

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Luis Antonio Justulin Junior

**REPOSIÇÃO HORMONAL NA PRÓSTATA VENTRAL DE
RATOS CASTRADOS: RECUPERAÇÃO GLANDULAR,
REORGANIZAÇÃO ESTROMAL E
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
LUIS ANTONIO JUSTULIN JR.
Sérgio Luis Felisbino
aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

Campinas - 2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	17/11/05
V	EX
TOMES BCI	64008
PROC.	16-P.00086-09
C	☐ ☒ ☐ ☒
PREÇO	11,00
DATA	01/06/09
Nº CPD	

Relat - id 350913

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

J986r

Justulin Junior, Luis Antonio

Reposição hormonal na próstata ventral de ratos castrados: recuperação glandular, reorganização estromal e atividade de metaloproteinases de matriz / Luiz Antonio Justulin Junior. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Sérgio Luis Felisbino.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Metaloproteinase. 3. Matriz extracelular.

I. Sérgio Luis Felisbino. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

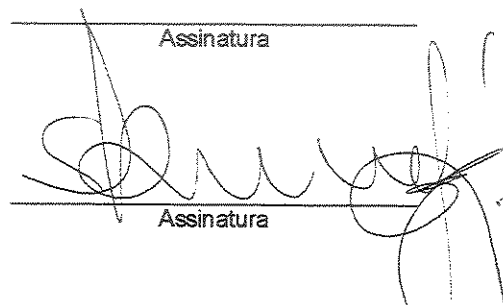
Campinas, 11 de março de 2005

Banca Examinadora

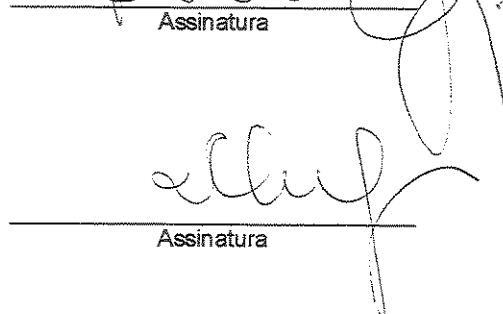
Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino (orientador)


Assinatura

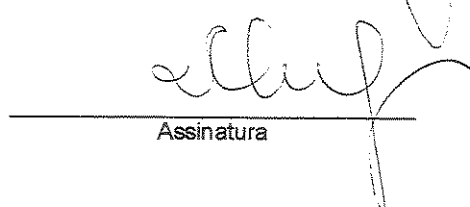
Prof. Dr. Oduvaldo Camara Marques Pereira

Assinatura


Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Assinatura


Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Assinatura


*Dedico este trabalho aos meus
pais “Nego” e “Cida” pelo
exemplo de perseverança que são
para todos, pelo amor e incentivo
a mim dedicados e por sempre
representarem meu porto seguro.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino, pela excelente orientação neste trabalho, que contribuiu sobremaneira para meu crescimento profissional. Pela confiança em mim depositada, e acima de tudo, pelo profissionalismo, amizade e humildade, dentro e fora da universidade, que fizeram de cada dia de trabalho uma vitória. Agradeço também por ter dividido sua sala comigo, por ter me dado a oportunidade de participar de outros projetos que certamente contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal. Além da força nas longas noites trabalhadas dias antes de terminarmos a dissertação. Á você, que além de orientador é amigo, minha sincera e eterna gratidão!

Ao Prof. Dr. Oduvaldo Camara Marques Pereira por aceitar fazer parte da banca examinadora e pelas valiosas sugestões na análise prévia dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela colaboração durante a análise prévia desse trabalho, além do auxílio em outras etapas.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho pela colaboração na análise prévia deste trabalho, além de ceder seu laboratório para a realização de algumas etapas importantes.

A Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pelo auxílio durante esses dois anos, mas acima de tudo, por ter me apresentado e pela sua indicação ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan pela ajuda com a imunohistoquímica e pela convivência sempre agradável.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, por ceder seu laboratório para as análises de densitometria dos géis de zimografia

A Sílvia Canova pela ajuda na redação dessa dissertação, mas acima de tudo pela agradável convivência nesses dois anos.

A minha amiga Heloisa Helena M. Della-Coleta pela ajuda no início dos meus experimentos, por ter me recebido tantas vezes em Campinas sempre disposta a ajudar. Tenho certeza que você irá desempenhar brilhantemente suas atividades de pós-doutorado no exterior.

Aos alunos de iniciação científica Rodrigo e Michele que tanto contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos de todas as horas Carol, Aline, Danilo, Fernanda, Flávia, Francis, Glaura Kelly, Lucas, Marcos, Paulo, Raquel, Robson, Shadia, Sérgio e Virgínia, e todos os outros amigos que conviveram comigo nesses dois anos. Pelos dias e noites de “trabalho”. Viva o *meeting*!

Aos professores do Departamento de Morfologia, IB-Unesp, Botucatu pela colaboração e pelo convívio diário.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular, IB-Unicamp, que tanto colaboraram para a minha formação.

A coordenadoria do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela competência e determinação empenhadas, e por terem feito deste programa um dos melhores do país.

A Lílíam Alves Senne Panagio, pela eficiência com que cuida dos interesses do programa e dos alunos do programa de Pós-Graduação

Ao centro de Microscopia Eletrônica, IB-Unesp, Botucatu pelo processamento do material para análise ultra-estrutural.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, IB-Unesp, Botucatu, em especial á Sueli e “Zé” Eduardo, pela colaboração nas diversas etapas do trabalho.

Aos amigos de laboratório de Matriz extracelular do IB-Unicamp, Alexandre, Dani, Eliane, Helene, Helô, Manoel, Silvia, Sheila, Taize por todas as vezes que fui muito bem recebido.

Aos amigos do curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Dani, Ariele, Alberto, Gisele, Eduardo, Adriano e, em especial Flávia, Fernanda Thati pela amizade e por terem me albergado durante alguns dias em Campinas.

Aos grandes amigos do curso de graduação em Ciências Biológicas, Unesp-Bauru, onde tudo começou. Dalhe bura!

Aos meus amigos de Bariri, que mesmo sem entender muito bem, agüentaram minhas lamentações nesses dois anos

A Carol, minha namorada, por seu amor, dedicação e paciência durante os bons e maus momentos vividos durante esses dois anos.

A toda minha família por tudo o que representam, pela união, carinho e por sempre me apoiarem nestes longos anos de caminhada.

Enfim, á todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa dissertação.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	3
Introdução.....	5
Justificativa e relevância da temática.....	16
Objetivos.....	17
Artigo e Manuscritos resultantes da tese.....	18
Artigo 1.....	19
Manuscrito 2.....	39
Manuscrito 3.....	67
Conclusões gerais.....	84
Referências Bibliográficas da Introdução.....	85

Resumo

A próstata (PV) e a vesícula seminal (VS) são glândulas andrógeno-dependentes que sofrem atrofia e recuperação após privação e reposição androgênica, respectivamente. Em ambos eventos são observadas alterações tanto no compartimento epitelial quanto no estromal. Os aspectos relacionados às alterações epiteliais provocadas pela reposição hormonal na próstata de ratos castrados estão bem descritos na literatura. Entretanto as alterações estromais e a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) não estão descritas, tão pouco um estudo comparativo da resposta proliferativa entre a PV e a VS. Desta forma, este trabalho teve por objetivos: a) comparar a resposta da PV e da VS de ratos castrados submetidos ao processo de recuperação glandular por reposição hormonal; b) caracterizar o processo de reorganização estromal da próstata ventral de ratos castrados submetidos à reposição hormonal; c) avaliar a atividade das MMPs-2 e 9 durante a castração e reposição hormonal. Para tanto, ratos Wistar adultos machos (3 meses de idade) foram divididos em 3 grupos experimentais: controle, castrado (remoção dos testículos), e castrado tratado com testosterona. Os animais do grupo castrado foram sacrificados após 3, 5, 7, 21, 24, 26, 28, e 31 dias após a castração, enquanto os do grupo castrado tratado receberam, após 21 dias de castração, doses diárias de propionato de testosterona (4mg/kg/dia) e foram sacrificados após 3, 5, 7 e 10 dias de reposição. Finalmente, os animais do grupo controle foram sacrificados ao 3º, 7º, 21º e 31º dias após o início do experimento. Os animais foram pesados e mortos. As próstatas ventrais (PV) e as vesículas seminais (VS) foram pesadas e processadas para análises histoquímicas, imunohistoquímicas, morfométricas, estereológicas, ultra-estruturais e análises bioquímicas por zimografia. Os resultados foram avaliados estatisticamente. Com a castração tanto a PV quanto a VS sofreram o característico processo de involução, com perda de peso, redução de área epitelial e luminal, e aumento da área estromal. Esses eventos foram revertidos progressivamente com a reposição hormonal. Entretanto, ao final do tratamento, a VS respondeu mais intensamente à reposição com testosterona do que a PV, superando significativamente o peso das glândulas dos grupos controle, enquanto o peso da PV não atingiu o peso das glândulas dos grupos controle. Esta diferença entre as duas glândulas

também foi observada no índice de proliferação (IP) celular obtido pela marcação imunohistoquímica para PCNA. As células epiteliais da VS apresentaram um IP aproximadamente três vezes superior às da VP. Embora a castração promova um aparente aumento da área estromal, nossos resultados de peso absoluto do estroma revelaram que ocorre na verdade uma diminuição no conteúdo estromal, com uma possível degradação da matriz extracelular. Embora, as fibras colágenas, reticulares e elásticas, condensadas durante a castração, tenham sido progressivamente distendidas e dispersadas ao redor dos ductos durante a reposição hormonal, ocorreu um aumento progressivo no volume absoluto do estroma, sugerindo a síntese destes componentes durante o tratamento. Este resultado confirma as observações ultra-estruturais de fibroblastos e células musculares lisas com citoplasmas repletos de organelas envolvidas na síntese protéica (Cisternas dilatadas de retículo endoplasmático rugoso e Complexo de Golgi). Na degradação dos componentes da matriz extracelular do estroma durante a castração certamente ocorre com a participação das metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9, as quais exibiram aumento de atividade gelatinolítica de suas formas latentes e principalmente de suas formas ativas. A MMP-9 apresentou maior atividade durante a fase final da involução glandular, enquanto a MMP-2 apresentou aumento de atividade tanto na involução, quanto na recuperação glandular. Esses resultados demonstram que hormônios androgênicos modulam a fisiologia da próstata, influenciando o conteúdo e a organização da matriz extracelular do estroma através das células musculares lisas e, principalmente, dos fibroblastos.

Abstract

The ventral prostate (VP) and the seminal vesicle (SV) are both androgen dependents, in which undergo atrophy and regrowth processes after androgen deprivation and reposition. In both events, it was observed alterations in the epithelium as well as in the stromal compartments. The aspects related to the prostate epithelium induced by testosterone replacement in castrated rats are very well described, however the stromal modifications and matrix metalloproteinases (MMPs) activity are not, even not a comparative study of proliferative responsiveness between VP and SV to testosterone replacement. In this sense, the aim of this work was: a) to compare the responsiveness to androgen reposition of the VP and SV involuted; b) to describe the process of stromal reorganization of castrated ventral prostate submitted to testosterone replacement; c) to analyse the gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in the ventral prostate during castration and androgen reposition; For this, male adult Wistar rats (3 months-old) were divided into 3 experimental groups: control, castrated (testis excision), and castrated plus testosterone replacement. The animals from castrated group were sacrificed at 3, 5, 7, 21, 24, 26, 28 and 31 days after castration, while those from testosterone replacement, after 21 days of castration, started to receive daily doses of testosterone propionate (4mg/kg/day) and were sacrificed at 3, 5, 7 and 10 days after testosterone replacement. Finally, the animals from control group were sacrificed at 3, 7, 21 and 31 days after beginning the experiment. The animals were killed and weighted. The VPs and SVs were weighted and processed for histochemistry, immunohistochemistry, morphometric-stereological, ultra-structural and zymography analyses. The results were analysed statistically. Castration induced the characteristic process of involution. This process was progressively reverted by the testosterone replacement. However, at the end of the treatment, the more responsiveness of SV was demonstrated. The SV from TESTO group overcome the control value, while the VP did not reach the control value. This difference between two glands was also observed in the proliferation index (PI) obtained by the immunoreaction for PCNA. The epithelial cells from involuted SV presented a PI value about 3 times higher than that from VP. In despite castration promote an increase in the stromal area, our results from stromal absolute volume

showed a reduction in the estromal compartment, with a probably degradation of extracellular matrix. Moreover, the condensed collagen, reticular and elastic fibers have been distended and dispersed during testosterone replacement. In fact occurred a progressive increase in the stromal absolute volume, suggesting synthesis of this components. These results confirm the ultrastructural observations of fibroblasts and smooth muscle cell with enlarged rough endoplasmatic reticulum cisterns and Golgi complex evident. In the degradation of extracellular matrix components from stroma during castration, certainly the participation of MMPs is present. MMP-2 and -9 exhibited increased gelatinolytic activity of latent and mainly of active forms. The MMP-9 presented higher activity during the late phase of glandular involution, while the MMP-2 presented increased activity in both castration and testosterone replacement processes. These results shown that androgen modulate the prostate physiology and influence the composition and organization of stromal extracellular matrix through smooth muscle cells and mainly fibroblasts.

1. Introdução

Com o aumento da expectativa de vida mundial, vem crescendo a incidência de doenças diagnosticadas com o envelhecimento. Entre os homens, as mais freqüentes são a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e o Câncer de Próstata (CP), que afetam 1/6 dos homens com idade avançada (Schulman, 2002; Thompson et al. 2003). Por esta razão, a próstata tem despertado grande interesse médio-científico.

A próstata e a vesícula seminal – estrutura, origem embrionária e ação de andrógenos

A próstata humana é um órgão compacto, pesando entre 30 e 50g, situada logo abaixo da bexiga e envolve totalmente a uretra. Internamente, pode ser dividida em três conjuntos de glândulas túbulo-alveolares denominadas: 1) glândulas da zona central ou periuretrais ou da mucosa; 2) glândulas da zona periférica ou glândulas principais; 3) glândulas da zona de transição ou da submucosa (McNeal, 1981).

Nos roedores, a próstata não é compacta, sendo constituída por um conjunto de ductos/túbulos ramificados com lúmen dilatado, dividida em três pares de lóbulos: 1) lóbulos ventrais; 2) lóbulos dorsolaterais; 3) lóbulos anteriores (glândula de coagulação) que estão associados às vesículas seminais (Jesik et al. 1982; Roy-Burman et al. 2004). A próstata ventral de ratos é composta por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares, nas quais as células epiteliais encontram-se envolvidas por um estroma (Aümuller, 1979). Além das células musculares lisas e fibroblastos, outros tipos celulares também são encontrados no estroma, como mastócitos, células endoteliais e pericitos, juntamente com terminações nervosas e gânglios sensitivos. Cada lobo prostático consiste de oito conjuntos de ductos que se originam a partir da uretra como uma simples estrutura tubular e dos quais emergem ramos e sub-ramos. Esse conjunto de ductos é dividido em três regiões morfológica e funcionalmente distintas, denominadas de distal, intermediária e proximal, em relação à uretra (Lee, 1990; Shabsigh et al. 1999). Na região distal, são encontradas células epiteliais colunares altas com núcleo apical, indicando atividade proliferativa, enquanto as células musculares lisas apresentam-se como uma camada esparsa e descontínua, associada a uma

abundante camada de tecido fibroso (Nemeth & Lee, 1996). Na região intermediária, as células epiteliais também são colunares altas, porém quiescentes, apresentando características de células secretoras. Nesta região, a camada de células musculares lisas é fina e contínua. Na região proximal, as células epiteliais são cúbicas e baixas, muitas das quais sofrem apoptose. Tanto na região intermediária como na proximal, o tecido fibroso está presente no espaço entre os ductos e, ocasionalmente, intercalando a camada de células musculares lisas. O epitélio prostático é constituído por três tipos celulares, divididos em dois compartimentos distintos. O compartimento basal é formado por células basais e neuroendócrinas, enquanto no compartimento luminal encontram-se as células secretoras. Estas últimas apresentam altos níveis de AR e PSA. São células altamente diferenciadas que apresentam pouca atividade proliferativa e necessitam de contínuo suprimento androgênico para manutenção de sua fisiologia. Em contraste, as células basais são andrógeno- independentes, pois não sofrem apoptose seguida a privação androgênica. Além disso, exibem alta atividade proliferativa após exposição a andrógenos sintéticos (Prins et al. 1991). Tem sido proposto que as células basais incluem uma subpopulação de “stem cell” pluripotentes, capazes de se diferenciar nos diferentes tipos celulares do epitélio prostático.

O desenvolvimento prostático e sua função secretora são determinados e regulados por andrógenos, os quais participam da diferenciação e manutenção do estado ativo da glândula (Cunha et al., 1985; Donjacour & Cunha, 1993). Durante a embriogênese, sob ação de andrógenos, células epiteliais da uretra em formação invaginam para o interior do mesênquima do sino urogenital. Este mesênquima induz a proliferação epitelial, com formação de ductos e suas ramificações, expressão de receptores de andrógenos e secreção de proteínas específicas da próstata (Cunha et al. 1987; Hayward et al. 1997; Marker et al. 2003).

Hayward et al. (1992) demonstraram que as células estromais são essenciais para a diferenciação e organização arquitetural do epitélio prostático, pois na ausência de células estromais, mesmo com altos níveis de andrógenos locais, tanto a função secretora quanto a organização epitelal característica na próstata, não são atingidas.

Nemeth & Lee (1996) e Sugimura et al. (1986) sugeriram que o estroma seja o primeiro alvo da ação dos andrógenos, sendo a resposta epitelial mediada por fatores estromais. Além disso, tanto o seio urogenital quanto os brotos prostáticos, não apresentam receptores androgênicos em níveis detectáveis, enquanto o mesênquima do seio urogenital e o estroma da próstata em formação apresentam grandes quantidades desses receptores. Essas evidências sugerem que a ação dos andrógenos na morfogênese epitelial prostática deva ser indireta, atuando via estroma, uma vez que parte significativa do crescimento epitelial (que é dependente do estímulo androgênico) ocorre na fase em que as células epiteliais não apresentam receptores para andrógenos (Donjacour & Cunha, 1988).

Assim, a interação parácrina entre o epitélio e o estroma, que é mediada por andrógenos e outros fatores, tais como EGF, FGF, TGF- β , IGF, desempenha um papel fundamental na regulação da fisiologia prostática (Lee, 1996; Farnsworth, 1999; Marker et al. 2003).

No homem, a testosterona (T) é o mais abundante andrógeno circulante, sendo produzido principalmente pelas células de Leydig no testículo (95%). A zona reticular da glândula adrenal contribui com 5% da produção de andrógenos, sintetizando a androstenediona e diidroepiandrosterona, os quais são menos potentes que os andrógenos testiculares (Aumüller & Seitz, 1990).

Na próstata, a T é convertida em diidrotestosterona (DHT), que é o principal andrógeno responsável pelo desenvolvimento prostático (Torres et al. 2003). A DHT é sintetizada a partir da redução enzimática da testosterona pela ação da enzima 5 α -redutase. Estudos imunohistoquímicos e de hibridização *in situ* identificaram duas isoformas desta enzima (tipos I e II), sendo a 5 α -redutase tipo I encontrada preferencialmente na pele e no fígado, enquanto a do tipo II, predomina nos tecidos andrógeno-dependentes. Na próstata, as células estromais e epiteliais basais expressam atividade da 5 α -redutase tipo II, mas não as células epiteliais secretoras (Steers, 2001).

A DHT tem 10 vezes mais afinidade ao receptor de andrógeno (AR) que a testosterona (Deslypere et al. 1992). Essa maior afinidade é responsável pelo aumento da estabilidade na ligação entre AR e receptor de AR, proporcionando aumento na transcrição gênica. Embora cada um desses andrógenos se ligue ao mesmo receptor, cada um exerce

efeitos biológicos distintos. No desenvolvimento prostático, por exemplo, quando a conversão da T em DHT é bloqueada, a testosterona é capaz de induzir a diferenciação do seio urogenital em tecido prostático, mas o desenvolvimento e crescimento glandular são grandemente reduzidos (Marker et al. 2003). Além disso, a deficiência na atividade da 5α -redutase está relacionada a casos de pseudohermafroditismo masculino (Imperato-McGinley, 1991).

A vesícula seminal tem origem a partir do ducto de Wolffian junto com o epidídimo e o ducto deferente. Esta distinta origem se reflete também na regulação hormonal. A testosterona somente é responsável pela virilização do ducto de Wolffian e conseqüente formação da vesícula seminal (George, 1997; Marker et al. 2003). A inibição da formação de DHT nos estágios iniciais da embriogênese não impede a formação das estruturas derivadas do ducto de Wolffian (Imperato-McGinley et al. 1974; Imperato-McGinley, 1991).

A vesícula seminal é uma glândula menos complexa estruturalmente que a próstata. Ela é constituída de um único ducto muito dilatado sem ramificações. O ducto é revestido por um epitélio muito pregueado com células epiteliais secretoras e células basais. Outra característica importante da vesícula seminal é a espessa camada de células musculares lisas ao redor do ducto. Entre a camada muscular e o epitélio, existe uma lamina própria de tecido conjuntivo frouxo bem evidente (Hayward et al. 1996a; 1996b).

A próstata e a vesícula seminal como modelos de estudo de regulação hormonal

A próstata e a vesícula seminal permanecem rudimentares até a puberdade, quando ocorre considerável aumento da produção de andrógenos pelos testículos e crescimento glandular (Nazian, 1986). No indivíduo adulto, a privação androgênica (por orquiectomia, tratamento com antiandrógenos ou pela união desses eventos) causa atrofia das glândulas.

Neste processo de atrofia/involução são observadas mudanças rápidas e drásticas na próstata e na vesícula. A notável redução do tamanho e peso do órgão é decorrente de uma série de eventos, inicialmente marcada por uma diminuição do fluxo sanguíneo prostático, parada na síntese protéica, seguida pela diminuição na altura e no número das células

epiteliais por processos de apoptose, resultando em lóbulos reduzidos com células epiteliais baixas e aumento relativo do estroma glandular (Brandes, 1966; Kyprianou & Isaacs, 1988; Carvalho et al. 1997a; Shabsigh et al. 1998; Vilamaior et al. 2000). A involução da próstata seguida à privação androgênica tem sido extensivamente usada em modelos de roedores para o estudo da fisiologia prostática (Powell et al. 1996).

A involução da prostática, seguida à castração, pode ser dividida em três fases distintas. Na primeira fase, representada pelos dois primeiros dias após a privação androgênica, não se observa alteração no peso úmido, conteúdo de DNA ou RNA. Na segunda fase, entre o 3º e 7º dias, ocorre rápida involução tecidual, com declínio de peso glandular, conteúdo de DNA, RNA. Neste período, ocorre o pico de apoptose das células epiteliais, principalmente das células secretoras da região distal dos ductos. A fase final da regressão glandular, atingida por volta do 21º dias após a castração, é caracterizada pela estabilização tecidual. Após esse período, perda de peso, além de conteúdo de DNA e proteínas não são evidentes (Lee, 1996).

A involução prostática provocada pela privação androgênica pode ser revertida pela administração exógena de andrógenos, com a total recuperação do peso e estrutura histológica (Sandford et al. 1983). Este ciclo de involução-recuperação glandular pode ser repetido por mais de 30 vezes (Tsujimura et al. 2002). Uma subpopulação de células basais andrógeno-independentes (stem cells), localizadas principalmente na região proximal da próstata, têm papel relevante nesse processo de recuperação glandular.

Tsujimura et al. (2002) demonstraram que após a exposição a andrógenos, as células basais iniciam uma fase de proliferação e migração ao longo dos ductos prostáticos em direção à região distal, com formação dos brotos epiteliais e suas ramificações, que invadem o estroma. Durante o processo de migração, as células basais formam grupos (clusters) ao longo dos ductos. Concomitantemente com os processos de proliferação e migração ocorrem a diferenciação das células basais em células secretoras luminais, que iniciam a síntese da secreção prostática.

Maffini et al. (2002) observaram que o pico de proliferação celular ocorre por volta do 3º dia de reposição hormonal, quando ocorre expressiva diminuição no índice mitótico. Esse fato parece estar relacionado à alta expressão da proteína nuclear AS3, conhecida por

mediar a parada (arrest) da proliferação celular induzida por andrógeno, conforme estudos imunohistoquímicos de incorporação de BrdU e expressão de AS3. Esse mecanismo de controle parece contribuir para a manutenção do volume da próstata, mesmo em animais adultos, onde os níveis de andrógenos são constantemente altos.

O processo de involução da próstata ventral e da vesícula seminal é muito semelhante. Entretanto, diferenças na sensibilidade de resposta à reposição hormonal entre as glândulas já foram sugeridas (Sufrin & Coffey, 1974; Chung & Raymond, 1975; Huttunen et al. 1982; Nishino et al. 2004). Contudo, estes resultados foram obtidos utilizando-se próstatas com 7 dias de involução, ou seja não completamente involuídas (Sufrin & Coffey, 1974). Outros estudos utilizaram animais neonatos ou na puberdade, momentos em que as glândulas ainda estão em crescimento (Chung & Raymond, 1975; Nishino et al. 2004). E, ainda, outro estudo, utilizando próstatas completamente involuídas, não avaliou a vesícula seminal e não investigou a resposta proliferativa (Huttunen et al. 1982). Estas diferenças experimentais e de abordagens encontradas na literatura, não permitem uma comparação objetiva da resposta hormonal entre as duas glândulas.

A próstata ventral como modelo de estudo da matriz extracelular

Entre as células epiteliais e o estroma encontra-se a membrana basal. Esta estrutura é extremamente importante no controle das atividades celulares e, principalmente, na manutenção da fisiologia das células epiteliais (Hayward et al. 1997). Composta principalmente de colágeno tipo IV e laminina, a membrana basal é essencial para a manutenção do fenótipo diferenciado e secretor das células epiteliais glandulares (Labat-Robert et al. 1990, Ferguson et al. 1992). Os principais componentes das membranas basais foram detectados na próstata humana normal (Knox et al. 1994) e nas membranas basais dos carcinomas com diferentes graus de diferenciação tumoral, com exceção do colágeno do tipo VII, que está ausente dos ductos neoplásicos.

Carvalho e Line (1996) descreveram as modificações associadas à membrana basal das células epiteliais e das células musculares lisas ocorridas após a privação de andrógenos, demonstrando que eventos apoptóticos ocorrem após a perda de adesão da

célula à membrana basal e que existe um retardo na absorção das membranas basais residuais, as quais se tornam extremamente onduladas contendo moléculas intactas de laminina, mesmo após 21 dias de castração.

Por outro lado, Ilio et al. (2000) observaram que a laminina está presente uniformemente na membrana basal ao longo do sistema de ductos prostáticos, enquanto o colágeno tipo IV é encontrado na membrana basal da região distal e intermediária, mas está praticamente ausente na região proximal. Eles também demonstraram que o processo de involução prostática inicia-se com a perda ou redução do colágeno tipo IV, nas diferentes regiões dos ductos, durante os primeiros períodos de castração, enquanto a laminina permanece intacta. Após o período de pico de apoptose (3º e 4º dia após a castração), o colágeno tipo IV volta a ser encontrado na membrana basal dos ductos. Isto sugere uma direta associação entre o aumento da apoptose e a perda de colágeno tipo IV.

A matriz extracelular do estroma, além de apresentar os componentes de membrana basal das células musculares lisas, é formada também por fibras de colágeno tipo I e tipo III, as quais sofrem um extenso rearranjo na próstata em regressão. Este rearranjo é caracterizado por um aspecto pregueado das fibras ao redor dos ductos e está intimamente associado às funções assumidas pelas células musculares lisas após a castração (Vilamaior et al. 2000).

Microfibrilas de colágeno tipo VI e fibras do sistema elástico também são encontrados no estroma prostático e apresentam modificações durante a involução prostática. Estes componentes parecem estar envolvidos no controle de alguns aspectos do comportamento celular e desempenham um papel estrutural, mantendo a integridade do órgão (Carvalho et al. 1996; 1997a). Modificações nas fibras do sistema elástico e nas fibras reticulares também foram descritas na próstata humana em condições normais e em condições patológicas (Taboga & Vidal, 2003; Vilamaior et al. 2003).

Vilamaior et al. (2000) demonstraram progressivo acúmulo de fibras colágenas e células musculares lisas ao redor do epitélio glandular após a privação androgênica. Essas alterações se tornaram mais evidentes entre o 14º e 21º dias após a castração. Concomitante com a involução prostática, as células musculares lisas passaram a apresentar contorno irregular, intimamente associado às fibras colágenas. Essas células sofreram alterações

fenotípicas, passando de um estado contrátil para o de uma célula secretora, envolvida na síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, auxiliando no remodelamento dos componentes fibrilares do estroma.

A próstata ventral como modelo de estudo da atividade de MMPs

Tanto o processo de involução, quanto a recuperação glandular, envolvem intensa reorganização da matriz extracelular da próstata, com degradação e síntese dos componentes estromais, além de alteração na organização estrutural da membrana basal epitelial e das células musculares lisas. Da mesma forma, um dos eventos críticos da invasão tumoral e metástase é a degradação da matriz extracelular, principalmente da membrana basal, que funciona como barreira. Em ambos os processos, a degradação da matriz extracelular é feita por uma variedade de proteases, principalmente pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) (Matrisian, 1990; Stamenkovic, 2000; Seiki, 2003).

As MMPs são endopeptidases dependentes de metais, principalmente zinco e cálcio, capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos. Estas enzimas estão envolvidas em processos fisiológicos normais, tais como na embriogênese, na ovulação, na involução do útero e da mama, na erupção dental e na remodelação e renovação dos componentes da matriz extracelular (Heikinheimo & Salo, 1995; Bagavandoss, 1998; Tanney et al. 1998; Ishizuya-Oka et al. 2000; Quaranta, 2000).

De acordo com o substrato que degradam, as MMPs são divididas em 5 grupos principais: 1) as collagenases intersticiais; 2) as gelatinases; 3) as estromelisinases; 4) as metaloproteinases de membrana e 5) MMPs que não se enquadram em nenhum dos grupos anteriores (tabela 1).

Tabela 1. Principais metaloproteínases de matriz e suas características

Grupo de MMPs	Número da MMP	Nome comum	Peso molecular relativo da pro-enzima/	Peso molecular relativo da enzima ativa
Colagenases intersticiais	MMP-1	colagenase 1 ou colagenase de fibroblasto	57 kDa	42/46 kDa
	MMP-8	colagenase 2 ou colagenase de neutrófilo	85 kDa	67 kDa
	MMP-13	colagenase 3 ou colagenase de osteoblasto	60 kDa	48 kDa
Gelatinases	MMP-2	gelatinase A	72 kDa	66 kDa
	MMP-9	gelatinase B	92 kDa	78 kDa
Estromelisinas	MMP-3	estromelisina 1	57 kDa	48 kDa
	MMP-10	estromelisina 2	57 kDa	47 kDa
	MMP-11	estromelisina 3	-	-
Metaloproteínases de membrana	MMP-14	MT1-MMP	65 kDa	63 kDa
	MMP-15	MT2-MMP	72 kDa	55/48 kDa
	MMP-16	MT3-MMP	65 kDa	63 kDa
	MMP-17	MT4-MMP	-	-
	MMP-24	MT5-MMP	-	-
	MMP-25	MT6-MMP ou leucolisina	65 kDa	-
Outras metaloproteínases	MMP-7	matrilisina	28 kDa	19 kDa
	MMP-12	elastase de macrófago	48 kDa	22 kDa
	MMP-18	colagenase 4	-	-
	MMP-19	-	-	-
	MMP-20	esmaltelina	54 kDa	25 kDa
	MMP-21	-	70 kDa	66 kDa
	MMP-22	-	58 kDa	53 kDa
	MMP-23	-	58 kDa	45 kDa
	MMP-26	endometase humana / endométrio	30 kDa	18 kDa
	MMP-27	-	60/58 kDa	50/48 kDa
	MMP-28	epilisina / testículo e queratinócitos	62/58 kDa	50/48 kDa

As MMPs são sintetizadas na forma de um precursor latente que são ativadas no espaço extracelular. As células sintetizam uma classe de metaloproteinases denominadas Metaloproteinases de Membrana (MT-MMPs), que possuem a propriedade de clivagem e ativação das MMPs latente. Além das MT-MMPs, outras proteases são capazes de ativar as MMPs, entre elas estão a plasmina, triptase, quimase. As MMPs também podem sofrer processos de auto-ativação ou auto-clivagem (Matrisian, 1990; Stamenkovik, 2000). As células também secretam proteínas inibitórias da atividade das MMPs. Esses inibidores são conhecidos como Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs). Assim, a atividade dessas enzimas é regulada por meio de um complexo mecanismo de síntese, ativação e inibição.

A secreção prostática, tanto a da próstata humana como a da próstata de ratos, apresentam atividade gelatinolítica de proteases cálcio dependentes (MMPs) de 64, 66, 71, 76 e 81kDa e 48, 51, 74 e 80 kDas, respectivamente. Além disso, também são observadas intensa atividade de proteases independentes de cálcio (classificadas como serina-proteases) de aproximadamente 27 kDa, e proeminente atividade das formas de 22, 36 e 41 kDas (Wilson et al. 1993a, b).

Wilson et al. (1992) descreveram aumento na atividade da MMP-2 durante o desenvolvimento e maturação da próstata e vesícula seminal de ratos. A maior atividade foi observada durante o desenvolvimento prostático em ratos com idade entre 2 e 10 dias. Essa atividade diminuiu progressivamente com a maturação sexual.

Após a castração, Wilson et al. (1991) demonstraram aumento na atividade das proteases de aproximadamente 58, 63 e 66 kDa, estimulada por cálcio, durante involução prostática, com pico de atividade por volta do 7º dia. Esses autores também descreveram aumento na atividade da forma de 58 kDa durante a recuperação glandular com tratamento com testosterona, após 4 dias.

Powell et al. (1996) demonstraram o aumento de expressão de RNA mensageiro para MMP-7 durante a involução prostática por castração. Esses autores observaram um pico de expressão de RNA mensageiro no 5º dia após a castração e diminuição de expressão após 8 dias. Estudos de hibridização *in situ* mostraram que as são as células epiteliais que sintetizam a MMP-7.

Jung et al. (1998) demonstraram a expressão de MMP-9 nas epiteliais tumorais, mas não nas células estromais da próstata.

O tecido tumoral é constituído de células cancerosas envolvidas pelo estroma. Embora as células cancerosas possam sintetizar MMPs, na maioria dos casos, apenas as células estromais secretam gelatinases. Fibroblastos e uma variedade de células do sistema imune, como macrófagos, monócitos, células dendríticas, entre outras, sintetizam gelatinases. Células dendríticas, quando estimuladas, demonstram aumento na capacidade de migração em matrigrel, principalmente devido ao aumento de expressão de MMP-9 e diminuição de TIMPs 1- e 2. Outro exemplo é a redução da migração de monócitos pela doxazosina, devido à inibição da atividade da MMP-9. Assim, a expressão de gelatinases em tumores não é necessariamente uma consequência do aumento de síntese pelas células tumorais, já que a atividade de MMPs está relacionada à migração das células do sistema imune, que são a primeira linha de defesa contra a invasão tumoral. As células cancerosas podem induzir as células normais a alterarem a expressão de MMPs, demonstrando que fatores solúveis sintetizados pelas células tumorais tomam parte no processo de regulação das MMPs. A degradação dos componentes da matriz extracelular também pode afetar a expressão das MMPs. Por exemplo, a degradação proteolítica da laminina pela elatase gera fragmentos que podem estimular a expressão de MMP-9 em macrófagos via fosforilação de MAPK (Mook et al. 2004).

Qualquer desequilíbrio na interação desses eventos pode levar a alterações de expressão e atividade dessas enzimas, como por exemplo, em tecidos cancerosos, onde observa-se aumento na razão MMPs/TIMPs, o que leva a um aumento na atividade catalítica dessas proteases (Matrisian, 1990).

Hoekstra et al. (2001) sugerem o estudo da expressão de MMPs nos tecidos como uma ferramenta para o diagnóstico do grau dos tumores, devido à correlação entre a expressão de MMPs no tumor e o estágio do tumor. Um exemplo é o aumento nos níveis de MMP-2, -7, -8, -9, -10, -13 e -14 em pacientes com câncer prostático, quando comparado aos níveis de homens saudáveis (Stearns & Stearns, 1996;). Jung et al. (2003) demonstraram, experimentalmente, uma elevada expressão de MMP-9 no plasma

sanguíneo de ratos com progressivo câncer de próstata. Esses autores sugerem a determinação dos níveis de MMP-9 como ferramenta para monitoramento da progressão de câncer de próstata. Liao et al. (2003) e Pang et al. (2004) demonstraram que hormônios androgênicos podem regular a expressão das MMPs- 2 e 13.

As gelatinases (MMPs 2 e 9) têm sido associadas ao potencial invasivo e metastático dos tumores malignos, principalmente por degradarem preferencialmente o colágeno tipo IV, principal constituinte da membrana basal, conforme observado em pacientes com de câncer de cólon. Todos os pacientes diagnosticados com metástase apresentaram ausência de colágeno IV nas membranas basais, associado à alta expressão local de MMP-9. Estudos de imunolocalização evidenciaram que a MMP-9 é mais frequentemente expressada em tumores de estágio avançado, onde as células tumorais encontram-se muito próximas às células inflamatórias, sugerindo que a proteólise localizada contribui para a invasão. Além disso, tem sido descrito que as gelatinases estão envolvidas na citodiferenciação, apoptose, angiogênese e crescimento das células tumorais (Mook et al. 2004).

Essas evidências quanto à participação das MMPs no caráter metastático dos tumores demonstram que a inibição da atividade das MMPs, por inibidores naturais ou sintéticos, pode ser um importante caminho para o tratamento do câncer de próstata independente de hormônios (Kugler, 1999; Lokeshwar, 1999; Woessner, 1999; Hidalgo & Eckhardt, 2001).

2. Justificativa e relevância da temática

Desde que, por razões ainda desconhecidas, os processos de neoplasias benignas e malignas nas glândulas andrógeno-dependentes são mais limitadas à próstata e que os andrógenos têm sido frequentemente implicados na etiologia e tratamento destas patologias, mais investigações sobre a ação dos andrógenos na próstata e na vesícula podem ser informativas para tentar explicar esta marcante diferença.

As MMPs têm participação importante na degradação e remodelação da matriz extracelular em processos normais e patológicos. Recentemente, os estudos sobre

tratamento de tumores invasivos e metastáticos têm revelado a enorme importância de se estudar a participação destas enzimas e o uso de inibidores sintéticos nos processos tumorais.

Considerando a extensa remodelação tecidual sofrida durante a involução prostática e a reorganização da glândula após a reposição hormonal, parece fundamental realizar uma investigação sobre a atividade destas MMPs, assim como caracterizar a reorganização da matriz extracelular durante o processo de recuperação da próstata ventral de ratos, procurando um maior entendimento da participação destas enzimas na fisiologia prostática normal e patológica.

3. Objetivos

Comparar, por meio de análises morfométricas e estruturais, a resposta glandular da próstata ventral e da vesícula seminal de ratos castrados após a o tratamento com testosterona;

Caracterizar o processo de reorganização estromal da próstata ventral de ratos castrados e tratados com testosterona, empregando-se microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão;

Avaliar a atividade das MMPs-2 e 9, por zimografia, durante os processos de involução prostática seguida a privação androgênica e a recuperação glandular com a reposição hormonal.

4. Artigo e Manuscritos resultantes desta Tese.

“Glandular recovery with testosterone replacement in castrated rats:
a comparison between ventral prostate and seminal vesicle”

“Reorganização do estroma da próstata ventral de ratos castrados
submetidos à reposição hormonal”

“Atividade da MMP-2 e MMP-9 na próstata ventral de ratos
durante a privação androgênica e reposição hormonal”

**Glandular Recovery with Testosterone Replacement in Castrated Rats:
A Comparison between Ventral Prostate and Seminal Vesicle**

Running head: PCNA index of the prostate and seminal vesicle

Luis A. Justulin Jr¹, Rodrigo P. Ureshino², Michelle Zanoni² and Sergio L. Felisbino^{2*}

From the Department of Morphology, Institute of Bioscience, Paulista State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

Correspondence to: Dr. Sérgio L. Felisbino, Department of Morphology, Institute of Bioscience, Paulista State University - UNESP, PO Box 510, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil

(e-mail: felisbin@ibb.unesp.br).

Financial support: FUNDUNESP, CNPq (Proc.476137/03-9) and FAPESP (Proc. 02/11102-4).

Submetido à revista Journal of Andrology

Abstract

The prostate and seminal vesicle are both androgen-dependent glands. However, their incidences of benign and malignant processes are different, suggesting differences in hormone responsiveness. In this work, we investigated the epithelial-cell proliferation and the glandular recovery in the ventral prostate (VP) and seminal vesicle (SV) during androgen reposition after castration. Adult male Wistar rats were castrated and, after 21 days of involution, were treated with testosterone propionate (4mg/kg/day). Intact and castrated rats without testosterone replacement (TR) were used as control. VP and SV were processed for histochemistry, morphometric-stereological analysis and immunocytochemistry for PCNA to determine the proliferation index (PI). After 10 days of TR, the VP weight reached about 73% of the control values, but the SV weight overcame about 21% of the control values. Morphometry showed that 3 days of treatment was sufficient to recover the epithelial cell height in both glands. However, stereology showed that VP lumen and epithelium absolute volumes were not recovered after 10 days of TR. VP and SV control PIs were about 1% and 8%, respectively. Castration abolished any cell proliferation in both glands. Androgen reposition at 3 and 10 days produced, respectively, a mean PI of 34% and 11% for VP and 94% and 16% for VS. These findings indicate that epithelial cells from involuted SV are more sensitive to TR than those from VP. In the VP, the accumulated stroma remodeling and a more complex glandular structure, with several branched and folded ducts, may also take more time to restore.

Key words: proliferation index, castration, morphometry, stroma, PCNA

INTRODUCTION

The prostate and seminal vesicle (SV) are androgen-dependent secretory glands of the male genital tract (Cunha et al, 1987; 1992). Androgen ablation in adulthood promotes an extensive involution of the prostate and seminal vesicle gland with arrest of secretory activity and elimination of epithelial cells by apoptosis (Kyprianou and Isaacs, 1988; Sensibar et al, 1991). The epithelium modification is followed by an atrophy of smooth muscle cells and accumulation of extracellular matrix components (Carvalho and Line, 1996; Carvalho et al, 1997a; 1997b; Vilamaior et al, 2000). After 21 days of androgen ablation, the prostate and seminal vesicle glands have about 10% of normal wet weight and the stroma occupies most portions of the glands (Lee, 1996; Antonioli et al, 2004).

Testosterone replacement (TR) after a short or long period since castration restores the original architecture of both glands, but some quantitative differences have been found suggesting differences in their response to hormonal control stimulus (Sufrin and Coffey, 1974; Chung and Raymond, 1975; Huttunen et al, 1982; Sandford et al, 1984; Nishino et al, 2004).

However, some previous works used immature rats or incomplete gland involution (7 days of castration) (Sufrin and Coffey, 1974; Chung and Raymond, 1975; Nishino et al, 2004). Huttunen et al (1982) evaluated the ventral prostate regrowth using adult rats castrated 30 days prior to the onset of TR, but did not pay attention to the proliferative response of the ventral prostate and did not analyze the seminal vesicle.

Due to the fact that, for unknown reasons, both benign and malignant neoplasia of human sex accessory tissue is primarily limited to the prostate, and because hormones have been frequently implicated in the etiology and treatment of these pathologies, more investigations about androgen action in the prostate and seminal vesicle may help to explain this marked difference.

Thus, in this work, we investigated the glandular recovery with TR on 21 days after involution of the ventral prostate and seminal vesicle from adult castrated rats, with special attention to epithelial cell proliferation.

MATERIAL AND METHODS

Animals, castration and testosterone administration

Adult male 3-months-old Wistar rats were used. They were maintained in a controlled environment with free access to food and water. The experiment was performed according to the *Guide for Care and Use of Laboratory animals*. The animals were divided into three groups: intact rats (control = CT), castrated rats without testosterone replacement (CS), and castrated rats plus testosterone replacement (TESTO).

Castration was performed via the scrotal route under sodium pentobarbital anesthesia (30mg/kg – intraperitoneally). After 21 days of glandular involution, a group of castrated animals started to receive daily doses of testosterone propionate (TP) (4mg/kg of body weight/day) (Sigma-CO, Saint Louis, MO, USA) dissolved in corn oil, subcutaneously injected, for 10 days. CT and CS animals received only the vehicle.

After 0, 3, 5, 7 and 10 days of the TR, 8 animals from each group were killed by overdose of pentobarbital. The ventral prostates (VP) and seminal vesicles (SV) were excised, immediately weighed and immersed in fixative. The coagulating gland or anterior prostate was separated from seminal vesicle before weighing.

Hormone Assay

Blood samples from each animal were collected at the time of sacrifice. The plasma was separated and stored at –80°C. Plasma testosterone (T) concentration was measured by RIA using a commercial COAT-A-COUNT – DPC-Med Lab (DPC, Los Angeles, CA, USA) kit, without modification. The test sensitivity was 0.5 ng/ml.

Histochemistry

Venrtal prostates and seminal vesicles were fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in phosphate buffer saline for 24 hours. Fixed samples were dehydrated in graded ethanol series and embedded in glycol metacrilate resin (Leica Histoiresin embedding kit) or clarified in xylene and embedded in Paraplast (Sigma-CO, Saint Louis, MO, USA). Resin sections (3µm) were submitted to Massson's trichrome staining for general morphology

study and for morphometric-stereological analysis. Analyzes were carried out using a DMLB Leica Microscope and the images were obtained by a Leica DFC300FX digital camera connected to the microscope.

Morphometric-Stereological Analysis

The mean heights of the ventral prostate and seminal vesicle epithelium were determined for each experimental group by 200 random measures at a magnification of X1000. The measurements were done utilizing digitalized images, using an image analyzer Leica Q-win software Version 3 for Windows™.

The volume fraction (relative volume) of the ventral prostate lumen and epithelium compartments was determined by using Weibel's system with a 168-point grid (Weibel, 1963) According to Dekler and Coffey (1978), 1 mg of fresh rat ventral prostate tissue had a volume of approximately 1 mm³. Consequently, the weight of the ventral prostate (mg) may be considered as equivalent to volume (mm³). Thus, for calculation of the absolute volume of each compartment, the relative volumes of the lumen and epithelium were multiplied by the mean VP wet weight from the respective group.

Immunohistochemistry for PCNA and proliferation index determination

Sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue pretreated by a citric acid monohydrate antigen retrieval method were immunostained with the mouse monoclonal antibody against Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). The primary antibody was detected using a secondary antibody labbed with peroxidase. The reaction was revealed using diaminobenzidine tetrachloride as a chromagen and the sections were counter-stained with hematoxylin.

Epithelial cells marked for PCNA were counted at a magnification of X400. A total of 4,000 epithelial cells from randomly chosen fields of four different glands from each experimental group were counted. The proliferative index (PI) was expressed as percentage of cells marked in relation to the total cells counted.

Statistical analysis

The values represent mean $\pm$ SD. The Mann-Whitney Test, One-way Anova analysis of variance and Tukey-Kramer test were employed and a P value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

A daily dose of 4mg/kg body weight of TP was sufficient to keep a supra-physiologic plasma T level in TESTO group animals. The plasma T from TESTO animals was significantly higher than control on days 3, 5 and 7 of treatment ($P < 0.05$) and declined to about control levels on day 10. In the castrated rats, the plasma T level was below test sensitivity (0.5 ng/ml) (Fig. 1).

On day 10 after TR, the mean absolute weight of the VP from TESTO group was 316mg and did not reach the mean value of the CT group (433mg) ($P < 0.05$) (Fig. 2A). On the other hand, the seminal vesicle absolute weight from TESTO group overcame the control values (1.7g vs. 1.4g, respectively) ($P < 0.05$) (Fig. 2B). Castration up to 31 days (CS d10) did not cause additional absolute weight reduction in either gland (Figs. 2A-B).

The morphological analysis of normal VP revealed ducts lined by tall columnar secretory epithelial cells, filed with secretion, and surrounded by a reduced stroma (Fig. 3A). Castration produced low cubical epithelial cells, reduced lumen and increased stroma (Fig. 3B). 3 days after TR, VP showed ducts with folded epithelium lined by tall columnar epithelial cells. The secretion had started to accumulate and lateral budding formation forward stroma could be seen (Fig. 3C). 10 days after TR, stroma was not completely reduced and the ducts presented an increased lumen and a less folded epithelium (Fig. 3D). The normal seminal vesicle presented a large lumen and a folded epithelium formed by tall columnar cells (Fig. 3E). Castration promoted a reduction in the cell size and in the lumen area (Fig. 3F). Testosterone replacement restored the epithelial height and lumen area, and reduced the number and the extension of the epithelium folds (Figs. 3G-H).

To observe quantitatively the action of androgen on the epithelial height, a morphometric analysis was performed (Fig. 4). The normal mean height of VP and SV epithelial cells showed a negligible reduction from the beginning to the end of the experiment. Castration reduced by half the height of epithelial cells from both glands

($P < 0.001$). A rapid response of epithelial cells to restore the normal height of both glands by testosterone replacement was observed. And in the VP (after 10 days of TR) and in the SV (after 5 and 7 days of TR), the heights of epithelial cells were higher than those of the controls ($P < 0.05$) (Figs. 4A-B).

As incomplete recovery of the VP absolute weight was observed, while the epithelial cell height and the apparent general architecture of the gland were obtained, a stereological analysis was employed to determine objectively the castration and testosterone replacement effects on the glandular parenchyma of the VP. Figure 5A shows that the lumen increased in the control groups during the experimental time. Castration decreased tremendously the lumen compartment and TR progressively increased the lumen accumulation; however, on day 10 after TR, the lumen absolute volume did not reach the control value ($P < 0.001$). The epithelium did not increase in the control groups during the experimental time. Castration decreased tremendously the epithelium compartment and TR progressively increased the epithelium quantity, although, on day 10 after TR, the epithelium absolute volume did not reach the control value ($P < 0.01$) (Fig. 5B). The lumen and SV epithelium absolute volume from TESTO day 10 group were higher than in the CT day 10 group (data not shown).

Thus, to evaluate the epithelial cell population reposition in both glands after TR, there was processed an immunoreaction for PCNA in the ventral prostate and seminal vesicle sections (Fig. 6). In the VP and SV from the CT group, positive reaction in a few nuclei from secretory epithelial cells was observed (Figs. 6A and E, respectively). After 3 days of TR, the VP presented many interphase nuclei marked in brown and also the cytoplasm of epithelial cell in mitosis (Fig. 6B), but in the SV, only a few nuclei are not marked (Fig. 6F-G). In the TESTO day 5 group, the positive reaction can still be observed in many cell nuclei from VP and SV (Fig. 6C and H, respectively). And 10 days after TR, the number of marked nuclei decreased, but was still higher than in the CT group (Figs. 6D and I, respectively).

The determination of the PCNA index or proliferation index (PI) was important to quantify the cell proliferation in both glands. The proliferative index of seminal vesicle cells was much higher than that of the ventral prostate in all situations analyzed here. VP

and SV control PIs were about 1% and 5%, respectively. Castration abolished any cell proliferation in both glands. Androgen reposition at 3, 5, 7 and 10 days produced, respectively, a mean PI of 33.5, 21.8, 18.5 and 11.3% for VP and 94.6, 40.1, 24.1 and 16.4% for VS ($P < 0.001$) (Figs. 7A-B).

DISCUSSION

In this work we have shown the superior responsiveness of the epithelial cells from involuted SV than VP to testosterone replacement. Differently from previous works, we used adult glands with 21 days of involution, by which most glandular atrophy is completed.

Lee (1996) proposed that castration-induced regression in the rat prostate could be divided into three phases. The first phase is represented by the first 2 days post-castration, during which no significant changes in wet weight, DNA, RNA or protein can be noted. The second phase falls at days 3-7 post-castration, in which a rapid rate of tissue involution occurs. Wet weight, DNA, RNA and protein content all show a rapid rate of decline. The final phase of the prostatic regression is characterized by a rapid rate of stabilization of tissue involution. By day 21 post castration, the prostate wet weight is about 10% of normal and the gland enters into a new steady state, in which further loss in weight is not evident.

Results of the present study confirm those of Lee (1996). We did not observe any additional ventral prostate weight loss from day 21 to day 31 post castration. The same observation was made in the seminal vesicle.

Ten days of testosterone propionate replacement at a dose of 4mg/kg/day was sufficient to demonstrate the difference in the hormone responsiveness between SV and VP. With this dosage, the plasma testosterone level was kept constantly higher than the control, but decreased progressively to a level not statistically significant from control at day 10 of treatment. This decline of plasma testosterone level in castrated testosterone-treated rats may represent the progressive repair of androgen-dependent tissues, which were progressively consuming and metabolizing the circulating androgen.

Higher doses than 4mg/kg/day of testosterone replacement did not produce a superior ratio of prostate recovery. Huttunen et al, (1982), using 10mg/kg/day of

testosterone propionate, got a total ventral prostate wet weight recovery only after 15 days of androgen replacement. However, they did not analyze the seminal vesicle.

In a previous comparative study, Sufrin and Coffey (1974), already observed that the seminal vesicle could be slightly more responsive than the ventral prostate, although they suggested that the difference was only marginal and may be not significant. However, as they used 7 days of glandular involution, they could not have elicited the same response observed in our study.

The normal epithelial cell height was obtained in both glands at 3 days of testosterone replacement, suggesting that the secretory function was rapidly restored. However, after 10 days of treatment, the total secretion accumulation was not completely restored in ventral prostate. This fact is probably related to the incomplete restoration of the epithelial compartment also observed in the prostate. The difference in size of the ventral prostate between the CT group and the TESTO group is totally due to the glandular parenchyma, since the glandular stroma was totally repaired (data not shown).

However, the most important difference between two glands demonstrated in this work was the proliferation index of the epithelial cells. In this work, the PCNA index showed that SV epithelial cells are almost 3 times more sensitive to testosterone replacement than those from VP. The difference in the number of cells marked in the two glands at 3 days of treatment was tremendously. Previous works did not reveal such a great difference. The high ratio of epithelial cell proliferation observed in the seminal vesicle may explain its faster glandular recovery. In the ventral prostate, the incomplete recovery of the epithelium and lumen is probably due to the slow reposition of secretory epithelial cells.

Moreover, two other facts may be also involved in the differences observed in these two glands. First, the greater structural complexity of the ventral prostate could take more time to re-establish. The seminal vesicle, in mammals, is a less complex structure, constituted of elongated, dilated and a non-branched duct. The ducts are lined by a tall columnar secretory epithelium with many projections. The seminal vesicle fibromuscular stroma is very well developed and can be divided in a loose lamina propria and a thick smooth muscle cells layer (Hayward et al, 1996a; 1996b).

On the other hand, the adult rat ventral prostate is constituted of 5-7 main ducts, branched and folded in profusion. Along the ducts, there is a morphofunctional variation in both epithelium and stroma from close to the uretra, proximal region, to distant, distal region, with an intermediate region between them. In both distal and intermediate regions, tall columnar secretory cells, some in mitosis, supported by a delicate fibromuscular stroma, line the ducts. On the contrary, the proximal region of the ducts is lined by low-cubic epithelial cells, with low secretory activity and a high rate of apoptosis, and supported by many layers of fibromuscular stroma (Lee et al, 1990). Stromal diffusing factors, such as TGF- β 1 concentration, produced by smooth muscle cells, are supposed to be responsible for increased epithelial cell death and reduced proliferation in the ductal proximal region (Nemeth and Lee, 1996).

In this way, the accumulated stroma found in the involuted prostate could also work as barrier to a fast re-establishment of branched and folded ducts. In fact, at three days of testosterone replacement, we found many buds from main ducts invading the glandular stroma. In the ventral prostate, the epithelial cells should remodel the surrounding stroma to elongate and branch the ducts. This event resembles the aspect found during post-natal prostate development program (Timms et al, 1994).

Second, the ventral prostate and seminal vesicle also present distinct embryological origin and "hormone preference". Ventral prostate develops from the urogenital sinus and seminal vesicle from the Wolffian duct (George, 1997; Marker et al, 2003). Testosterone itself is responsible for virilization of the Wolffian duct system in the epididymis, vas deferens, and seminal vesicle, whereas dihydrotestosterone (DHT), a more potent androgen derived from testosterone, induces the prostate and male external genitalia development (George, 1997; Marker et al, 2003). Thus, impairment of DHT formation results in a characteristic phenotype consisting of predominantly female external genitalia and rudimentary prostate but normally virilized Wolffian ducts and its derivatives (Imperato-McGinley et al, 1974).

In adult rat ventral prostate, the type-2 5-alpha reductase enzyme, which converts T in DHT, is found in both basal epithelial cells and stromal cells (Djoseland et al, 1983). Wright et al, (1996; 1999) showed that DHT is more potent for inducing secretory activity

than T in the prostate epithelial cells. In addition, Kyprianou & Isaacs (1987a; 1987b) showed that, in the castrated rats, androgen-induced increase in prostatic cell number begins only when the concentration of prostatic DHT is above a critical threshold value.

Thus, in the involuted ventral prostate, at the beginning of testosterone replacement, a small number of cells producing DHT are found, while in the seminal vesicle the cells are already responding to the high levels of testosterone.

In conclusion, the results presented in this study showed clearly that epithelial cells from involuted SV are more responsive to proliferation and secretion after testosterone replacement than that from VP. The more complex homonal regulation and glandular structure found in the prostate is responsible for that difference, and is probably involved in the distinct incidence of abnormal growth in this gland.

REFERENCES

- Antonioli E, Della-Colleta HH & Carvalho HF. Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* 2004;25:50-56.
- Carvalho HF & Line SRP. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* 1996;20:809-819.
- Carvalho HF, Taboga SR & Vilamaior, PSL. Collagen type VI is a component of the microfibrils of the prostatic stroma. *Tissue Cell* 1997a;29:163-170.
- Carvalho HF, Vilamaior PSL & Taboga SR. The elastic system of the rat ventral prostate and its modification following orchidectomy. *Prostate* 1997b;32:27-34.
- Chung LWK & Raymond GF. Differences among rat accessory glands in their neonatal androgen dependency. *Endocrinology* 1975;97:145-153.
- Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour AA, Boutin EL & Foster BA. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl* 1992;3:465-475.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ & Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 1987;8:338-362.
- DeKlerk DP & Coffey DS. Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique. *Biomorphometrics. Investig Urol* 1978;16:240-245.

- Djoseland O, Bruchovsky N, Rennie PS, Otal N & Hoglo S. 5 alpha-reductase activity in stroma and epithelium of rat prostate and epididymis. A contribution to elucidation of the mechanism for development of hyperplastic growth of prostatic tissue. *Acta Endocrinol* 1983;103:273-281.
- George FW. Androgen metabolism in the prostate of the finasteride-treated, adult rat: a possible explanation for the differential action of testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone during development of the male urogenital tract. *Endocrinology* 1997;138:871-887.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS & Cunha GR. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat* 1996a;155:81-93.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS & Cunha GR. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 1996b;155:94-103.
- Huttunen E, Romppanen T & Helminen HJ. Testosterone action on the ventral prostate lobe of the castrated rat as assessed with a stereologic morphometric method. *Am J Anat* 1982;165:199-209.
- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T & Peterson RE. Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974;186:1213-1215.
- Kyprianou N & Isaacs JT. Biological significance of measurable androgen levels in the rat ventral prostate following castration. *Prostate* 1987a;10:313-324.
- Kyprianou N & Isaacs JT. Quantal relationship between prostatic dihydrotestosterone and prostatic cell content: critical threshold concept. *Prostate* 1987b;11:41-50.
- Kyprianou N & Isaacs JT. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 1988;122:552-562.
- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA & Liao S. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod* 1990;43:1079-1086.

- Lee C. Role of androgen in prostate growth and regression: stromal-epithelial interaction. *Prostate* 1996;6:52-56.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R & Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 2003;253:165-174.
- Nemeth HA & Lee C. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. *Prostate* 1996;28:124-128.
- Nishino T, Wedel T, Schmitt O, Buhlmeyer K, Schonfelder M, Hirtreiter C, Schulz T, Kuhnel W & Michna H. Androgen-dependent morphology of prostates and seminal vesicles in the Hershberger assay: evaluation of immunohistochemical and morphometric parameters *Ann Anat* 2004;186:247-253.
- Sandford NL, Searle JW & Kerr JF. Successive waves of apoptosis in the rat prostate after repeated withdrawal of testosterone stimulation. *Pathology* 1984;16:406-410.
- Sensibar JA, Liu XX, Patai B, Alger B & Lee C. Characterization of castration-induced cell death in the rat prostate by immunohistochemical localization of cathepsin D. *Prostate* 1991; 16:263-276.
- Sufrin G & Coffey DS. A comparison of the hormone responsiveness of the prostate and seminal vesicles. *Investig Urol* 1974;11:86-391.
- Timms BG, Mohs TJ & Didio LJA. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J Urol* 1994;151:1427-1432.
- Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR & Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* 2000;45:253-258.
- Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 1963;12:131-155.
- Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB & Rittmaster RS. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest* 1996;98:2558-2563.
- Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB & Rittmaster RS. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5 α -reductase. *Endocrinology* 1999;140:4509-4515.

Legend of the figures

Fig. 1. Castration and testosterone replacement effects on the plasma testosterone level from the different experimental groups. The values represent mean $\pm$ SD. In the castrated rats, the testosterone level was below 0.5 ng/ml. Different letters means statistically significant differences with $P < 0.05$. CT = control group and TESTO = castrated plus testosterone replacement group.

Fig. 2. Castration and testosterone replacement effects on absolute weight of the ventral prostate (A) and seminal vesicle (B). The values represent mean $\pm$ SD. A) The value of the TESTO day 10 did not reach the control value with $P < 0.05$ (*). B) Seminal vesicle. The value of the TESTO day 10 overcame the control value with $P < 0.05$ (*). CT = control group, CS = castrated group and TESTO = castrated plus testosterone replacement group.

Fig. 3. Section of ventral prostate (A-D) and seminal vesicle (E-H) stained with Masson's Trichromic. A) VP from CT. Lumen (L) and stroma (S). B) VP from CS. Low cubical epithelial cells (arrow), lumen (L) and stroma (S). C) VP from TESTO day 3. Epithelial budding (arrows), lumen (L) and stroma (S). D) VP from TESTO day 10. Stroma (S), lumen (L) and epithelium (arrow). X200. E) VS from CT. Tall columnar cells (arrow), lumen (L). F) VS from CS. Lumen (L) and low cubical epithelial cell (arrow). G) VS from TESTO day 3. Epithelial cell (arrow) and lumen (L). H) VS from TESTO day 10. Lumen (L) and epithelium (arrow). Scale bar: A and D = 100 μ m; B = 50 μ m; C, E-H = 80 μ m.

Fig. 4. Castration and testosterone replacement effects on the ventral prostate (VP) and seminal vesicle (VS) epithelium heights. The values represent mean $\pm$ SD. A) VP. ** = $P < 0.001$ and * = $P < 0.05$ vs. control. B) SV. ** = $P < 0.001$ and * = $P < 0.05$ vs. control. CT = control group, CS = castrated group and TESTO = castrated plus testosterone replacement group.

Fig. 5. Castration and testosterone replacement effects on the lumen (A) and epithelium (B) absolute volumes from ventral prostate (VP). The values represent mean $\pm$ SD. A) The lumen increased in the control groups during the experimental time. Castration decreased tremendously the lumen compartment. Testosterone replacement progressively restored the lumen accumulation, however, after 10 days, the value did not reach the control value ($P < 0.001$). B) The epithelium did not increase in the control groups during the experimental time. Castration decreased tremendously the epithelium compartment. Testosterone replacement progressively restored the epithelium, however, after 10 days, the value did not reach the control value ($P < 0.05$). CT = control group, CS = castrated group and TESTO = castrated plus testosterone replacement group.

Fig. 6. Immunoreaction for PCNA in the ventral prostate (A-D) and seminal vesicle (E-I). A and E) CT group. Positive reaction in a few nuclei from secretory epithelial cells (arrows). B, F and G) TESTO day 3 group. Positive reaction was observed in many nuclei (brown) and also in the cytoplasm of epithelial cell in metaphase (arrow). In the seminal vesicle (F and G), only a few nuclei were not marked (arrowhead). C and H) TESTO day 5 group. The positive reaction was still observed in many cell nuclei (brown). D and I) TESTO day 10 group. The number of marked nuclei (arrows) decreased, but was higher than in the CT group. Scale bar = 50 μ m.

Fig. 7. Testosterone replacement effect on the proliferation index of epithelial cells from ventral prostate (A) and seminal vesicle (B). The values represent mean $\pm$ SD. The proliferation index of seminal vesicle cells was much higher than that the ventral prostate cells, even in control group ($P < 0.001$). All the TESTO group values vs. control group values differ statistically ($P < 0.001$). CT = control group, CS = castrated group and TESTO = castrated plus testosterone replacement group.

Figure 1.

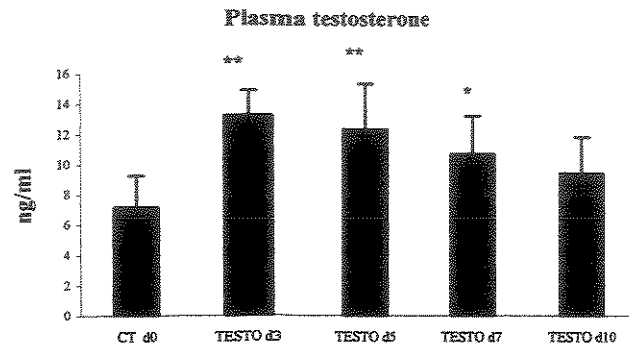


Figure 2.

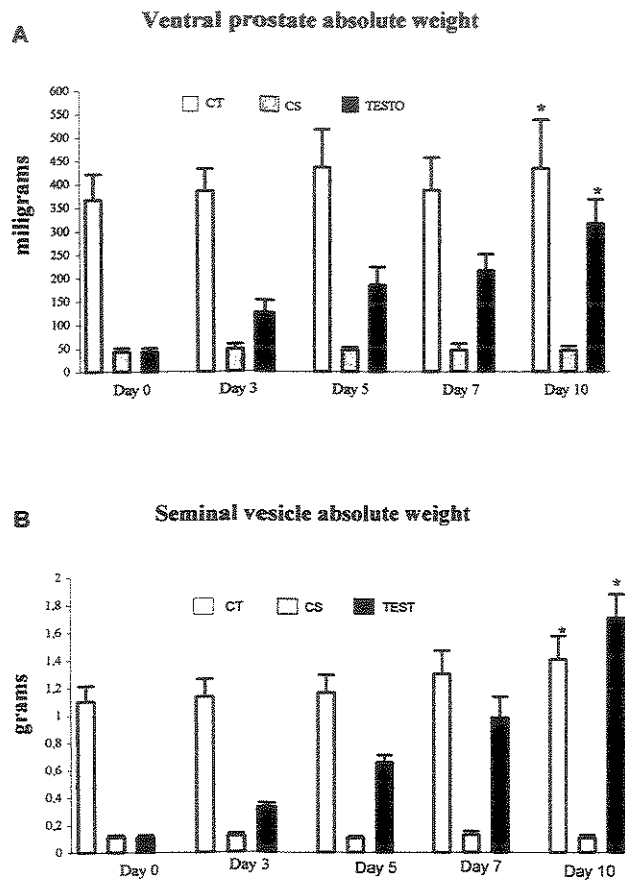


Figure 3.

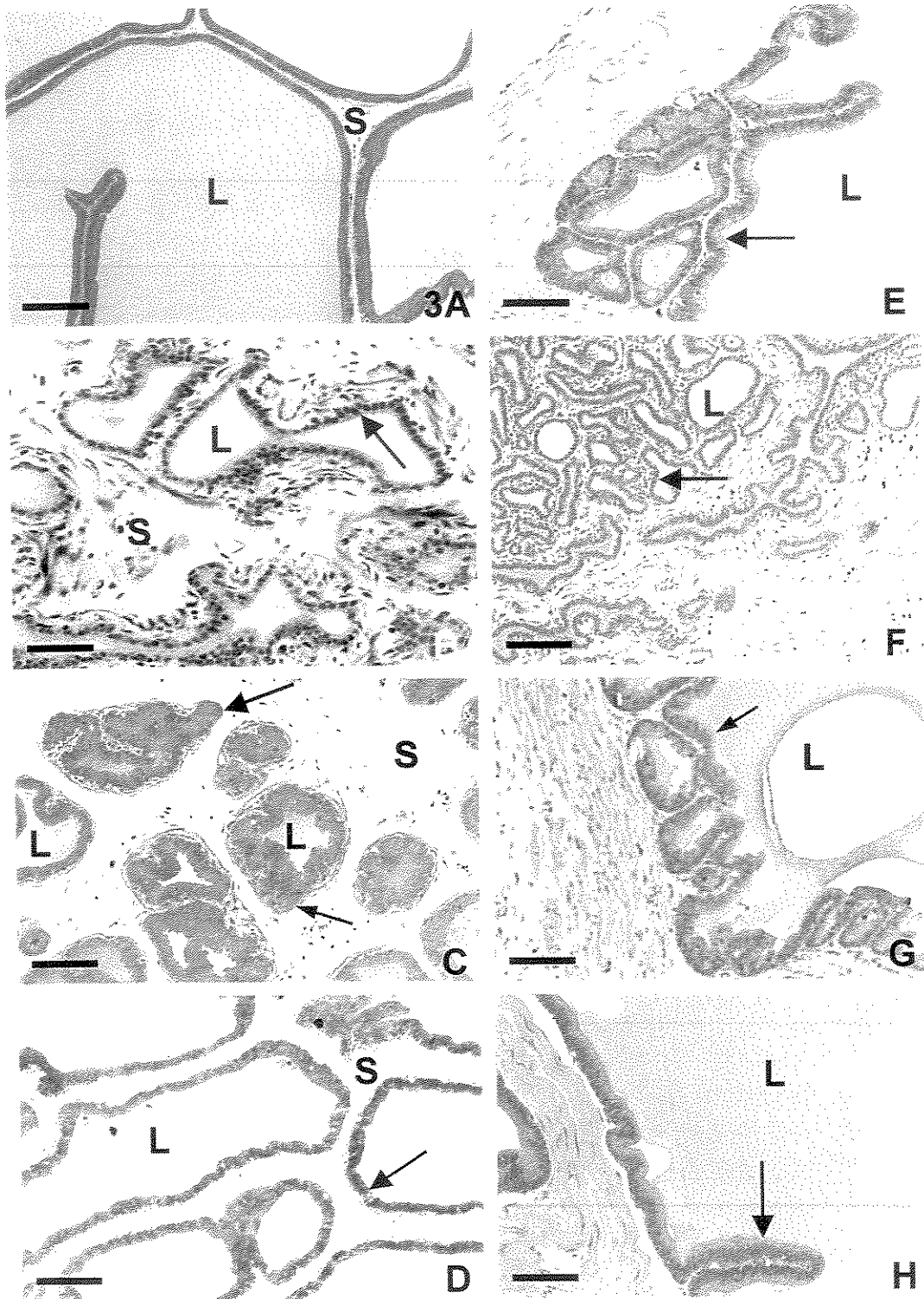


Figure 4.

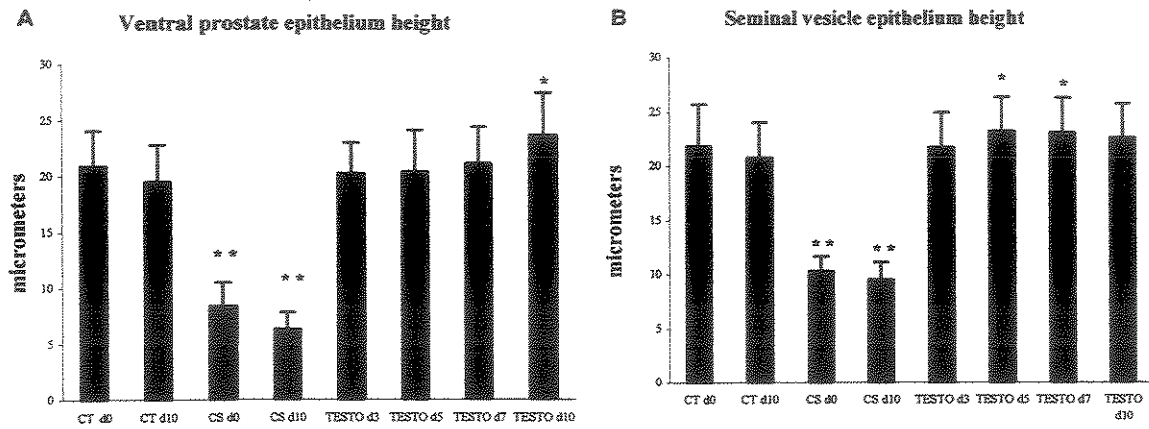


Figure 5.

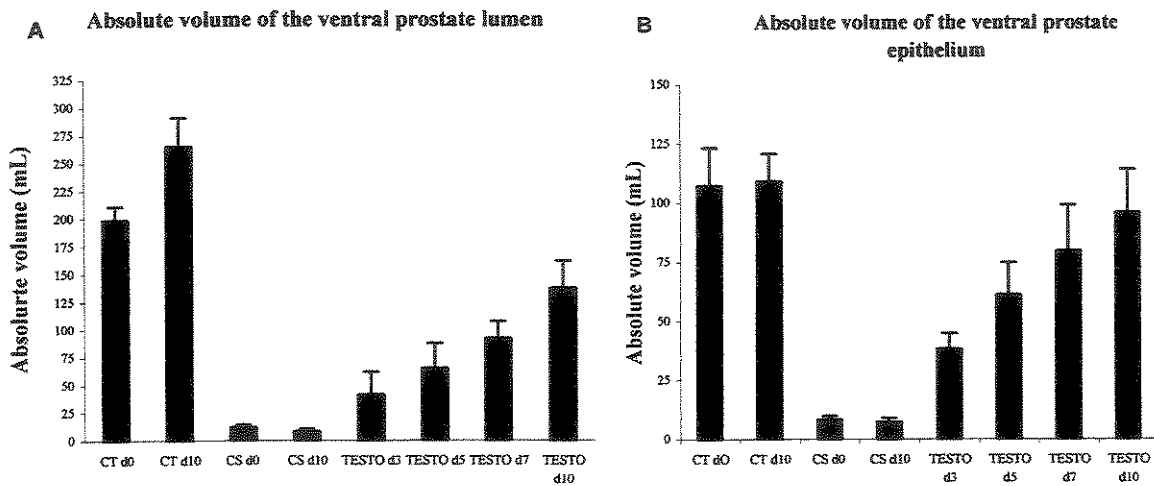


Figure 6.

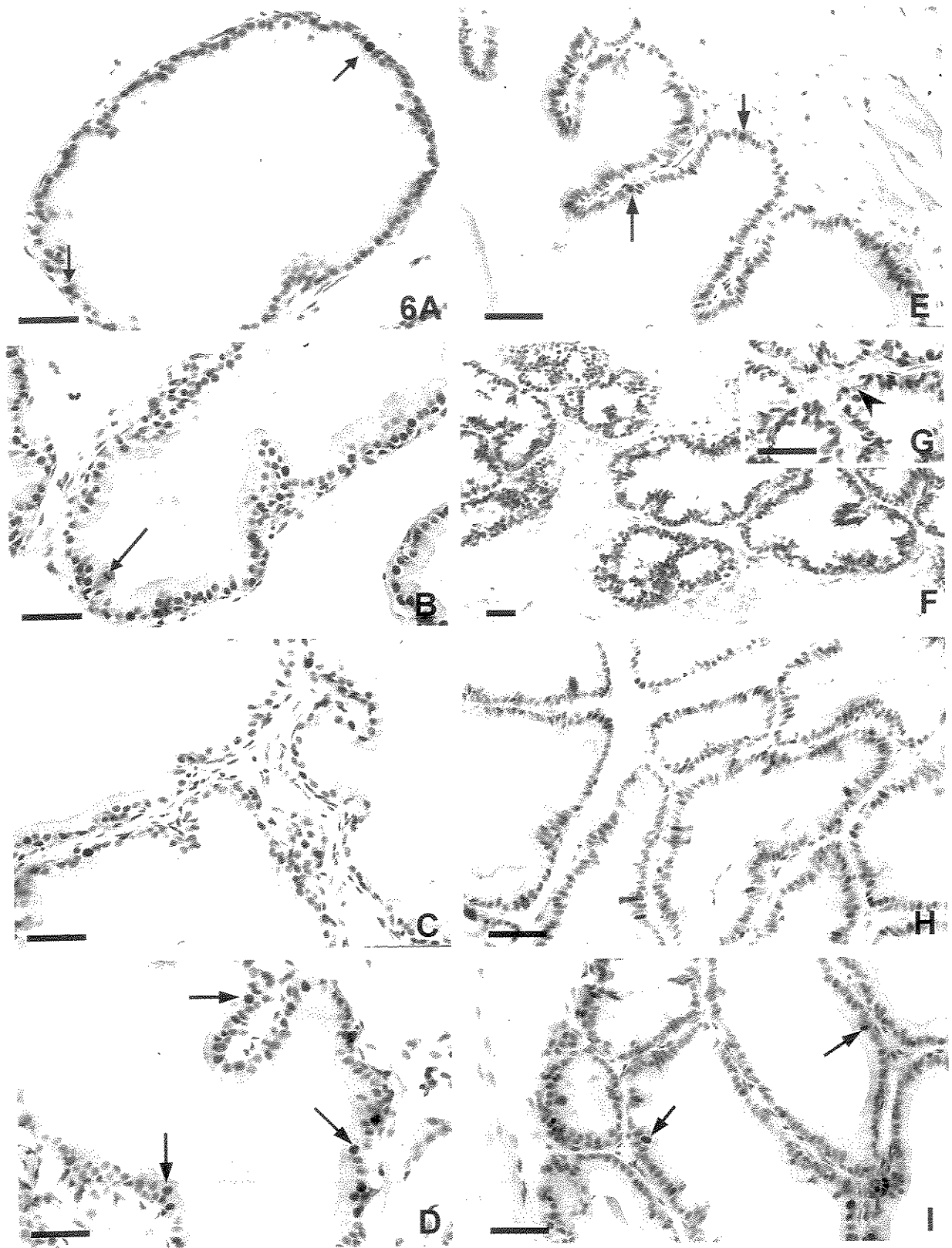
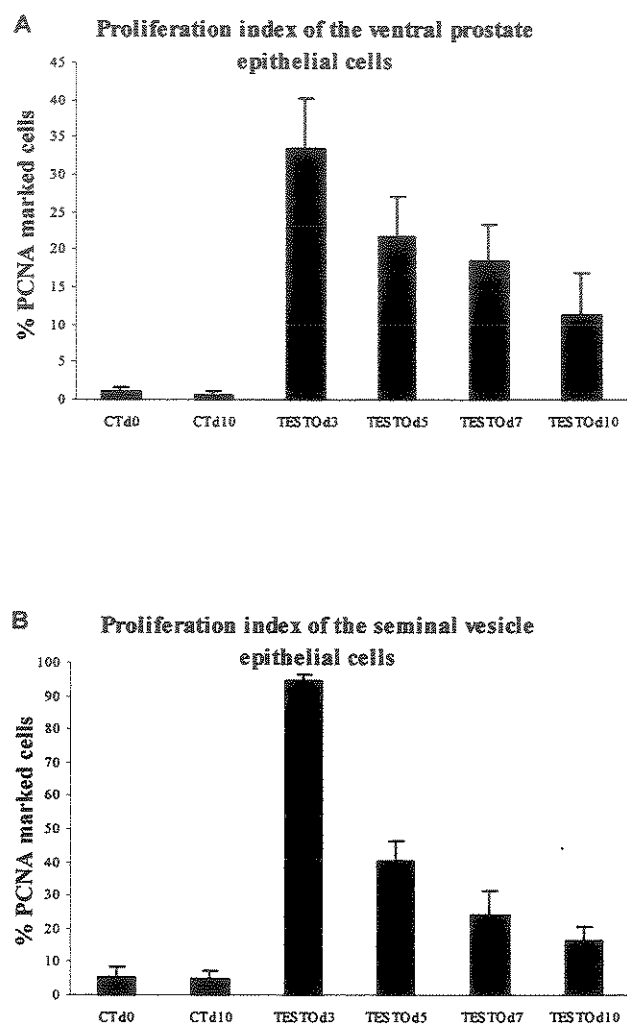


Figure 7.



**A reorganização do estroma da próstata ventral de ratos
castrados submetidos à reposição hormonal**

Justulin Jr LA¹, Ureshino RP², Zanoni M², Felisbino SL.²

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia – Universidade Estadual de
Campinas - (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

² Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil

Título resumido: reorganização estromal e reposição hormonal na próstata

Palavras chave: testosterona, castração, fibras colágenas, fibras elásticas, fibras reticulares,
membrana basal

Este trabalho teve auxílio financeiro das seguintes entidades: CNPq (Proc.476137/03-9),
FAPESP (Proc. 02/11102-4) e FUNDUNESP.

Agradecimentos: Os autores agradecem o suporte técnico do Centro de Microscopia
Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu/SP

A ser submetido à revista Cell and Tissue Research

Resumo

Neste trabalho, nós investigamos as modificações do estroma da próstata ventral (PV) de ratos castrados submetidos à recuperação glandular por reposição com testostosterona, com especial atenção aos componentes fibrilares e as membranas basais. Ratos Wistar adultos machos foram castrados e, após 21 dias de involução, foram tratados com propionato de testosterona (4mg/kg/dia). Ratos intactos e castrados sem tratamento com testosterona foram usados como controles. As PVs dos diferentes grupos foram removidas após 0, 3, 5, 7 e 10 dias de tratamento com testosterona, pesadas e processadas para análises histoquímicas, estereológicas e ultra-estruturais. O principal evento observado nas próstatas do grupo tratado pela testosterona por 3 e 5 dias foi a formação de brotamentos epiteliais dos ductos em crescimento. Estes brotamentos epiteliais invadiam o estroma glandular e eram envolvidos por uma membrana basal intacta e por fibroblastos apenas, que nela se aderiam. As fibras colágenas, reticulares e elásticas, acumuladas durante a castração, foram progressivamente distendidas e espalhadas ao redor dos ductos prostáticos durante a reposição com testoteron. Ao redor dos brotamentos, as fibras reticulares apareceram fragmentadas. Os fibroblastos e as células musculares lisas apresentavam o Reticulo endoplasmático rugoso e Complexo de Golgi bem desenvolvidos e evidentes durante todo o período de reposição hormonal. As análises estereológicas mostraram uma significativa redução do volume absoluto do estroma não muscular durante a castração e uma progressiva recuperação deste compartimento durante a reposição hormonal, sugerindo a degradação de alguns componentes da matriz extracelular durante a castração e síntese durante a reposição hormonal. Esses resultados demonstram que o andrógeno modula a composição e a organização das fibras da matriz extracelular do estroma através das células musculares lisas e dos fibroblastos, principalmente, processo no qual muito provavelmente estão envolvidas as MMPs.

Introdução

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente constituída de uma porção epitelial e outra estromal. Sua organização e estado funcional estão sob o controle androgênico. O estroma é um compartimento dinâmico e tem influência direta sobre o epitélio (Cunha et al. 1985; Donjacour & Cunha, 1993; Maffini et al. 2002; Antonioli et al. 2004).

A involução da próstata seguida à privação androgênica tem sido extensivamente utilizada em modelos de roedores para o estudo da fisiologia prostática (Powell et al. 1996). A privação androgênica por castração química ou cirúrgica leva a uma marcante involução na próstata. Essas alterações correspondem à diminuição da atividade secretora, apoptose das células epiteliais e aumento da celularidade e densidade dos componentes estromais (Brandes, 1966; Kyprianou & Isaacs, 1988; Shabsigh et al. 1998).

Carvalho e Line (1996) descreveram modificações associadas à membrana basal das células epiteliais e das células musculares lisas ocorridas após a privação de andrógenos, demonstrando que eventos apoptóticos ocorrem após a perda de adesão da célula à membrana basal e que existe um retardo na absorção das membranas basais residuais, que se tornam extremamente onduladas contendo moléculas intactas de laminina, mesmo após 21 dias de castração. Por outro lado, Ilío et al. (2000) observaram que a laminina está presente uniformemente na membrana basal ao longo do sistema de ductos prostáticos, enquanto o colágeno tipo IV é encontrado na membrana basal da região distal e intermediária, mas está praticamente ausente na região proximal. Eles também demonstraram que o processo de involução prostática inicia-se com a perda ou redução do colágeno tipo IV, nas diferentes regiões dos ductos, durante os primeiros períodos de castração, enquanto a laminina permanece intacta. Após o período de pico de apoptose (3º e 4º dia após a castração), o colágeno tipo IV volta a ser encontrado na membrana basal dos ductos. Isto sugere uma direta associação entre o aumento de apoptose e a perda de colágeno tipo IV.

A matriz extracelular do estroma, além de apresentar os componentes de membrana basal das células musculares lisas, é formada também por fibras de colágeno tipo I e tipo

III, as quais sofrem um extenso rearranjo na próstata em regressão. Este rearranjo é caracterizado por um aspecto pregueado das fibras ao redor dos ductos.

Microfibrilas de colágeno tipo VI e fibras do sistema elástico também são encontrados no estroma prostático e apresentam modificações durante a involução prostática. Estes componentes parecem estar envolvidos no controle de alguns aspectos do comportamento celular e desempenham um papel estrutural, mantendo a integridade do órgão (Carvalho et al. 1997a; 1997b). Modificações nas fibras do sistema elástico e nas fibras reticulares também foram descritas na próstata humana em condições normais e em condições patológicas (Taboga & Vidal, 2003; Vilamaior et al. 2003).

Vilamaior et al. (2000) demonstraram um progressivo acúmulo de fibras colágenas e reticulares ao redor do epitélio glandular após a privação androgênica. Estas fibras estavam em íntima associação às células musculares lisas, as quais passavam a apresentar um contorno irregular, sugerindo sua participação na reorganização da matriz extracelular durante a involução prostática. Antonioli et al. (2004) também descreveram alterações fenotípicas das células musculares lisas, passando de um fenótipo contrátil característico, para um fenótipo sintético, com diminuição do conteúdo de proteínas contráteis. Assim, as células musculares lisas parecem estar envolvidas na remodelação dos componentes estromais.

Nakada et al (1994) estudando os processos de síntese e degradação dos componentes estromais na próstata de ratos, durante os eventos de privação androgênica, observaram acúmulo de colágeno e elastina nos lóbulos ventral e dorsolateral após a privação androgênica.

Embora estes trabalhos anteriores tenham demonstrado um acúmulo de fibras colágenas no estroma da próstata involuída, Uke et al. (1983), através de dosagens de hidroxiprolina, demonstraram que não ocorre alteração no conteúdo de colágeno na próstata durante a castração.

A reposição hormonal em animais castrados resulta na recuperação da estrutura glandular observada nos grupos controles (Sandford et al. 1983; Tsujimura et al. 2002). Após a exposição a andrógenos, as células basais iniciam uma fase de proliferação e migração ao longo dos ductos prostáticos em direção à região distal (Tsujimura et al. 2002).

Entretanto, as investigações anteriores sobre os efeitos da reposição hormonal sobre a próstata se dedicaram principalmente aos aspectos da recuperação glandular e de proliferação celular e pouca atenção foi dispensada ao estroma (Sufrin & Coffey, 1974; Huttunen et al. 1982; Sandford et al. 1983; Wright et al. 1999; Tsujimura et al. 2002). Desta forma, neste trabalho, nós investigamos as alterações ocorridas nos componentes estromais fibrilares da matriz extracelular de ratos castrados submetidos à reposição hormonal.

3. Material e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos com idade de 3 meses, pesando cerca de 350g. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (CT); grupo castrado (CS); e grupo castrado tratado com testosterona (TESTO).

A castração foi realizada por uma pequena incisão escrotal, sob anestesia com pentobarbital sódico (30mg/kg), e retirada dos testículos.

Os animais do grupo TESTO, após 21 dias de castração, receberam doses diárias de testosterona (Propionato de Testosterona - 4mg/kg peso corpóreo), dissolvida em óleo de milho e administrada por injeção subcutânea. Os outros dois grupos de animais receberam apenas o veículo. Os animais foram mortos por alta dose de pentobarbital sódico (100mg/kg), injetado intraperitonealmente, após 0, 3, 5, 7 e 10 dias de tratamento com testosterona. Para cada período e em cada situação experimental foram utilizados 10 animais.

Os lóbulos ventrais da próstata foram removidos. No momento do sacrifício, foram obtidos os pesos dos animais e das próstatas dos diferentes grupos. Os resultados das pesagens foram analisados estatisticamente.

Obtenção de cortes em Paraplast e resina

Lóbulos de próstatas ventrais foram fixados em paraformaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2, por 48 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes de 5 µm, produzidos em micrótomo rotativo, foram coletados em lâminas silanizadas e armazenados

até o momento de uso. Alguns fragmentos foram desidratados até álcool 95% e embebidos em resina metacrilato (Historesin kit - Leica). Após a embebição, o material foi incluído em moldes plásticos. Cortes de 4µm foram produzidos com navalha de vidro em micrótomo rotativo automático, coletados e armazenados em estufa 50°C até o momento de uso.

Análise histoquímica

Cortes em Paraplast e em resina foram corados pelo Tricrômico de Masson (TM), para se obter uma análise geral da estrutura glandular; e pelo Picrossírius-hematoxilina (PSH), para análise das fibras de colágeno (Junqueira et al. 1979); pela Resorcina Fucsina de Weigert (RFW), para análise das fibras do sistema elástico (Carvalho et al. 1997b) e pela Reticulina de Gömori (Gömori, 1937, modificado, em Taboga e Vidal, 2003) para análise das fibras reticulares presentes na membrana basal. Os cortes foram observados em luz normal e polarizada e fotomicrografados em microscópio Leica DMLB.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos de próstata ventral de ratos dos diferentes grupos experimentais foram fixados em tampão Millonig's pH 7,3 contendo glutaraldeído a 3% e ácido tânico a 0,25% (Cotta-Pereira et al. 1976). O material foi, então, pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, lavado, desidratado em concentrações crescentes de acetona e incluído em Araldite. Cortes ultrafinos, produzidos com navalha de diamante, foram contrastados pelas técnicas rotineiras do acetato de uranila e citrato de chumbo.

Os cortes ultrafinos foram observados e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100 operando a 80 kV.

Análises estereológicas

A fração volumétrica (volume relativo em porcentagem) dos compartimentos estroma muscular e estroma não muscular foi determinada usando o sistema de multipontos com uma grade de 168 pontos (Weibel, 1963). De acordo com Dekler & Coffey (1978), 1 mg de próstata ventral úmida tem um volume aproximado de 1 mm³. Desta forma, o peso

úmido da próstata ventral em mg pode ser considerado equivalente ao volume (mm^3). Assim, para calcular os volumes absolutos de cada compartimento, os volumes relativos (%) do estroma muscular e do estroma não muscular foram multiplicados pelo peso úmido médio da PV de cada respectivos grupos.

Análises estatísticas

Os valores representam média $\pm$ SD. Os valores foram submetidos à análise de variancia pelo teste One-way Anova e posterior teste de Tukey-Kramer, sendo considerados significativamente diferentes os valores com $P \leq 0,05$.

Resultados

Análises quantitativas

A tabela 1 demonstra o efeito da castração e da reposição hormonal sobre os valores numéricos de peso absoluto da próstata ventral (mg), além dos dados das análises estereológicas do estroma. Após 21 dias de castração, grupo CS 0d, a próstata ventral sofreu redução de peso de aproximadamente 90%. Essa redução, principalmente provocada pela perda de secreção (lúmen) e da área ocupada pelas células epiteliais secretoras dos ductos (Fig. 1B), promoveu a condensação do compartimento estromal, levando a um aumento do volume relativo ocupado pelo estroma muscular e não muscular prostático nos animais castrados. A reposição hormonal induz a recuperação glandular com aumento progressivo de peso e diminuição no volume relativo ocupado pelo estroma.

Entretanto, em termos absolutos, o que se observou foi a redução tanto do estroma muscular quanto do estroma não muscular durante o período de castração e após 10 dias de tratamento com testosterona, não se observou a completa recuperação do peso glandular, mas se observou a completa recuperação do estroma muscular e do estroma não muscular.

Morfologia geral e histoquímica

A próstata ventral (PV) dos animais controle apresenta ductos de luz ampla totalmente preenchidos por secreção, ficando o estroma restrito somente a pequenas áreas entre os ductos (Fig. 1A). Após 21 dias de castração, ocorre inversão de uma estrutura glandular para outra dominada pelo estroma, com também diminuição da altura das células epiteliais e da área ocupada pelos ductos secretores (Fig. 1B).

O tratamento com testosterona dá início ao processo de recuperação glandular, que é marcado, principalmente, pela formação de brotamentos epiteliais que invadem o estroma. Com três dias de reposição hormonal, esses brotos são evidentes (Fig. 1C-D). Durante a formação dos brotamentos, ocorre um distanciamento das células musculares lisas das extremidades dos brotos (Fig. 1D). A recuperação glandular continua com o tratamento até a retomada da morfologia glandular no 10º. dia de tratamento (Fig. 1E-F).

Secções de próstatas coradas com Picrossirius e observadas sob luz polarizada, revelaram progressivo aumento das fibras colágenas e reticulares ao redor dos reduzidos ductos prostáticos nos animais castrados, comparados com o grupo controle (Fig. 2A-B). Com três dias de tratamento, observa-se o aumento da luz ductal e diminuição da birrefringência das fibras estromais, que se continua com o período de tratamento (Fig. 2C-E). Entretanto, a birrefringência das fibras do sistema colágeno das próstatas dos animais do grupo TESTO 10 dias era mais intensa que as do grupo controle (Fig. 2F).

A impregnação pela prata, que evidencia fibras reticulares (colágeno tipo III), constituintes de membranas basais, demonstrou a organização dessas fibras de maneira contínua tanto na membrana basal epitelial quanto nas células musculares lisas no grupo controle (Fig. 3A). Após 21 dias de castração, essas fibras apresentavam um aspecto fragmentado e ondulado abaixo do epitélio e ao redor das células musculares lisas (Fig. 3B). Com a recuperação glandular no grupo TESTO, observou-se a reorganização das fibras reticulares, principalmente ao redor dos brotamentos epiteliais (Fig. 3C), que com três dias de tratamento ainda apresentam um aspecto fragmentado. Nos outros tempos de tratamento, estas fibras foram adquirindo estrutura parecida com o grupo controle (Fig. 3D-E).

O estudo das fibras do sistema elástico revelou fibras delgadas e distendidas, concentradas na base do epitélio e associadas às células musculares lisas no grupo controle (Fig. 4A). Durante a involução, essas fibras tornaram-se mais grossas e onduladas, sem diferenças entre os grupos CS 21 dias e CS 31 dias (Fig. 4B). As fibras do sistema elástico também acompanham a reorganização do estroma após a reposição hormonal. Essas fibras foram progressivamente se tornando alongadas e finas, como as observadas nos animais controle (Figura 6E-F).

Ultra-estrutura

Os animais do grupo controle apresentavam células secretoras altas, com nucléolo evidente e cromatina frouxa. Os ductos eram revestidos por uma camada de células musculares lisas e fibroblastos alongados com pouco citoplasma e cromatina nuclear condensada. Também era evidente a presença de vasos sanguíneos no estroma interductal (Fig. 5A), além de fibrilas de colágeno associadas às células musculares lisas (Fig. 5B).

A castração resultou na diminuição da altura das células epiteliais. Concomitantemente, observou-se a atrofia das células musculares lisas, que passavam a apresentar contorno irregular. Os fibroblastos apresentavam núcleos com cromatina condensada (Fig. 6A e 7B), características da diminuição da atividade sintética. Foi possível observar a associação de fibras do sistema elástico à superfície irregular das células musculares lisas com contorno irregular, além de fibrilas de colágeno (Fig. 6A-B e 7B). Era evidente o acúmulo de fibrilas de colágeno formando feixes e de microfibrilas no estroma (Fig. 6A-B e 7A-B). Várias dobras de membranas basais epiteliais acumuladas foram observadas abaixo do epitélio atrofiado. O mesmo aspecto não foi observado para as células musculares lisas (Fig. 6C).

Os brotamentos epiteliais observados na microscopia fotônica, ao terceiro dia de reposição hormonal, também foram observados na ultra-estrutura. Eles apareciam como projeções do epitélio em direção ao estroma. Revestindo os brotos observou-se prolongamentos de fibroblastos. As células musculares lisas não acompanham o crescimento epitelial e restringem-se as bases do brotamento em desenvolvimento (Fig. 8A). A membrana basal dos brotamentos apresentava-se intacta e distendida e com poucas

fibrilas de colágeno associadas (Fig. 8B). Tanto os fibroblastos quanto as células musculares lisas apresentavam dilatadas as cisternas do Retículo endoplasmático granular e do Complexo de Golgi, evidenciando uma alta atividade sintética destas células (Fig. 8C).

Foram observados pontos de adesão entre os fibroblastos e a membrana basal do epitélio em crescimento (Fig. 9A). Ao final do tratamento, as células musculares lisas e os fibroblastos retomam a estruturas alongadas, revestindo os ductos glandulares. Entretanto, essas células ainda apresentam organelas com cisternas dilatadas e algumas células epiteliais ainda apresentavam resquícios de membrana basal acumulada (Fig. 9B).

Discussão

Neste trabalho nós demonstramos a reorganização estromal da próstata ventral de ratos castrados por 21 dias e tratados com testosterona, enfocando principalmente as alterações nos componentes fibrilares do estroma.

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente que sofre intensa remodelação tecidual após com a castração (Maffini et al 2002, Wahlqvist et al 1996). Esse fenômeno inclui degradação/deposição dos componentes estromais, além de fagocitose das células epiteliais que sofrem apoptose (Matrisian et al 1996).

Após 21 dias de castração, a próstata sofre uma redução de aproximadamente 90% do seu volume. Essa involução é resultado de uma marcante atrofia epitelial, acompanhada por uma intensa hiperplasia do estroma. Esses eventos causam um aumento do volume relativo ocupado tanto pelo estroma muscular, como pelo estroma não muscular, conforme observado por Vilamaior et al. (2000), Tam et al. (1991) e Wahlqvist et al. (1996).

Entretanto, as análises estereológicas demonstraram que ocorre uma diminuição do volume absoluto do estroma prostático durante a castração. Esses dados confirmam os resultados obtidos por Huttunen et al. (1982) e Antonioli et al. (2004). Análises preliminares sobre o volume absoluto das fibras birrefringentes do estroma, também apontam uma redução significativa das fibras do sistema colágeno (dados não mostrados). Desta forma, pode-se afirmar que, durante a castração, exista uma atrofia de todo o estroma prostático e não somente das células musculares lisas. Esta atrofia estromal, por ser mais

lenta que a atrofia epitelial e pela visualização de um estroma acumulado, só pode ser demonstrada por análises morfométricas e estereológicas.

A reposição hormonal induziu a progressiva recuperação da morfologia glandular. Após 10 dias de tratamento com testosterona a próstata ventral recuperou a morfologia característica, com ductos de luz ampla preenchidos por secreção e estroma reduzidos ao redor dos ductos. Além disso, as análises morfométricas e estereológicas revelaram que o período de tratamento não foi suficiente para a total recuperação do peso glandular. Os componentes parenquimais (epitélio e lúmen) foram os que não se recuperaram ao final do tratamento (manuscrito submetido à publicação), pois o compartimento estromal mostrou recuperação.

Cortes de próstatas dos animais castrados, coradas com Picrosirius-Hematoxilina e observados sob luz polarizada revelaram acúmulo de colágeno intersticial, ao redor do epitélio, com aumento da birrefringência dessas fibras entre os ductos secretores atrofiados, conforme já descrito na literatura (Vilamaior et al. 2000).

Taboga & Vidal (2003) também observaram aumento da birrefringência das fibras colágenas em adenocarcinomas em tecido prosático humano. Com a reposição hormonal, ocorreu progressivo aumento da luz ductal e diminuição da área ocupada pelo estroma. Entretanto, com 10 dias de tratamento, ainda foi observada maior birefringência das fibras colágenas, o que confirma os dados das análises estereológicas.

A análise do colágeno tipo III presente na membrana basal epitelial e das células musculares lisas evidenciou intensa marcação na base do epitélio e nas células musculares lisas. Com a castração observou-se diminuição da intensidade de marcação, além da aparência fragmentada dessas fibras. Vilamaior et al (2000) descreveram raras fibras reticulares presentes na membrana basal do epitélio dos animais controle e um progressivo aumento dessas fibras após a castração. Este aspecto fragmentado das fibras reticulares pode representar a desorganização destas fibras e provável degradação das mesmas durante a castração.

Com a reposição hormonal e a recuperação do compartimento epitelial, observou-se uma maior fragmentação do colágeno tipo III, principalmente nas extremidades dos brotamentos epiteliais. Essa reorganização dos componentes da membrana basal parece

necessária para o crescimento epitelial, visto que este mesmo aspecto de reorganização das fibras reticulares ao redor dos brotamentos epiteliais também foi observado durante as primeiras fases de desenvolvimento prostático pós-natal (Vilamaior, 2003).

Alterações na composição da membrana basal foram sugeridas como responsáveis pela indução de apoptose das células epiteliais. Dentre estas alterações, a degradação do colágeno tipo IV seria responsável pelo maior índice de apoptose com a privação androgênica (Ilio et al. 2000). Aqui, nós observamos uma fragmentação das fibras reticulares (colágeno tipo III) durante a involução. Esta fragmentação das fibras sugere um processo de degradação deste componente da matriz extracelular, provavelmente com a participação de MMPs.

Após 10 dias de reposição hormonal, as fibras reticulares da membrana basal do epitélio e das células musculares lisas voltaram a apresentar o aspecto observado no observado no grupo controle, sugerindo que a testosterona estimule as células estromais à sintetizar estas fibras.

As fibras do sistema elástico, com a castração tornaram-se espessas e onduladas, acompanhando as alterações das células musculares lisas, com as quais estão intimamente associadas. Carvalho et al. (1997b) também sugeriram que grossas fibras do sistema elástico poderiam sofrer futuras modificações em uma eventual privação androgênica superior a 21 dias. Neste experimento, não se observaram modificações evidentes no comportamento das fibras elásticas com 10 dias adicionais de castração. Desta forma, caso haja futuras modificações nas fibras do sistema elástico, possivelmente elas devam ocorrer de forma ainda mais lenta e para observá-las, seriam necessários períodos mais longos de castração.

As análises ultra-estruturais revelaram detalhes interessantes sobre a formação dos brotamentos epiteliais que invadem o estroma. Nessas regiões, foi possível observar que, num primeiro momento, somente os prolongamentos dos fibroblastos acompanham o crescimento do epitélio. Nossos resultados demonstraram íntima associação entre as células epiteliais e os fibroblastos, com formação de pontos de adesão entre estas células e a membrana basal epitelial. Além disso, durante todos os períodos de reposição hormonal, examinados neste estudo, os fibroblastos apresentaram um fenótipo altamente sintético. Isto

sugere, papel ativo destas células no processo de recuperação da matriz extracelular do estroma e na reorganização dos ductos glandulares. Esta intensa atividade sintética pode ser tanto uma ação direta do andrógeno sobre os fibroblastos bem como de outros fatores parácrinos liberados pelo epitélio em crescimento.

As células musculares lisas não acompanham o crescimento epitelial e ficam restritas á base dos brotamentos em desenvolvimento. Wikstrom et al. (2001) demonstraram que os altos níveis de TGF- β sintetizado pelas células musculares lisas funcionam como um importante regulador tanto do tecido prostático normal quanto do alterado. TGF- β influencia diretamente a diferenciação celular, além de inibir a proliferação e induzir apoptose das células epiteliais. Células prostáticas alteradas normalmente perdem seus receptores para TGF- β e adquirem resistência aos seus efeitos inibitórios. Além disso, o TGF- β é um mediador de apoptose induzida por castração das células epiteliais andrógeno-depentes (Kyprianou & Isaacs, 1988b; Kyprianou & Isaacs, 1989; Nemeth et al. 1997; Banerjee et al. 1998). Desta forma, a interação entre as células musculares lisas e os brotamentos poderia, via TGF- β , retardar o processo de recuperação epitelial.

Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo revelaram que o restabelecimento da arquitetura glandular normal repete os eventos de seu desenvolvimento pós-natal e que uma intensa reação do estroma à reposição hormonal, com conseqüente ativação das células musculares lisas e principalmente dos fibroblastos, têm participação fundamental neste processo.

Referências

- Antonioli E, Della-Colleta HH, Carvalho HF (2004) Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl* 25:50-56
- Banerjee S, Banerjee PP, Zirkin BR, Brown TR (1998) Regional expression of transforming growth factor-alpha in rat ventral prostate during postnatal development, after androgen ablation, and after androgen replacement. *Endocrinology* 139: 3005-3013

- Brandes D (1966) The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int. Ver. Cytol* 20: 207-276
- Carvalho HF, Line SRP (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int* 20: 809-819
- Carvalho HF, Taboga S.R. & Vilamaior, P.S.L. (1997a) Collagen type VI is a component of the microfibrils of the prostatic stroma. *Tissue Cell* 29: 163-170
- Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR (1997b) The elastic system of the rat ventral prostate and its modification following orchidectomy. *Prostate* 32: 27-34
- Cotta-Pereira, G., Rodrigo, F.G. and David-Ferreira, J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol* 51: 7-11
- Cunha GR, Bigsby RM, Coople PS, Sugmura Y (1985) Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Diff* 17: 137-148
- DeKlerk DP, Coffey DS, (1978) Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique. *Biomorphometrics. Invest Urol* 16: 240-245
- Donjacour AA, Cunha GR (1993) Assessment of protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-intensive mice. *Endocrinology* 132: 2342-2350
- Huttunen E, Romppanen T & Helminen HJ (1982) Testosterone action on the ventral prostate lobe of the castrated rat as assessed with a stereologic morphometric method. *Am J Anat* 165: 199-209
- Ilio KY, Nemeth JA, Sensibar JA, Lang S, Lee C (2000) Prostatic ductal system in rats: changes in regional distribution of extracellular matrix proteins during castration-induced regression. *Prostate* 43: 3-10
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11: 447-55

- Kyprianou N, Isaacs JT (1988a) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinol* 122: 552-562
- Kyprianou N, Isaacs JT (1988b) Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Endocrinology* 123: 2124-31
- Kyprianou N, Isaacs JT (1989) Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Mol Endocrinol* 3: 1515-22
- Maffini V, Geck P, Powell CE, Sonnenschein C, Soto AM (2002). Mechanism of androgen action on cell proliferation: AS3 protein as a mediator of proliferative arrest in the rat prostate. *Endocrinology* 143: 2708-2714
- Nakada T, Kubota Y, Sasagawa I, Suzuki H, Watanabe M, Suzuki Y (1994) The effect of oestradiol-17 beta on connective tissue protein in rat prostate *Int Urol Nephrol.* 26: 327-335
- Nemeth JA, Sensibar JA, White RR, Zelner DJ, Kim IY, Lee C (1997) Prostatic ductal system in rats: tissue-specific expression and regional variation in stromal distribution of transforming growth factor-beta 1. *Prostate* 33: 64-71
- Powell WC, Domann Jr. FE, Mitchen JM, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden T (1996) Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. *Prostate* 29: 159-168
- Sandford NL, Searle JW, Kerr JF (1983) Successive waves of apoptosis in the rat prostate after repeated withdrawal of testosterone stimulation. *Pathology* 16: 406-410
- Shabsigh A, Tanji N, D'agati V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O, Shabsigh R, Buttyan R (1999) Vascular anatomy of the rat ventral prostate. *Anat Rec* 256: 403-11
- Sufrin G, Coffey DS (1974) A comparison of the hormone responsiveness of the prostate and seminal vesicles *Investigative Urology* 11: 386-391
- Taboga SR, Vidal Bde C (2003) Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies *J Submicrosc Cytol Pathol* 35:11-6.

- Tam CC, Wong YC, White FH, Fowler JP (1991) Morphometric and stereological study of the glandular epithelium of the lateral prostate of the intact and castrated guinea pig. *Prostate* 19:1-22
- Tsujimura A, Koikawa Y, Salm S, Takao T, Coetzee S, Moscatelli D, Shapiro E, Lepor H, Sun TT, Wilson EL. (2002) Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *J Cell Biol* 157: 1257-65.
- Uke E, Lee C, Grayhack JT (1983) The effect of CIS hydroxyproline on ventral prostatic growth in rats. *J Urol* 129: 171-4
- Vilamaior PSL (2003). Regulação hormonal e interações célula-matriz extracelular na próstata ventral de ratos. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
- Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* 45: 253-258.
- Wahlqvist R, Dahl E, Tveter KJ (1996) Effects of castration upon the morphology of the accessory sex organs of the male rat--a scanning electron microscopy study. *Scanning Microsc* 10: 1155-1162
- Weibel ER (1963) Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 12: 131-155
- Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB & Rittmaster RS (1999) Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5 α -reductase. *Endocrinology* 140: 4509-4515

Legendas das figuras

Figura 1: Cortes histológicos de próstata corados com Tricrômico de Masson. **A)** CT 0 dias. Os ductos das glândulas controle apresentam o lúmen amplo (L) preenchido por secreção, o epitélio secretor com poucas dobras (seta) e um estroma reduzido (asterisco), 150X; **B)** CS 3 dias. O aspecto geral da glândula de um animal castrado releva ductos com lúmen reduzido (L), epitélio baixo (setas) e aumento do estroma (E). 250X. **TESTO 3 dias.** Observar o aumento da luz dos ductos (L), com formação de brotamentos epiteliais dos ductos (seta), que invadem o estroma (E). 200X. **D)** Detalhe da figura anterior, destacando a formação de brotos epiteliais nos ductos (broto) e as células musculares lisas distantes da extremidade do broto (setas). 1000X. **E)** TESTO 7 dias. O estroma (E) fica reduzido entre os ductos de luz ampla (L), com poucas dobras (seta), preenchidos por secreção. 200X. **F)** TESTO 10 dias. A redução na área ocupada pelo estroma (E), com poucas dobras epiteliais é observada (setas), e acúmulo de secreção nos ductos (L). 200X.

Figura 2: Cortes histológicos da próstata dos diferentes grupos experimentais corados com Picrossirius + hematoxilina e observados em luz polarizada. **A)** CT 3 dias. **B)** CS 21 dias. **C-F)** TESTO 3, 5, 7 e 10 dia, respectivamente. Observar a pouca birrefringência das fibras do sistema colágeno no grupo CT (setas). Essa birrefringência aumenta no grupo CS 21 dias e diminui progressivamente no grupo TESTO (setas). Aumentos = 200X.

Figura 3: Cortes histológicos de próstatas dos diferentes grupos experimentais corados pela técnica da Reticulina de Gömöri. **A)** CT 0 dia, região distal evidenciando fibras reticulares contínuas na membrana basal do epitélio (seta) e das células musculares lisas (cabeça de seta). **B)** CS 3 dia. As setas indicam o aspecto fragmentado das fibras reticulares na membrana basal do epitélio (setas) e das células musculares lisas (cabeça de seta). **C)** TESTO 03 dias, região distal mostrando a recuperação glandular com início da reorganização das fibras reticulares ao redor dos ductos. Observar que após 03 dias de tratamento, essas fibras ainda apresentam aspecto fragmentado, principalmente na região onde os brotamentos epiteliais invadem o estroma (seta). **D)** TESTO 10 dias, região distal

evidenciando o retorno da continuidade das fibras reticulares na membrana basal do epitélio (setas) e das células musculares lisas (cabeças de setas). Aumentos = 900X.

Figura 4: Cortes histológicos de próstatas dos diferentes grupos experimentais corados pela Resorcina Fucsina de Weigert. **A) CT 0 dia**, destacando fibras do sistema elástico, delgadas e distendidas ao redor do ducto e das células musculares lisas (cabeças de setas). **B) CS 21 dias**, mostrando fibras do sistema elástico mais espessas e contorcidas ao redor dos ductos e, em geral, acompanhando a conformação irregular das células musculares lisas (setas). **C) TESTO 3 dias**, mostrando fibras do sistema elástico retornando ao seu aspecto delgado e distendido ao redor dos ductos e ao longo das células musculares lisas (setas). **F) TESTO 10 dias**, mostrando a recuperação das fibras do sistema elástico (alongadas e distendidas), em cortes transversais e longitudinais ao redor do ducto (setas). Aumentos = 900X

Figura 5: **A)** Aspecto ultra-estrutural da próstata ventral, grupo CT. **A)** Epitélio secretor (EP), células musculares lisas (CML) e fibroblastos alongados ao redor dos ductos. No estroma intersticial (EI) observa-se vaso sanguíneo (VS). 2.800X **B)** Detalhe da figura anterior evidenciando epitélio (EP), célula muscular lisa alongada (CML) e fibrilas de colágeno no estroma periductal (CO) 13.500X.

Figura 6: Aspecto ultra-estrutural da próstata ventral, grupo CS 21 dias. **A)** Observar a redução na altura das células epiteliais (EP), presença de fibroblastos com cromatina condensada e poucas organelas (F) e células musculares lisas com contorno irregular (CML), além de fibrilas de colágeno (CO) no estroma intersticial. 5.800X. **B)** Detalhes de uma célula muscular lisa com contorno irregular e presença de fibras do sistema elástico associadas (setas). 13.600X. **C)** Células epiteliais (EP) com grande quantidade de membrana basal residual (setas). Fibroblasto com cromatina condensada (F). 23.800X

Figura 7: Aspecto ultra-estrutural da próstata ventral, grupo CS 31 dias. **A)** Estroma apresentando fibroblastos com cromatina condensada (F), célula muscular lisa com aspecto

espinhoso (CML), além de mastócito (M) no estroma intersticial e fibrilas de colágeno formando feixes (CO). 7.250X. **B)** Detalhe da figura anterior evidenciando grande quantidade de microfibrilas no estroma intersticial (MF). Fibrilas de colágeno (CO). 53.750X.

Figura 8: Aspecto ultra-estrutural da próstata ventral, grupo **TESTO 03 dias**. **A)** Visão detalhada de um broto epitelial (BE), evidenciando o prolongamento de um fibroblasto (F) que o envolve. Observar que durante o brotamento, as células musculares lisas (CML) não acompanham o crescimento epitelial. Estroma intersticial (EI) com vaso sanguíneo (VS). 3.185X. **B)** Membrana basal (MB) da célula epitelial (EP) intacta e distendida. Fibroblasto com muitas organelas de síntese protéica (F). 10390X. **C)** Detalhes de um fibroblasto (F) e de uma célula muscular lisa (CML) com evidente área de Complexo de Golgi (asterisco) indicando alta atividade sintética. 9.000X.

Figura 9: **A)** Aspecto ultra-estrutural da próstata ventral, grupo **TESTO 07 dias**. As setas indicam pontos de adesão entre o fibroblasto (F) e a membrana basal da célula epitelial (EP). 11.900X. **B)** Aspecto ultra-estrutural da próstata ventral, grupo **TESTO 10 dias**. São observados resquícios de dobras de membrana basal (MB) epitelial, células epiteliais (EP) com cromatina descompactada, células musculares lisas (CML) alongadas e fibroblastos (F) com cisternas do retículo endoplasmático granular dilatadas (asterisco). 12.670X.

Tabela 1. Efeito da castração e da reposição hormonal sobre os valores numéricos de peso absoluto da próstata ventral (mg) e sobre os volumes relativos (%) e absolutos (mg) do estroma muscular e não muscular.

Medidas	Grupos experimentais							
	CT 0d	CT 10d	CS 0d	CS 10d	TESTO	TESTO	TESTO	TESTO
					3d	5d	7d	10d
Peso da próstata	385,2	435,3	45,8 ^a	42,7 ^a	124,9 ^a	184,5 ^a	215,6 ^a	316,5 ^b
(mg)	±47,1	±81,2	±9,0	±15,3	±27,0	±38,6	±35,2	±51,6
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
Dosagem	7,15	8,24			13,21	12,29	10,67	9,4
Hormonal ng/ml	±2,5	±3,35	< 0,05	< 0,05	±2,2	±4,5	±3,75	±3,15
Volume relativo do estroma muscular (%)	8,1	7,2	27,6 ^a	30,1 ^a	15,2 ^b	13,3 ^b	11,7 ^b	9,2
	±3,5	±4,3	±9,5	±7,5	±7,1	±5,4	±5,2	±4,1
Densidade de volume do estroma muscular (ml)	31,2	31,4	12,6 ^a	12,8 ^a	18,9 ^a	24,5 ^b	25,2 ^b	29,1
	±13,5	±18,7	±4,3	±3,2	±8,8	±9,9	±11,2	±13
Volume relativo do estroma não muscular (%)	9,2	8,6	33,3 ^a	33,4 ^a	17,2 ^a	14,2 ^b	12,8 ^b	11,6
	±3,8	±4,1	±8,5	±8,7	±5,1	±6,4	±3,9	±5,3
Densidade de volume do estroma não muscular (ml)	35,4	37,4	15,2 ^a	14,2 ^a	21,4 ^a	26,1 ^b	27,5 ^b	36,7
	±14,6	±17,8	±3,9	±3,7	±6,3	±11,8	±8,4	±16,7

Os valores representam a média ± desvio padrão.

^a = diferença estatisticamente significativa com P< 0,001 vs. o grupo controle.

^b = diferença estatisticamente significativa com P< 0,05 vs. o grupo controle.

Figura 1.

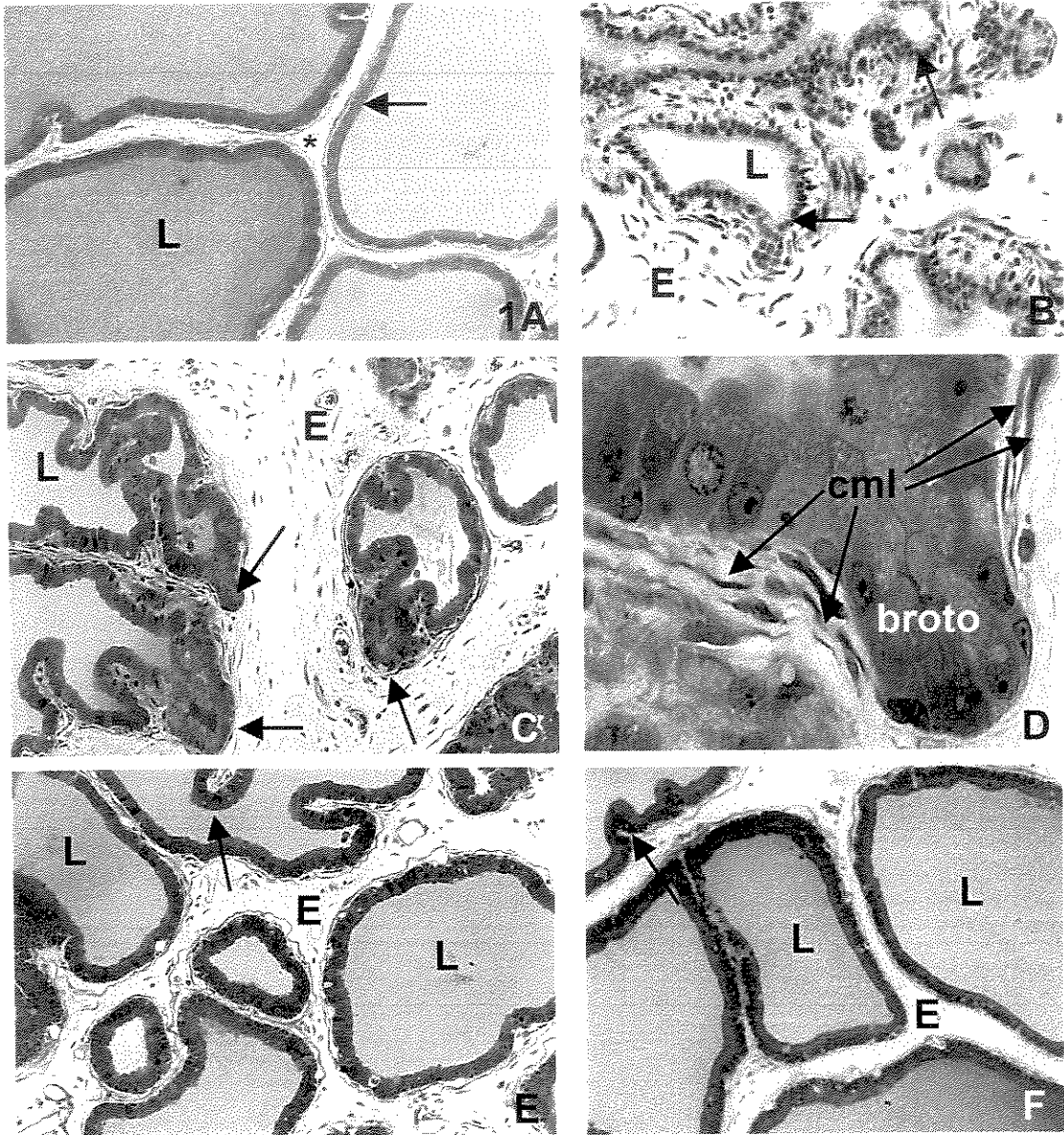


Figura 2.

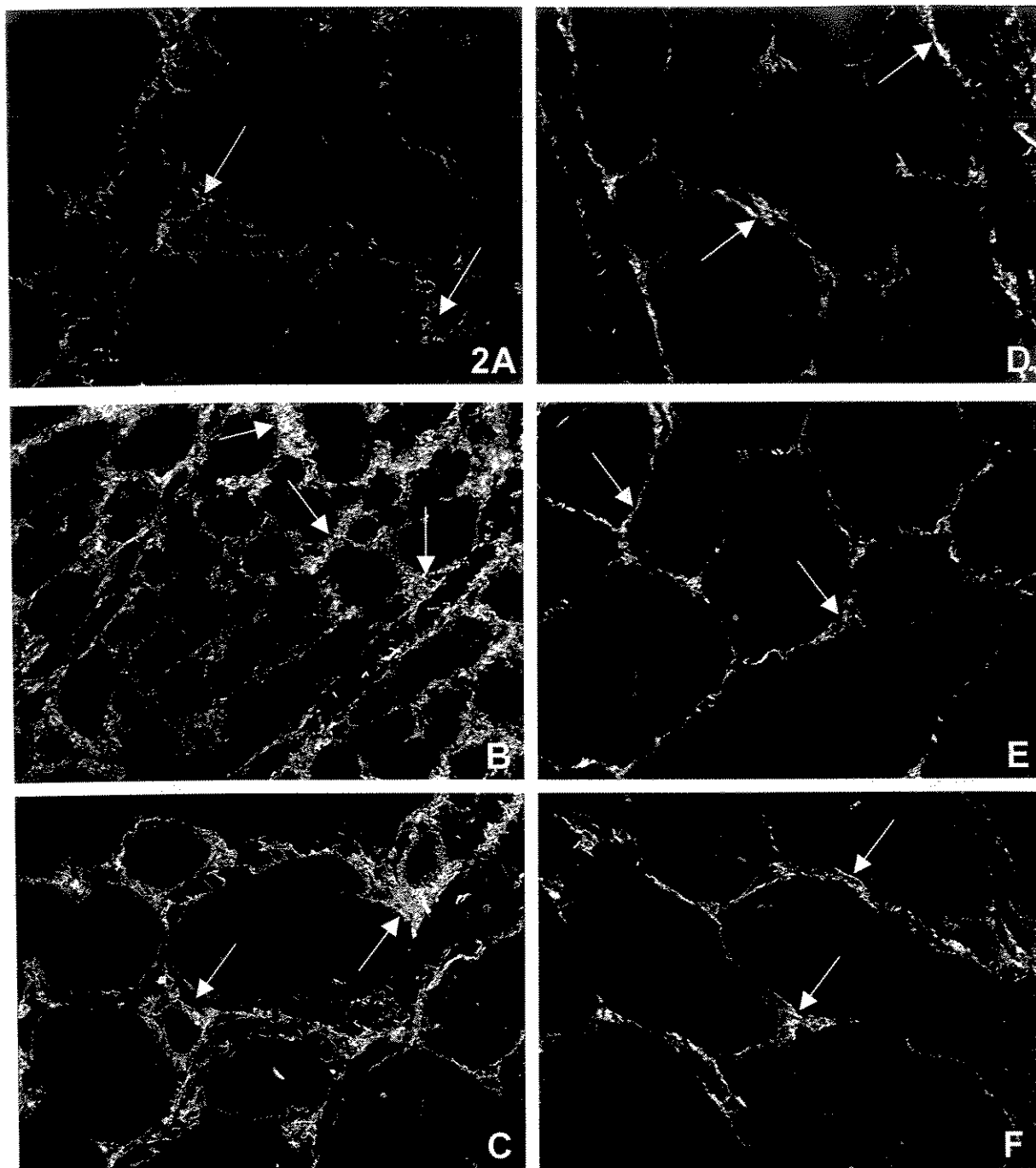


Figura 3.

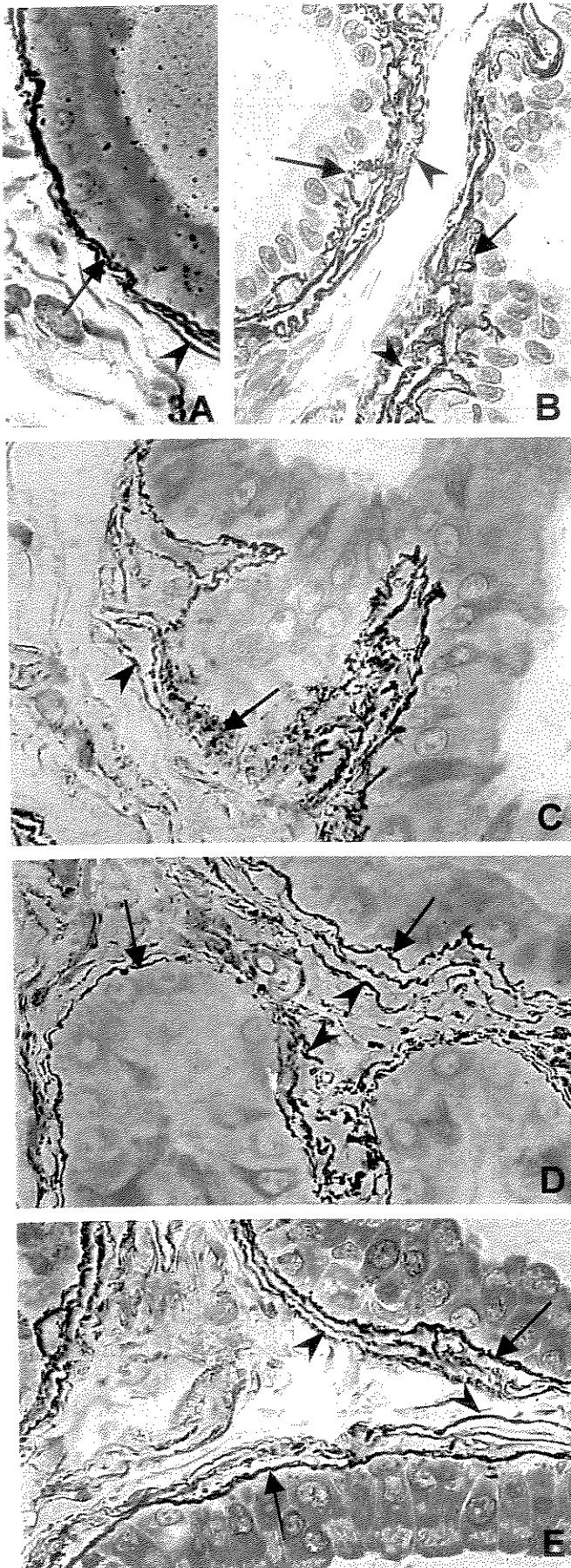


Figura 4.

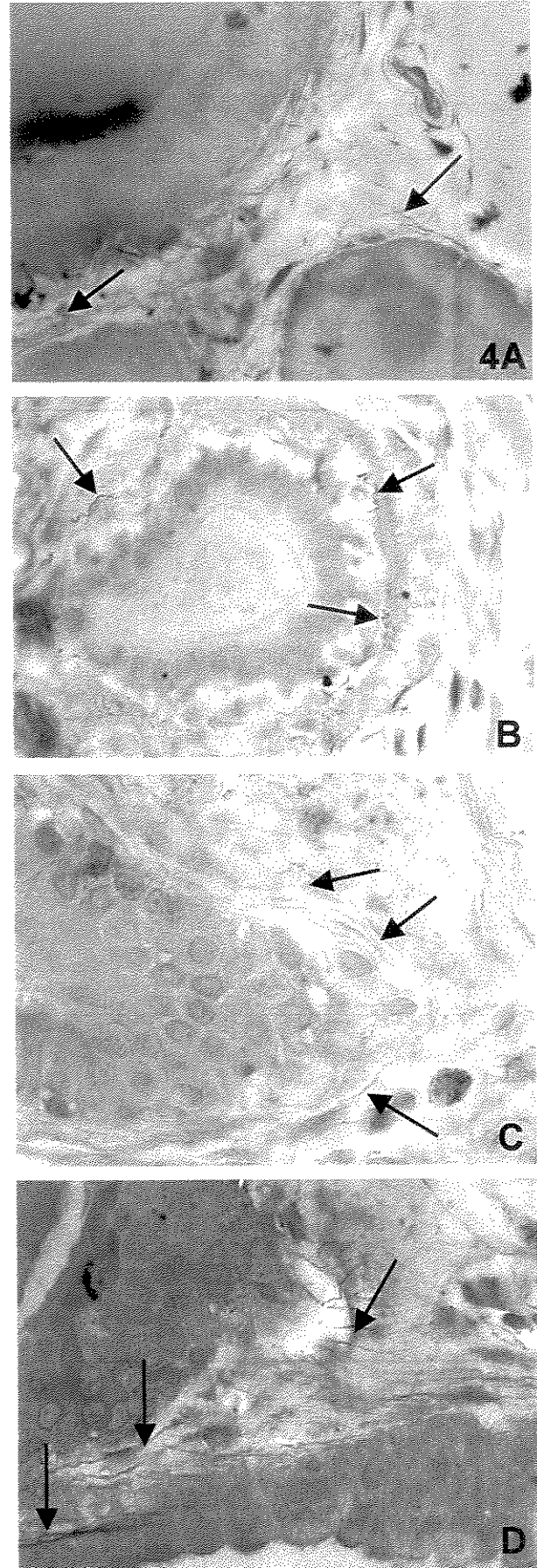


Figura 5.

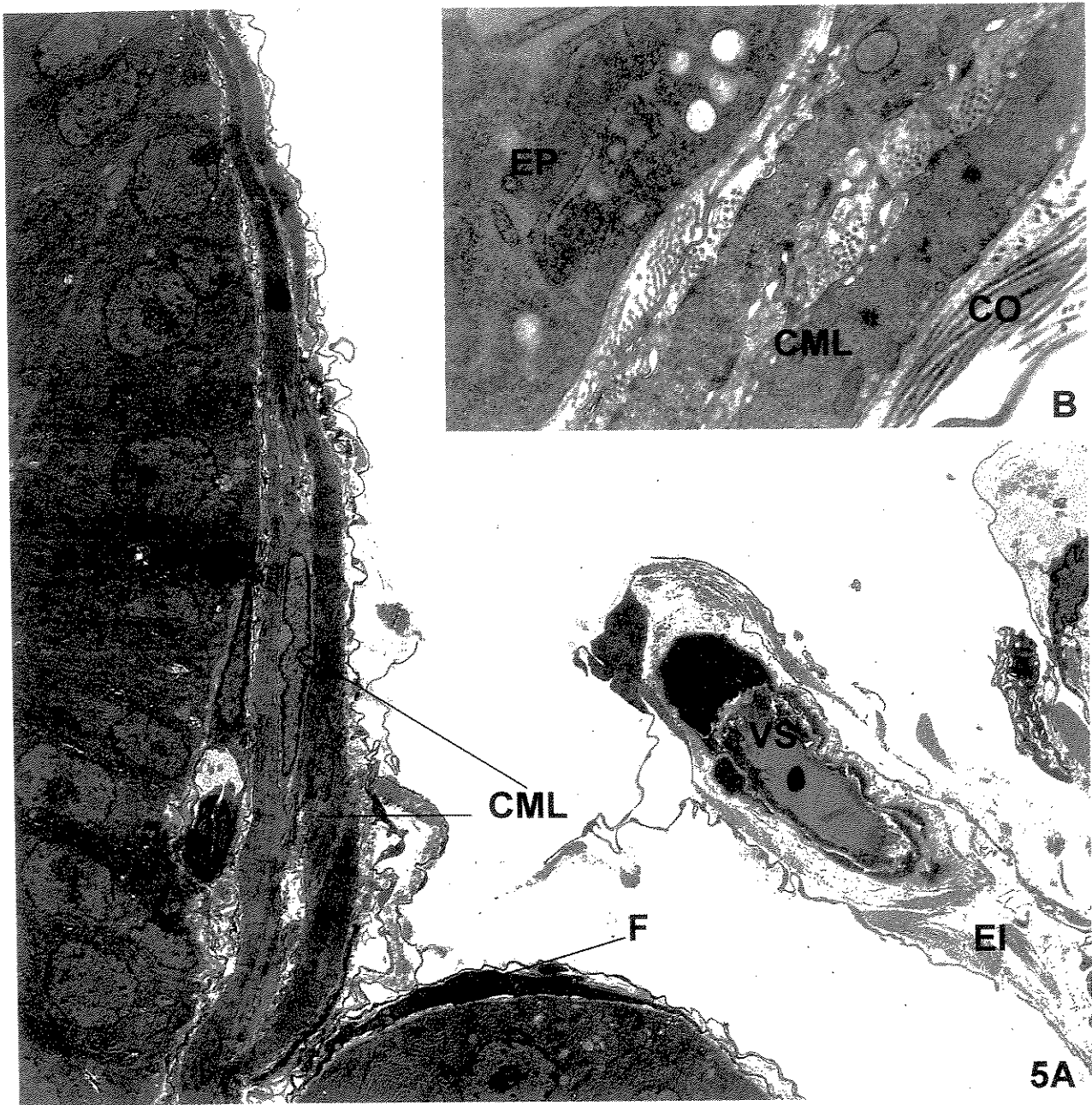


Figura 6.

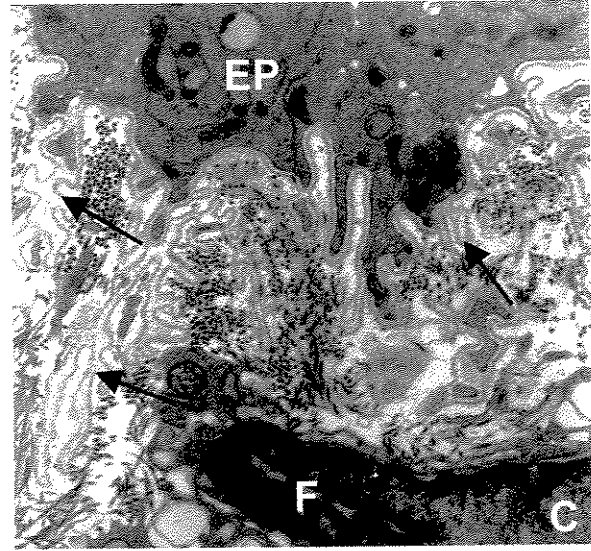
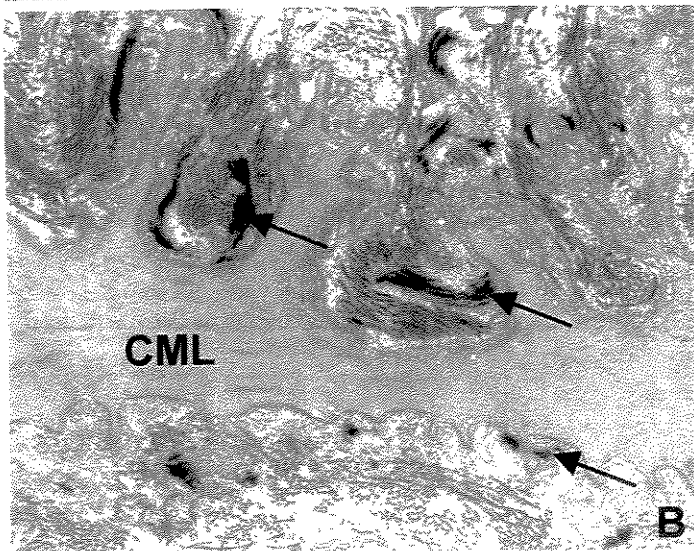
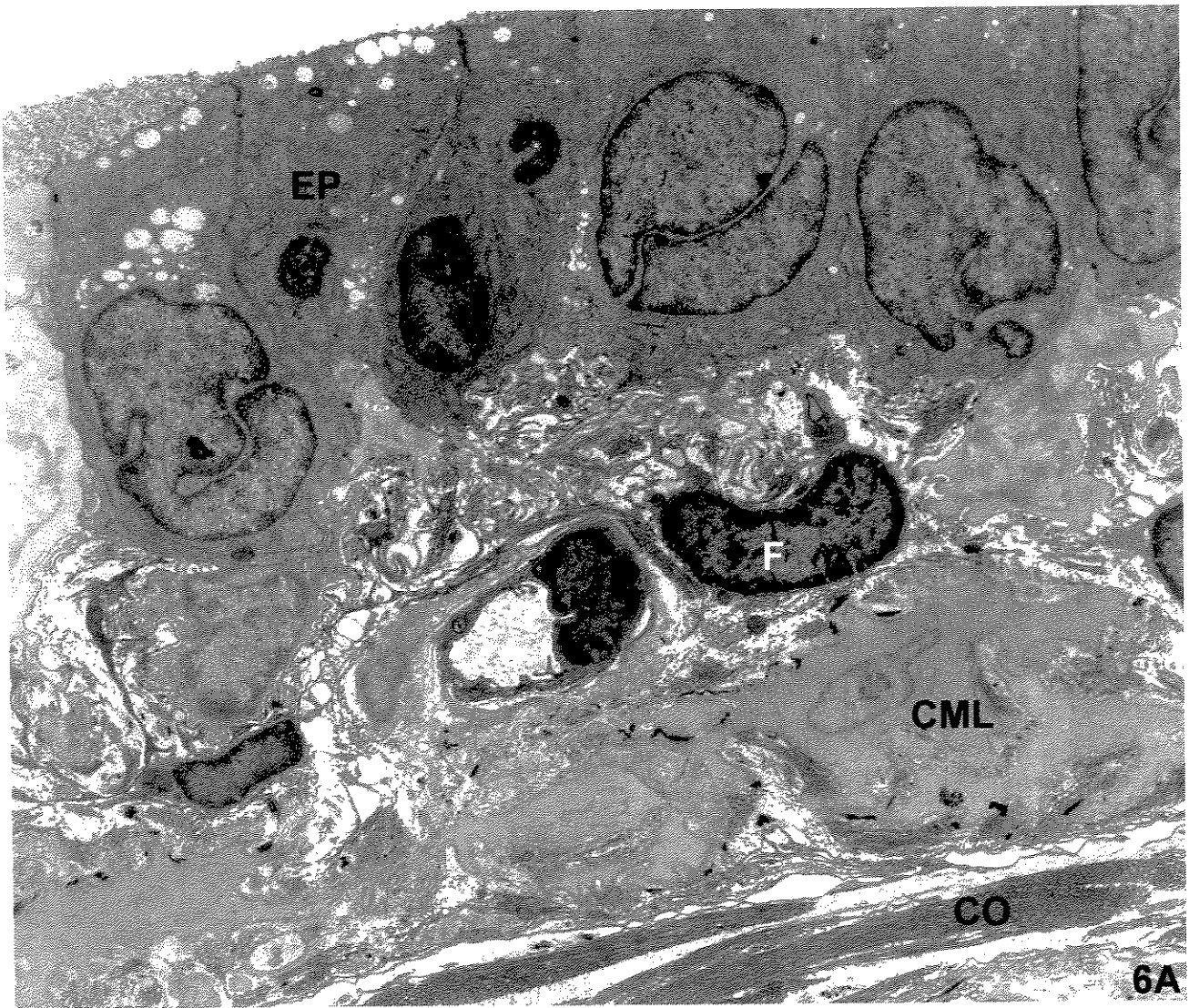


Figura 7.

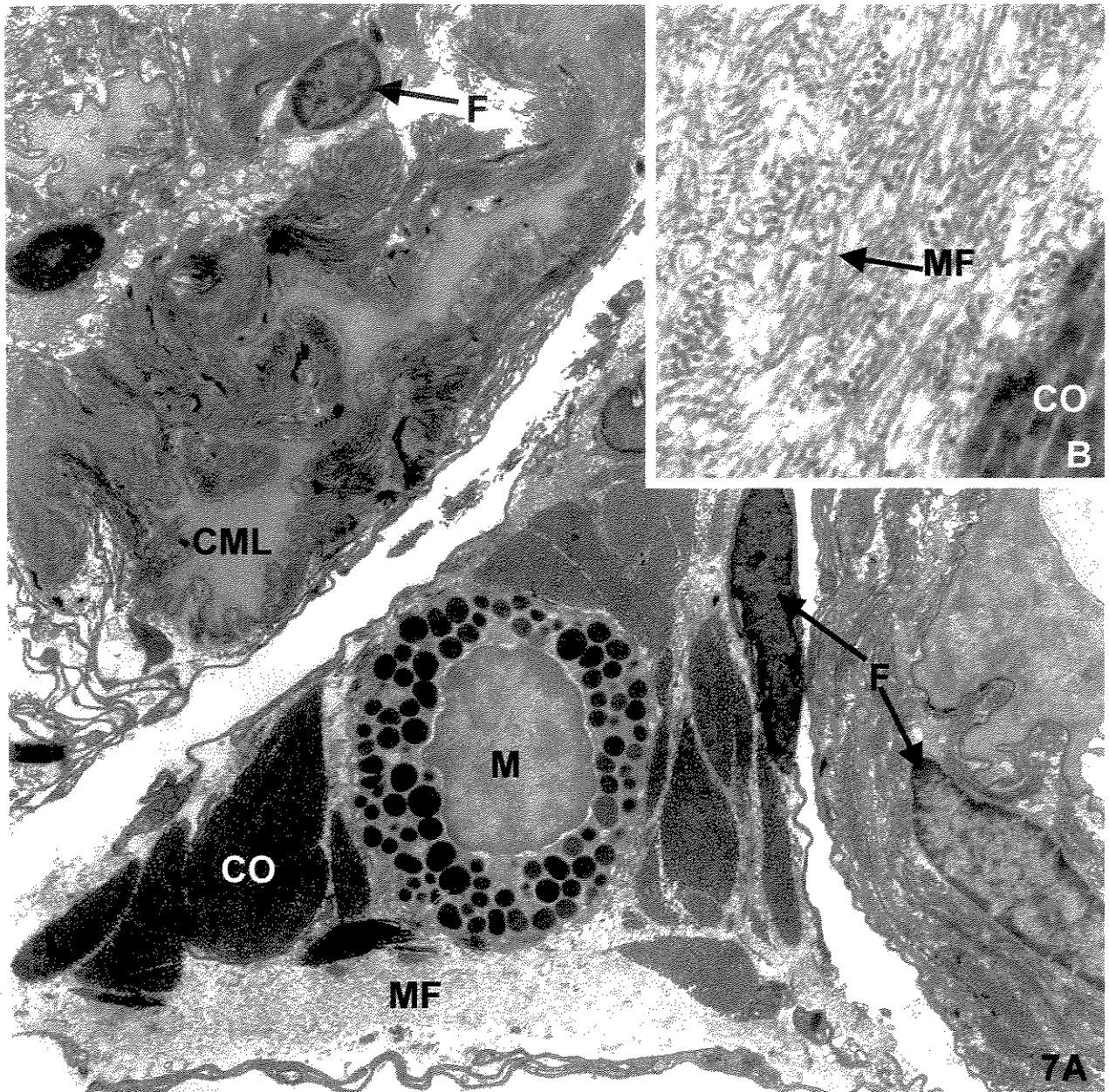


figura 8.

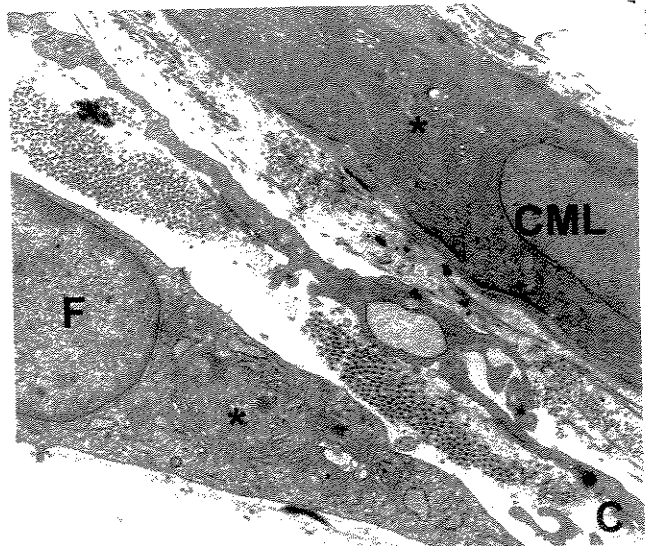
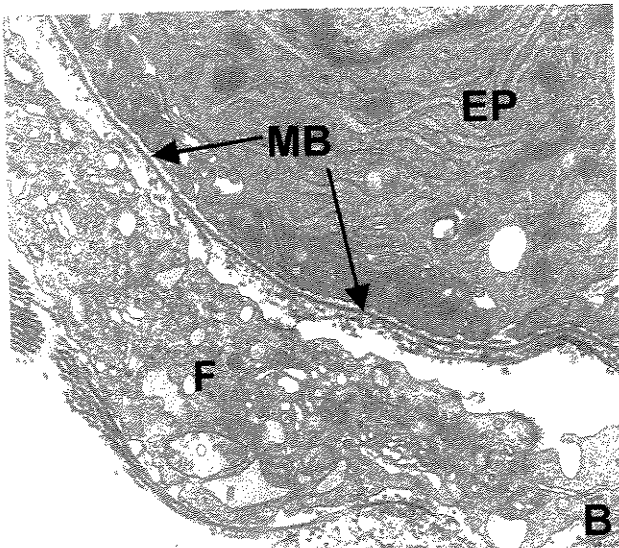
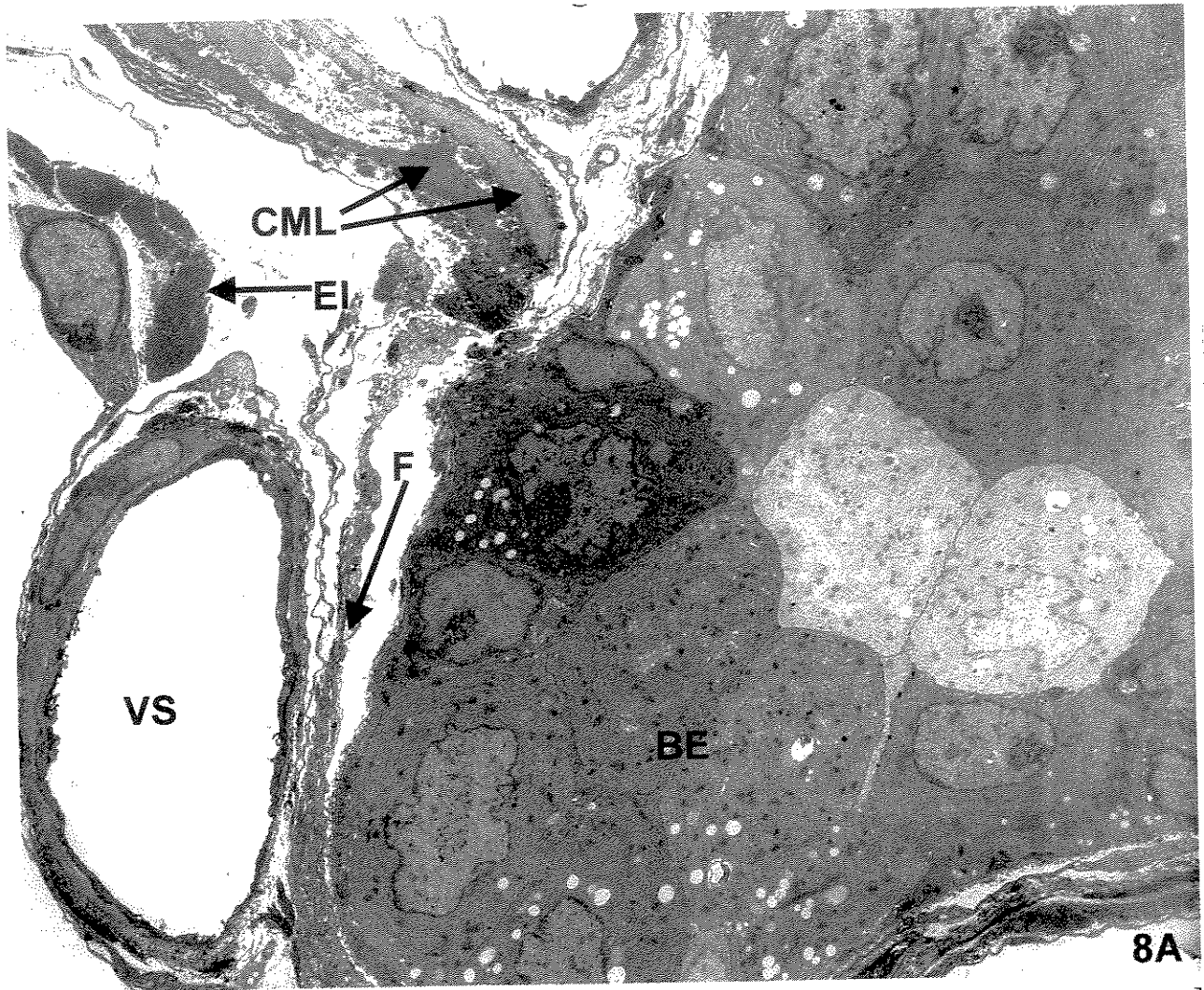
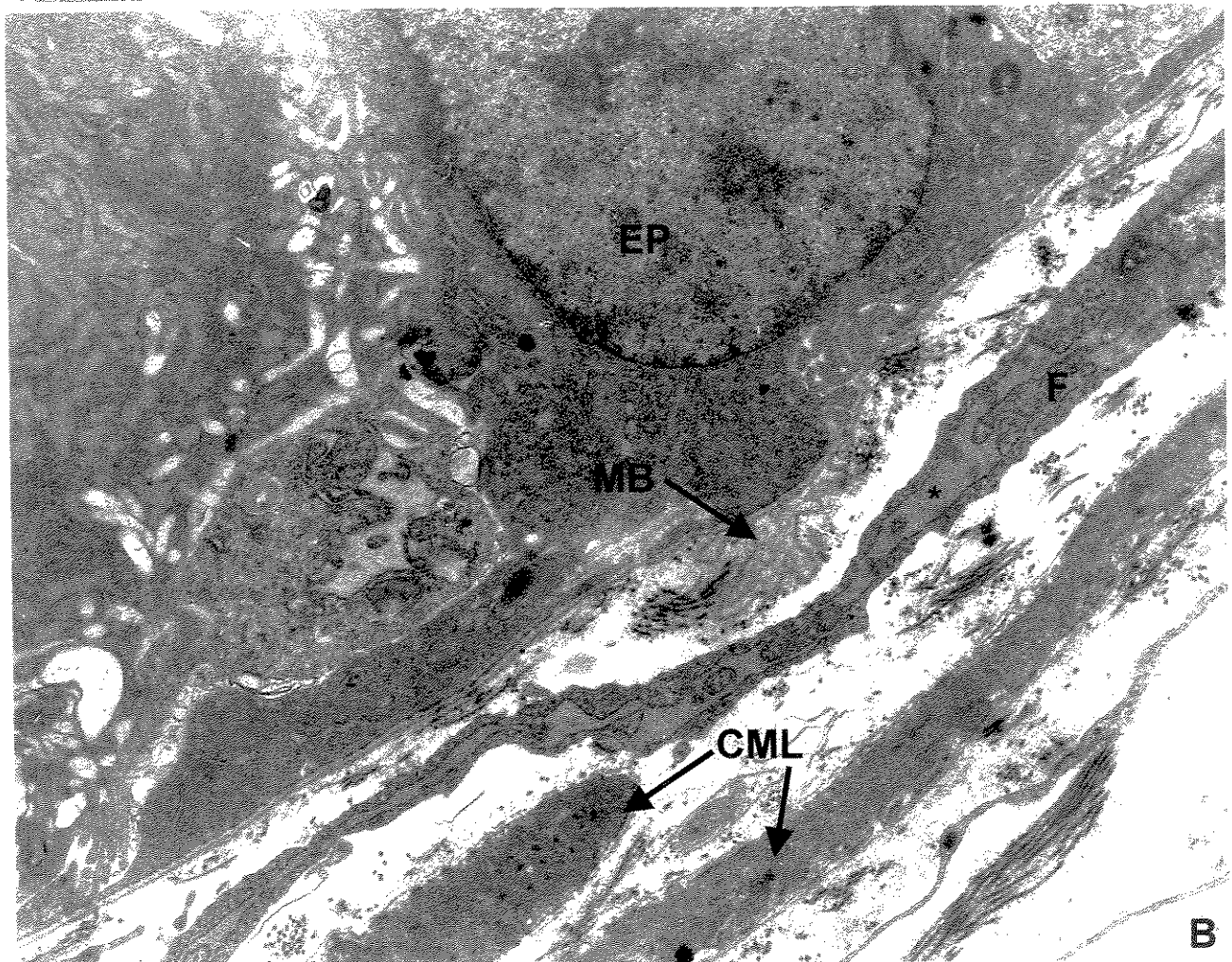
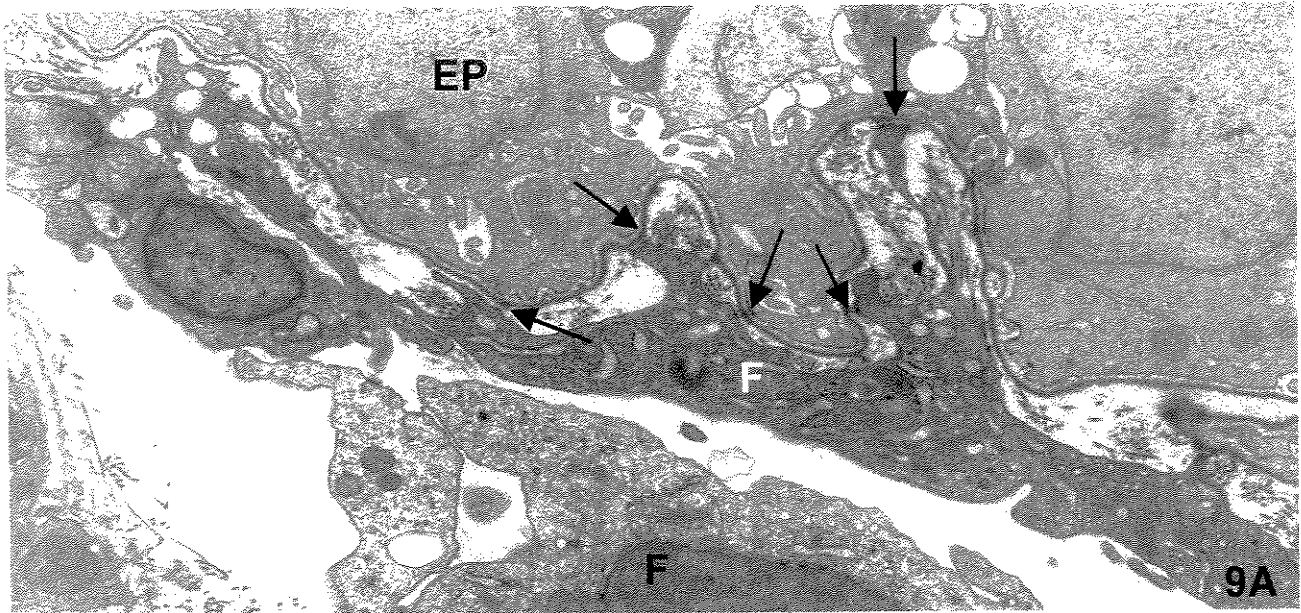


Figura 9.



Atividade da MMP-2 e da MMP-9 na próstata ventral de ratos durante a privação androgênica e reposição hormonal

Justulin Jr LA¹, Ureshino RP², Zanoni M², Felisbino SL.²

¹ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas - (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

² Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil

Título resumido: Atividade da MM-2 e MMP-9 na próstata

Palavras chave: castração, reposição hormonal, zimografia, stroma, matriz extracelular

Este trabalho teve auxílio financeiro das seguintes entidades: CNPq (Proc. 476137/03-9), FAPESP (Proc. 02/11102-4) e FUNDUNESP.

A ser submetido à Revista Cell and Tissue Research

Resumo

A privação androgênica promove atrofia da próstata e a reposição hormonal recupera a estrutura normal da glândula. Em ambos eventos, ocorrem intensa remodelação da matriz extracelular do estroma. Metallproteinasas de matriz (MMPs) formam uma família de enzimas com capacidade de degradar vários componentes da matriz extracelular. Neste trabalho nós investigamos a atividade das formas latentes e ativas das MMP-2 e MMP-9 durante a castração e recrescimento glandular. Ratos Wistar machos foram divididos em 3 grupos experimentais: controle (CT), castrados (CS) e castrados por 21 dias e tratados com testosterona (TESTO). Os animais foram sacrificados em diferentes tempos de castração e de reposição hormonal. Próstatas inteiras de animais dos diferentes grupos foram homogeneizadas em condições não denaturantes e os extratos (28µg de proteína por linha) foram analisados por zimografia em géis SDS-PAGE a 8% contendo 0,1% de gelatina. A atividade gelatinolítica das MMPs foi analisada por densitometria das bandas e uma análise quantitativa das bandas foi empregada. A PV dos ratos controle mostrou pouca atividade das formas pró (72 kDa) e ativa (57 kDa) e uma maior atividade da forma intermediária (66 kDa) da MMP-2. Somente a banda ativa da MMP-9 (81 kDa) apresentou uma mínima atividade gelatinolítica no grupo controle. Na castração, ocorreu um aumento progressivo da atividade de todas as bandas da MMP-2 e da banda ativa da MMP-9. Um aumento mais expressivo, entretanto, foi observado para a banda ativa da MMP-2, principalmente após 24 dias de castração e após 3 dias de reposição hormonal e da MMP-9 após 31 dias de castração. As análises de densitometria comprovam estas observações. Após 10 dias de reposição hormonal todas as bandas apresentaram atividades levemente superiores às do grupo controle. Em termos absolutos, atividade por próstata, o que se observou foi que apenas as bandas ativas da MMP-2 e da MMP-9 apresentavam atividade aumentada durante a castração e reposição hormonal em relação ao grupo controle. Esses resultados indicam que ocorre ativação de MMP-2 e MMP-9 durante a privação androgênica e reposição hormonal. Esta maior atividade certamente participa na remodelação da matriz extracelular do estroma prostático observado nestes eventos.

Introdução

As metaloproteinases de matriz (MMPs) formam uma família de endopeptidases, dependentes de metais, que degradam vários componentes da matriz extracelular. Essas enzimas, têm papel relevante em vários processos fisiológicos, tais como desenvolvimento embrionário, involução do útero após o parto, involução da mama após a lactação. Entretanto elas também estão presentes em várias situações patológicas, como na invasão tumoral e metastases (Werb et al. 1996; Hidalgo & Eckhardt, 2001).

As MMPs são sintetizadas na forma de um precursor latente que são ativados no espaço extracelular. As células sintetizam uma outra classe de metaloproteinases denominada Metaloproteinases de Membrana (MT-MMPs), que possuem a propriedade de clivar as MMPs latentes, proporcionando sua ativação. Além das MT-MMPs, outras proteases são capazes de ativar as MMPs e entre elas estão a plasmina, triptase e quimase. As MMPs também são ativadas via uma cascata de ativação, onde uma enzima ativa é capaz de ativar uma outra enzima latente (Matrisian, 1990; Stamenkovik, 2000). As células também secretam proteínas inibitórias de MMPs. Esses inibidores são conhecidos como Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs). Assim, a atividade das MMPs é regulada por meio de um complexo mecanismo de síntese, ativação e inibição (Ries et al 1995). Qualquer desequilíbrio na interação desses eventos pode levar a alterações na expressão e atividade dessas enzimas, como por exemplo, em tecidos cancerosos, onde se observa aumento na razão MMP/TIMP (Matrisian, 1990; Werb et al 1996; Mook, et al. 2004).

As gelatinases (MMPs 2 e 9) em particular, tem despertado grande interesse no desenvolvimento e progressão de câncer. Essas MMPs têm a capacidade de degradar o colágeno tipo IV, principal constituinte das membranas basais (MB). A degradação da MB é um evento crítico para a invasão tumoral e metástase. Além disso, as gelatinases também estão envolvidas nos processos de diferenciação celular, apoptose e angiogênese (Mook et al. 2004).

As células cancerosas podem induzir as células normais a aumentarem a expressão de MMPs, demonstrando que fatores solúveis sintetizados pelas células tumorais tomam parte no processo de regulação das MMPs. A degradação dos componentes da matriz

extracelular também pode afetar a expressão das MMPs. Por exemplo, a degradação proteolítica da laminina pela elastase de macrófagos (MMP-12) gera fragmentos que podem estimular a expressão de MMP-9 em macrófagos via fosforilação de MAPK (Mook et al. 2004).

Wilson et al. (2002) descreveram a expressão da MMP-2 durante a morfogênese da próstata humana. A maior expressão foi encontrada nas células epiteliais do compartimento basal. Entretanto, as células secretoras luminiais também apresentaram marcação positiva. Esses autores não encontraram marcação para MMP-2 nas células estromais. Zeng et al. (2003) demonstraram correlação positiva entre o maior potencial invasivo e o aumento da expressão das MMPs 2 e 9 no câncer de próstata, concluindo que o conhecimento da expressão dessas enzimas pode ajudar no prognóstico do câncer de próstata.

Estudos de imunolocalização evidenciaram que a MMP-9 é mais freqüentemente expressada em tumores de estágio avançado, onde as células tumorais encontram-se muito próximas às células inflamatórias, sugerindo que a proteólise localizada contribui para a invasão tumoral (Mook et al. 2004).

Wilson et al. (1993a) descreveram atividade de diversas proteases na secreção da próstata humana. As formas que mais apresentaram atividade gelatinolítica foram as de 81, 64, 66, 71 e 76 KDa, que foram estimuladas pela adição de CaCl_2 ao tampão de incubação, confirmando a identificação como MMPs. Além das MMPs, esses autores também observaram a atividade de proteases de menor peso molecular (23, 36 e 38 KDas), independentes de CaCl_2 , classificadas como serina-proteases.

Wilson et al. (1992) descreveram aumento na atividade da MMP-2 durante o desenvolvimento e maturação da próstata e vesícula seminal de ratos. A maior atividade foi observada durante o desenvolvimento prostático em ratos com idade entre 2 e 10 dias. Essa atividade diminuiu progressivamente com a maturação sexual. Wilson et al. (1991) demonstraram aumento na atividade das proteases de aproximadamente 58, 63 e 66 KDa, estimulada por cálcio, durante involução prostática, com pico de atividade por volta do 7º dia após a castração. Esses autores também descreveram aumento na atividade da forma de 58 KDa durante a recuperação glandular com tratamento com testosterona, após 4 dias.

Powell et al. (1996) demonstraram o aumento de expressão de RNA mensageiro para MMP-7 durante a involução prostática por castração. Esses autores observaram um pico de expressão de RNA mensageiro no 5º dia após a castração e diminuição de expressão após 8 dias. Estudos de hibridização *in situ* mostraram que são as células epiteliais que sintetizam a MMP-7.

Wilson et al. (1993b) descreveram atividade gelatinolítica das proteases cálcio dependentes de 48, 51, 74 e 80 kDas na secreção da próstata ventral de ratos. Além disso, esses autores também observaram intensa atividade de proteases independentes de cálcio de aproximadamente 27 KDa, e proeminente atividade das formas de 22, 36 e 41 KDas.

Hoekstra et al. (2001) e Jung et al. (2003) sugeriram que o estudo da concentração plasmática e da atividade das MMPs, em associação com a determinação dos níveis de PSA, poderiam funcionar como ferramenta para o monitoramento da progressão maligna dos tumores de próstata. Outro exemplo é o aumento nos níveis de MMP-2, -7, -8, -9, -10, -13 e -14 em pacientes com câncer prostático, quando comparado aos níveis de homens saudáveis (Stearns & Stearns, 1996; Wilson et al. (2004). Liao et al. (2003) e Pang et al. (2004) demonstraram que hormônios androgênicos também podem afetar a expressão das MMP-2 e -13 em tumores de próstata.

Essas evidências quanto à participação das MMPs no caráter metastático dos tumores demonstram que a inibição da atividade das MMPs, por inibidores naturais ou sintéticos, pode ser um importante caminho para o tratamento do câncer de próstata independente de hormônios (Woessner, 1999; Kugler, 1999; Lokeshwar, 1999; Hidalgo & Eckhardt, 2001).

Considerando que a próstata ventral de ratos tem sido extensivamente utilizada como modelo de estudo da fisiologia prostática normal e patológica, pareceu-nos extremamente importante realizar um estudo semi-quantitativo e temporalmente mais detalhado sobre a atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 durante os processos de involução e recuperação glandular. Neste trabalho, nós demonstramos um aumento extremamente significativo da atividade das formas ativas da MMP-2 e MMP-9 na próstata ventral de ratos durante estes dois eventos.

Material e Métodos

Animais

Foram empregados ratos Wistar adultos machos com idade de 3 meses, pesando cerca de 350g. Os animais foram mantidos sob condições constantes de temperatura e fotoperíodo, sendo fornecida água e ração “*ad libitum*”. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle (CT); grupo castrado (CS); e grupo castrado por 21 dias e tratados com testosterona (TESTO).

A castração foi realizada por uma pequena incisão escrotal, sob anestesia com pentobarbital sódico (30 mg/kg, injetados intraperitonealmente), e retirada dos testículos.

Os animais do grupo TESTO, após 21 dias de castração, receberam doses diárias de testosterona (Propionato de Testosterona - 4mg/kg peso corpóreo/dia), dissolvida em óleo de milho e administrada por injeção subcutânea. Os outros dois grupos de animais receberam apenas óleo de milho.

Os animais do grupo castrado foram sacrificados após 3, 5, 7, 21, 24, 26, 28, e 31 dias após a castração, enquanto os do grupo castrado tratado receberam, após 21 dias de castração, doses diárias de propionato de testosterona (4mg/kg/dia) e foram sacrificados após 3, 5, 7 e 10 dias de reposição. Finalmente, os animais do grupo controle foram sacrificados ao 3º, 7º, 21º e 31º dias após o início do experimento.

Para cada período e em cada situação experimental foram utilizados 10 animais.

Os lóbulos das próstatas ventrais foram removidos, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C até o momento do uso.

Preparação do extrato de tecido

Próstatas ventrais inteiras (um par de lóbulos) de 3 ratos diferentes de cada grupo experimental foram utilizados em cada extração. Os lóbulos foram homogeneizadas em tampão de extração (30mg de próstata/100µl de solução), contendo Tris-HCl 50Mm pH 7,4, NaCl 0,2M, Triton X-100 0,1% e 0,1% de cocktail inibidor de protease (P-8849 - Sigma-CO, Saint Louis, MO, USA) utilizando um homogeneizador do tipo Turrax em três ciclos de 5 segundos cada. O homogeneizado ficou incubando por 2 horas a 4°C, para

aumentar a eficiência da extração. Após a incubação, o homogeneizado foi centrifugado a 4.000 RPM por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e mantido à -80°C até a hora do uso. A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976).

Zimografia de Proteínas

Alíquotas (28 µg de proteína por linha) do extrato foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100V a 4°C) em gel de poliacrilamida a 8% contendo 0,1% de gelatina (colágeno denaturado). Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X-100 2,5% duas vezes de 15 minutos, e em seguida em tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 por duas vezes de 5 minutos e então incubados por 12 horas a 37°C no mesmo tampão contendo 5 Mm de CaCl₂ e 1 µM de ZnCl₂. Após a incubação, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue 0,25%. Áreas de proteólise aparecem como bandas claras contra um fundo azul escuro. Foram utilizados como controle positivo da atividade das MMPs no gel de zimografia 30 picogramas da MMP-9 ativa e 2 nanogramas da MMP-2 ativa, adquiridas comercialmente (Oncogene, Darmstadt-Germany),.

As bandas obtidas na zimografia foram digitalizadas, convertidas em bandas escuras sobre um fundo claro e analisadas por densitometria. A atividade gelatinolítica das bandas da MMP -2 e 9 foi analisada obtendo-se a densidade óptica integrada (IOD) das bandas utilizando-se Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

Após obtenção do IOD das diferentes bandas da MMP-2 e da MMP-9, para melhor visualização das diferenças encontradas, foi feita uma razão entre o IOD das bandas dos grupos experimentais CS e TESTO sobre o IOD das bandas do grupo CT.

O IOD das bandas da zimografia refere-se à atividade gelatinolítica presente em 28 µg de proteínas. Como foram obtidos diferentes volumes de extratos, proporcionais ao peso das glândulas nos diferentes grupos, os valores de IOD obtidos na zimografia foram transformados em IOD absoluto, considerando-se o peso prostático médio de cada grupo.

Análises estatísticas

Os valores representam média $\pm$ SD. Os valores foram submetidos à análise de variância pelo teste One-way Anova e posterior teste de Tukey-Kramer, sendo considerados significativamente diferentes os valores com $P \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Após vários testes de padronização, 28 μ g de proteínas de extrato prostático e 12 horas de incubação revelaram serem eficientes para demonstrar a atividade das principais bandas da MMP-2 e MMP-9 sem provocar a saturação de nenhuma banda. A figura 1 mostra o resultado da atividade gelatinolítica em gel de zimografia. O gel representa os resultados obtidos por três diferentes géis de duas diferentes extrações.

Na zimografia, foi possível visualizar as típicas bandas de 81 kDa da forma ativa da MMP-9 e as bandas de 72, 64 e 57 kDa, todas correspondentes às formas pró, intermediária e ativa da MMP-2, respectivamente (Fig. 1).

Todas as bandas da MMP-2 dos grupos experimentais apresentaram-se aumentadas em relação ao grupo controle. Wilson et al. (1992) descreveram aumento na atividade das 3 formas da MMP-2 durante o desenvolvimento e maturação da próstata e vesícula seminal de ratos. A maior atividade foi observada durante o desenvolvimento prostático em ratos com idade entre 2 e 10 dias. Wilson et al. (2002) demonstraram a expressão da MMP-2 durante a morfogênese da próstata humana. A maior expressão foi encontrada nas células epiteliais do compartimento basal. Entretanto, as células secretoras lumbais também apresentaram marcação positiva. Neste experimento, os autores não encontraram marcação para MMP-2 nas células estromais. Esses resultados sugerem o envolvimento dessas proteases nas modificações na matriz extracelular, que são necessárias para o estabelecimento da organização tecidual observada na próstata de um animal adulto.

Wilson et al. (1991) demonstraram aumento na atividade das proteases de aproximadamente 58, 63 e 66 KDa, estimulada por cálcio, durante involução prostática. Esses autores observaram o processo de involução por 30 dias e demonstraram um pico de atividade das 3 bandas da MMP-2 por volta do 7º dia após a castração. Entretanto, nós

observamos uma maior atividade das formas da MMP-2 em uma fase mais avançada da involução glandular, entre o 24 ° e 28 ° dia após a castração. A atividade das 3 formas diminuiu até o 31 ° em nosso experimento. Esses autores também descreveram aumento na atividade da forma de 58 KDa durante a recuperação glandular com tratamento com testosterona, após 4 dias.

Em nosso experimento, o aumento da atividade da banda de 57 kDa foi muito expressivo tanto na castração quanto na recuperação hormonal. A reposição hormonal induziu maior aumento na atividade das três formas da MMP-2, comparado com a castração. Essa atividade diminuiu progressivamente com o tratamento. Entretanto, após 10 dias de recuperação glandular, a atividade das três bandas da MMP-2 foi aproximadamente 2 vezes maior que a observada no grupo controle (fig. 2).

A atividade da banda ativa da MMP-9 apresentou-se sempre extremamente elevada durante a castração e no início da reposição hormonal, mas principalmente no final do período de castração. Após 5, 7 e 10 dias de tratamento com testosterona a atividade desta banda diminuiu progressivamente para os níveis do grupo controle (Fig. 4).

Mook et al. (2004) descreveram aumento de expressão de RNAm das MMP-2 e 9 em câncer de cólon, além da maior ativação de suas formas latentes, demonstrando uma correlação entre a atividade das gelatinases e o fenótipo agressivo do câncer de cólon. Esses autores também demonstraram a maior atividade da MMP-9 em fases mais avançadas da invasão tumoral, principalmente em regiões onde ocorreram perda ou ausência de colágeno tipo IV nas membranas basais epiteliais. Já foi demonstrado que, na próstata em involução, ocorrem alterações na membrana basal, com degradação de colágeno tipo IV e indução de apoptose de células epiteliais (Carvalho & Line, 1996; Ilio et al. 2000). Desta forma, é possível que a atividade da MMP-9 esteja relacionada com estas modificações na membrana basal e apoptose das células epiteliais.

As alterações de expressão da MMP-7, durante a involução da próstata ventral, foram descritas por Powell et al. (1996). A MMP-7 não foi encontrada em níveis detectáveis nos animais controle. Ocorreu um aumento de expressão do RNAm por volta do 2º dia após a castração, com pico detectado no 5 ° dia. Por outro lado, observou-se que o pico de expressão protéica ocorria antes do pico de expressão do RNAm. Esses resultados

parecem contraditórios, uma vez que a expressão protéica esteja ocorrendo antes da transcrição do RNAm correspondente. Entretanto, o que se observou neste experimento foi um aumento de ativação da forma latente da MMP-7, que é um evento pós-transcricional e independente dos níveis de expressão de RNAm. Estes resultados descritos por Powell et al. (1996) para a MMP-7 corroboram as nossas observações, nas quais são observados maiores aumentos na atividade das formas ativas em detrimento das formas de pró-enzima.

Entretanto, quando se analisa o IOD absoluto por próstata inteira, o perfil de atividade das bandas da MMP-2 revela que apenas a banda da forma ativa esta aumentada durante a castração e reposição hormonal (Fig. 3). Já a MMP-9 continua apresentando grande atividade na próstata dos animais do grupo CS e TESTO (Fig. 5).

Wilson et al. (1991) demonstraram que durante a castração ocorre uma progressiva diminuição da quantidade das proteases presentes na secreção. Em nosso estudo, também foi observado este aspecto (dados não mostrados). Além disso, também foi demonstrado que a MMP-2 e MMP-9 estão presentes na secreção da próstata ventral. Considerando que a quantidade de secreção prostática acumulada nos ductos diminui progressivamente durante a castração, é possível concluir que a maior atividade das MMPs -2 e 9 observada durante os eventos de castração e reposição hormonal esteja presente no compartimento estromal da próstata.

Esta observação suporta a hipótese de que, na regressão prostática seguida à privação androgênica, além da atrofia dos compartimentos epiteliais e luminiais, também ocorra uma atrofia estromal, com degradação da matriz extracelular do estroma.

Referências Bibliográficas

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Carvalho HF, Line SRP (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration *Cell Biol Int* 20: 809-819

- Hidalgo M, Eckhardt SG (2001) Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93: 178-193
- Hoekstra R, Eskens FALM, Verweij J (2001) Matrix metalloproteinase Inhibitors: current developments and future perspectives. *The Oncologist* 6: 415-427
- Ilio KY, Nemeth JA, Sensibar JA, Lang S, Lee C (2000) Prostatic ductal system in rats: changes in regional distribution of extracellular matrix proteins during castration-induced regression. *Prostate* 43: 3-10.
- Jung K, Krell HW, Ortel B, Hasan T, Romer A, Schnorr D, Loening SA, Lein M (2003) Plasma matrix metalloproteinase 9 as biomarker of prostate cancer progression in Dunning (Copenhagen) rats. *Prostate* 54: 206-211.
- Kugler A (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res* 19: 1589-1592.
- Liao X, Thrasher J. B, Pelling J, Holzbeierlein J, Sang QX A and Li B. (2003). Androgen Stimulates Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Human Prostate Cancer. *Endocrinology* 144: 1656-1663.
- Matrisian LM (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trend Genet* 6: 121-125.
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ (2004) The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis *Biochim Biophys Acta*. 1705: 69-89
- Pang ST, Flores-Morales A, Skoog L, Chuan YC, Nordstedt G, Pousette (2004) A Regulation of matrix metalloproteinase 13 expression by androgen in prostate cancer *Oncol Rep*. 11(6): 1187-1192
- Powell WC, Domann Jr. FE, Mitchen JM, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden T (1996) Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate. *Prostate* 29: 159-168.

Ries C, Petrides PE (1995) Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 376: 345-355.

Stearns M, Stearns ME (1996) Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. *Oncol Res* 8: 69-75.

Werb Z, Ashkenas J, MacAuley A, Wiesen JF (1996) Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res* 29: 1087-1097.

Wilson MJ, Strasser M, Vogel MM, Sinha AA (1991) Calcium-dependent and calcium-independent gelatinolytic proteinase activities of the rat ventral prostate and its secretion: characterization and effect of castration and testosterone treatment. *Biol Reprod* 44: 776-785.

Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA. (1992) Metalloproteinases Activities Expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicle. *Biology of Reproduction* 47: 683-691.

Wilson MJ, Norris H, Kapoor D, Woodson M, Limas C, Sinha AA (1993a) Gelatinolytic and caseinolytic proteinase activities in human prostatic secretions *J Urol* 149: 653-658

Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA (1993b) Gelatinolytic and caseinolytic proteinase activities in the secretions of the ventral, lateral, and dorsal lobes of the rat prostate *Biol Reprod*. 48:1174-84.

Wilson MJ, Sellers RG, Wiehr C, Melamud O, Pei D, Peehl DM (2002) Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells. *J Cell Physiol*. 1: 208-16.

- Wilson MJ, Woodson M, Wiehr C, Reddy A, Sinha AA (2004) Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of estradiol-induced nonbacterial prostatitis in the lateral prostate lobe of the Wistar rat. *Exp Mol Pathol*. 77: 7-17
- Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 878: 388-403
- Wood MK, Fudge JL, Mohler et al. (1997) In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 in human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 15: 246-258.
- Yoshimoto MF, Itoh H, Yamamoto et al. (1993) Expression of MMP-7 (PUMP-1) mRNA in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 54: 614-618.
- Zeng H, Xiao Y, Lu G, Chen Y (2003) Immunohistochemical studies of the expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in human prostate cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 23: 373-4, 379

Legendas das figuras

Figura 1. Atividade gelatinolítica da MMP-9 e da MMP-2 durante a castração e reposição hormonal. Podem ser visualizadas as bandas de 81 kDa que corresponde à forma ativa da MMP-9 e as bandas de 72, 64 e 57 kDa que correspondem, respectivamente, as formas pró, intermediária e ativa da MMP-2.

Figura 2. Razão entre o IOD das bandas da MMP-2 dos grupos CS e TESTO sobre o grupo CT.

Figura 3 Razão entre o IOD absoluto da MMP-2 dos grupos CS e TESTO sobre o grupo CT.

Figura 4. Razão entre o IOD da banda da MMP-9 dos grupos CS e TESTO sobre o grupo CT.

Figura 5. Razão entre o IOD absoluto da MMP-9 dos grupos CS e TESTO sobre o grupo CT.

Figura 1.

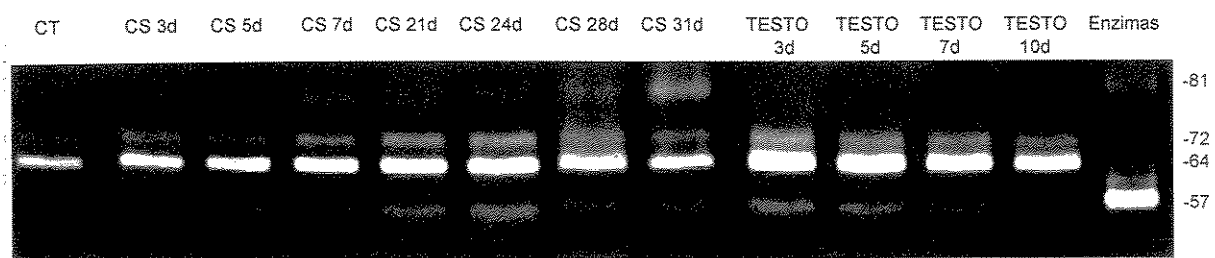


Figura 2.

Razão entre o IOD das bandas da MMP-2 na zimografia dos grupos experimentais sobre o grupo controle

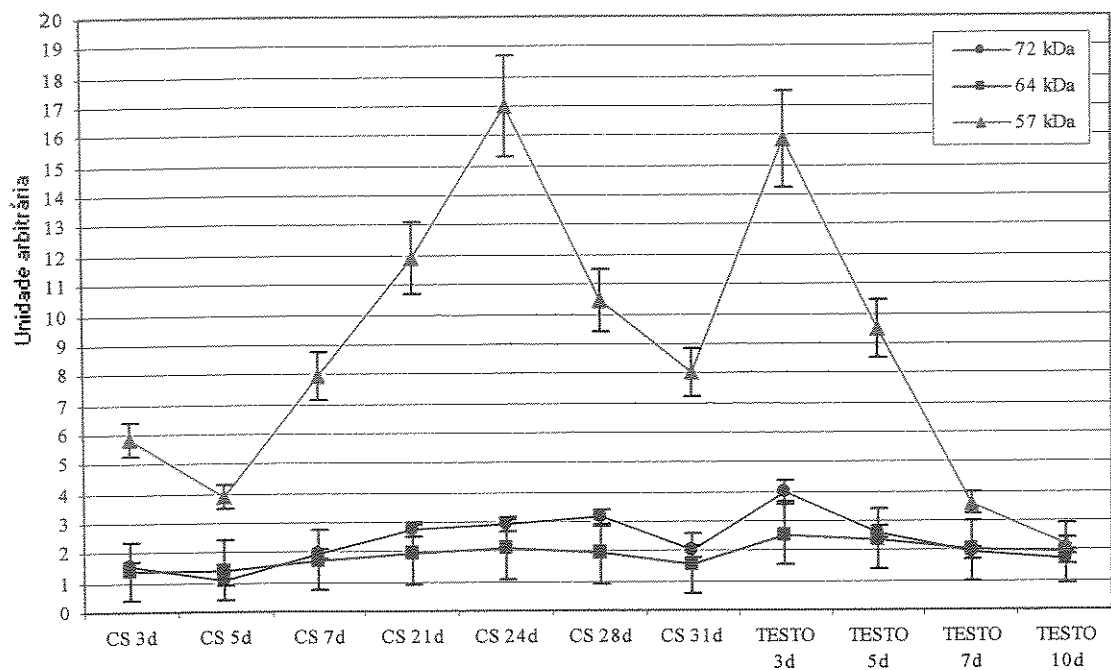


Figura 3.

Razão entre o IOD absoluto das bandas da MMP-2 na próstata dos diferentes grupos sobre a do grupo controle

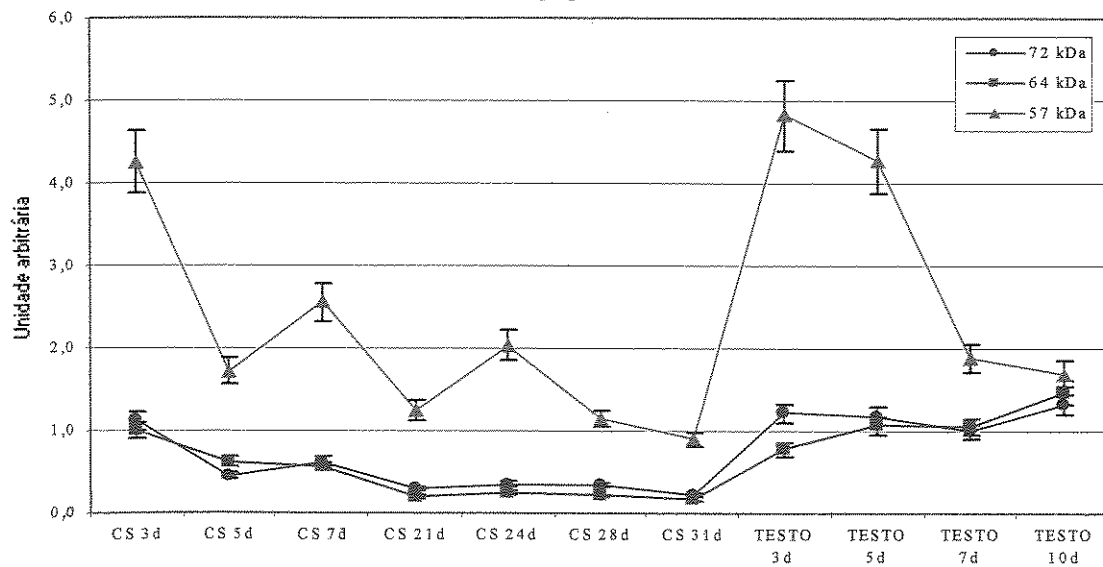


Figura 4.

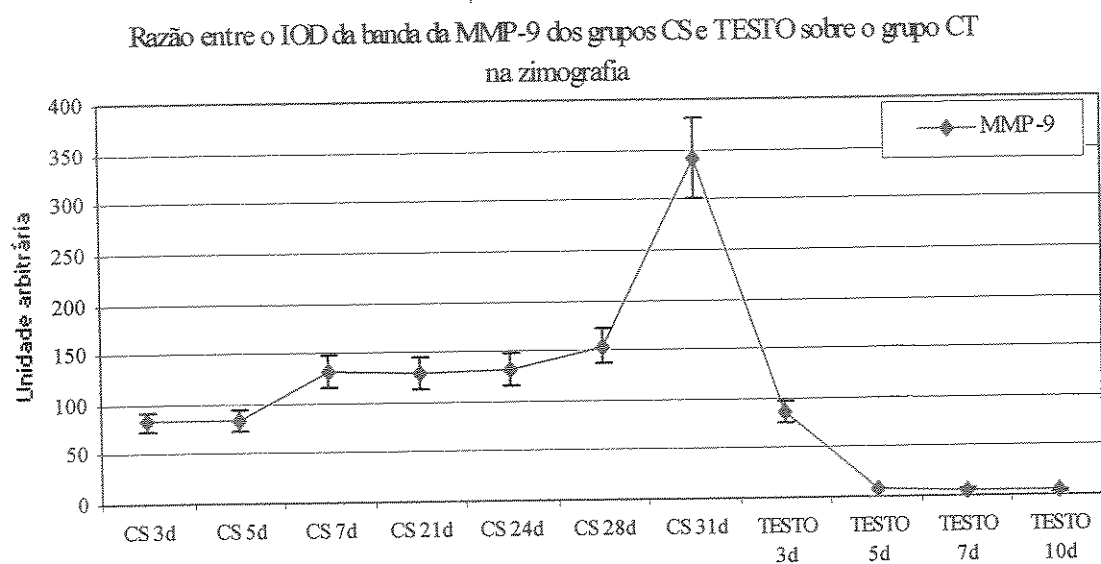
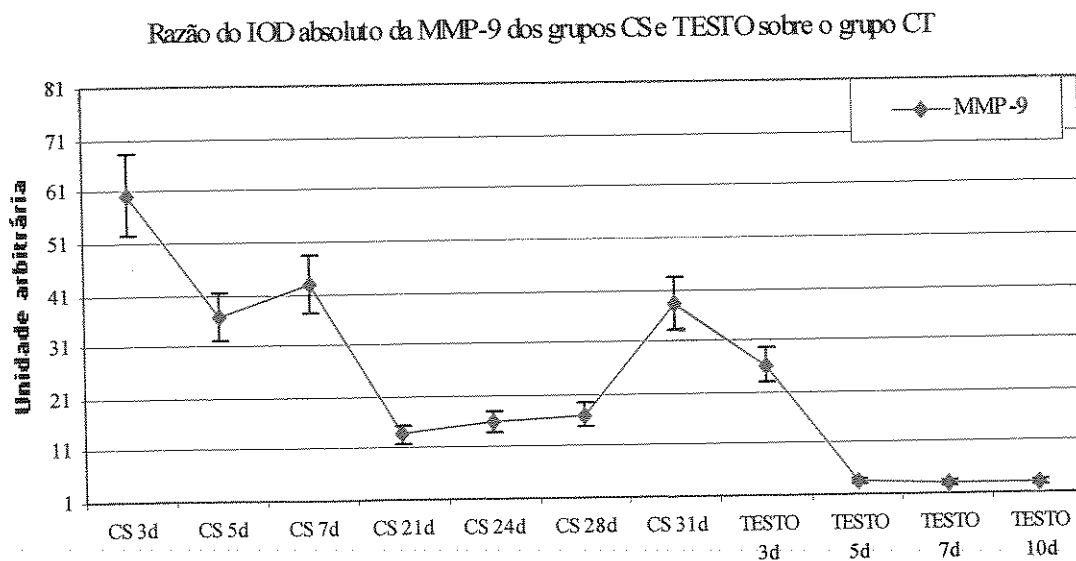


Figura 5.



5. Conclusões gerais da tese

1. As células epiteliais da vesícula seminal involuída apresentam uma resposta inicial proliferativa mais intensa à reposição hormonal do que às da próstata ventral, conforme avaliado pelo índice de proliferação celular;
2. A maior complexidade estrutural da próstata e o estroma acumulado durante a involução glandular requerem um maior tempo para a sua completa recuperação;
3. O tempo necessário para a recuperação glandular da próstata ventral depende do período de privação androgênica, ou seja, quanto maior o tempo de privação, maior o tempo necessário para recuperá-la;
4. 10 dias de reposição hormonal são suficientes para a recuperação do conteúdo estromal, mas não para parênquima glandular;
5. A recuperação glandular da próstata involuída repete os eventos do seu desenvolvimento pós-natal com a formação de brotamentos do epitélio;
6. Durante a involução glandular e o posterior re-crescimento ocorrem tanto síntese dos componentes fibrilares estromais e também degradação pela atividade das MMPs
7. Ocorre um aumento na concentração e atividade das MMPs no estroma durante os eventos de involução e recuperação glandulares;
8. Na involução e na recuperação glandular ocorre ativação das formas latentes das MMPs 2 e 9, as quais participam da degradação e remodelação das fibras estromais;
9. Os efeitos da castração e da reposição hormonal sobre a próstata ventral de ratos são um bom modelo de estudos das interações epitélio-estroma, da matriz extracelular e da atividade de metaloproteinases de matriz.

6. Referências Bibliográficas da Introdução

- Aümuller G (1979) Prostate gland and seminal vesicles In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Edited by A. Okche and L Vollrath. Berlin-Heidelberg-New York Springer-Verlag VII/6 1
- Aumüller G, Seitz J (1990) Protein secretion and secretory process in male accessory Sex gland Int Ver Of Citology Germany 21: 127-231
- Bagavandoss P (1998) Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary J Endocrinol 158: 221-228
- Brandes D (1966) The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones Int Ver Cytol 20: 207-276
- Carvalho HF, Line SRP (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration Cell Biol Int 20: 809-819
- Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior PS (1997a) Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma Tissue Cell 29:163-70
- Carvalho HF, Vilamaior PS, Taboga (1997b) SR Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy Prostate 32: 27-34.
- Chung LWK, Raymond GF (1975) Differences among rat accessory glands in their neonatal androgen dependency Endocrinology 97: 145-153
- Cunha GR, Bigsby RM, Coople PS, Sugmura Y (1985) Stromal-epithelial interactions in adult organs Cell Diff 17: 137-148
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate Endocrinology 8: 338-362
- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ (1992) Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene Mol Cell Endocrinol 88:15-22.

- Donjacour AA, Cunha GR (1988) The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate *Dev Biol* 128: 1-14
- Donjacour AA, Cunha GR (1993) Assessment of protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-intensive mice *Endocrinology* 132: 2342-2350
- Farnsworth WE (1999) Prostate stroma: Physiology *Prostate* 38: 60-72
- Ferguson JE, Schor AM, Howell A, Ferguson MWJ (1992) Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle *Cell Tissue Res* 268: 167-177
- George FW (1997) Androgen metabolism in the prostate of the finasteride-treated, adult rat: a possible explanation for the differential action of testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone during development of the male urogenital tract *Endocrinology* 138: 871-887
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR (1996) Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle *Acta Anatomica* 155: 81-93
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR (1996) Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anatomica* 155: 94-103
- Hayward SW, Del Buono R, Deshpande N, Hall PA (1992) A functional model of adult human prostate epithelium The role of androgens and stroma in architectural organisation and the maintenance of differentiated secretory function *Cell Sci* 102: 361-372
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR (1997) Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate *Br J Urol* 79 Suppl 2:18-26
- Heikinheimo K, Salo T (1995) Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth *J Dent Res* 74: 1226-1234
- Hidalgo M, Eckhardt SG (2001) Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy *J Natl Cancer Inst* 93: 178-193

- Hoekstra R, Eskens FALM, Verweij J (2001) Matrix metalloproteinase Inhibitors: current developments and future perspectives *The Oncologist* 6: 415-427
- Huttunen E, Romppanen T, Helminen HJ (1982) Testosterone action on the ventral prostate lobe of the castrated rat as assessed with a stereologic morphometric method. *Am J Anat* 165: 199-209.
- Ilio KY, Nemeth JA, Sensibar JA, Lang S, Lee C (2000) Prostatic ductal system in rats: changes in regional distribution of extracellular matrix proteins during castration-induced regression *Prostate* 43: 3-10
- Imperato-McGinley J (1991) 5 alpha-metabolism in finasteride-treated subjects and male pseudohermaphrodites with inherited 5 alpha-reductase deficiency. A review *Eur Urol* 20 Suppl 1:78-81
- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T & Peterson RE (1974) Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 186: 1213–1215
- Ishizuya-Oka A, Li Q, Amano T, Damjanovski S, Ueda S, Shy YB (2000) Requirement for matrix metalloproteinase stromelysin-3 in cell migration and apoptosis during tissue remodeling in *Xenopus laevis* *J Cell Biol* 150:1177-1188
- Jesik CJ, Holland JM, Lee C (1982) An anatomic and histologic study of the rat prostate *Prostate* 3: 81-97.
- Jung K, Krell HW, Ortel B, Hasan T, Romer A, Schnorr D, Loening SA, Lein M (2003) Plasma matrix metalloproteinase 9 as biomarker of prostate cancer progression in Dunning (Copenhagen) rats *Prostate* 54: 206-211
- Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA (1998) Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer *Int J Cancer* 74: 220-223

- Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS, Dalkin BL, Nagle RB (1994) Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate Am J Pathol 145: 167-174
- Kugler A (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors Anticancer Res 19: 1589-1592
- Kyprianou N, Isaacs JT (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration Endocrinology 122: 552-562
- Labat-Robert J; Bihari-Varga, M & Robert L (1990) Extracellular matrix FEBS Lett 268: 368-393
- Lee C (1996) Role of androgen in prostate growth and regression: stromal-epithelial interaction Prostate 6: 52-56
- Lee C; Sensibar JA; Dudek SM; Hiipakka RA; Liao S (1990) Prostatic ductal system in rats: Regional variation in morphological and functional activities Biol Reprod 43: 1079-1086
- Liao X; Thrasher JB, Pelling J; Holzbeierlein J; Sang QXA; Li B (2003) Androgen Stimulates Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Human Prostate Cancer Endocrinology 144: 1656-1663
- Lokeshwar BL (1999) MMP inhibition in prostate cancer Ann N Y Acad Sci 878: 271-289
- Maffini V; Geck P; Powell CE; Sonnenschein C; Soto AM (2002) Mechanism of androgen action on cell proliferation: AS3 protein as a mediator of proliferative arrest in the rat prostate Endocrinology 143: 2708-2714
- Marker PC; Donjacour AA; Dahiya R; Cunha GR (2003) Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development Develop Biol 253: 165-174
- Matrisian LM (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling Trend Genet 6: 121-125
- McNeal JE (1981) The zonal anatomy of the prostate Prostate 2:35-49
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ (2004) The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis Biochim Biophys Acta 1705: 69-89

- Nazian SJ (1986) Concentrations of free testosterone, total testosterone, and androgen binding protein in the peripheral serum of male rats during sexual maturation *J Androl* 7: 49-54
- Nemeth, Ha & Lee, C (1996) Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization *Prostate* 28: 124-128
- Nishino T, Wedel T, Schmitt O, Buhlmeyer K, Schonfelder M, Hirtreiter C, Schulz T, Kuhnel W & Michna H (2004) Androgen-dependent morphology of prostates and seminal vesicles in the Hershberger assay: evaluation of immunohistochemical and morphometric parameters *Annals of Anatomy* 186: 247-253
- Pang ST, Flores-Morales A, Skoog L, Chuan YC, Nordstedt G, Pousette (2004) A Regulation of matrix metalloproteinase 13 expression by androgen in prostate cancer *Oncol Rep* 11: 1187-1192
- Powell WC, Domann Jr FE, Mitchen JM, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden T (1996) Matrilysin expression in the involuting rat ventral prostate *Prostate* 29: 159-168
- Prins Gs, Birch, L, Greene Gl (1991) Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate *Endocrinology* 129: 3187-3199
- Quaranta V (2000) Cell migration through extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way *J Cell Bio* 149: 1167-1170
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB (2004) Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development *Endocr Relat Cancer* 11:225-254
- Sandford NL, Searle JW, Kerr JF (1983) Successive waves of apoptosis in the rat prostate after repeated withdrawal of testosterone stimulation *Pathology* 16: 406-410
- Schulman C, Lunenfeld B (2002) The ageing male *World J Urol.* 20: 4-10
- Seiki M (2003) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion *Cancer Letters* 194: 1-11
- Shabsigh A, Tanji, N; D'agati, V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O Shabsigh R, Buttyan R (1999) Vascular anatomy of the rat ventral prostate *Anat Rec* 256: 403-11

- Stamenkovic I (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis *Cancer Biology* 10: 415-433
- Stearns M, Stearns ME (1996) Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression *Oncol Res* 8: 69-75
- Steers W (2001) 5-alpha-reductase activity in the prostate *Urology* 58:17-24
- Sufrin G, Coffey DS (1974) A comparison of the hormone responsiveness of the prostate and seminal vesicles *Investigative Urology* 11: 386-391
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA (1986) Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate *Biol Reprod* 34: 961-971
- Taboga SR, Vidal Bde C (2003) Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies *J Submicrosc Cytol Pathol* 35:11-6.
- Tanney DC, Feng L, Pollok AS, Lovett DH (1998) Regulated expression of matrix metalloproteinases and TIMP in nephrogenesis *Dev Dyn* 213:121-129
- Thompson IM, Klein EA, Lippman SM, Coltman CA, Djavan B (2003) Prevention of prostate cancer with finasteride: US/European perspective *Eur Urol* 44: 650-655
- Torres JM, Ruiz E, Ortega E (2003) Development of a quantitative RT-PCR method to study 5alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status *Prostate* 56:74-79
- Tsujimura A, Koikawa Y, Salm S, Takao T, Coetzee S, Moscatelli D, Shapiro E, Lepor H, Sun TT, Wilson EL. (2002) Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis *J Cell Biol* 157:1257-65
- Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF (2000) Structural characterization and distribution of elastic system fibers in the human prostate and some prostatic lesions. *Braz J Morphol Sci* 20: 101-107.
- Vilamaior PS, Suzigan S, Carvalho HF, Taboga SR (2003) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate* 45: 253-258

- Wilson MJ, Strasser M, Vogel MM, Sinha AA (1991) Calcium-dependent and calcium-independent gelatinolytic proteinase activities of the rat ventral prostate and its secretion: characterization and effect of castration and testosterone treatment. *Biol Reprod* 44: 776-785.
- Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA (1992) Metalloproteinases Activities Expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicle *Biol of Reproduction* 47 683-691
- Wilson MJ, Norris H, Kapoor D, Woodson M, Limas C, Sinha AA (1993) Gelatinolytic and caseinolytic proteinase activities in human prostatic secretions *J Urol* 149: 653-658
- Wilson MJ, Sellers RG, Wiehr C, Melamud O, Pei D, Peehl DM (2002) Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells. *J Cell Physiol.* 1: 208-16.
- Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinase inhibition From the Jurassic to the third millennium *Ann N Y Acad Sci* 878: 388-403