que a deficiência androgênica leva a involução da próstata, ativação da apoptose e intensa remodelação da matriz extracelular desse órgão (Banerjee et al., 2000; Vilamaior et al., 2000; Heinlein & Chang, 2004). Embora, a testosterona e a DHT utilizem o mesmo receptor de andrógeno (AR) para atuarem no tecido prostático, essas ações parecem estar associadas a diferentes funções teciduais (Prins et al., 1991; Wright et al., 1996; Toorians et al., 2003). No entanto, ambas são capazes de manter a atividade prostática, porém a DHT é 1,6 a 1,9 vezes mais potente que a testosterona (Wright et al., 1996; Toorians et al., 2003).

Além dos hormônios androgênicos, outros hormônios como os estrógenos participam do desenvolvimento da próstata, tanto em humanos como em roedores, os quais atuam sinergicamente à testosterona, influenciando não só as funções normais do órgão quanto às alterações patológicas (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, com conseqüente redução na produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al.,

2002).

A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização deste pela enzima aromatase (citocromo P450 aromatase), expressada pelo gene Cyp19 (Fishman & Goto, 1981; O' Donnel et al., 2001; Risbridger et al., 2003). Esta enzima é regulador crítico entre o balanço de andrógeno e estrógeno, a qual contribui para o nível circulante e no tecido desses hormônios (Risbridger et al., 2003). A evidência da síntese local de estrógenos na próstata foi demonstrada através da detecção local da enzima aromatase (Ellem et al., 2004). Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desse hormônio em receptores estrogênicos específicos  $\alpha$  e  $\beta$ , os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Risbridger et al., 2001; Cunha et al., 2002). A identificação desses dois subtipos de receptores estrogênicos no tecido prostático confirmou a sinalização do caminho de estrógenos neste órgão (Cunha et al., 2002). Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver tanto ações diretas, através dos receptores, como indiretas, através do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Cunha et al., 2002).

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 glandular (Jarred et al., 2002). Assim sendo, esses trabalhos evidenciaram que tanto os estrógenos como os andrógenos são elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes caminhos.

Um estudo com ratos neonatais demonstrou que durante o desenvolvimento a exposição desses animais a elevadas doses de estrógenos resulta em múltiplas mudanças no crescimento morfológico prostático, além de reduzir a sensibilidade à exposição de andrógenos na vida adulta, o qual inclui a aceleração da degradação dos receptores androgênicos prostáticos (Prins et al., 1991; Jarred et al., 2000). Também, outros efeitos da estrogenização na próstata incluem a ocorrência de atipia celular ao avançar da idade,

processo inflamatório, hiperplasia epitelial e emergência de lesões displásicas (Jarred et al., 2002; Bianco et al., 2002). Assim, essas lesões são importantes visto que as doenças inflamatórias podem ser positivamente associadas com mudanças benignas e malignas da próstata. Já as displasias, referem-se às neoplasias intraepiteliais prostáticas (NIPs), as quais precedem o desenvolvimento do carcinoma (Jarred et al., 2002). A NIP caracteriza-se por proliferação do epitélio secretor de ácinos ou ductos, o qual mostra atipias citológicas como núcleos volumosos e nucléolos proeminentes. Não há desarranjo arquitetural e, diferentemente do adenocarcinoma, as células basais estão presentes (Billis, 2003).

Estudos envolvendo o ER $\beta$  têm adicionado mais um nível de complexidade nos mecanismos de ações dos estrógenos na próstata (Weihua et al., 2002). Experimentos caracterizaram importante envolvimento dos ER $\beta$  nos mecanismos prostáticos, conjuntamente as ações exercidas pelos ER $\alpha$ , sendo os efeitos estrogênicos produto de um balanço dinâmico entre ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Adams et al., 2002; Weihua et al., 2002), e a alteração deste balanço pode implicar na etiologia de várias doenças, inclusive câncer (Carruba, 2007). Os ER $\beta$  são expressos especialmente nas células epiteliais basais da próstata normal, sendo que essa subpopulação de células mostra importante propriedade biológica, com potencial efeito proliferativo sobre as células epiteliais, além de envolvimento na carcinogênese (Bonkhoff et al., 1998; Weihua et al., 2002; Imamov et al., 2005). Estudos têm postulado efeito antiproliferativo dos ER $\beta$  na glândula prostática (Chang & Prins, 1999; Imamov et al., 2004). No câncer prostático, a ativação do ER $\beta$  parece limitar diretamente a proliferação celular ou através da inibição do ER $\alpha$ , e a perda do ER $\beta$  tem sido associada com a progressão do tumor (Carruba, 2007). Segundo Weihua et al. (2002), camundongos *Knockout* para os ER $\beta$  demonstraram focos de hiperplasia epitelial celular no lobo ventral da próstata aos 5 meses de idade, sendo que com 1 ano de idade esses animais desenvolveram neoplasias. Portanto, esse experimento confirmou a capacidade antiproliferativa relacionada aos ER $\beta$ . Contudo, Taylor et al. (2005) consideraram a ação antiproliferativa dos estrógenos como mediada por outras vias, as quais não envolvem os receptores estrogênicos.

Em adição, outros estudos destacaram que o ER $\beta$  pode estar envolvido não só ao

processo antiproliferativo epitelial, mas também à diminuição do processo apoptótico epitelial glandular (Imamov et al., 2004). Esta afirmação baseou-se no fato de camundongos *Knockout* para os ER $\beta$  apresentarem aumento da proliferação epitelial e decréscimo da apoptose (Imamov et al., 2004). Segundo Adams et al. (2002), os receptores estrogênicos  $\beta$  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, posteriormente, agir de forma a limitar o crescimento celular em períodos tardios gestacionais em fetos humanos. Ainda, diversos estudos demonstraram que o ER $\beta$  é supra-regulado por andrógenos. Tal fato foi demonstrado pela administração de testosterona em ratos, com conseqüente aumento do nível de expressão desse receptor no RNA mensageiro (Adams et al., 2002; Asano et al., 2003).

É amplamente conhecido, que ocorre declínio do nível de testosterona com a idade. Diferentes estudos mostraram que homens senis possuem baixo nível androgênico, levando à complicações como disfunção sexual, diminuição da massa corpórea, sendo essas mudanças conhecidas como climatério masculino, andropausa ou ainda menopausa masculina (Marks, 2006). 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 efetivamente para o desequilíbrio glandular (Marks et al., 2006). Anteriormente, Sugimura et al. (1986) observaram importantes alterações lobo-específicas nos diferentes lobos prostáticos de camundongos senis, sendo essas: diminuição do nível de testosterona, redução da altura epitelial e desaparecimento de pregueamento da mucosa. Também, é conhecido que na glândula prostática de adultos a redução do nível de testosterona causa regressão de super-crescimento prostático tanto benigno quanto maligno. Por outro lado, em homens com câncer avançado de próstata, a administração de testosterona freqüentemente exacerba a doença (Marks et al., 2006).

### **I.3- Senescência e Doenças Prostáticas**

A morfologia e a fisiologia da próstata têm sido examinadas com particular atenção devido às condições patológicas que atingem esse órgão. Dentre essas, pode-se destacar a hiperplasia benigna (HBP) e o câncer prostático (Marcelli & Cunningham, 1999; Leav et al., 2001). Estas afecções afetam a qualidade de vida, e os custos em saúde excedem, anualmente, 4 bilhões de dólares no mundo (Guess, 2001). O câncer de próstata é a segunda maior causa de mortes por câncer na população ocidental masculina, embora sua etiologia não esteja totalmente estabelecida (Wong et al., 2000). A HBP caracteriza-se por uma predominante proliferação estromal e, embora um aumento substancial do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida (Droller, 1997). O câncer de próstata, em contraste, é considerado uma doença do epitélio e, freqüentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). Sabe-se que, o desenvolvimento do carcinoma prostático e a ocorrência de HBP são de natureza endócrina e que a possibilidade de ocorrer aumenta com a idade, sendo tipicamente uma doença de homens com mais de 50 anos de idade (Davies & Eaton, 1991; Krieg et al., 1993; Walsh et al., 1998; Kumar et al., 2005). Krieg et al. (1993) verificaram que há aumento da taxa de estrógeno/andrógeno especialmente no estroma prostático de animais com HBP.

A NIP é clinicamente apontada como uma lesão precursora do adenocarcinoma invasivo, sendo resultante do processo anormal de diferenciação e proliferação, sendo que a camada de células basais perde sua capacidade de proliferação e esta passa a ser realizada pelas células luminais secretoras, caracterizando uma desordem tipicamente pré-maligna (Bonkhoff et al., 1994; Scattoni et al., 2006; Majumder et al., 2008). Ainda, estudos clínicos têm mostrado que homens com neoplasia intraepitelial prostática de alto grau têm 17 a 35% de risco de câncer sobre a repetição da biópsia. Análises de biópsias têm revelado que, estas neoplasias intraepiteliais podem preceder o desenvolvimento de câncer de próstata por até 10 anos (Scattoni et al., 2006).

Atualmente, a importância dos hormônios androgênicos e estrogênicos tem sido demonstrada no desenvolvimento de doenças prostáticas a partir de estudos clínicos e

experimentais (Marcelli & Cunningham, 1999; Cunha et al., 2002; Tuxhorn et al., 2002; Risbridger et al., 2003).

Várias hipóteses têm sido correlacionadas à manifestação do carcinoma prostático. Estudos epidemiológicos consideram os hormônios estrogênicos como tendo papel vital na carcinogênese prostática (Montie & Pienta, 1994). Segundo Bianco et al. (2002), estudando experimentalmente as ações de andrógenos e estrógenos verificaram que as atuações independentes de andrógeno e estrógeno 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 conhecido (Bianco et al., 2002). Também, Risbridger et al. (2003), 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.

Por outro lado, estudos destacaram que não há correlação entre a expressão dos ER $\beta$  na HBP (Weihua et al., 2002). Contudo, quando há ocorrência de câncer prostático verificou-se decréscimo do mesmo, com aumento da expressão em estágios avançados da doença incluindo metástase (Weihua et al., 2002).

## II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A participação efetiva da próstata no processo reprodutivo masculino, associada à elevada taxa de doenças, tem motivado diferentes estudos sobre a biologia celular, molecular e endocrinológica desse órgão.

As alterações hormonais detectadas em indivíduos senis, certamente estão diretamente relacionadas às diferentes lesões neste órgão. Além disso, a atual prática clínica de terapias de reposição hormonal em homens na andropausa, as quais indicam tanto efeitos positivos na recuperação de algumas alterações da próstata, quanto conseqüências negativas em casos de câncer de próstata avançado vêm sendo alvos de diversos estudos.

Os mecanismos de ação dos estrógenos na glândula prostática, através dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$ , vêm sendo considerados cruciais no desenvolvimento e na progressão de alterações patogênicas neste órgão. A descoberta do segundo receptor estrogênico, ER $\beta$ , tem sinalizado uma nova perspectiva para os efeitos dos estrógenos, os quais foram anteriormente atribuídos como sendo mediados pelos ER $\alpha$ . Estudos destacaram o papel dos ER $\beta$  para a manutenção da homeostase glandular. Também, o conhecimento de outros polipeptídeos envolvidos tanto nos processos de mitogênese celular, como o IGF, quanto na manutenção da estrutura do órgão, como as distroglicanas, serão fatores decisivos para o entendimento dos mecanismos moleculares glandulares na senescência e para a sinalização de novas terapias e prevenção das lesões que acometem a próstata.

Assim, os principais objetivos do presente estudo foram caracterizar a estrutura e ultra-estrutura da zona periférica prostática, incluindo análises morfométricas, bem como identificar e associar a distribuição das diferentes moléculas envolvidas na manutenção da estrutura e funcionamento da próstata de homens senis com e sem diagnóstico de doenças prostáticas. Para tal, utilizar-se-á técnicas de microscopias de luz e eletrônica de transmissão, imunohistoquímicas, morfométricas e western blotting.

### **III - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **AMOSTRAS PROSTÁTICAS HUMANAS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

No presente trabalho foram utilizadas 60 amostras de tecido prostático, provenientes de pacientes entre 60-90 anos de idade com e sem lesões prostáticas hospitalizados no Hospital de Clínicas da UNICAMP. Quinze amostras foram obtidas de pacientes necropsiados sem diagnóstico de doenças prostáticas ou urológicas. As amostras prostáticas foram coletadas da zona periférica (McNeal apud Blacklock, 1977) (Fig. 2A) e a divisão na face posterior, de basal para apical do órgão indica os pontos de retirada dos fragmentos glandulares (Figura 2B) (Modificado DE LA TAILLE et al; 2003). Dessas amostras somente as glândulas normais foram incluídas no estudo.

As outras 45 amostras prostáticas foram obtidas de pacientes submetidos à prostatectomia radical no período de novembro de 2008 à junho de 2009. Os espécimes cirúrgicos foram inclusos e processados como um todo. Uma média de 32 blocos de parafina foi processada (entre 10 a 56 blocos), e cortes de 6µm de cada bloco foram corados com hematoxilina-eosina. Áreas de hiperplasia benigna prostática (HBP), neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (NIP) e carcinoma prostático Gleason 3+3=6 (CP) foram diagnosticadas de acordo com critérios morfológicos (Mostofi & Price, 1973) por um uropatologista sênior.

As amostras prostáticas foram divididas em 4 grupos (15 amostras por grupo): grupo Senil (sem lesões prostáticas – pacientes autopsiados), grupo HBP, grupo NIP, e grupo CP.

As amostras foram submetidas às técnicas de microscopias de luz e eletrônica de transmissão, imunohistoquímicas, morfométricas, western blotting, além da determinação dos índices proliferativo e apoptótico.

Todos os procedimentos estão de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa/FCM/UNICAMP (0094.0.146.000-08).

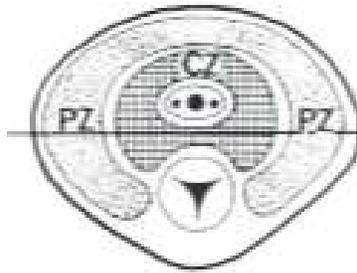


Figure 2A: Esquema de corte transversal da próstata mostrando a subdivisão externa da glândula prostática. PZ= zona periférica, CZ= zona central (McNeal apud Blacklock, 1977).

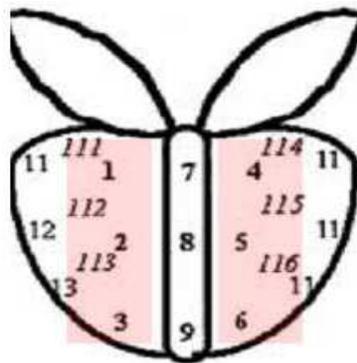


Figure 2B: Esquema da vista posterior da localização da retirada de amostras prostáticas. Os números 1, 2, 3 e 4, 5, 6, correspondem aos fragmentos coletados da zona periférica, do sentido basal para o apical da próstata. (Modificado DE LA TAILLE et al; 2003).

### **III.1 - Microscopia de Luz**

Amostras prostáticas de todos os pacientes foram coletadas e fixadas em solução de Bouin por doze horas e paraformoldeído a 4% por 48 horas. Após a fixação, os tecidos fixados com Bouin foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Já os fragmentos fixados em paraformoldeído 4%, foram lavados em água corrente, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em parafina e polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA). Em seguida, os materiais foram seccionados em micrótomo (Biocut – Modelo 1130) com espessura de 5 micrômetros com posterior coloração em Hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson (Junqueira et al., 1979), Prata Amoniaca e Resorsina-Fucsina de Weigert, e fotografados no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) e submetidos a análises morfométricas.

### **III.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Amostras prostáticas de todos os pacientes foram imersas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). A seguir, os fragmentos prostáticos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Os fragmentos foram inclusos em resina plástica (polyscience, Niles, IL, USA) e seccionados com 0,5 micrômetro de espessura no ultramicrotomo LKB 8800 ultratome III e corados com azul de metileno e azul II. Posteriormente, os blocos foram trimados e seccionados no ultramicrotomo Ultracult UCT 020 Leica. Os cortes obtidos foram montados em telas de cobre de 200 Mesh e contrastados pelo acetato de uranila (Watson, 1958) e pelo citrato de chumbo (Reynolds, 1963), examinados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/UNICAMP.

### **III.3 - Análises Morfométricas**

#### **III.3.1 - Morfometria em nível de Microscopia de Luz**

Para o estudo morfométrico foram utilizadas células epiteliais das amostras prostáticas, coradas com hematoxilina e eosina, de todos os pacientes analisados. Posteriormente, as imagens celulares obtidas foram digitalizadas no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) e submetidas às mensurações da área celular total, área nuclear, área citoplasmática, área luminal e porcentagem da área relativa do epitélio x estroma glandular por meio do programa NIS-Elements: Advanced Research (USA).

Para quantificação das áreas celulares, nucleares, citoplasmáticas e luminais foram utilizadas células epiteliais contidas em dez campos aleatoriamente definidos, fixando-se as observações com a objetiva de 100X.

Para a determinação, em porcentagem, da área relativa (epitélio X estroma glandular) foi utilizado o programa NIS-Elements: Advanced Research (USA) com a objetiva 20X.

#### **III.3.2 - Morfometria em nível de Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Eletromicrografias das próstatas de todos os pacientes foram obtidas e digitalizadas no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906. As eletromicrografias tiveram aumento de 3597X e ampliação de 3,5X. Dez células, de cinco pacientes por grupo, as quais apresentaram núcleo visível, lâmina basal e ápices evidentes foram utilizadas. Posteriormente, as imagens celulares foram submetidas às mensurações da área ocupada pelas vesículas secretoras, gotas lipídicas, complexo de Golgi e vacúolos digestivos nas células epiteliais secretoras prostáticas. As medidas foram realizadas através de um sistema de análise de imagens computadorizado, programa NIS-Elements: Advanced Research (USA).

#### **III.4 - Imunomarcção para os Receptores Androgênicos (AR), Estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), IGFR-1, Ki-67, distroglicanas $\alpha$ e $\beta$ (DG $\alpha$ , DG $\beta$ ), Laminina $\alpha$ 3 (Lam $\alpha$ 3), metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP2 e MMP9), e citoqueratina de alto peso molecular (HMW 34 $\beta$ E12).**

A imunomarcção para os receptores androgênicos, estrogênicos  $\alpha$  e estrogênicos  $\beta$ , IGF-IR $\alpha$ , Ki-67,  $\alpha$ -distroglicana,  $\beta$ -distroglicana, laminina, MMP-2, MMP-9 e citoqueratina HMW utilizou amostras prostáticas de todos os pacientes. A seguir, foram obtidos cortes com cinco micrômetros de espessura no micrótomo (Biocut – Modelo 1130), coletados em lâminas silanizadas. Os diferentes antígenos para AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , IGFR-1, Ki-67, DG $\alpha$ , DG $\beta$ , Lam  $\alpha$ 3, MMP2, MMP9 e HMW 34 $\beta$ E12 foram localizados através dos anticorpos: policlonais rabbit N-20 (sc-816) (Santa Cruz Biotchenollogy) para AR, rabbit MC-20 (sc-542) (Santa Cruz Biotchenollogy) para ER $\alpha$ , rabbit H-150 (sc-8974) (Santa Cruz Biotchenollogy) para ER $\beta$ , rabbit N-20 (sc-712) (Santa Cruz Biotchenollogy) para IGFR-1, rabbit H-300 (sc-15402) (Santa Cruz Biotchenollogy) para Ki-67, rabbit N-19 (sc-16160) (Santa Cruz Biotchenollogy) para DG $\alpha$ , rabbit C-20 (sc-16165) (Santa Cruz Biotchenollogy) para DG $\beta$ , rabbit T-20 (sc-16587) (Santa Cruz Biotchenollogy) para Lam  $\alpha$ 3, monoclonal mouse (ab776) (Santa Cruz Biotchenology) para HMW 34 $\beta$ E12, monoclonal mouse IM53 (Calbiochem, USA) para MMP2 e monoclonal mouse IM37 (Calbiochem, USA) para MMP9. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em solução de ácido cítrico (pH 6.0) a 100°C por 15 minutos ou incubação com proteinase K. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3% em metanol) por 5 minutos. A seguir, os materiais foram incubados com os anticorpos primários diluídos (1:50) em BSA 1% e armazenados overnight a 4 °C. Após a lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário marcado com peroxidase e, posteriormente, revelados com diaminobenzidina (DAB). Para a contra-coloração destes, foi utilizado Verde Metil (Methyl Green) e hematoxilina de Harrisson. As lâminas foram desidratadas, montadas e avaliadas em microscopia de luz convencional.

### III.5 – Extração de proteínas e Western blotting

Amostras prostáticas de 5 pacientes de cada grupo foram coletadas, pesadas e homogeneizadas em tampão de extração contendo 100 mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 10% (v/v) Triton X-100 and 10 µl/ml de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Os extratos obtidos por centrifugação foram submetidos à determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.,USA). O correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 70 V por 3 horas. As membranas foram então bloqueadas com 3% BSA diluído por uma hora e incubadas com os anticorpos primários policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para AR, monoclonal *mouse* clone 1D5 (Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, USA) para ER $\alpha$ , policlonal *rabbit* 06-629 (Upstate, USA) para ER $\beta$ , policlonal *rabbit* N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para IGFR-1, policlonal *rabbit* H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para DG $\alpha$ , policlonal *rabbit* H-242 (sc-28535) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para DG $\beta$ , monoclonal *mouse* IM53 (Calbiochem, USA) para MMP2, monoclonal *mouse* IM37 (Calbiochem, USA) para MMP9 e policlonal *rabbit* H-187 (sc-20143) (Santa Cruz Biotchenollogy) para Lam  $\alpha$ 3 na diluição 1:500. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit e anti-mouse* HRP conjugados na diluição de 1:2000 em 1% BSA. A atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Anticorpo para  $\beta$  actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens NIS-Elements: *Advanced Research* (USA).

### **III.6 - Contagem de células Ki-67 positivas**

Os índices proliferativos foram obtidos por contagem das células Ki-67 positivas e Ki-67 negativas (coradas com verde metil) em dez campos aleatoriamente definidos, fixando-se as observações com a objetiva de 100X no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400). Foram utilizadas amostras das próstatas de 5 pacientes por grupo, os mesmos destinados a imunomarcagem para Ki-67. O número total de células Ki-67 positivas foi expresso em porcentagem do total de células.

### **III.7 - Detecção da Apoptose e Determinação do Índice Apoptótico**

Amostras prostáticas fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas, de todos os pacientes, foram seccionadas e submetidas à reação de Feulgen. Posteriormente, os cortes foram submetidos à hidrólise com 4 N HCl por 75 minutos e tratados com o reagente de Schiff por 40 minutos. Depois de extensa lavagem, os cortes foram desidratados e montados em lâminas. Em seguida, dez campos de cinco pacientes por grupo foram analisados com objetiva de 40X e o índice apoptótico foi determinado dividindo-se o número de núcleos apoptóticos pelo número total de núcleos encontrados nos campos microscópicos. Os núcleos apoptóticos foram identificados por características como picnose e/ ou fragmentação nucleolar, de acordo com Kerr & Searle (1973). Somente as células epiteliais foram consideradas para contagem.

### **III.8 - Análises Estatísticas**

Os parâmetros quantificados nas análises morfométricas de microscopias de luz e eletrônica de transmissão e os índices de apoptose foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos. Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% (Montgomery, 1991).

#### **IV - ARTIGOS CIENTÍFICOS**

**IV.1 - “Structural and proliferative features in the prostate of elderly men: occurrence of prostatic intraepithelial neoplasia, benign prostatic hyperplasia and câncer”.** Publicado no Periódico *The Aging Male*; março de 2009.

**IV.2 – “Senescência e Doenças Prostáticas: Caracterização dos Receptores Hormonais, IGFR-1, Metaloproteinases, Distroglicanas e Laminina”.** Será submetido ao Periódico *The Journal of Urology*.

**“Structural and proliferative features in the prostate of elderly men: occurrence of prostatic intraepithelial neoplasia, benign prostatic hyperplasia and cancer”**

Hetzl AC<sup>1</sup>, Fávaro WJ<sup>1</sup>, Billis A<sup>2</sup>, Ferreira U<sup>3</sup>, Cagnon VHA<sup>1</sup>

1 - Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

2 - Department of Pathology, School of Medicine, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

3 - Department of Urology, School of Medicine, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Short Title: **Prostate of Elderly Men**

Correspondence to: Valéria H. A. Cagnon PhD, Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brazil. Telephone: +(55) 19-3521-6103. Fax: +(55) 19-3289-3124. E-mail: [quitete@unicamp.br](mailto:quitete@unicamp.br)

### *Abstract*

Senescence is one of the main etiological factors which are responsible for natural androgen ablation in men and occurrence of prostatic diseases. However, it is unclear how the prostatic lesions are signaled in the prostate. Thus, the aim of this study is to characterize the structural, the ultrastructural and proliferative aspects of the peripheral prostatic zone in the elderly men with and without diagnoses of prostatic lesions and with potential precursors of prostate cancer. Sixty samples of prostatic tissue, from 60 to 90- year-old patients with and without lesions obtained from autopsied or prostatectomized patients were divided into four groups (15 samples per group): standard group (no lesions), benign prostatic hyperplasia group, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia group, and prostatic carcinoma group. The samples were submitted to morphometrical, structural, and ultrastructural analyses in addition to cellular apoptosis and proliferative analyses. The results showed morphological damages in the stroma and cellular organelles involved in the secretory process of the prostate. Moreover, the prostatic lesions in elderly men demonstrated disturbance in the proliferation/apoptosis rate, indicating a prevalence of the proliferative process. Finally, the imbalance in prostatic stroma-epithelium interaction was a harmful feature in the elderly men as a result of structural changes, which are crucial factors for the development and progression of carcinogenesis.

Key words: prostate cancer; prostatic intraepithelial neoplasia; benign prostatic hyperplasia; senescence

## *INTRODUCTION*

The prostate is a male accessory sex gland which is fundamental in the reproductive process [1], showing epithelium with columnar secretory cells, and a layer of basal cells, the latter being closely related to the transport and distribution of substances between the epithelial and stromal compartments [2]. Luminal epithelial cells are highly differentiated and represent the most frequent cell type both in normal and in hyperplastic epithelium forming the prostatic exocrine compartments, which secrete proteins such as the prostate specific antigen (PSA) and prostatic acid phosphatase (PAP) [3]. However, the basal cells are relatively undifferentiated, not showing secretory activity [4].

The prostate stroma is made up of a complex arrangement of stromal cells and extracellular matrix associated to growth factors; regulatory molecules; and restructuring enzymes, which lead to general biological signs and have mechanical influences on the epithelial cells, apart from being considered an important morphogenesis and maturation regulator of the gland [5]. The fibroblasts and smooth muscle cells are important cell types of the prostatic stroma, which synthesize structural and regulatory components of the extracellular matrix. The extracellular matrix is a network of fibrillar proteins; adhesive glycoproteins; and proteoglycans and is a reservoir of active and latent growth factors [6]. Structural components such as collagen fibers and elastic fibers provide mechanical rigidity and flexibility to the tissue. Thus, stromal and extracellular matrix cell interaction creates a microenvironment that regulates the growth and functional differentiation of adjacent cells [7].

Prostate morphology and physiology has been analyzed due to pathological conditions that affect this organ. Among these, benign prostatic hyperplasia (BPH), high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN); and prostate cancer [8] can be highlighted. BPH is characterized by predominant stromal proliferation, and although there is an increase of the epithelium, the regional integrity of the gland is preserved [9]. On the other hand, prostate cancer is considered an epithelium disease and often extends itself beyond the normal limits of the organ [9]. HGPIN is clinically pointed out as being a precursor lesion of invasive cancer; however, the molecular mechanisms that support this transition are not yet fully known [10].

Senescence is one of the main etiological factors responsible for natural androgen depletion in men, and

occurrence of various prostatic diseases. However, it is not clear how the mechanism is signalized in the prostate.

Thus, the aim of this study is to characterize the structural, the ultrastructural and proliferative aspects of the peripheral prostatic zone in the elderly men with and without diagnoses of prostatic lesions and with potential precursors of prostate cancer.

## *MATERIALS AND METHODS*

### *Human Samples and Tissue Preparation*

Sixty prostatic samples were obtained from 60 to 90-year-old patients (mean 63 years) with and without prostatic lesions hospitalized in the teaching Hospital of the School of Medicine, University of Campinas (UNICAMP). Fifteen prostatic samples were obtained from necropsied patients without diagnosis of prostatic or other urological diseases. The samples were obtained from the parasagittal midline of the posterior surface of the prostatic peripheral zone. From these samples only areas with normal glands were included for the study.

In addition, another forty-five prostatic samples were taken from the prostate of patients submitted to retropubic radical prostatectomy in a period from November 2008 to June 2009. The surgical specimens were whole-mount processed and totally embedded. A mean of 32 paraffin blocks (range 10 to 56 blocks) were processed, and 6 $\mu$ m sections from each block were stained with hematoxylin and eosin. Areas of benign prostatic hyperplasia (BPH), high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN), and Gleason 3+3=6 prostatic carcinoma (PC) were diagnosed according to morphological criteria [11] by a senior uropathologist (AB).

The prostatic samples were divided into four groups (15 samples per group): from the autopsied patients the Standard Group (no lesions) and from the patients submitted to prostatectomy the BPH Group, the HGPIN Group, and the PC Group. The samples were submitted to morphometrical, structural, ultrastructural analyses in addition to cellular apoptosis and proliferative analyses.

Ethical permission was obtained from the Research Ethics Committee of the School of Medicine, University of Campinas/UNICAMP (number 0094.0.146.000-08).

### *Light Microscopy*

Prostatic samples from 5 patients in each group for histological analysis, fixed by immersion in Bouin's solution, embedded in paraplast (Paraplast Plus, Brazil), cut into 5- $\mu$ m thick sections and submitted to the following staining procedures: Hematoxylin-Eosin [12] Ammoniacal silver [12], Masson's trichrome [13] and Weigert's Resorcin-Fucsin. The slides were photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope.

### *Transmission Electron Microscopy*

Samples of the prostatic peripheral zone were collected from 5 patients in each group were fixed with Karnovsky's solution. Next, the samples were immersed in cacodylate buffer and 1% osmium tetroxide for 1 hour. After that, all the material was embedded in resin (Polysciences, Niles, IL), cut with an ultramicrotome (Ultracult UCT 020 Leica), mounted on copper grids (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), and counterstained with uranyl acetate and lead citrate. The specimens were then examined and photographed under a LEO 906 transmission electron microscope.

### *Morphometrical Procedures*

Prostatic samples, from 5 patients in each group were used for morphometrical analyses, the same used for light microscopy.

Cellular, cytoplasm and nuclear areas were measured (10 fields per sample were randomly taken), using  $\times 100$  magnification. To determine epithelial and stromal areas, ten fields per sample were randomly taken, using  $\times 20$  magnification.

So as to determine autophagic and secretory vesicle areas, electronmicrographs of the 5 patients in each group, taken with a LEO 906 transmission electron microscope, were used. Ten cells from each sample per group were measured and the final magnification electronmicrographs were measured using the following proportion:  $\times 3597 \times 3.5$ . The cells used were those which presented accurate limits, basal membrane and cellular apex.

The different parameters were measured using the NIS-Elements: Advanced Research (Nikon, Tokyo,

Japan) computerized image analysis system.

#### *Detection of apoptosis and determination of the apoptotic index*

Prostatic samples from 5 patients were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde and processed for DNA fragmentation by means of a fluorescein apoptosis detection system (Promega, Madison, WI, USA). The apoptotic nuclei were identified using a Nikon TS-100 microscope equipped for fluorescence (DXM 1200F, Nikon, Tokyo, Japan), in addition to Feulgen's reaction. The sections were subjected to hydrolysis with 4N HCl for 75 min and then treated with Schiff's reagent for 40 min., for Feulgen's reaction. After washing, the sections were dehydrated and mounted on slides. Ten microscopic fields, with a total area of 90304.7  $\mu\text{m}^2$ , were randomly taken and analyzed per sample, resulting in 50 fields per group, using a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope with a  $\times 100$  objective. The apoptotic index was determined by dividing the number of apoptotic nuclei by the total number of nuclei found in the microscope field. Apoptotic nuclei were identified by the characteristic pyknosis and/or nuclear fragmentation.

#### *Immunolabeled Ki-67 and determination of the proliferative index*

Prostatic samples from 5 patients, the same used for light microscopy, were taken and cut into 5  $\mu\text{m}$  thick sections. Antigens were retrieved by boiling the sections in a 10 mM citrate buffer, pH 6.0, in a microwave oven. After that, the sections were incubated in 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 15 min to block endogenous peroxidase. Nonspecific binding was blocked by incubating the sections in a blocking solution for 1h at room temperature. Primary *rabbit* AB-9260 (Chemicon International, USA) for the Ki-67 antibody was diluted in 1% BSA (1:50) and applied to the sections. The Envision HRP Kit (Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA) was used to visualize the bound antibody. Secondary labeled polymer from the Envision HRP Kit (Dako) was applied for 40 min. at room temperature. Peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen kit from Envision HRP Kit (Dako) for 10 min. Sections were lightly counterstained with methyl green dehydrated in an increasing ethanol series and xylene, mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) and photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope. Each section was evaluated for the presence of brown DAB precipitate

which indicates antibody binding.

The proliferative index was determined by Ki-67 immunolocalization in 5 patients in different groups. Ten fields were taken at random and measured per sample, resulting in 50 fields per group with  $\times 100$  magnification, representing a total area of  $90304.7 \mu\text{m}^2$  and the total number of cells was expressed by means of percentage.

#### *Statistical Analyses*

Mean data for cellular, nuclear, cytoplasmatic, epithelial, stromal areas and secretory and autophagic vesicle areas, apoptotic index and proliferative counting were compared among groups and analyzed statistically by means of analysis of variance and Tukey multiple range test, with the level of significance set at 5% [14].

## *RESULTS*

### *Transmission Electron and Light Microscopies and Morphometrical Analyses*

#### *Standard Group (without structural changes)*

The prostatic peripheral zone showed different sizes and folded mucosa of the acini (Figures 1a and 1b). The secretory epithelium presented a secretory layer of columnar cells and another one of basal cells (Figures 1a, 1b, 2a). Flattened rough endoplasmic reticulum cisternae and developed Golgi complex in the supranuclear and perinuclear were observed in the cellular cytoplasm (Figures 2c, 2d). Also, secretory vesicles with granules, showing different electron density in the apical cytoplasm were presented (Figures 2b, 2c), representing a cytoplasmatic area which was 2.8 times greater than those found for digestive vacuoles (Graph 1). The luminal surface had short and sparse microvilli (Figure 2b). The prostatic stroma showed thin collagen fibers underlying the secretory epithelium and intermingled with smooth muscle cells, and reticular and elastic fibers underlying the epithelium around the acini (Figures 1c, 1d, 2d). The muscular layer presented long smooth fibers underlying the epithelium (Figure 2d). The stromal area was close to 6.7% greater than that found for the epithelial area (Table 1).

### *HGPIN Group*

High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) was verified in the prostatic peripheral zone, characterized by cytological atypia with voluminous and prominent nucleoli with different intensity (Figures 1e, 1f, 2e, Table 1). Basal cells were identified (Figures 1e, 2e). Occasional regions of dilated rough endoplasmic reticulum and Golgi complex cisternae were observed in the cellular cytoplasm (Figures 2f, 2g). The secretory vesicle area was 1.3 times greater than those found for digestory vacuoles; however this same area was significantly reduced if compared to the Standard group (Figures 2f, 2g, Graph 1). Ruptured mitochondrial cristae were observed (Figure 2f), in addition to cellular cytoplasm vacuolization (Figures 2f, 2g). Short and sparse microvilli covered the cellular surface.

Hypertrophied stroma with increased collagen fibers were verified, not only placed underlying the epithelium but also in the entire stromal area (Figures 1e, 1f, 2g). The stromal area was close to 5.0 times greater than the epithelial area (Table 1) Increased reticular and elastic fibers showing ondulated form were verified in the all glandular stroma (Figures 1g, 1h).

### *PC Group*

The prostatic peripheral zone showed infiltrative adenocarcinoma characterized by peaked neoplastic acini in addition to a lack of basal layer and occurrence of periacinar spacing (Figures 1i, 1j, 2h, 2i). The cell nuclei which covered the neoplastic acini were voluminous, showing an oval shape and prominent nucleoli, however the nuclear area was significantly smaller than that found in the HGPIN group and greater than those found in the Standard and BPH groups (Figures 2h, 2i, 2j and Table I). Occasional organelles and secretory vesicles were observed in the cellular cytoplasm (Figure 2i, 2j). The secretory vesicle areas were significantly smaller than those found for HGPIN, Standard and BPH (Table 1). The digestory vesicles showed an inverse relation when compared to secretory vesicles (Graph 1). Amylaceous bodies were verified in the neoplastic acinus lumen (Figures 1j, 2i). The basal lamina showed discontinuous regions (Figure 2i). Lack of microvilli were verified in the cellular surface (Figures 2h, 2i).

Moderate stromal hypertrophy was observed with an amount of reticular, elastic and collagen fibers

close to those found for the Standard group (Figures 1i, 1j, 1k, 1l, 2j). The stromal area increased in relation to the epithelial one (table I). Nevertheless, this rate increased quantitatively in comparison to the Standard group and was significantly smaller in relation to HGPIN and BPH groups (Table 1). The smooth muscle fibers were dispersed and with spinous features (Figures 1i, 1j, 2i). Also, occurrence of inflammatory cells in the stroma was verified (Figure 1j).

#### *BPH Group*

Well limited hyperplastic nodules were verified in the peripheral zone, characterized by acinus showing an external straight line and internal papillomatosis (Figure 1m).

The secretory epithelium presented tall columnar cells with basal nuclei and clear nucleoli in addition to basal cell layer (Figures 1n, 2k). The nuclear area was greater, quantitatively in relation to the Standard group and significantly smaller in comparison to the HGPIN and PC groups (Table 1). Dilated rough endoplasmic reticulum and Golgi cisternae were verified (Figure 2l). The secretory vesicle area was not significantly different from that found for the HGPIN group, however this same area was smaller than that found for the standard group and greater than that found for the PC group (Figures 2k, 2l and Graph 1) On the other hand, the digestory vacuole area was greater than that found for the HGPIN and Standard groups, in terms of number and significantly smaller than that found for the PC group (Figures 2l, 2m and Graph 1). Rare microvilli covered the cellular surface (Figure 2k).

Hyperplastic and hypercellular stroma with a great amount of collagen, reticular and elastic fibers were observed both underlying the epithelium and intermingled with the smooth muscle cells (Figures 1n, 1o, 1p, 2m). Increased stromal area was verified in relation to the epithelial area (Table 1). Folded sarcolemma was seen in the smooth muscle cells, characterizing spinous features (Figure 2m).

#### *Detection of apoptosis and determination of the apoptotic index*

The apoptotic index significantly increased in the HGPIN and BPH groups in relation to Standard and PC groups (Figure 3i). Nevertheless, the PC group showed an average apoptotic index which was significantly

greater than those found for the standard group (Figures 3b, 3d, 3f, 3h).

#### *Immunolabeled Ki-67 and determination of the proliferative index*

The proliferative response was significantly greater in HGPIN than those found for PC, BPH and Standard groups, which showed decreasing values for this variable (Figures 3a, 3c, 3e, 3g and 3i).

#### *DISCUSSION*

The study herewith demonstrated that the prostatic stroma occupied the great majority of the glandular area in elderly men. In addition, in the elderly men who had characterized prostatic diseases the changes was much intensified, specially, in the HGPIN and PC groups. The group with HGPIN showed cytological atypia characterized by large nuclei and prominent nucleoli, presence of basal layer of epithelial cells, which were responsible for the integrity of the architectural arrangement and basal membrane. A decrease of secretory vesicles in relation to normal and hyperplastic prostate tissue as well as an increase in the proliferative process could also be seen. However, the PC group showed absence of basal layer and basal membrane rupture points, apart from strong cellular atypia and architectural disorder. The BPH group was characterized by hypercellularity and increased fibrillar elements in the stroma as well as an increase of proliferation. Also, other morphological changes which were in common such as disorganization of organelles involved in the secretory process; stromal hyperplasia; presence of inflammatory cells in the prostatic stroma; smooth muscle cell with secretory phenotype; and increased apoptotic process were identified in the HGPIN, PC and BPH groups.

HGPIN is an abnormal differentiation and proliferation process, so that the layer of basal cells loses its proliferation capacity, which is carried out by the luminal secretory cells, characterizing typical pre-malignant disorder [15]. All genotypic and phenotypic information showed HGPIN to be a precursor lesion of invasive adenocarcinoma [16].

In adenocarcinoma, the loss of basal cell differentiation is a critical point in the progression of invasive cancer and is probably related to the inability of transformed cells to produce basal membrane proteins [17]. The causal association of HGPIN with adenocarcinoma is based on the fact that their prevalence increases as the

patient gets older and that HGPIN may precede the onset of prostate cancer [16].

The prostatic stroma is a fundamental compartment in the function of the gland because of its role in maintaining the prostate homeostasis and its morphological and-physiological involvement in diseases such as benign prostatic hyperplasia (BPH) and cancer [18]. Based on morphological, functional and embryology aspects, epithelium-stromal interaction may be considered a single functional unit [19]. The alterations in the normal homeostatic stromal–epithelial interaction may play a role in the pathogenesis of the prostate [20]. The alterations of stromal microenvironment are the initial steps in the development and progression of prostate cancer [21]. The increase in the production of extracellular matrix, especially collagen; growth factors; and reorganization of stromal components is known as reactive stroma, creating a microenvironment which can cause tumor growth [22]. Reactive stroma alters the stromal-epithelium interaction benefiting the expansion of genetically altered epithelial cells [23]. An event that frequently occurs during carcinogenesis is the change in stromal cell composition, which involves the replacement of smooth muscle cells with a fibroblast population, due to changes in the differentiation of muscle cells or the recruitment of fibroblasts to tumor location [21]. Different authors observed altered phenotype from smooth muscle cells in remodeling tissues, in response to various injuries; and in prostate carcinomas [24]. Thus, not only the hypertrophy of the muscle layer and the synthetic phenotype acquired by smooth muscle cells, but also the accumulation of collagen, suggest that these cells have an active role in the constant remodeling of the extracellular matrix that is possibly occurring in the stroma of the prostatic peripheral areas in senile men with HGPIN, PC and BPH.

Although proliferation and apoptosis processes were greater due to the prostate lesions, the proliferative process was greater representing a 4.2 time increase compared to a 2.3 time increase of the apoptosis process. Also, it was found that the ratio between proliferation and apoptosis was 1.4 in elderly healthy men and 2.0 in men with BPH, 2.6 in men with HGPIN and 3.0 in men with PC.

Apoptosis is a physiological active cellular mechanism, which occurs during the processes of development and restructuring tissue [25]. This is characterized by morphological changes that include loss of plasma membrane and condensation of the cytoplasm and the nucleus [26]. This mechanism ensures the physiological organization of tissue in the development and cellular balance of the organ in adults and is often

associated with the process of tissue involution [27]. Thus, the mechanism is the balance between proliferation and cell death [26]. The cell survival of many tissues depends on a constant supply of growth factors and/or hormones. The prostate is an androgen-regulated gland. The lack of testosterone leads to rapid tissue involution due to apoptotic elimination of glandular cells [28]. In hormone-dependent tumors, such as prostate cancer, the induction of programmed cell death due to androgen ablation has been associated with tumor regression [29].

Age is indicated as a cumulative event due to the interaction between intrinsic and extrinsic factors in the development of hyperplasia. Intrinsic factors such as extracellular matrix, smooth muscle and epithelial cells, as well as environmental factors, are known to influence the differentiation and morphogenesis of the prostate gland [30].

The blocking of cell replication classified by senescence is identified as being a possible intrinsic mechanism in the defense against epithelial cancer. In this mechanism, the cells stop replication, but they remain metabolically active. The change from senescent cells influences adjacent cells, such as what happens to senescent fibroblasts, which interfere in the proliferation increase and tumorigenicity of epithelial cells [6]. These changes in the architecture of the tissue in the senescence have been considered as a potential factor to harmful effects in the prostate. Paradoxically, although there is evidence that the aging cell can develop mechanisms to prevent malignant transformation by blocking the replication of carcinogenic events [31], new studies suggest that senescent cells can alter the glandular microenvironment, promoting carcinogenesis in non-senescent epithelium [6]. Thus, the aging first inhibits the development of cancer, but later senescent cells change the microenvironment causing epithelial cancer [32].

Therefore, it can be concluded that the prostatic lesions in elderly men demonstrated disturbance in the proliferation/apoptosis rate, indicating a prevalence of the proliferative process. Moreover, it can also be seen that the imbalance in prostatic stroma-epithelium interaction was a harmful feature in the elderly men as a result of structural changes, which are crucial factors for the development and progression of carcinogenesis. Finally, it can also be said that these structural changes have distinct intensities in benign prostatic hyperplasia, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic cancer.

The structural changes observed in senescence as well as in all the prostatic diseases verified in elderly

men, such as high-grade prostatic intraepithelial neoplasia; nodular hyperplasia; and adenocarcinoma; effectively jeopardized the cellular organelles involved in the secretory process of the organ.

Acknowledge: STATE OF SÃO PAULO RESEARCH FOUNDATION (FAPESP 2008/53468-1)  
NATIONAL COUNCIL FOR SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL  
DEVELOPMENT (CNPQ 300068/2008-5)

#### REFERENCES

1. Cavazos F. Fine structure and functional correlates of male accessory sex glands of rodents In Washington Roy O. Greep, Edwin B. Astwood Handbook of Physiology. American Physiological Society 1975, 353-381.
2. Garraway LA, Lin D, Signoretti S et al. Intermediate basal cells of the prostate: In vitro and in vivo characterization. *The Prostate* 2003, 55: 206-218.
3. Taylor RA, Risbridger GP. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation* 2008, 76:671-68.
4. Mcneal JE. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988, 12: 619-633.
5. Dean JP, Nelson PS. Profiling influences of senescent and aged fibroblasts on prostate carcinogenesis. *British Journal of Cancer* 2008, 98: 245-249.
6. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.* 2001, 166: 2472-2483.

7. Cornell RJ, Rowley D, Wheller T et al. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology* 2003, 61: 870-875.
8. Leav I, Lau KM, Adams JA 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, 159: 79-92.
9. Droller MJ. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br J Urol.* 1997, 79: 42-52.
10. Majumdar PK, Grizansio C, O'Connell F et al. A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* 2008, 14: 146-155.
11. Mostofi, FK, Price EB Jr. Tumors of the Male Genital System, Atlas of Tumor Pathology, Second Series, Fascicle 8. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology 1973, 202-217.
12. Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AG. Manual Para Histologia Normal e Patológica. Edart-Edusp, 1976, São Paulo, 225.
13. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani R. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem.* 1979, 11: 447-455.
14. Zar HA, Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR. Mild therapeutic hypothermia for postischemic vasoconstriction in the perfused rat liver. *Anesthesiology.* 1999, 90: 1103-1111.
15. Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic

- human prostate. *Prostate* 1994, 24: 114-118.
16. Bostwick DG, Liu L, Brawer MK et al. High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Rev. Urol.* 2004, 6: 171-179.
  17. Bonkhoff H, Fixemer T, Remenberg K. Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate* 1998, 34: 251-258.
  18. Zhang YH, Nojima S, Nakayama H et al. Characteristics of normal stromal components and their correlation with cancer occurrence in human prostate. *Oncol Rep* 2003, 10: 207-211.
  19. Hayward SW & Cunha GR. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am.* 2000, 38: 1-14.
  20. Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 2002, 70: 473-485.
  21. Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ et al. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003, 107: 1-10.
  22. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ et al. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin. Cancer. Res.* 2002, 8: 2912-23.
  23. Hayward SW, Wang Y, Cao M et al. Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res.* 2001, 61: 8135-8142.

24. Fávaro WJ, Cagnon VH. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue Cell* 2006, 38: 311-23.
25. Kerr M, Lee A, Wang PL. Detection of insulin and Insulin-Like Growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. *Biochem. Pharmacol.* 1995, 49: 1521-1523.
26. Sohn BH, Moon HB, Kim TY et al. Interleukin-10 up-regulates tumour-necrosis-factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene expression in mammary epithelial cells at the involution stage. *Biochem J.* 2001, 360: 31-38.
27. Rauch F, Polzar B, Stephan H et al. Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J Cell Biol.* 1997, 137: 909-923.
28. Kyprianou N, Isaacs JT. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 1988, 122: 552-562.
29. Staack A, Kassis AP, Olshen A et al. Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue in vivo. *Prostate* 2003, 54: 212-219.
30. Zenzmaier C, Untergasser G, Berger P. Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. *Exp Gerontol.* 2008, Artigo Aceito para Publicação.
31. Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A et al. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci.* 2005, 118: 485-496.

32. Sprenger CC, Plymate SR, Reed MJ. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. British Journal of Cancer 2008, 98: 250-255.

### **FIGURE LEGENDS**

*Figure 1:* Photomicrographs of the prostatic peripheral zone from Standard (a, b, c, d), PIN (e, f, g, h), PC (i, j, k, l) and BPH (m, n, o, p) groups. (a) Epithelium with secretory columnar and basal cells; *inset:* secretory epithelial cell nucleus (*N*), basal cells (*arrow*) with flattened nuclei. (b) Thin collagen fibers (*Col*) underlying the epithelium and among smooth muscle cells. (c), (d) Reticular (*Rf*) and elastic (*Ef*) fibers underlying the epithelium. (e) Prostatic intraepithelial neoplasia (*PIN*); *inset:* PIN focus, voluminous cellular nuclei (*N*), and basal cells (*arrow*). (f) Secretory epithelium with PIN foci (*arrows*), increased collagen fibers (*Col*) and smooth muscle cells. (g), (h) Increased reticular (*Rf*) and elastic (*Ef*) fibers. (i) Peaked neoplastic acini (*asterisks*) with infiltrative feature, periacinar space (*arrows*); Irregular smooth muscle cells; *inset:* neoplastic acini with increased nuclei (*arrow*). (j) Neoplastic acini (*arrows*); Increased collagen fibers (*Col*), smooth muscle fibers, amilaceous body (*asterisk*) and inflammatory cells (*Ic*). (k), (l) Disorganized and increased reticular (*Rf*) and elastic (*Ef*) fibers. (m) Benign prostatic hyperplasia (*BPH*) with acinus showing an external straight line and internal papillomatosis. (n) Epithelium with secretory columnar and basal cells (*arrow*); hypercellular stroma with increased collagen fibers (*Col*). (o), (p) Hyperplastic stroma with increased reticular (*Rf*) and elastic (*Ef*) fibers. *a – p:* *Ep* – epithelium, *L* – lumen, *Smc* – smooth muscle cell and *St* – stroma.

*Figure 2:* Electronmicrographs of the prostatic peripheral zone from standard (a, b, c, d), PIN group (e, f, g), PC (h, i, j) and BPH (k, l, m) groups. (a) Columnar cells with basal nuclei and clear nucleoli (*Nu*); Basal cells (*Bc*). Stroma (*St*). (b) Often secretory vesicles; short and scattered microvilli (*Mv*).

(c) Flattened and parallel Golgi cisternae (*arrow*) with secretory vesicles. (d) Rough endoplasmic reticulum cisternae (*RER*). Basal lamina (*arrow*); Stroma with collagen fibers (*Col*) underlying the epithelium and among smooth muscle cells (*Smc*) and fibroblast (*Fb*). (e) Prostatic intraepithelial neoplasia (*PIN*); Basal cells (*Bc*). (f) Dilated Golgi cisternae (*arrow*); *inset*: Ruptured mitochondrial cristae (g) Dilated rough endoplasmic reticulum cisternae (*RER*). Digestory vacuoles (*asterisk*); Basal lamina (*arrow*); Increased collagen fibers (*Col*) distributed among smooth muscle cells (*Smc*). (h) Neoplastic cells with increased nuclei (*arrow*). (i) Neoplastic nuclei (*arrow*); Amilaceous bodies (*Ab*); Interrupted basal lamina (*asterisk*); Smooth muscle cells (*Smc*) showing irregular feature and collagen fibers (*Col*). (j) Neoplastic cell with increased nuclei and rare cytoplasm (*arrow*); Increased collagen fibers (*Col*). (k) Columnar cells. (l) Dilated Rough endoplasmic reticulum cisternae (*Rer*) and Golgi (*arrow*). Digestory vacuoles (*asterisk*). (m) Basal cells (*Bc*); Digestory vacuoles (*arrow*) in the cellular cytoplasm; Increased collagen fibers (*Col*) and fibroblast (*Fb*) and smooth muscle cells (*Smc*); *inset*: smooth muscle cells showing spinous feature (*Smc*). *a – m*: *L* – lumen, *M* – mitochondria, *N* - nucleus, *St* – stroma e *Vs* – secretory vesicles.

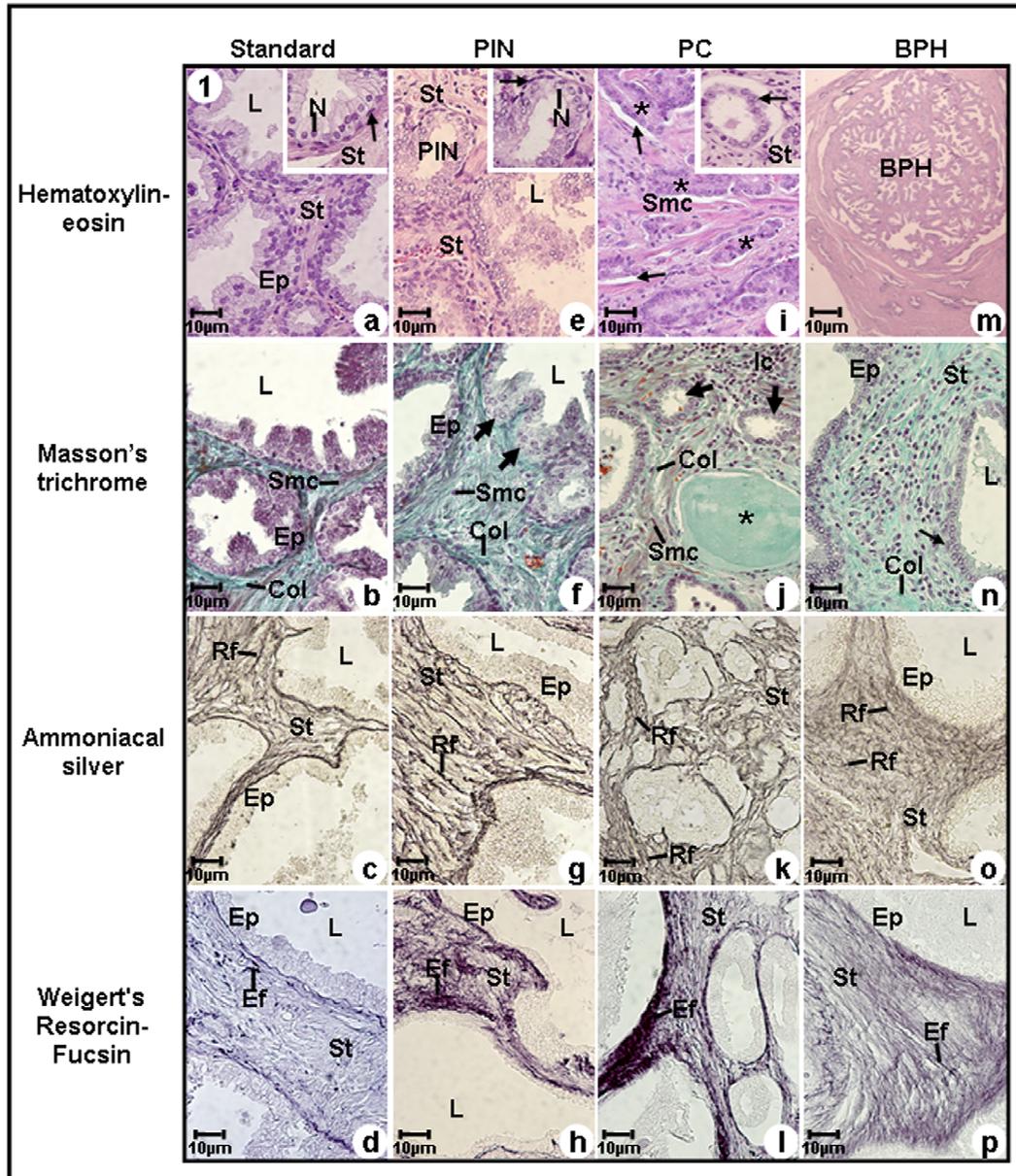
*Figure 3*: Immunolabeled Ki-67 and apoptotic index of the prostatic peripheral zone from Standard (3a, 3b, 3i), PIN (3c, 3d, 3i) PC (3e, 3f, 3i) and BPH (3g, 3h, 3i) groups. (a) Weak Ki-67 immunoreactivity (*arrows*) in the secretory epithelial and stromal cells. (b) Weak DNA fragmentation (*arrows*) in the secretory epithelial cells. (c) Intense Ki-67 immunoreactivity (*arrows*) in the secretory epithelial and stromal cells. (d) Intense DNA fragmentation (*arrows*) in the secretory epithelial cells. (e) Intense Ki-67 immunoreactivity (*arrows*) in the neoplastic acini (*asterisks*) and stromal cells. (f) Moderate DNA fragmentation (*arrows*) in the neoplastic acini (*asterisks*). (g) Moderate Ki-67 immunoreactivity (*arrows*) in the secretory epithelial and stromal cells. (h) Moderate DNA

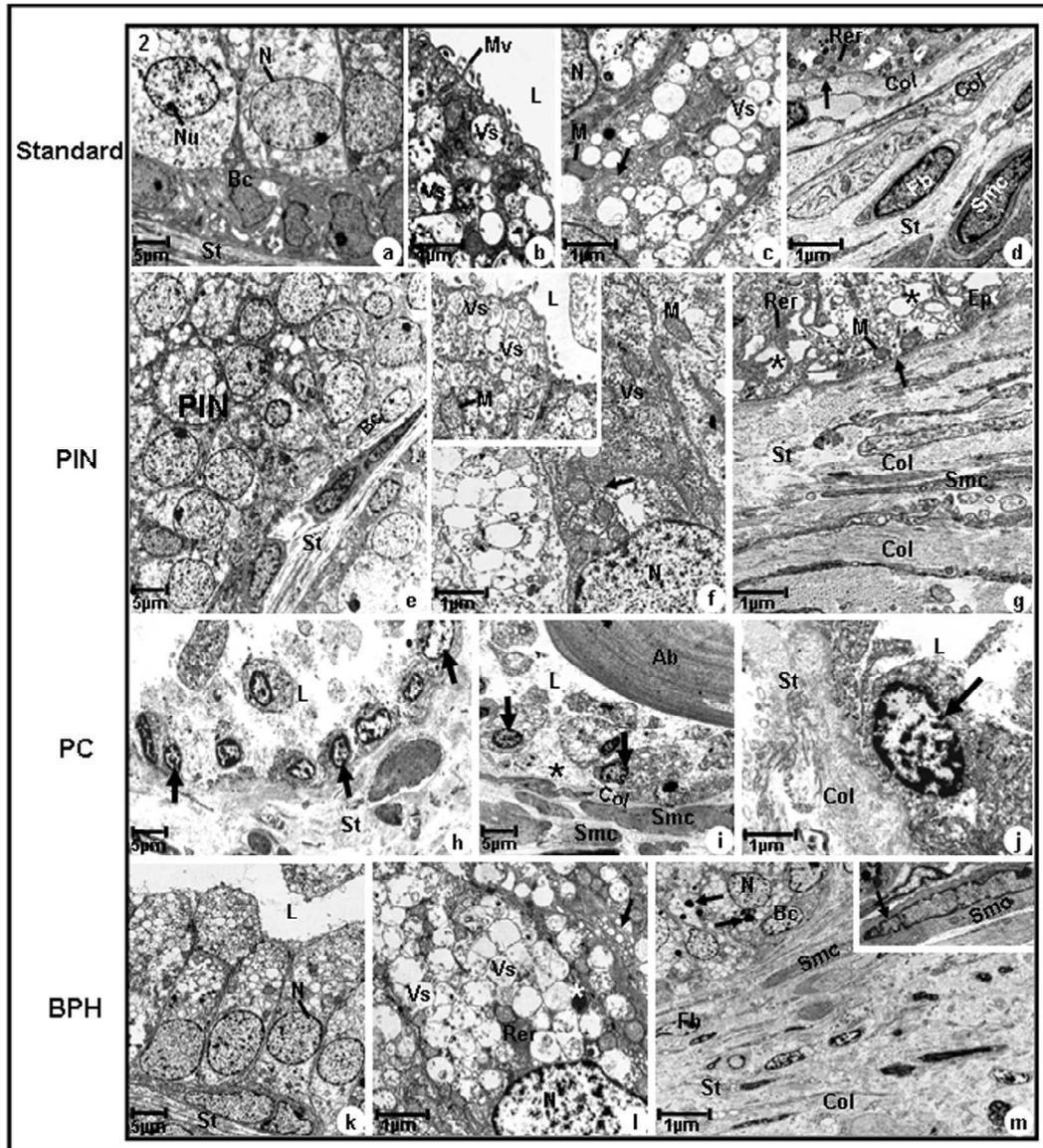
fragmentation (*arrows*) in the secretory epithelial cells. (i) Percentage of immunolabeled Ki-67 and apoptotic index. *a – h*: *Ep* – epithelium, *L* – lumen and *St* – stroma.

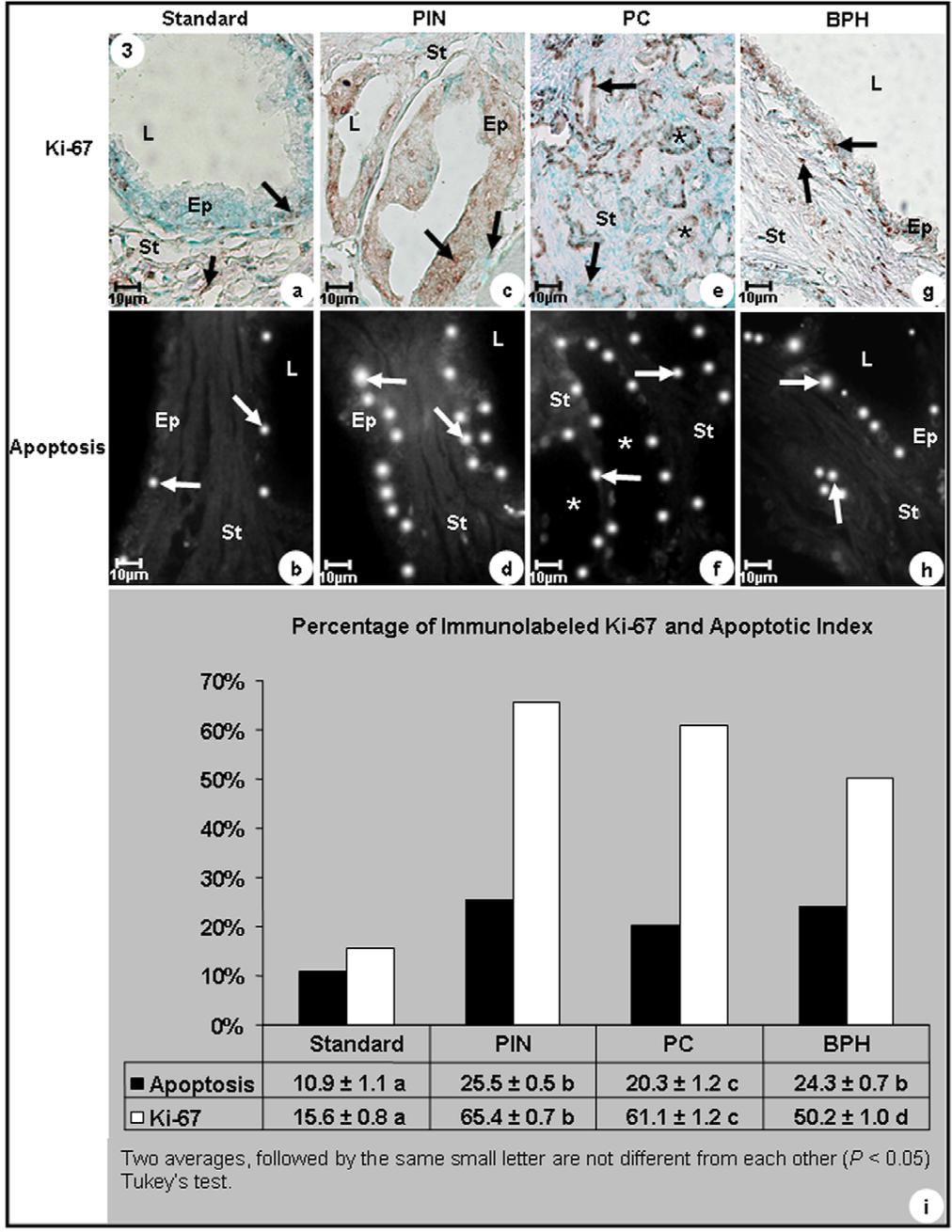
*Table I:* Mean and standard deviation of the nuclear, cytoplasmatic, epithelial and stromal areas ( $\mu\text{m}^2$ ) of the prostatic peripheral zone from different groups

Variables	Groups			
	Standard	BPH	PIN	PC
Stromal Area	223017 $\pm$ 3968 <b>a</b>	277483 $\pm$ 6834 <b>b</b>	255012 $\pm$ 40989 <b>b</b>	238084 $\pm$ 61390 <b>a</b>
Epithelial Area	33346 $\pm$ 19457 <b>a</b>	6632.5 $\pm$ 4618,5 <b>a</b>	50259 $\pm$ 123509 <b>a</b>	25024 $\pm$ 32941 <b>a</b>
Nuclear Area	139.32 $\pm$ 20.8 <b>a</b>	195.28 $\pm$ 42.1 <b>a</b>	1073.4 $\pm$ 167.5 <b>b</b>	288.2 $\pm$ 29.5 <b>c</b>
Cytoplasmatic Area	1846 $\pm$ 485.3 <b>a</b>	436.9 $\pm$ 105.9 <b>b</b>	2024 $\pm$ 455.7 <b>a</b>	281.8 $\pm$ 112.8 <b>bc</b>

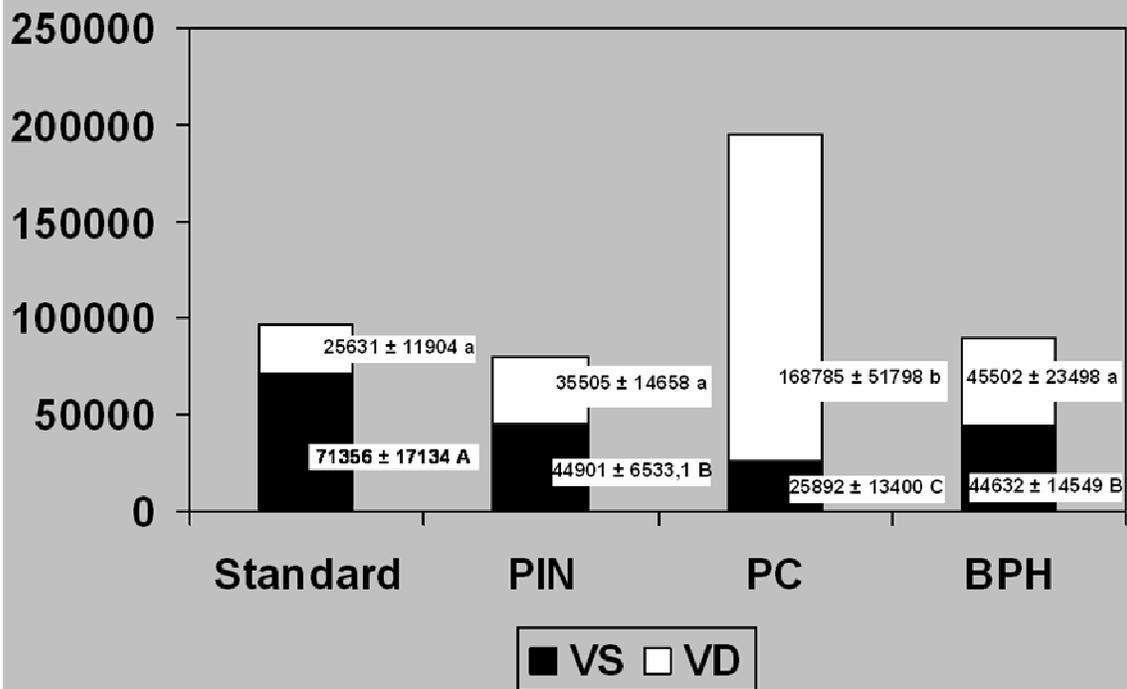
Different lowercase letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between the groups after Tukey's test.







**Graph 1:** Mean and standard deviation of the areas ( $\mu\text{m}^2$ ) of the secretory vesicle (VS) and digestory vacuoles (VD) of the epithelial cells of the prostatic peripheral zone from four different groups.



Two averages, followed by the same small letter are not different each other ( $P > 0.05$ ) Tukey's test.

Two averages, followed by the same capital letter are not different each other ( $P > 0.05$ ) Tukey's test.

**“Senescência e Doenças Prostáticas: Caracterização dos Receptores Hormonais, IGFR-1, Metaloproteinases, Distroglicanas e Laminina”**

Hetzl AC<sup>1</sup>, Fávaro WJ<sup>1</sup>, Billis A<sup>2</sup>, Ferreira U<sup>3</sup>, Cagnon VHA<sup>1</sup>

1 – Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

2 – Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

3 - Departamento de Urologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

**Título Resumido: Próstata de Homens Senis**

Palavras-chave: Próstata, Senescência, IGFR-1, Distroglicana, Hormônios Esteróides, Metaloproteinases.

Endereço para correspondência: Valéria H. A. Cagnon PhD, Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brasil. Telefone: (19) 3521-6103. Fax: (19) 3289-3124. E-mail: [quitete@unicamp.br](mailto:quitete@unicamp.br)

## RESUMO

A senescência é fator determinante para a ocorrência de alterações na biologia molecular da próstata, considerando-se tanto o desequilíbrio hormonal quanto o das interações epitélio-estroma. Assim, os objetivos desse estudo foram caracterizar e correlacionar as imunoreatividades das distroglicanas  $\alpha$  e  $\beta$  (DG $\alpha$ , DG $\beta$ ), receptores androgênicos (AR), receptores estrogênicos  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP2, MMP9), laminina e fator de crescimento homólogo à insulina (IGFR-1) nos compartimentos epitelial e estromal da zona periférica prostática de homens senis, com e sem diagnóstico de lesões prostáticas. 60 amostras das zonas periféricas prostáticas provenientes de necrópsias ou prostatectomias de homens (60-90 anos), as quais foram divididas em 4 grupos (15 amostras cada): Grupo Senil (sem lesões prostáticas); Grupo Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP); Grupo Hiperplasia Benigna Prostática (HBP); Grupo Câncer (CA). O diagnóstico das lesões prostáticas baseou-se em critérios morfológicos e por imunomarcção para citoqueratina de alto peso molecular (HMW 34 $\beta$ E12). Os resultados foram avaliados por análises imunohistoquímicas e Western Blotting. Os resultados mostraram que a imunolocalização para AR se manteve igual em todos os grupos estudados, com predominância da imunolocalização no compartimento epitelial. Já o ER $\beta$  foi preferencialmente localizado no compartimento epitelial, sendo ausente no compartimento estromal do grupo CA. A imunolocalização do ER $\alpha$  foi preferencialmente no compartimento epitelial dos grupos estudados, sendo intensa nos grupos CA e NIP em relação aos demais. Também, intensa imunoreatividade para IGFR-1, MMP2 e MMP9 foi verificada nos grupos CA e NIP em relação aos demais grupos. As imunolocalizações para DG $\alpha$ , DG $\beta$  e Lam  $\alpha$ 3 foram mais fracas nos grupos CA e NIP em relação aos grupos HBP e Senil. Assim, pode-se concluir que o desequilíbrio da interação epitélio-estroma prostático causado pelas mudanças estruturais é fator decisivo para o desenvolvimento e progressão da carcinogênese na senescência. Ainda, a diminuição dos níveis protéicos do complexo das DGs e o aumento dos níveis das MMPs estão associados com a gravidade da lesão prostática e tem importante papel na manutenção do fenótipo maligno, tendo sido evidenciado de forma potencializada de acordo com o comprometimento da lesão. A ocorrência de IGFR-1 sinalizou o grau de comprometimento glandular e a perda da imunolocalização da laminina propiciou a progressão das lesões. Também, a localização diferencial dos receptores esteróides nas diferentes lesões prostáticas entre os compartimentos epitelial e estromal de homens senis certamente indicou diferentes sinalizações

parácrinas para a dinâmica prostática, indicando ação diferencial desses receptores a partir dos compartimentos prostáticos e apontaram a importância das vias estrogênicas nos mecanismos de ativação dessas alterações. Finalmente, a interação do IGFR-1 com as MMP2 e MMP9 apontaram a relevância dessas moléculas nas investigações e tratamentos das doenças prostáticas.

## **INTRODUÇÃO**

A senescência é um dos principais fatores etiológicos responsáveis pela depleção androgênica natural em homens sendo o período mais frequente de ocorrência de doenças prostáticas, como a hiperplasia benigna prostática (HBP), a neoplasia intraepitelial prostática (NIP) e o câncer<sup>1,2</sup>.

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células prostáticas são reguladas por andrógenos<sup>3,4</sup>. Outros hormônios, como os estrógenos, também atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais do órgão quanto as alterações patológicas<sup>5,3</sup>. Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, com redução da produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos<sup>6</sup>.

Além disso, outros elementos como polipeptídeos e os fatores de crescimento homólogos à insulina (IGFs) são agentes mitogênicos importantes para o funcionamento da próstata<sup>7</sup>. Os IGFs na próstata são produzidos pelas células estromais e atuam como fatores de crescimento parácrinos no epitélio glandular normal, através de seus receptores do tipo 1 (IGFR-1)<sup>7</sup>. Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que a elevação dos níveis séricos de IGF-1 constitui potente fator de risco para o início da hiperplasia benigna e da carcinogênese prostática<sup>7,8</sup>.

As distroglicanas (DGs) são proteínas integrais de membrana expressas por uma variedade de tecidos que interagem com proteínas extracelulares, na interface entre a membrana basal e a membrana celular, atuando na transdução de sinais e organização do citoesqueleto<sup>9</sup>. As DGs são formadas por duas subunidades,  $\alpha$  (extracelular) e  $\beta$

(transmembrana), que são codificados por um único gene<sup>9</sup>. Anormalidades na expressão das DGs interferem na interação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, sendo que o desequilíbrio dessa interação pode promover o aparecimento de carcinomas, como o prostático<sup>9,10</sup>.

Além das DGs, as metaloproteinases de matriz (MMPs) são um importante grupo de proteínas proteolíticas<sup>11</sup> (Kabashima et al., 2005), envolvidas na remodelação tecidual em diferentes condições conforme ocorre nos processos de invasão e metástases tumorais<sup>12,13</sup>. As MMPs 2 e 9 estão diretamente relacionadas às doenças prostáticas através da degradação da membrana basal<sup>14</sup>.

Dessa forma, dúvidas persistem quanto à interação entre os hormônios esteróides e a dinâmica de moléculas sinalizadoras dos eventos prostáticos durante a senescência. Assim, os objetivos desse estudo foram caracterizar, quantificar e correlacionar a imunoreatividade das moléculas MMP2, MMP9, DGs, Lam  $\alpha$ 3 e do receptor de IGF-1 com os receptores de hormônios esteróides nos compartimentos estromal e epitelial da zona periférica prostática de homens senis sem diagnóstico de lesão glandular e apresentando hiperplasia benigna, neoplasia intraepitelial prostática e câncer.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostras humanas e Procedimento Experimental**

No presente trabalho foram utilizadas 60 amostras de tecido prostático, provenientes de pacientes entre 60-90 anos de idade com e sem lesões prostáticas hospitalizados no Hospital de Clínicas da UNICAMP. Quinze amostras foram obtidas de pacientes necropsiados sem diagnóstico de doenças prostáticas ou urológicas. As amostras prostáticas foram coletadas da zona periférica (McNeal apud Blacklock, 1977) (Fig. 2A) e a divisão na face posterior, de basal para apical do órgão indica os pontos de retirada dos fragmentos glandulares (Figura 2B) (Modificado DE LA TAILLE et al; 2003). Dessas amostras somente as glândulas normais foram incluídas no estudo.

As outras 45 amostras prostáticas foram obtidas de pacientes submetidos à prostatectomia radical no período de novembro de 2008 à junho de 2009. Os espécimes cirúrgicos foram inclusos e processados como um todo. Uma média de 32 blocos de parafina foi processada (entre 10 a 56 blocos), e cortes de 6µm de cada bloco foram corados com hematoxilina-eosina. Áreas de hiperplasia benigna prostática (HBP), neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (NIP) e carcinoma prostático Gleason 3+3=6 (CP) foram diagnosticadas de acordo com critérios morfológicos (Mostofi & Price, 1973) por um uropatologista sênior.

As amostras prostáticas foram divididas em 4 grupos (15 amostras por grupo): grupo Senil (sem lesões prostáticas – pacientes autopsiados), grupo HBP, grupo NIP, e grupo CP. A seguir, as amostras foram submetidas às análises imunológicas e Western Blotting.

Todos os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (processo número 0094.0.146.000-08).

### **Imunomarcção dos Receptores Androgênicos (AR), Estrogênicos $\alpha$ e $\beta$ (ER $\alpha$ e ER $\beta$ ), IGFR-1, Distroglicanas $\alpha$ e $\beta$ (DG $\alpha$ e DG $\beta$ ), Metaloproteinasas de Matriz 2 e 9 (MMP2 e MMP9), Laminina $\alpha$ 3 (Lam $\alpha$ 3) e Citoqueratina de Alto Peso Molecular (HMW 34 $\beta$ E12)**

Amostras prostáticas de 5 pacientes de cada grupo foram coletadas e fixadas em solução de Bouin; inclusos em parafina e polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA) e seccionados com 5 µm de espessura no micrótomo (Hyrax M60, Zeiss, Alemanha). A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3% em metanol) por 15 minutos, com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%). Posteriormente, os antígenos AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , IGFR-1, DG $\alpha$ , DG $\beta$ , MMP2, MMP9, Lam  $\alpha$ 3 e HWM 34 $\beta$ E12 foram localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* AR-N20

(sc-816) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para AR, monoclonal *mouse* clone 1D5 (Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, USA) para ER $\alpha$ , policlonal *rabbit* 06-629 (Upstate, USA) para ER $\beta$ , policlonal *rabbit* N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para IGFR-1 $\alpha$ , policlonal *rabbit* H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para DG $\alpha$ , policlonal *rabbit* H-242 (sc-28535) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para DG $\beta$ , monoclonal *mouse* IM53 (Calbiochem, USA) para MMP2, monoclonal *mouse* IM37 (Calbiochem, USA) para MMP9, policlonal *rabbit* H-187 (sc-20143) (Santa Cruz Biotchenollogy) para Lam  $\alpha$ 3 e monoclonal *mouse* M0630 (Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, USA) para HMW 34 $\beta$ E12 diluídos (1:50) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O *kit* Envision HRP (Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, USA) foi usado para detecção dos antígenos. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kit* Envision (Dako) e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB). Para a contra-coloração destes foram utilizados verde metil (*Methyl Green*) e Hematoxilina de Harris. A intensidade da imunolocalização foi graduada como intensa (+++), moderada (++) e fraca (+)<sup>17</sup>.

### **Extração de Proteínas e Western Blotting**

Amostras prostáticas de 5 pacientes de cada grupo foram coletadas, pesadas e homogeneizadas em tampão de extração contendo 100 mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 10% (v/v) Triton X-100 and 10  $\mu$ l/ml de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Os extratos obtidos por centrifugação foram submetidos à determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.,USA). O correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 70 V por 3 horas. As membranas foram então bloqueadas com 3% BSA diluído por uma hora e incubadas com os anticorpos primários policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (Santa Cruz Biotchenollogy, USA) para AR,

monoclonal *mouse* clone 1D5 (Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA) para ER $\alpha$ , policlonal *rabbit* 06-629 (Upstate, USA) para ER $\beta$ , policlonal *rabbit* N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotchnology, USA) para IGFR-1, policlonal *rabbit* H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchnology, USA) para DG $\alpha$ , policlonal *rabbit* H-242 (sc-28535) (Santa Cruz Biotchnology, USA) para DG $\beta$ , monoclonal *mouse* IM53 (Calbiochem, USA) para MMP2, monoclonal *mouse* IM37 (Calbiochem, USA) para MMP9 e policlonal *rabbit* H-187 (sc-20143) (Santa Cruz Biotchnology) para Lam  $\alpha$ 3 na diluição 1:500. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit e anti-mouse* HRP conjugados na diluição de 1:2000 em 1% BSA. A atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Anticorpo para  $\beta$  actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens NIS-Elements: *Advanced Research* (USA).

### **Análises Estatísticas**

Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias dos valores obtidos nas análises de Western Blotting entre os grupos. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%<sup>18</sup>.

## **RESULTADOS**

### **Imunomarcção e Análise de Western Blotting**

#### ***Grupo Senil***

A imunolocalização de AR foi intensa nas células epiteliais e moderada nas estromais, representando 158,2% de nível protéico em relação ao padrão  $\beta$ -actina (Figuras 2a, 4 e Tabela

1). O nível protéico de ER $\alpha$  foi reduzido em comparação aos demais grupos experimentais, apresentando fraca imunoreatividade tanto nas células epiteliais quanto nas estromais (Figuras 2c, 4 e Tabela 1). Intensa imunoreatividade para ER $\beta$  foi observada nas células epiteliais e fraca nas estromais, demonstrando nível protéico de 172,5% (Figuras 2d, 4 e Tabela 1). Fraca imunoreatividade para IGFR-1 e MMP2 foi observada nas células epiteliais e estromais quando comparados aos demais grupos, demonstrando níveis protéicos de 79,7% e 87,9%, respectivamente (Figuras 2b, 3c, 4 e Tabela 1). Já a imunolocalização para MMP9 foi fraca nas células epiteliais e ausente nas células estromais, representando nível protéico de 65,8% (Figuras 3d, 4 e Tabela 1).

A imunolocalização de DG $\alpha$  foi intensa nas células epiteliais e moderada nas estromais, representando nível protéico de 123,5% (Figuras 3a, 4 e Tabela 1). A imunoreatividade para DG $\beta$  foi intensa na interface epitélio-estroma, representando 134,6% de nível protéico (Figuras 3b, 4 e Tabela 1). Intensa imunoreatividade para Lam  $\alpha$ 3 foi observada nas células estromais quando relacionadas aos demais grupos, representando nível protéico de 110,8%, (Figuras 3e, 4 e Tabela 1).

### ***Grupo NIP***

Os níveis protéicos para AR e ER $\beta$  foram detectados em 85,4% e 140,9% das células, respectivamente, demonstrando moderada imunoreatividade no compartimento epitelial e fraca no estromal dos dois receptores (Figuras 2e, 2h, 4 e Tabela 1). Intensa imunoreatividade para ER $\alpha$  foi observada nas células epiteliais e moderada nas estromais, demonstrando níveis protéicos (120,6%) superiores aqueles detectados nos grupos Senil e HBP (Figuras 2g, 4 e Tabela 1). As imunoreatividades para IGFR-1 e MMP2 foram intensas nas células epiteliais e estromais quando comparadas aos grupos Senil e HBP, representando níveis protéicos de 121,5% e 159,4%, respectivamente (Figuras 2f, 3h, 4 e Tabela 1). Já a imunolocalização para MMP9 foi intensa nas células epiteliais e fraca no compartimento estromal, demonstrando nível protéico de 137,4% (Figuras 3i, 4 e Tabela 1).

As imunoreatividades para DG $\alpha$ , DG $\beta$  e Lam  $\alpha$ 3 foram fracas tanto no epitélio quanto

no estroma quando relacionadas aos grupos Senil e HBP, representando níveis protéicos de 89,4%, 90,7% e 56,7%, respectivamente (Figuras 3f, 3g, 3j, 4 e Tabela 1).

### ***Grupo CA***

A imunoreatividade para AR foi intensa nos ácinos neoplásicos e moderada nas células estromais, com nível protéico de 120,9% (Figuras 2i, 4 e Tabela 1). Contudo, o nível protéico para ER $\beta$  foi reduzido em comparação aos demais grupos, apresentando fraca imunoreatividade nos ácinos neoplásicos e ausente nas células estromais (Figuras 2l, 4 e Tabela 1). A imunoreatividade para ER $\alpha$  foi intensa nos ácinos neoplásicos em comparação aos grupos Senil e HBP, e moderada nas células estromais, demonstrando nível protéico de 161,2% (Figuras 2k, 4 e Tabela 1). Intensa imunoreatividade para IGFR-1 e MMP2 foi observada nos ácinos neoplásicos e células estromais quando comparada aos grupos Senil e HBP, representando níveis protéicos de 152,6% e 174,5%, respectivamente (Figuras 2j, 3m, 3n, 4 e Tabela 1). Já a imunolocalização para MMP9 foi intensa nas células epiteliais e fraca nas células estromais, demonstrando nível protéico de 170,2% (Figuras 3n, 4 e Tabela 1).

As imunoreatividades para DG $\alpha$ , DG $\beta$  e Lam  $\alpha$ 3 foram fracas tanto nos ácinos neoplásicos quanto no estroma glandular quando relacionadas aos grupos Senil e HBP, representando níveis protéicos de 23,6%, 19,6% e 45,7%, respectivamente (Figuras 3k, 3l, 3o, 4 e Tabela 1).

### ***Grupo HBP***

A imunoreatividade para AR foi intensa nas células epiteliais e moderada nas estromais, demonstrando nível protéico de 110,3% (Figuras 2m, 4 e Tabela 1). Entretanto, moderada imunomarcagem para ER $\beta$  foi observada nas células epiteliais e fraca nas estromais quando relacionada ao grupo Senil, demonstrando nível protéico de 137,7% (Figuras 2p, 4 e Tabela 1). O nível protéico de ER $\alpha$  foi reduzido em relação aos grupos CA e NIP, apresentando moderada imunoreatividade nas células epiteliais secretoras e estromais (Figuras 2o, 4 e Tabela 1). A imunoreatividade para IGFR-1 foi moderada nas células epiteliais e

estromais quando comparadas ao grupo Senil, representando níveis protéicos de 110,9% (Figuras 2n, 4 e Tabela 1). A imunolocalização para MMP2 foi fraca nas células epiteliais e moderada nas células estromais, representando nível protéico de 98,9% (Figuras 3r, 4 e Tabela 1). Já a imunoreatividade para MMP9 foi moderada no compartimento epitelial e ausente no compartimento estromal (Figuras 3s, 4 e Tabela 1).

As imunoreatividades para DG $\alpha$ , DG $\beta$  e Lam  $\alpha$ 3 foram moderadas tanto no epitélio quanto no estroma quando relacionadas ao grupo Senil, demonstrando níveis protéicos de 105,6%, 106,8% e 104,9%, respectivamente (Figuras 3p, 3q, 3t, 4 e Tabela 1).

## **DISCUSSÃO**

A imunolocalização dos receptores de hormônios esteróides e fatores de crescimento na próstata de homens senis apresentaram representativas alterações nas diferentes doenças estudadas. A imunolocalização para os receptores androgênicos foi predominantemente intensa no compartimento epitelial de todos os grupos, embora também tenha ocorrido no estroma desses. Já para o ER $\beta$ , a imunolocalização foi fraca no compartimento epitelial do grupo CA em relação aos demais grupos e ausente no compartimento estromal deste grupo. A reatividade do ER $\alpha$  foi intensa no compartimento epitelial dos grupos CA e NIP em relação aos demais grupos estudados, sendo que a imunomarcção desse receptor foi moderada no compartimento estromal dos grupos CA, NIP e HBP em relação ao Senil. Entretanto, a imunolocalização para IGFR-1 aumentou nos dois compartimentos dos grupos NIP e CA.

O balanço entre os níveis circulantes de andrógenos e estrógenos muda significativamente com o avançar da idade<sup>19</sup>. Os níveis plasmáticos androgênicos declinam enquanto os estrogênicos se mantêm constantes e/ou aumentam, sugerindo que os estrógenos também podem ter papel na carcinogênese prostática<sup>20</sup>.

Os estrógenos podem regular o crescimento de 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<sup>21</sup>.

A hiperplasia epitelial prostática tem sido verificada em animais ER $\beta$  *knockout*, porém tal lesão não foi caracterizada em camundongos knockout para ER $\alpha$ <sup>5</sup>. Tal evidência sugeriu que o ER $\beta$  tem papel protetor contra a ocorrência da proliferação anormal das células epiteliais prostáticas e sua ausência pode sinalizar um passo crucial na progressão de câncer. Por outro lado, a expressão de ER $\beta$  foi identificada em lesões neoplásicas de baixo grau, porém essa foi ausente nas células com displasia de alto grau. Ainda, sendo ER $\beta$  predominantemente localizado nas células basais, esse fato é consistente com a depleção dessas células receptor-positivas na maioria das displasias de alto grau<sup>5</sup>. Em contraste, observou-se que o ER $\beta$  é expresso na metástase de câncer prostático, o que indicou esse receptor como marcador de fenótipo altamente maligno<sup>2</sup>. Já, a ausência de ER $\alpha$  levou à hipertrofia da próstata, mas não levou à metaplasia epitelial escamosa, indicando que esta resposta específica é ER $\alpha$  dependente<sup>20</sup>.

Células tumorais podem tornar-se resistentes ao andrógeno como consequência da mutação do AR ou da alteração da sinalização androgênica, após fase inicial responsiva ao hormônio<sup>22</sup>. Ainda, a ausência de ER $\beta$  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 $\alpha$ . Assim, estudos indicaram que o aumento na heterogeneidade do AR ou diminuição na positividade em câncer prostático pode estar associado à doença de grau elevado e prognóstico ruim<sup>23</sup>. Já, a super-expressão de AR pode estar envolvida no processo que leva a independência androgênica dos tumores prostáticos e, anormalidades na expressão ER $\alpha/\beta$  podem modular o crescimento da resposta do câncer à independência hormonal<sup>24</sup>.

Os andrógenos estão envolvidos no desenvolvimento da doença prostática, e seus efeitos nas células são mediados por fatores de crescimento. Esses agem através de mecanismos autócrinos e parácrinos, aumentando a proliferação celular e reduzindo a apoptose<sup>25</sup>. IGF-I e IGFR-I aumentam com a idade na presença ou na ausência de hiperplasia, nas displasias e no câncer prostático<sup>7</sup>.

Autores demonstraram que andrógenos provavelmente estimulam a transição celular da fase G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub>, tornando-as responsivas ao IGF-1, facilitando a progressão da fase G<sub>1</sub> para S. 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 das proteínas ligantes de IGF (IGFBP), a qual regula a interação de IGF-1 com IGFR-1, causando o aumento de IGF-1 livre, induzindo as células cancerosas à resistência a apoptose, bem como o aumento da mitose e da produção de PSA<sup>7</sup>.

Já em relação às moléculas que auxiliam na manutenção da estrutura tecidual, nos grupos NIP e CA, a imunomarcação para as DGs foi fraca em ambos os compartimentos quando comparada aos grupos Senil e HBP. Enquanto que a imunolocalização para as MMPs foi intensa nos compartimentos epitelial e estromal dos grupos NIP e CA, quando relacionada aos demais grupos. E a imunomarcação para a laminina  $\alpha$ -3 foi fraca nos compartimentos estromais dos grupos NIP e CA, e moderada no grupo HBP, quando comparadas ao grupo Senil.

A matriz extracelular é o maior substrato para as metaloproteinases (MMPs), sendo essas de grande importância na mediação da função celular<sup>26</sup>. 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<sup>27</sup>.

As MMPs podem favorecer o crescimento tumoral através de forma direta, degradando a matriz extracelular, ou indiretamente, sinalizando fatores de crescimento como o IGF. As MMPs estão envolvidas na liberação do fator de crescimento homólogo à insulina (IGF) dos seus ligantes inibitórios de crescimento (IGFBPs), estimulantes do crescimento tumoral<sup>27</sup>.

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<sup>28</sup>.

A MMP2 tem sido envolvida na ruptura da laminina, levando à motilidade celular<sup>29</sup>.

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<sup>26</sup>.

As MMPs induzem a apoptose através de 2 mecanismos: degradação da matriz extracelular e perda dos sinais essenciais de sobrevivência; e solubilização de ligantes específicos indutores de morte celular. A indução da apoptose estimula a seleção das células resistentes à apoptose. Portanto, a contribuição das MMPs em induzir apoptose pode ter como consequência a seleção de populações de células que são prioritariamente tumorogênicas<sup>26</sup>.

A perda da distroglicana (DG) é uma característica de todos os tumores epiteliais. Assim, tem sido sugerido que a DG pode agir como supressor tumoral. Os passos iniciais para a perda da DG são mediados pelas MMPs, clivando o domínio extracelular de ligação das DGs<sup>30</sup>.

A expressão anormal da DG não somente resulta na ruptura da interação estrutural entre a matriz extracelular, a membrana celular e o citoesqueleto intracelular, mas também leva à mudanças na superfície celular e na perda de adesão, afetando a sinalização parácrina. A expressão reduzida de DG $\alpha$  tem sido observada no câncer prostático, estando essa também associada à progressão do tumor<sup>31</sup>. Também, a degradação da DG $\beta$  pelas MMPs desintegram o complexo DG, rompendo a interação entre células epiteliais e matriz extracelular via complexo DG<sup>32</sup>.

Autores demonstraram que a DG $\beta$  é necessária para a ligação entre células e a laminina, sendo que a ausência de sinalização da DG $\beta$  promove o crescimento e o aumento da angiogênese<sup>33</sup>.

Assim, a partir dos presentes resultados pode-se concluir que a diminuição dos níveis protéicos do complexo DG e o aumento dos níveis das MMPs estão associados com a gravidade da lesão prostática e tem importante papel na manutenção do fenótipo maligno, tendo sido evidenciado de forma potencializada de acordo com o comprometimento da lesão.

Ainda, pode-se sugerir que a localização diferencial dos receptores esteróides entre os compartimentos epitelial e estromal na próstata de homens senis frente às lesões prostáticas

indicou diferentes sinalizações parácrinas.

A ocorrência de IGFR-1 sinalizou o grau de comprometimento glandular e a perda da imunolocalização da laminina sem dúvida propiciou a progressão das lesões. Já a via de ação estrogênica ER $\beta$  é fator ainda contravertido e necessita de novas avaliações, mas pode indicar que a supra-regulação desse receptor por andrógenos depende fortemente da condição do microambiente glandular.

O IGFR-1 e sua interação com MMP2 e 9 apontaram a relevância dessas moléculas nas investigações e tratamentos das doenças prostáticas.

Assim, os presentes resultados mostraram a importância da sinalização dinâmica de atuação dos receptores androgênicos e estrogênicos nas diferentes lesões prostáticas, bem como das vias estrogênicas nos mecanismos de ativação dessas alterações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G. Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; v.84, p.3463-3468, 1999.
2. LEAV, I.; LAU, K.M.; ADAMS, J.A.; MCNEAL, J.E.; TAPLIN, M.E.; WANG, J.; SINGH, H.; HO, S.M. 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.*; v.159, p.79-92, 2001.
3. CUNHA GR, HAYWARD SW, WANG YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*, 70: 473-485, 2002.
4. IMAMOV, O.; SHIM, G.J.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol. Reprod.*; v.73, p.866-71, 2005.
5. WEIHUA, Z.; MAKELA, S.; ANDERSSON, L.C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J.I.;

JENSEN, E.V.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; v. 98, p. 6330-6335, 2001.

6. WEIHUA, Z.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell Endocrinol.*; v.193, p.1-5, 2002.

7. DJAVAN, B.; WALDERT, M.; SEITZ, C.; MARBERGER, M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol.*; v.19, p.225-233, 2001.

8. PAVELIC, J.; MATIJEVIC, T.; KNEZEVIC, J. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res.*; v.125, p.511-522, 2007.

9. BRENNAN, P.A.; JING, J.; ETHUNANDAN, M.; GORECKI, D. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol.*; v.30, p.589-592, 2004.

10. SGAMBATO, A.; DE PAOLA, B.; MIGALDI, M.; DI SALVATORE, M.; RETTINO, A.; ROSSI, G.; FARAGLIA, B.; BONINSEGNA, A.; MAIORANA, A.; CITTADINI, A. Dystroglycan Expression is Reduced During Prostate Tumorigenesis and is Regulated by Androgens in Prostate Cancer Cells. *J Cell Physiol.* v.213, p.528-539, 2007.

11. KABASHIMA, A.; MAEHARA, Y.; KAKEHI, Y. Clinicopathological features and over-expression of matrix metalloproteinases in intramural gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin Cancer Res*, v.6, p.3581-3584, 2000.

12. TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.*; v.166, p.2472-2483, 2001.

13. LONDON, C.; SEKHON, H.; ARORA, V.; STEIN, D.; IVERSEN, P.; DEVI, G. A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Gene Ther.*; v.10, p.823-832, 2003.

14. KAMIJIMA K, BURT T, COHEN G, ARANO I, HAMASAKI T. A placebo-controlled, randomized withdrawal study of sertraline for major depressive disorder in Japan. *Int Clin Psychopharmacol.*, v. 21, p. 1-9, 2006.
15. BLACKLOCK, N.J. The morphology of the parenchyma of the prostate. *Urol Res.*; v.5, p.155-156, 1977.
16. MOSTOFI, F.K.; PRICE, E.B.Jr. Tumors of the Male Genital System, Atlas of Tumor Pathology, Second Series, Fascicle 8. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology 1973, 202-217.
17. MARKOPOULOS, A.K.; POULOPOULOS, A.K.; KAYAVIS, I.; PAPANAYOTOU, P. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I in the labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Oral Dis.*, v. 6, p. 31-34, 2000.
18. MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. John Wiley: New York, p. 649, 1991.
19. VERMEULEN, A.; KAUFMAN, J.; GOEMAERE, S.; VAN POTTELBERG, I. Estradiol in elderly men. *Aging Male*, v.5, p.98-102, 2002.
20. HÄRKÖNEN, P.L.; MÄKELÄ, S.I. Role of estrogens in development of prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 92, p. 297-305, 2004.
21. 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.*, v.10, p.552-563, 2006.
22. CARRUBA, G. Estrogen and Prostate Cancer: An eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J. of Cell. Bioch.*; v. 102, p. 899-911, 2007.
23. TAPLIN, M.; HO, S. The endocrinology of prostate cancer. *The J of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.86, p.3467-3477, 2001.

24. LATIL, A.; BIECHE, I.; VIDAUD, D.; LIDEREAU, R.; BERTHON, P. ; CUSSENOT, O. ; VIDAUD, M. Evaluation of androgen, estrogen (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res.*, v.61, p.1919, 2001.
25. MARCELLI, M.; ITTMANN, M.; MARIANI, S. et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.*, v.60, p.944-949, 2000.
26. LYNCH, C.; MATRISIAN, L. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*, v.70, p.561-573, 2002.
27. MARTIN, M. D.; MATRISIAN, L. M. The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*; v.26, p.717-724, 2007.
28. ROSS, J.; KAUR, P.; SHEEHAN, C.; HUGH, B.; FISHER, H.; KAUFFMAN, R.; KALLAKURY, B. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol.*, v. 16, p.198-205, 2003.
29. GIANELLI, G.; FALK-MARZILLIER, J.; SCHIRALDI, O.; STETLER-STEVENSON, W.; QUARANTA, V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science*, v.277, p.225-228, 1997.
30. CROSS, S.; LIPPITT, J.; MITCHELL, A.; BALASUBRAMANIAN, F.; REED, M.; EATON, C.; CATTO, J.; HAMDY, F.; WINDER, S. Expression of  $\beta$ -dystroglycan is reduced or absent in many human carcinomas. *Histopathology*, v.53, p.561-566, 2008.
31. HENRY, M. D.; COHEN, M. B.; CAMPBELL, K. P. Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer. *Hum Pathol.*; v.32, p.791-5, 2001.
32. YAMADA, H.; SAITO, F.; FUKUTA-OHI, H.; ZHONG, D.; HASE, A.; ARAI, K.; OKUYAMA, A.; MAEKAWA, R.; SHIMIZU, T.; MATSUMURA, K. Processing of  $\beta$ -dystroglycan by matrix

metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. Hum Mol Genet., v.10, p.1563-1569, 2001.

33. HOSOKAWA, H.; NINOMIYA, H.; KITAMURA, Y.; FUJIWARA, K.; MASAKI, T. Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. J of Cell Science, v.115, p.1487-1496, 2002.

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1:** Fotomicrografias das zonas periféricas dos grupos Senil (a), NIP (b), CA (c) e HBP (d). (a) Células colunares secretoras e basais; **inset:** intensa imunomarcção para 34 $\beta$ E12 (**seta**) no compartimento epitelial basal. (b) Neoplasia Intraepitelial Prostática (**NIP**) de alto grau. (c) Ácinos neoplásicos (**asteriscos**) pontiagudos e dispostos em cunha, com núcleos volumosos e nucléolos proeminentes; **inset:** ausência de imunomarcção para 34 $\beta$ E12 nos ácinos neoplásicos (**asteriscos**). (d) Epitélio simples com células colunares secretoras, células basais; estroma hiper celular com abundantes fibras colágenas e células musculares lisas (**Smc**). **a – d: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

**Figuras 2a – 2d:** Grupo Senil. (a) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estromais. (b) Fraca imunoreatividade de IGFR-1 (**setas**) no epitélio secretor e moderada no estroma prostático. (c) Fraca imunoreatividade para ER $\alpha$  (**seta**) no epitélio secretor e no estroma. (d) Intensa imunoreatividade para ER $\beta$  (**setas**) no epitélio secretor e fraca no estroma prostático. **a – d: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

**Figuras 2e – 2h:** Grupo NIP. (e) Moderada imunoreatividade de AR (**setas**) no núcleo das células epiteliais secretoras e estromais. (f) Intensa imunoreatividade de IGFR-1 (**setas**) no epitélio secretor e estroma prostático. (g) Intensa imunoreatividade para ER $\alpha$  (**setas**) no epitélio secretor e moderada no estroma prostático. (h) Moderada imunoreatividade para ER $\beta$

(**setas**) no epitélio secretor e fraca no estroma prostático. **e – h: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

**Figuras 2i – 2l:** Grupo CA. (i) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) nos ácinos neoplásicos e moderada nas células estromais. (j) Intensa imunoreatividade de IGFR-1 (**setas**) nos ácinos neoplásicos e estroma prostático. (k) Intensa imunoreatividade para ER $\alpha$  (**setas**) nos ácinos neoplásicos e moderada no estroma prostático. (l) Fraca imunoreatividade para ER $\beta$  (**setas**) nos ácinos neoplásicos e ausente no estroma prostático. **i – l: asteriscos** – ácinos neoplásicos e **St** – estroma.

**Figuras 2m – 2p:** Grupo HBP. (m) Intensa imunoreatividade de AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e moderada nas células estromais. (n) Moderada imunoreatividade de IGFR-1 (**setas**) no epitélio secretor e estroma prostático. (o) Moderada imunoreatividade para ER $\alpha$  (**setas**) no epitélio secretor e estroma prostático. (p) Moderada imunoreatividade para ER $\beta$  (**setas**) no epitélio secretor e fraca no estroma prostático. **m – p: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

**Figuras 3a – 3e:** Grupo Senil. (a) Intensa imunoreatividade para DG $\alpha$  (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (b) Intensa imunoreatividade para DG $\beta$  (**setas**) na interface epitélio- estroma. (c) Fraca imunoreatividade para MMP2 (**setas**) no epitélio secretor e estroma prostático. (d) Fraca imunoreatividade para MMP9 (**seta**) no epitélio secretor. (e) Intensa imunoreatividade da Lam  $\alpha$ 3 (**setas**) no estroma periacinar. **a – e: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

**Figuras 3f – 3j:** Grupo NIP. (f) Fraca imunoreatividade para DG $\alpha$  (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (g) Fraca imunoreatividade para DG $\beta$  (**setas**) na interface epitélio-estroma. (h) Intensa imunoreatividade para MMP2 (**setas**) no epitélio secretor e estroma prostático. (i) Intensa imunoreatividade para MMP9 (**seta**) no epitélio

secretor. (j) Fraca imunoreatividade da Lam  $\alpha 3$  (**setas**) no estroma periacinar. **f – j: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

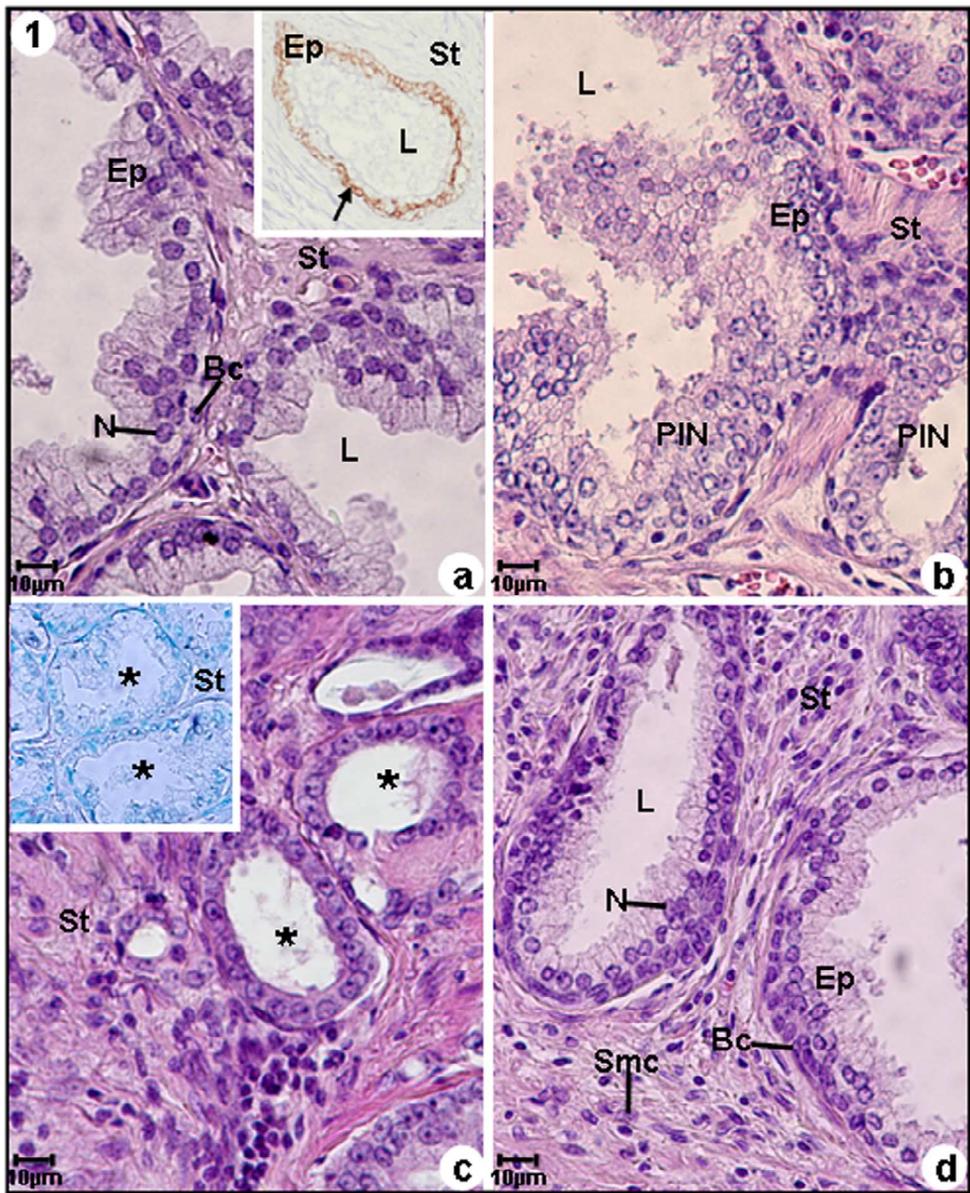
**Figuras 3k – 3o:** Grupo CP. (k) Fraca imunoreatividade para DG $\alpha$  (**setas**) no estroma prostático. (l) Fraca imunoreatividade para DG $\beta$  (**setas**) na interface dos ácinos neoplásicos (**asteriscos**). (m) Intensa imunoreatividade para MMP2 (**setas**) nos ácinos neoplásicos (**asteriscos**) e estroma prostático. (n) Intensa imunoreatividade para MMP9 (**seta**) nos ácinos neoplásicos (**asteriscos**). (o) Fraca imunoreatividade da Lam  $\alpha 3$  (**setas**) no estroma periacinar; ácinos neoplásicos. **k – o: St** – estroma.

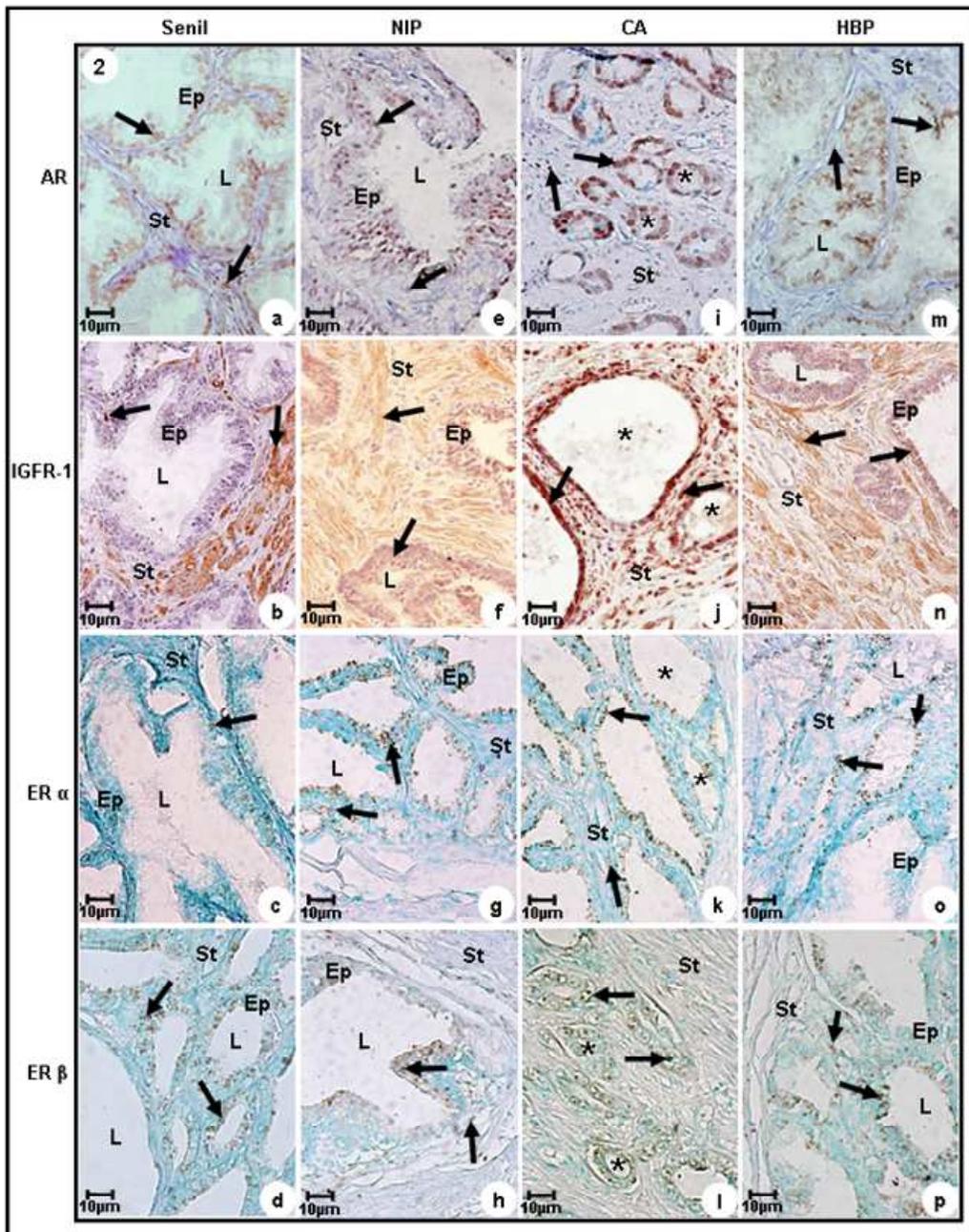
**Figuras 3p – 3t:** Grupo HBP. (p) Moderada imunoreatividade para DG $\alpha$  (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (q) Moderada imunoreatividade para DG $\beta$  (**setas**) na interface epitélio estroma. (r) Fraca imunoreatividade para MMP2 (**setas**) no epitélio secretor e moderada no estroma prostático. (s) Moderada imunoreatividade para MMP9 (**seta**) no epitélio secretor. (t) Moderada imunoreatividade da Lam  $\alpha 3$  (**setas**) no estroma periacinar. **p – t: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

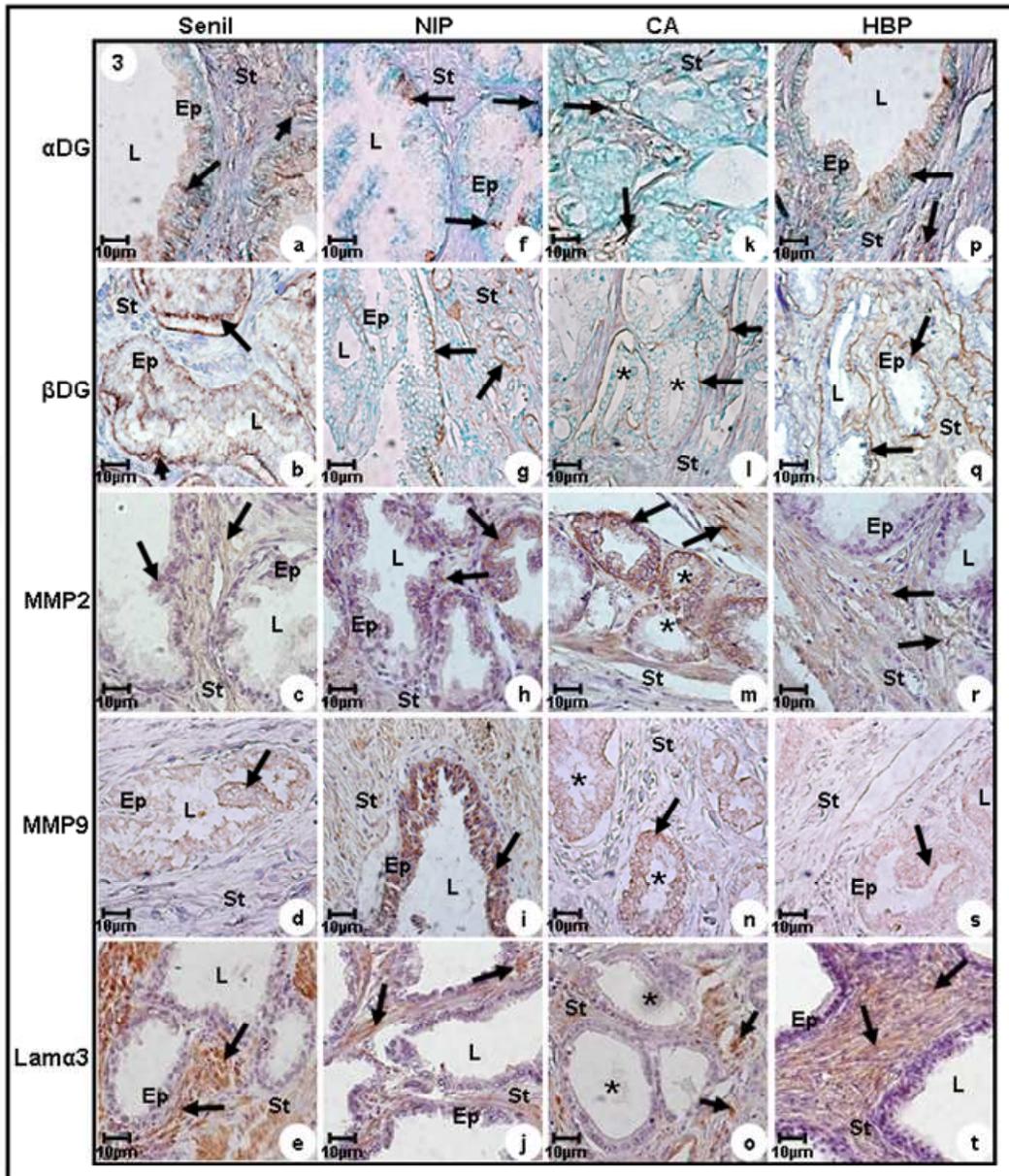
**Tabela 1:** Intensidade de imunoreatividade dos receptores AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , IGF-1, DG $\alpha$ , DG $\beta$ , MMP2, MMP9 e Lam  $\alpha$ 3.

Grupos								
Antígenos	Senil		NIP		CA		HBP	
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma
AR	+++	++	++	+	+++	++	+++	++
ER $\alpha$	+	+	+++	++	+++	++	++	++
ER $\beta$	+++	+	++	+	+	-	++	+
IGFR-1	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++
DG $\alpha$	+++	++	+	+	+	+	++	++
DG $\beta$	+++	-	+	-	+	-	++	-
MMP2	+	+	+++	+++	+++	+++	+	++
MMP9	+	-	+++	+	+++	+	++	-
Lam $\alpha$ 3	-	+++	-	+	-	+	-	++

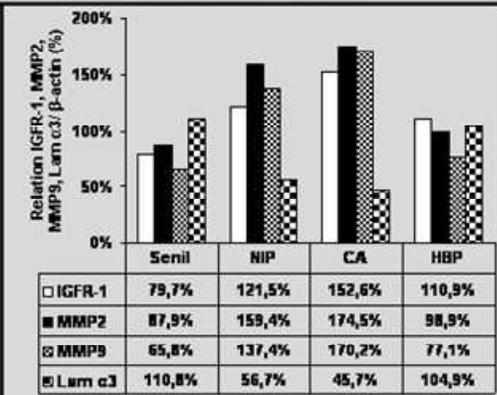
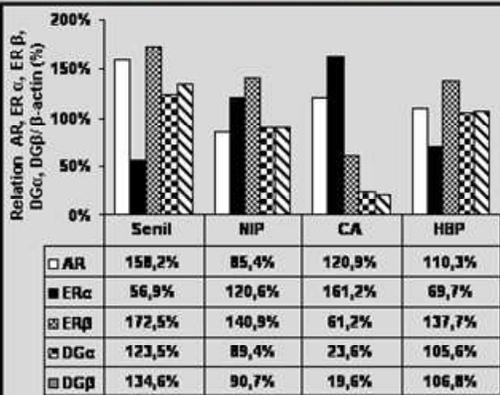
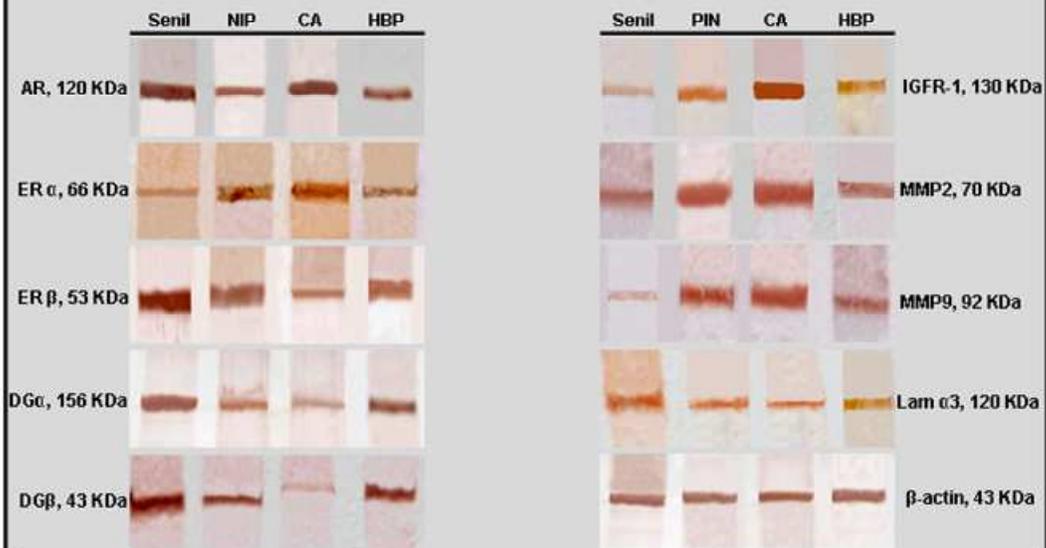
Intensa (+++), Moderada (++), Fraca (+)







4



## CONCLUSÕES

- As lesões prostáticas na senescência levaram a um desequilíbrio na taxa de proliferação/apoptose indicando predominância do processo proliferativo;
- Na senescência observou-se desequilíbrio na interação epitélio-estroma prostática com conseqüentes alterações estruturais, que são elementos decisivos para o desenvolvimento e progressão da carcinogênese;
- As lesões prostáticas morfológicas caracterizadas foram gradativas e progressivas a partir da hiperplasia, neoplasia intraepitelial e do adenocarcinoma prostático;
- As alterações estruturais verificadas nos grupos senil, neoplasia intraepitelial prostática, hiperplasia e câncer comprometeram efetivamente os elementos celulares envolvidos no processo secretor do órgão;
- A diminuição na expressão do complexo DG e o aumento da expressão das MMPs estão associados com a ocorrência de câncer prostático e sinalizaram importante papel no processo e manutenção do fenótipo maligno;
- Os presentes achados caracterizaram o desequilíbrio nas reatividades dos receptores esteróides nas diferentes lesões prostáticas CP, NIP e HBP de homens senis que certamente indicou diferentes sinalizações parácrinas para a dinâmica prostática;
- A reatividade aumentada das MMPs e a oposição a diminuição das reatividades das DGs  $\alpha$  e  $\beta$  nas doenças prostáticas indicaram a potencialização das ações e/ou ausência de ação dessas moléculas nas diferentes lesões culminando no aumento da desestruturação glandular;
- A diminuição da reatividade das DGs indicou o papel crucial dessas duas moléculas nas diferentes doenças estudadas com relação à desorganização glandular. O IGFR-I também pode indicar o grau de comprometimento glandular e a perda da imunolocalização da laminina sem dúvida indicou o potencial da progressão das doenças. Já a via de ação estrogênica ER $\beta$  é fator ainda contravertido e necessita de novas avaliações, mas sugere-se que a supra-regulação desse receptor por andrógenos estaria fortemente relacionada à condição do microambiente glandular;

- Os presentes resultados indicaram a importância da dinâmica de reatividade diferencial nos compartimentos prostáticos de atuação dos receptores androgênicos e estrogênicos nas diferentes lesões prostáticas e apontaram à importância das vias estrogênicas nos mecanismos de ativação dessas alterações.

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSSON, P.A.; LILJA, H. Partial characterization of a thyroid-stimulating hormone-like peptide in neuroendocrine cells of the human prostate gland. *Prostate*; v.14, p.71-81,1989.

ADAMS, J.Y.; LEAV, I.; LAU, K.M.; HO, S.M.; PFLUEGER, S.M. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*; v.52, p.69-81, 2002.

ASANO, K.; MARUYAMA, S.; USUI, T.; FUJIMOTO, N. Regulation of estrogen receptor alpha and beta expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocr. J.*; v.50, p.281-287, 2003.

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*; v.141, p.821-822, 2000.

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*; v.143, p.4922-33, 2002.

BLACKLOCK, N.J. The morphology of the parenchyma of the prostate. *Urol Res.*; v.5, p.155-156, 1977.

CAVAZOS, F. Fine structure and functional correlates of male accessory sex glands of rodents In Washington Roy O. Greep, Edwin B. Astwood Handbook of Physiology. American Physiological Society, p.353-381, 1975.

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*; v.61, p.870-875, 2003.

CUNHA, G.R.; MATRISIAN, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*; v.70, p.469-472, 2002.

CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate.

Differentiation, v.70, p.473-485, 2002.

DEAN, J.P.; NELSON, P.S. Profiling influences of senescent and aged fibroblasts on prostate carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, v.98, p.245-249, 2008.

DE LA TAILLE, A.; ZERBIB, M. Urologic complications of radiotherapy. *Ann. Urol.*; v.37, p.345-57, 2003.

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*; v.155, p.1985-1992, 1999.

DJAVAN, B.; WALDERT, M.; SEITZ, C.; MARBERGER, M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol.*; v.19, p.225-233, 2001.

HSING, A.W.; REICHARDT, J.K.V.; STANCZYK, F.Z. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate*; v.52, p.213-235, 2002.

IMAMOV, O.; SHIM, G.J.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol. Reprod.*; v.73, p.866-71, 2005.

JARRED, R.A.; McPHERSON, S.J.; BIANCO, J.J.; COUSE, J.F.; KORACH, K.S.; RISBRIDGER, G.P. Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol. Met.*, v. 13, p. 163-168, 2002.

KERR, J.F.; SEARLE, J. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch B Cell Pathol.*; v.13, p.87-102, 1973.

KERR, M.; LEE, A.; WANG, P.L.; PURUSHOTHAM, K.R.; CHEGINI, N.; YAMAMOTO, H.; HUMPHREYS-BEHER, M.G. Detection of insulin and Insulin-Like Growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. *Biochem. Pharmacol.*; v.49, p.1521-1523, 1995.

KNOX, J.D.; CRESS, A.E.; CLARK, V.; MANRIQUEZ, L.; AFFINITO, K.S.; DALKIN, B.L.; NAGLE, R.B. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am J Pathol.*; v.145, p.167-74, 1994.

KREIS, T.; VALE, R. Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. *New York: Oxford University Press*; 1999.

LABAT-ROBERT, J.; BIHARA-VARGA, M.; ROBERT, L. Extracellular Matrix. *FEBS*; v.268, p.386-393, 1990.

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*; v.29, p.137-145, 1996.

LIN, C.Q.; BISSEL, M.J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB*; v.7, p.737-743, 1993.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semem. Berlin: Springer-Verlog., p.495, 1981.

MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G. Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. *J. Clin. Endocrinol. MetaB.*, v.84, p.3463-3468, 1999.

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal cellular and molecular control of cprostatic development. *Develop Biol.*, v.253, p.165-174, 2003.

MARKS, L.S.; MAZER, N.A.; MOSTAGHEL, E.; HESS, D.L.; DOREY, F.J.; EPSTEIN, J.L.; VELTRI, R.W.; MAKAROV, D.V.; PARTIN, A.W.; BOSTWICK, D.G.; MACAIRAN, M.L.; NELSON, P.S. Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. *JAMA.*; v.296, p.2351-2361, 2006.

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.*; v.48, p.34-39, 2005.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. John Wiley: New York, p.649, 1991.

MONTIE, J.E.; PIENTA, K.J. Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology*, v.43, p.892-899, 1994.

PRINS, G.S.; BIRSCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*, v.129, p.3187-3199, 1991.

RISBRIDGER, G.P.; BIANCO, J.J.; ELLEM, S.J.; MCPHERSON, S.J. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, v.10, p.187-191, 2003.

RISBRIDGER, G.; WANG, H.; YOUNG, P.; KURITA, T.; WANG, Y.Z.; LUBAHN, D.; GUSTAFSSON, J.A.; CUNHA, G.R.; WONG, Y.Z. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol.*, v.231, p.289, 2001.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB*; v.11, p.51, 1997.

TAYLOR R.A.; RISBRIDGER, G.P. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*; v.76, p.671-68, 2008.

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.*; v.88, p.5207-5211, 2003.

TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.*, v.166, p.2472-2483, 2001.

VILAMAIOR, P.S.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate*, v.45, p.253-8, 2000.

WALSH, P.C.; RETIK, A.B.; VAUGHAN, E.D.; WEIN, A.J.; Campbell's Urology. 7 ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, p.1384-1473, 1998.

WEIHUA, Z.; MAKELA, S.; ANDERSSON, L.C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J.I.; JENSEN, E.V.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p. 6330-6335, 2001.

WEIHUA, Z.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell Endocrinol.*; v.193, p.1-5, 2002.

WENDELL-SMITH, C. Terminology of the prostate and related structures. *Clin Anat.*, v.13, p.207-213, 2000.

ZHAO, W.Q.; CHEN, H.; QUON, M.J.; ALKON, D.L. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol.*, v.490, p.71-81, 2004.



CEP, 25/03/08.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 125/2008 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0094.0.146.000-08

## I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “MAPEAMENTO DA ESTRUTURA E BIOLOGIA MOLECULAR PROSTÁTICA DE HOMENS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Valéria Helena Cagnon Quitete

**INSTITUIÇÃO:** Hospital de Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 11/03/2008

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 25/03/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

## II - OBJETIVOS

Caracterizar a histopatologia das diferentes zonas prostáticas, bem como identificar diferentes moléculas envolvidas na manutenção da estrutura e funcionamento da próstata de homens em diferentes faixas etárias.

## III - SUMÁRIO

Serão utilizadas 20 amostras de tecido prostático, provenientes de 20 cadáveres post-mortem com e sem diagnóstico de patologias prostáticas, provenientes do HC da UNICAMP. As amostras serão de cadáveres nas seguintes faixas etárias: 0-20; 20-40; 40-60; 60-80 anos. As amostras teciduais serão submetidas a técnicas de microscopias de luz e eletrônica de transmissão, imunohistoquímicas, morfométricas, além da detecção e determinação da proliferação celular e do índice apoptótico. Esses dados serão analisados estatisticamente para os diferentes grupos.

## IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bem elaborado, onde o pesquisador responsável solicita dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de um estudo retrospectivo.

Recomendamos que o profissional do Departamento de Anatomia Patológica deverá estar ciente do desenvolvimento desta pesquisa.

## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa

supracitada. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

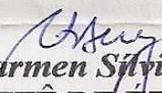
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de março de 2008.

  
**Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP