

AMANDA CIA HETZL

**“Senescência e Próstata: Interações dos hormônios esteroides e dos
fatores de crescimento no microambiente glandular”**

Campinas, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

AMANDA CIA HETZL

**“Senescência e Próstata: Interações dos hormônios esteroides e
dos fatores de crescimento no microambiente glandular”**

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

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para
obtenção do Título de Doutora
em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

H479s Hetzl, Amanda Cia, 1984-
Senescência e próstata: interações dos hormônios esteroides e dos fatores de crescimento no microambiente glandular / Amanda Cia Hetzl. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Valeria Helena Alves Cagnon Quitete.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata. 2. Fatores de crescimento de fibroblasto. 3. Hormônios esteroides. 4. Senescência. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Senescence and prostate: steroid hormone and growth factors interactions in the glandular microenvironment

Palavras-chave em Inglês:

Prostate

Fibroblast growth factors

Steroid hormones

Senescence

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Valeria Helena Alves Cagnon Quitete [Orientador]

Carlos Alberto Vicentini

Maira Aparecida Stefanini

Silvana Martinez Baraldi Artoni

Taize Machado Augusto

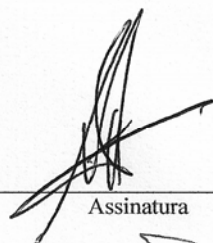
Data da defesa: 15-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

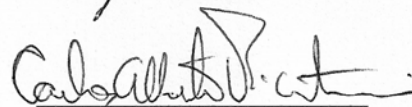
Campinas, 15 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

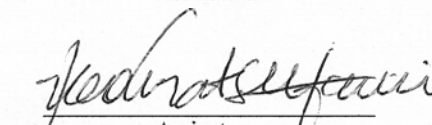
Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete (Orientadora)


Assinatura

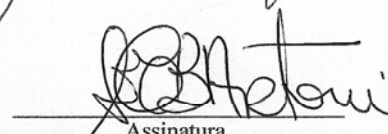
Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini


Assinatura

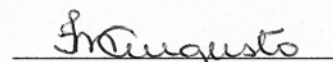
Profa. Dra. Máira Aparecida Stefanini


Assinatura

Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni


Assinatura

Profa. Dra. Taize Machado Augusto


Assinatura

Prof. Dr. Humberto Santo Neto

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Martinez

Assinatura

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

Assinatura

Dedicatória

À DEUS...

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

AOS MEUS PAIS, ROSMARY E FÁBIO

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

AOS MEUS IRMÃOS, RAFAEL E PAMELLA

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

AO MEU NAMORADO, RODRIGO

“Por caminhar do meu lado durante toda essa etapa e compartilhar mais uma conquista. Muito obrigada pelo amor, compreensão e incentivo”.

Agradecimentos

À Profa. Valéria, por ter me recebido tão bem desde o Mestrado, ter acreditado em mim e estar contribuindo na construção da minha carreira profissional.

Aos professores, titulares e suplentes, Dr. Carlos Alberto Vicentini, Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, Dra. Maíra Aparecida Stefanini, Dra. Taíze Machado Augusto, Dr. Humberto Santo Neto, Dr. Marcelo Martinez e Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro, que gentilmente aceitaram o convite para fazer parte desta banca de tese.

Aos professores Dra. Elaine Minatel, Dra. Ana Paula Tiemi Taniguti e Dra. Cíntia Yuri Matsumura pelas arguições e valiosas sugestões para melhoria da tese e do projeto apresentados no exame de qualificação ao doutorado.

Aos amigos do Laboratório: Fabio Montico, por ter se tornado um grande amigo dentro e fora do laboratório; Larissa Akemi Kido, pela amizade e apoio; Raísa Mistieri Lorencini, pela amizade e cumplicidade; e Eduardo Marcelo Cândido, pela amizade e exemplo. Graças à nossa equipe que consegui realizar e concluir esse trabalho. Muito obrigada pela amizade, companheirismo e incentivo. Guardarei com alegria e carinho na memória e no coração.

Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Anatomia, pela amizade e disposição em ajudar durante a realização deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Anatomia-IB-Unicamp pelo valioso aprendizado, desde as disciplinas que cursei durante o mestrado, até as conversas informais e conselhos, que permitiram meu crescimento como pessoa, educador e pesquisador.

À Líliam Panagio, secretária da Pós-graduação, pela dedicação e eficiência com que desenvolve seu trabalho há anos. E por me dispensar atenção durante todo o Doutorado.

Aos meus amigos e familiares que acompanharam minha trajetória até aqui, pelo apoio e carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do IB-Unicamp.

Ao CNPq, FAPESP, CAPES/PROEX e CAPES/PROAP pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1 - INTRODUÇÃO.....	05
1.1- Generalidades e Estrutura da Próstata.....	05
1.2- Hormônios Esteróides e Próstata.....	08
1.3- Senescência e Lesões Prostáticas.....	12
2 - JUSTIFICATIVA	14
3- OBJETIVOS.....	15
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1.1. Procedimentos Experimentais em Amostras Prostáticas de Roedores.....	16
4.1.2. Procedimentos Experimentais em Amostras Prostáticas Humanas.....	18
4.2. Microscopia de Luz.....	19
4.3. Imunomarcação para os receptores AR, Er α , Er β , PR, EGF, α -actina, vimentina, FGF2, FGF7 e FGF8.....	19
4.4. Microdissecção Manual.....	21
4.5. Extração de Proteínas e Western blotting.....	22
4.6. Dosagens Hormonais Plasmáticas.....	23
4.7. Análises Estatísticas.....	24
5 - ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	25
5.1. “Fibroblast Growth Factor, Estrogen and Prolactin Receptor Features in Different Grades of Prostatic Adenocarcinoma in Elderly Men”. Publicado no Periódico <i>Microscopy research and technique</i> em Janeiro de 2013.....	26
5.2. “Perfil Morfológico e Molecular da Próstata de Animais Senis Frente às diferentes variações hormonais”. Será submetido ao Periódico <i>Micron</i>	46
5.3. “Microambiente Prostático na senescência: Fatores de Crescimento Fibroblástico x Desequilíbrio Hormonal” Será submetido ao Periódico <i>Histochemistry and Cell Biology</i>	81
6 - CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS DA TESE.....	112
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

RESUMO

A senescência é fator determinante para a ocorrência de alterações morfofuncionais da próstata. O objetivo desse estudo foi caracterizar e correlacionar as interações entre os receptores dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGFR2, FGFR7, FGFR8), fator de crescimento epidermal (EGFR), α -actina e vimentina e os receptores androgênicos (AR), estrogênicos α e β (ER α , ER β) e de prolactina (PR) nos compartimentos epitelial e estromal frente à condição de senilidade e variações hormonais. Além disso, caracterizar e correlacionar o AR, ER α , ER β e PR com os FGFs nos compartimentos epitelial e estromal de amostras humanas com adenocarcinoma de alto grau e baixo grau. 50 ratos machos senis (10 meses de idade) e 10 ratos machos jovens (4 meses de idade) foram divididos em grupos: Jovem (JOV) e Senil (SE): óleo de amendoim por 30 dias; Castrado (CAS): castração cirúrgica e química; Tamoxifeno-Letrozol (TAM): tamoxifeno e de letrozol por 30 dias; Castrado+estrógeno (REEST): tratamento similar ao CAS, e posteriormente receberam injeções de 17 β -estradiol por 30 dias; Tamoxifeno-Letrozol+Andrógeno (RETEST): após tratamento similar ao grupo TAM, os animais receberam injeções de Cipionato de Testosterona por 30 dias. Os animais foram sacrificados e amostras do lobo ventral foram coletadas e submetidas às análises de Microscopia de Luz, imunohistoquímicas, western blotting e dosagem hormonal. 30 amostras prostáticas humanas foram divididas em grupos: Adenocarcinoma de alto grau e Adenocarcinoma de baixo grau. As amostras foram submetidas às análises de Microscopia de luz e imunohistoquímicas. Após a administração estrogênica, presença de microócinos, células inflamatórias e hipertrofia do estroma prostático foram observados. A hiperandrogenização levou à recuperação epitelial. No SE houve aumento de vimentina, ER α e PR em relação ao JOV. No CAS observou-se localização diferencial da prolactina e α -actina em relação ao SE. No RETEST, observou-se recuperação do padrão de distribuição de reatividade da α -actina e da prolactina em relação ao SE. No REEST foi observado aumento de ER α e ER β e localização diferencial destes, somando-se a diminuição da α -actina e vimentina em relação ao SE. No TAM foi observada diminuição de ER β e α -actina, e aumento de prolactina no compartimento estromal, em relação ao SE. Em humanos, os FGFR2 e FGFR8 apresentaram-se aumentados no estágio inicial do câncer prostático, sugerindo essas moléculas como bons alvos terapêuticos. Pode-se concluir que o envolvimento do ER α na ativação do estroma reativo tornou o microambiente favorável à progressão do câncer, devido à

potencialização do desequilíbrio estromal, e o ER β contribuiu para a inibição das lesões pré-cancerosas em homens na senescência. Já, o desequilíbrio causado pela ablação e/ou reposição hormonal não somente alterou o *feedback* entre os hormônios esteroides como modificou a localização da reatividade das moléculas nos compartimentos prostáticos, provavelmente interferindo nas sinalizações autócrinas e parácrinas dos estrógenos, EGF e prolactina, apontando esses como deflagradores da formação do estroma reativo. A ablação hormonal nos animais senis levou ao aumento da reatividade dos FGFs, sugerindo interações entre os hormônios e suas vias de sinalização e o microambiente prostático senil. As vias dos FGFs podem ser ativadas também de maneira andrógeno-independente, uma vez que os FGFs apresentaram níveis de detecção aumentados mesmo diante da intensa depleção androgênica imposta pela castração.

ABSTRACT

Senescence is a determining factor for morphological and functional prostatic alterations. The objective of this study was to characterize and correlate the interactions among fibroblast growth factor receptors (FGFR2, FGFR7, FGFR8), epidermal growth factor (EGFR), α -actin and vimentin and the androgen receptor (AR), estrogen α and β (ER α , ER β) and prolactin (PR) in epithelial and stromal prostatic compartments in elderly rats on hormonal variation. Also, the objective was to characterize and correlate the AR, ER α , ER β and PR with the FGFs in the human prostatic samples, presenting high grade and low grade adenocarcinoma. Fifty male rats (10 months old) and 10 young male rats (4 months old) were divided into groups: Young (JOV) and Senile Groups (SE)- peanut oil injections for 30 days, Castrated Group (CAS)- surgical and chemical castration; Tamoxifen-Letrozole Group (TAM)- tamoxifen and letrozole injections in period of 48 hours for 30 days; Castrated + estrogen Group (REEST)- surgical and chemical castration and subsequently the animals received 17 β -estradiol injections for 30 days; Tamoxifen-Letrozole + Androgen Group (RETEST): after treatment similar to the TAM group, the animals received testosterone cypionate injections for 30 days. After the treatment, the animals were sacrificed and the ventral lobe samples were collected and analyzed for the Light Microscopy, immunohistochemistry and Western blotting. Thirty human prostatic samples were collected from elderly men and divided into High-grade and Low-grade Adenocarcinoma Groups. The samples were submitted to light microscopy and immunohistochemical analyses. After estrogen administration, epithelial atrophy, microacini, inflammatory cells and stromal hypertrophy were observed. The hyperandrogenization led to the recovery of epithelium. The vimentin, ER α and PR increase was verified in the SE group in relation to JOV one. Differential localization of PR and α -actin was seen in the CAS group in relation to SE one. Recovery of the distribution pattern of α -actin and prolactin reactivities was observed in the RETEST group in relation to SE. In the REEST group, it was observed the ER α and ER β increase and differential localization of these receptors, and the α -actin and vimentin decrease in relation to SE. In the group TAM, it was observed the ER β and α -actin decrease and the prolactin increase in the stromal compartment in relation to SE group. Regarding to human samples, increased FGFR2 and FGFR8 were observed in the early stages of prostate cancer, suggesting these molecules as good therapeutic targets. Thus, it can be concluded that the involvement of ER α in activation of reactive stromal led to the

favorable microenvironment to cancer progression considering the strong stromal imbalance, and the ER β contributed to the inhibition of precancerous lesions in elderly men. The imbalance caused by ablation and/or hormone therapy not only changed the feedback between steroid hormones but also changed the reactivity localization of molecules in prostatic compartments, probably interfering in the autocrine and paracrine signaling of estrogen, prolactin and EGF, and pointing these molecules as possible triggers of the formation of reactive stroma. The present results demonstrated that hormone ablation in senile rats led to increased reactivities of the FGFs, suggesting interactions among hormones and their signaling pathways and senile prostatic microenvironment. Furthermore, it can be concluded that the ways of FGFs can be activated also androgen-independent manner, considering that the FGFs showed increased levels in the severe androgen depletion characterized by castration.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Caracterização Estrutural da Próstata

A próstata é uma glândula sexual acessória masculina que secreta diversos nutrientes que compõem o líquido seminal, fluido esse essencial para a nutrição e motilidade dos espermatozoides (Taylor & Risbridger, 2008). No homem, a próstata encontra-se localizada ao redor da uretra, inferiormente à bexiga urinária onde são descritas três regiões glandulares: zona periférica, zona central, zona de transição e zona peri-uretral, envoltas por uma fina camada fibromuscular (Wendell-Smith, 2000). A zona central é relativamente resistente ao desencadeamento de carcinomas. Por outro lado, a zona de transição é apontada como principal alvo da ocorrência de hiperplasia benigna prostática (Wendell-Smith, 2000). A zona periférica é a maior subdivisão anatômica contendo 75% do total de tecido glandular e sendo o local de ocorrência da maioria dos carcinomas (Walsh et al., 1998). As diferenças morfológicas entre as zonas central e periférica podem ser identificadas microscopicamente, sendo que a zona central possui grande quantidade de estroma fibromuscular, além de ácinos largos e escassos. Já a zona periférica tem delgado estroma fibromuscular e grande quantidade de ácinos secretores (Blacklock, 1977).

Já em roedores, a próstata divide-se em três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal de acordo com a localização ao redor da uretra prostática e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior localizadas na face côncava das vesículas seminais (Sugimura et al., 1986; Aumüller & Seitz, 1990). De maneira geral, os lobos prostáticos são compostos por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares, revestidos por epitélio secretor simples envolto por estroma (Aumüller & Adler, 1979). Uma membrana basal separa o epitélio do estroma, tendo como seus

principais componentes o colágeno tipo IV e a laminina (Knox et al., 1994).

O epitélio da próstata é formado por três tipos celulares; luminal ou glandular, basal e neuroendócrina; os quais são distintos quanto à expressão de citoqueratinas e ou expressão diferencial conjunta dessas (Berry et al., 2008). As células luminais representam o mais freqüente tipo celular no epitélio, constituindo o compartimento exócrino da próstata, secretando proteínas como o antígeno específico da próstata (PSA) nos humanos (De Marzo et al., 1999) e prostateína e probasina no rato (Berry et al., 2008). Já, as células basais são relativamente indiferenciadas não demonstrando atividade secretora (McNeal, 1988). Na próstata humana, as células basais formam uma camada contínua adjacente à membrana basal, sendo que a relação de células basal/luminal é de cerca de 1:1. No rato e camundongo, as células basais formam uma camada descontínua e a relação é de cerca de 1:7 (El-Alfy et al., 2000).

O estroma prostático é formado por um arranjo complexo de células estromais e matriz extracelular associado a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, as quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Cunha & Matrisian, 2002). Também, vasos sanguíneos, terminações nervosas e células imunes são componentes estromais (Tuxhorn et al., 2001). Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático. A principal função destes é sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (Lin & Bissel, 1993; Kreis & Vale, 1999; Tuxhorn et al., 2001), sendo um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (Taipale & Keski-Oja, 1997; Tuxhorn et al., 2001). Além disso, componentes estruturais, como fibras colágenas e fibras elásticas, proporcionam rigidez mecânica e flexibilidade ao tecido. Recentemente, Ceder et al. (2008) relataram a possível existência de

células estromais progenitoras na próstata adulta humana, sendo que essa população celular estromal expressaria vimentina e seria positiva para CD133.

Os processos biológicos na próstata, tais como regulação da proliferação e diferenciação celular, atividade mitogênica, processos secretores e crescimentos tumorais são regulados e/ou influenciados por diferentes polipeptídeos como os fatores de crescimento homólogos a insulina (IGF), fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) e fatores de crescimento epidermais (EGF) (Marszalek et al., 2005). Os FGFs são conectados à matriz extracelular e uma variedade de enzimas de degradação, particularmente as proteases, podem liberá-los da matriz extracelular. O FGF-2 age como agente mitogênico para as células estromais prostáticas e seu efeito se dá principalmente de maneira autócrina (Garrison & Kyprianou, 2004), além de contribuir para a angiogênese (Kwabi-Addo et al., 2004). Já, FGF-7 atua de maneira parácrina, agindo como mitógeno para células epiteliais prostáticas (Ittman & Mansukhani, 1997). Ainda, o FGF-8 é apontado por possuir papel na carcinogênese devido a sua super-expressão nas células cancerosas prostáticas (Cotton et al., 2008). Tem sido postulado que a expressão desse mitógeno é parcialmente regulada pelo receptor de andrógeno. Embora a sinalização de AR e FGF seja importante no desenvolvimento prostático, seu exato mecanismo de interação não é conhecido (Cotton et al., 2008). Kwabi-Addo et al. (2004) demonstraram que se as células cancerosas requerem atuação do FGF para sobreviverem, deve haver um processo de seleção de células que têm alterações genéticas e epigenéticas que potencializem a sinalização para FGF. Baseado nessas observações, a ruptura da sinalização do FGF tem sido alvo terapêutico no câncer prostático. Ainda, vale ressaltar que alguns tumores dependem do desequilíbrio na sinalização do FGF para o seu desenvolvimento e progressão e que essas moléculas provêm bons alvos terapêuticos (Ahmad et al., 2012).

Assim, em associação, células estromais e matriz extracelular criam um microambiente que regula o crescimento e diferenciação funcional das células adjacentes, desempenhando cada um desses, importante papel na manutenção da forma e função tecidual (Cornell et al., 2003).

1.2) Hormônios Esteróides e Próstata

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos (Imamov et al., 2005). A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática (Toorians et al., 2003). A DHT é resultante da conversão da testosterona através da enzima 5 α -redutase (Toorians et al., 2003).

A castração é um dos métodos mais utilizados para o estudo dos mecanismos envolvendo a testosterona na manutenção e funcionamento da próstata. A deficiência androgênica leva a involução da próstata, ativação da apoptose e intensa remodelação da matriz extracelular desse órgão (Vilamaior et al., 2000).

A próstata adulta de roedores tem a capacidade de sofrer sucessivos estágios de regeneração epitelial após a privação de andrógenos (castração) seguida de reposição hormonal (Taylor & Risbridger, 2008). A capacidade regenerativa tem sido atribuída a uma população de células de longa vida, as quais são designadas como células-tronco, que se localizam no epitélio prostático e são independentes de andrógeno para a sua sobrevivência, mas andrógeno-sensíveis e andrógeno-responsivas. As células luminais expressam receptor androgênico (AR) e são andrógeno-responsivas e andrógeno-dependentes (Taylor & Risbridger, 2008). As células basais são andrógeno-independentes, mas andrógeno-responsivas, podendo ser estimuladas por ação androgênica via fatores de crescimento derivados do estroma para a renovação do compartimento

celular luminal (Taylor & Risbridger, 2008).

A expressão de AR em células basais é relativamente baixa se comparada às células luminais (Leav et al., 1996). Contudo, as células basais expressam focalmente os receptores estrogênicos e podem proliferar quando submetidas à terapia estrogênica (Collins & Maitland, 2006). O papel exato das células epiteliais basais durante o desenvolvimento, funcionamento e carcinogênese ainda não é claro (Berry et al., 2008; Taylor & Risbridger, 2008). A resposta à manipulação hormonal, especialmente na ausência de andrógenos, foi reconhecida como prova da existência das células tronco prostáticas (CTP) (Isaacs, 1987). Além disso, o processo de apoptose ocorre principalmente nas células luminais epiteliais andrógeno-dependentes, sendo que as células basais andrógeno-independentes permanecem inalteradas, provocando mudança na relação células luminais/basais (Verhagen et al., 1988). No entanto, as células basais remanescentes, após a castração, são sensíveis aos andrógenos, de tal forma que a reposição de andrógenos leva à proliferação e regeneração da estrutura prostática. Este processo regenerativo tem sido atribuído à proliferação e diferenciação das células tronco localizadas no compartimento basal.

Estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais da próstata quanto às alterações patogênicas (Cunha et al., 2002). Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, com redução da produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002). Segundo Nellesmann et al. (2005), a expressão de AR na próstata parece estar sob regulação de estrógenos e andrógenos, já que a co-administração de testosterona com anti-estrógeno ou a co-administração de estrógeno com anti-andrógeno reduziu os efeitos dos hormônios sexuais.

A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse hormônio pela enzima aromatase (Risbridger et al., 2003). Os efeitos estrogênicos na próstata são resultados da ligação desses hormônios em receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Cunha et al., 2002).

Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver tanto ações diretas, através dos receptores, como indiretas, através do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Cunha et al., 2002). As ações diretas de estrógenos na próstata foram avaliadas através de um modelo de camundongos hipogonadal (hpg), os quais têm deficiência pós-natal em gonadotrofinas e testosterona, mas são sensíveis a hormônios. Nesse estudo, verificou-se resposta proliferativa direta aos estrógenos nos lobos ventral e anterior da próstata e vesícula seminal desses animais. Tais alterações aberrantes foram demonstradas através da proliferação de fibroblastos no estroma e metaplasia das células epiteliais basais, além de processo inflamatório. Contudo, evidenciou-se redução das células musculares lisas e das células epiteliais secretoras (Bianco et al., 2002). Outro estudo utilizando camundongos estrógeno-modulados, os quais eram *Knockout* para enzima aromatase, demonstrou que doses elevadas de andrógenos têm efeitos morfológicos similares a doses elevadas de estrógenos. Os resultados exibiram doses periféricas e intraprostáticas elevadas de andrógenos, aumento dos receptores androgênicos, além da expansão dos volumes dos compartimentos estromal, epitelial e luminal indicando efeito proliferativo glandular (Jarred et al., 2002). Assim sendo, esses trabalhos evidenciaram que tanto os estrógenos como os andrógenos são elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes caminhos.

A administração crônica de 17 β -estradiol ou dietilstilbestrol (DES) leva a metaplasia

escamosa, caracterizada por mudança na histodiferenciação que surge a partir do compartimento celular basal, o qual é considerado suposto nicho das CTP (Taylor & Risbridger, 2008). Também, é importante destacar os mecanismos diferenciais através dos dois receptores estrogênicos. Estudos envolvendo os ER β têm adicionado mais um nível de complexidade nos mecanismos de ações dos estrógenos na próstata (Weihua et al., 2002). Experimentos caracterizaram importante envolvimento dos ER β nos mecanismos prostáticos, conjuntamente as ações exercidas pelos ER α , sendo os efeitos estrogênicos produto de um balanço dinâmico entre ER α e ER β (Weihua et al., 2002). Por outro lado, Weihua et al. (2002) avaliando camundongos *Knockout* para os ER β demonstraram focos de hiperplasia epitelial celular no lobo ventral da próstata aos 5 meses de idade, afirmando a capacidade antiproliferativa dos ER β na próstata. Em adição, outros estudos destacaram que ER β podem estar envolvidos não só a um processo antiproliferativo epitelial, mas também à diminuição do processo apoptótico epitelial glandular (Imamov et al., 2004). Segundo Adams et al. (2002), os receptores estrogênicos β em conjunto com os hormônios androgênicos podem mediar diversos efeitos sobre a proliferação epitelial prostática, primeiramente promovendo a proliferação celular em períodos iniciais gestacionais e após isso agir de forma a limitar o crescimento celular em períodos tardios gestacionais em fetos humanos. Ainda, diversos estudos demonstraram que o ER β é supra-regulado por andrógenos. (Singh et al., 2008). Portanto, o declínio do nível de testosterona associado a idade pode ser um possível fator modulador na regulação do ER β durante a senescência (Singh et al., 2008).

Os estrógenos têm efeito similar aos da prolactina. Excesso de prolactina induz mudanças hipertróficas tanto no epitélio prostático como no compartimento estromal. Em adição, os estrógenos aumentam o nível de receptores de prolactina nas células epiteliais prostáticas.

Portanto, é possível que a prolactina sinalize os efeitos estrogênicos na próstata não somente de maneira sistêmica, mas também em nível celular, sendo um importante mecanismo no desenvolvimento das mudanças displásicas desse órgão (Härkönen & Mäkelä, 2004). Assim, há uma relação entre os níveis de prolactina e o aumento de doenças prostáticas (Bartke, 2004). Esse hormônio age como fator de crescimento para o tecido prostático, tendo papel na sobrevivência das células epiteliais depois da castração (Ingelmo et al., 2007), e inibe a apoptose induzida pela castração (Dagvadorj et al., 2007). Também, a prolactina altera a permeabilidade da membrana celular prostática ao andrógeno (Jeyaraj et al., 2000). Segundo Nevalainen et al. (1997), a ação autócrina ou parácrina da prolactina na próstata pode mediar algumas ações androgênicas. Assim, a síntese local de prolactina pode ser realizada por fatores que controlam a regulação androgênica de células cancerosas prostáticas durante o crescimento independente de andrógeno.

1.3) Senescência e Lesões Prostáticas

Nas diferentes espécies animais, incluindo a humana, o desbalanço hormonal é fator comum que leva a muitas alterações morfofuncionais da próstata (Roy-Burman et al., 2004). Banerjee et al. (2000) demonstraram que os níveis de DHT epitelial diminuem com o avanço da idade. Inversamente, os níveis de estradiol e estrona foram elevados tanto no epitélio quanto no estroma prostático. Dessa forma, as alterações nos níveis endógenos de hormônios esteróides relacionados à senescência contribuem fortemente para o desequilíbrio glandular. Em adição, é conhecido que a redução dos níveis de testosterona na senescência leva à regressão do crescimento prostático tanto de origem benigna quanto maligna. No entanto, em homens com carcinoma prostático avançado, quando submetidos à administração de testosterona, verificou-se freqüente agravamento da doença (Marks et al., 2006). Similarmente, Cordeiro et al. (2008)

revelaram que em gerbilos há uma menor taxa de receptores androgênicos comparando-se aos gerbilos jovens e adultos. Baseando-se nessas observações e com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e o bem-estar de homens em processo de envelhecimento, a terapia de reposição androgênica tem sido utilizada visando à recuperação dos níveis séricos de testosterona (Lau et al., 2003). Sabe-se que homens com deficiência hormonal tratados adequadamente com andrógenos apresentaram próstata com volume similar ao normal para sua idade (Morales, 2002).

A importância dos hormônios androgênicos e estrogênicos tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças prostáticas tanto clínica como experimentalmente (Risbridger et al., 2003). Várias hipóteses têm sido correlacionadas à manifestação do carcinoma prostático. Estudos epidemiológicos consideraram os hormônios estrogênicos como tendo papel fundamental na carcinogênese prostática (Montie & Pienta, 1994). Walsh & Wilson (1976) confirmaram a relação de estrógenos e andrógenos nas doenças prostáticas usando modelo canino e demonstraram que os estrógenos podem levar ao desenvolvimento de hiperplasia glandular. Pesquisadores em estudo experimentais das ações de andrógenos e estrógenos verificaram que as atuações independentes de andrógenos e estrógenos têm potencial para iniciar mudanças na próstata, incluindo a hiperplasia e displasia, mas não a malignescência no órgão. Por outro lado, como esses dois hormônios agem em sinergismo para induzir a carcinogênese não é conhecido (Risbridger et al., 2003).

A ablação androgênica tem importante papel no tratamento de câncer prostático, principalmente em homens com idade avançada. A independência androgênica do tumor prostático quase sempre segue a ablação androgênica limitando a eficácia desta terapia. A grande maioria dos cânceres andrógeno-independentes continua a expressar AR, indicando que a independência androgênica é devida a mudanças genéticas que permitem a ativação deste

receptor a baixos níveis androgênicos (Kwabi-Addo et al., 2004). Culig et al (1994) demonstraram que FGF-7, IGF e EGF ativam a transcrição do AR das células cancerosas prostáticas. No entanto, dada a evidência que a sinalização do FGFR é aumentada em avançado câncer prostático, é possível que o FGF contribua significativamente para a atividade do AR na doença andrógeno-independente. Porém, o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda é desconhecido (Kwabi-Addo et al., 2004). No carcinoma prostático, os efeitos do aumento da sinalização do FGF envolvem tanto as células cancerosas quanto o estroma circundante, incluindo a vascularização destes. Esses efeitos resultam no aumento da proliferação, resistência a apoptose, aumento da motilidade e da capacidade invasiva, aumento da angiogênese e metástase, resistência à quimioterapia e radioterapia, e independência androgênica (Cotton et al., 2008).

2) JUSTIFICATIVA

A senescência é um dos principais fatores etiológicos responsáveis pela ablação androgênica natural em homens, sendo esse o período de maior ocorrência de diferentes lesões prostáticas. Diferentes estudos indicaram a testosterona e mais recentemente os estrógenos como agentes desencadeadores dos processos patológicos na próstata. No entanto, são escassos os estudos em indivíduos senis relacionando a próstata com testosterona, estrógenos e seus receptores bem como suas relações com fatores de crescimento e suas sinalizações no microambiente estromal. Além disso, os estrógenos vêm sendo destacados como tendo papel decisivo para o funcionamento prostático, atuando na homeostase desse órgão, mesmo sendo encontrado em baixas quantidades se comparado à testosterona. A associação entre hormônios

esteroides, fatores de crescimento como os FGF-2, FGF-7, FGF-8, EGF, além da α -actina e vimentina são cruciais reguladores da dinâmica do microambiente prostático e nas sinalizações parácrinas e ou autócrinas nas interações dos compartimentos desse órgão.

3) OBJETIVOS

Baseando-se na importante variação dos níveis de hormônios esteróides durante a senescência, bem como sua implicação no desenvolvimento e na progressão das lesões prostáticas, o objetivo geral desse estudo foi caracterizar e correlacionar as interações entre diferentes moléculas como o FGFR2, FGFR7, FGFR8, EGFR, α -actina e vimentina em relação aos receptores AR, ER α , ER β e PR nos compartimentos epitelial e estromal frente à condição de variações hormonais na senilidade e em adenocarcinoma de baixo e alto grau em humanos. Tal objetivo foi alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

a) Caracterização da estrutura prostática de ratos senis frente às diferentes variações hormonais (Microscopia de Luz);

b) Caracterização e correlação das reatividades dos receptores AR, ER α , ER β e PR em relação ao EGFR, α -actina e vimentina nos compartimentos epitelial e estromal frente ao desequilíbrio hormonal na próstata de ratos senis (Imunohistoquímica);

c) Caracterização e correlação das reatividades dos receptores androgênicos e estrogênicos α e β em relação aos FGFR2, FGFR7 e FGFR8 nos compartimentos epitelial e estromal da próstata de ratos senis sob diferentes condições hormonais (Imunohistoquímica e western Blotting);

d) Quantificação proteica dos fatores de crescimento FGFR2 e FGFR8 nos compartimentos epitelial e estromal, isoladamente, da próstata de ratos senis sob diferentes

condições hormonais(western blotting);

e) Caracterização e correlação entre a localização e as possíveis interações dos receptores de hormônios (AR, ER α , ER β e PR) em relação aos fatores de crescimento FGFR2, FGFR7, FGFR8, EGFR, α -actina e vimentina, nos compartimentos epitelial e estromal da próstata de homens senis com adenocarcinoma de baixo grau e alto grau (Imunohistoquímica).

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. – Procedimentos Experimentais em Amostras Prostáticas de Roedores

No presente trabalho foram utilizados 50 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, com 10 meses de idade (SE, CAS, TAM, RETEST e REEST), e 10 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley com 4 meses de idade (JOV), obtidos no centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP)(Comitê de ética nº 2412-1). Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (10 animais cada):

a. **Grupo Adulto Jovem (JOV)**: recebeu injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias;

b. **Grupo Senil (SE)**: recebeu injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias;

c. **Grupo Castrado (CAS)**: a remoção de andrógenos foi feita através da castração cirúrgica e química. Para a castração cirúrgica, os animais foram anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e posteriormente, castrados por incisão cirúrgica, com retirada dos testículos. Posteriormente a cirurgia, os animais foram submetidos ao tratamento de castração química com injeções subcutâneas de 10 mg/Kg de Flutamida (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA*)

diluídos em 10 mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Shin et al. 2002);

d. Grupo Tamoxifeno-Letrozol (TAM): recebeu injeções subcutâneas de 1mg/Kg de tamoxifeno (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) diluídos em 1mL de óleo de amendoim a cada 48h por 30 dias para o bloqueio dos receptores estrogênicos (ER α e ER β) (Tilley et al., 1987). Para bloquear a aromatização da testosterona resultando em estrógenos, os animais receberam injeções subcutâneas de 1mg/Kg de letrozol (*LET- Femara, Novartis-Pharma, Basiléia, Suíça*) diluídos em 1mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Tobin & Canny, 1998).

e. Grupo Castrado + Estrógeno (REETST): a remoção de andrógenos foi feita através da castração cirúrgica e química. Para a castração cirúrgica, os animais foram anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e posteriormente, castrados por incisão cirúrgica, com retirada dos testículos. Após a cirurgia, os animais foram submetidos ao tratamento de castração química com injeções subcutâneas de 10 mg/Kg de Flutamida (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA*) diluídos em 10 mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Shin et al. 2002). Posteriormente, receberam injeções subcutâneas de 25 μ g/Kg de peso corpóreo de 17 β -estradiol (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA*) diluídos em 25 μ L de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Prins et al., 2001);

f. Grupo Tamoxifeno-Letrozol + Andrógeno (RETEST): recebeu injeções subcutâneas de 1mg/Kg de tamoxifeno (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) diluídos em 1mL de óleo de amendoim a cada 48h por 30 dias para o bloqueio dos receptores estrogênicos (ER α e ER β) (Tilley et al., 1987). Para bloquear a aromatização da testosterona resultando em estrógenos, os animais receberam injeções subcutâneas de 1mg/Kg de letrozol (*LET- Femara, Novartis-Pharma,*

Basiléia, Suíça) diluídos em 1mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Tobin & Canny, 1998). Posteriormente, os animais receberam injeções subcutâneas de 5mg/Kg de peso corpóreo de Cipionato de Testosterona (*Deposteron-Novaquímica, São Paulo, Brasil*) diluídos em 5 mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Sáttolo et al., 2004).

Os animais dos seis grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, PR, Brasil*). Após 30 dias de tratamento, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500, anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e posteriormente, sacrificados. Amostras do lobo ventral foram coletadas dos animais de cada grupo experimental e submetidas às análises de microscopia de luz, imunohistoquímicas e Western Blotting, além das dosagens hormonais.

4.1.2. - Procedimentos Experimentais em Amostras Prostáticas Humanas

No presente trabalho foram utilizadas 30 amostras de tecido prostático de pacientes na faixa etária de 60 a 90 anos com e sem diagnóstico de adenocarcinoma prostático, obtidas no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Comitê de ética n° 125/2008). Dez amostras prostáticas foram provenientes de necropsia de pacientes sem diagnóstico de lesão prostática e/ou doença urológica. Essas amostras foram coletadas da zona periférica baseando-se na divisão em sextantes da face posterior, orientados de basal para apical do órgão (McNeal apud Blacklock, 1977). Em adição, as outras vinte amostras prostáticas foram provenientes de um estudo retrospectivo de pacientes submetidos à prostatectomia radical. O diagnóstico de câncer prostático foi baseado em critérios morfológicos de acordo com Mostofi & Price (1973) por um uropatologista sênior.

Os pacientes foram divididos em 3 grupos (10 amostras cada): Grupo Normal (sem lesão), Grupo Adenocarcinoma de baixo grau (Gleason baixo grau); Grupo Adenocarcinoma de alto grau (Gleason alto grau). Todos os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (processo número 0094.0.146.000-08). A seguir, as amostras foram submetidas às análises de microscopia de luz, imunohistoquímicas e western blotting.

4.2. - Microscopia de Luz

Amostras prostáticas de 5 homens e 5 animais jovens e senis de cada grupo foram coletadas e fixadas em solução de Bouin por doze horas. Após a fixação, os tecidos fixados com Bouin foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Em seguida, os materiais foram seccionados em micrótomo (*Hyrax M60, Zeiss, Alemanha*) com espessura de 5 micrômetros com posterior coloração em Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson (Junqueira et al., 1979) e fotografados no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400).

4.3. - Imunomarcacão dos Receptores Androgênicos (AR), Estrogênicos α e β (ER α e ER β),

PR, FGFR2, FGFR7, FGFR8, EGFR, α -actina e vimentina.

Amostras prostáticas de 5 homens e 5 animais senis de cada grupo, os mesmos utilizados para a microscopia de luz, foram utilizadas para as imunomarcações. Foram obtidos cortes com cinco micrômetros de espessura no micrótomo (*Hyrax M60, Zeiss, Alemanha*), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos AR, ER α , ER β , PR, FGFR2, FGFR7, FGFR8 e EGFR, α -actina e vimentina foram localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para AR, monoclonal *mouse* clone 1D5 (*Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, EUA*) para ER α , policlonal *rabbit* 06-629 (*Upstate, EUA*) para ER β , policlonal *goat* (sc-7805) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para Prolactina, policlonal *rabbit* (147) (sc-79) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para FGFR2, policlonal *goat* (sc-1365) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para FGFR7, policlonal *rabbit* ab81384 (*Abcam, EUA*) para FGFR8, policlonal *rabbit* (sc-03) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para EGFR, policlonal *rabbit* (ab5694) (*Abcam, EUA*) para α -actina, monoclonal *mouse* ab8069 (*Abcam, EUA*) para vimentina diluídos (1:35-50) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O kit Envision HRP (*Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, USA*) foi usado para detecção dos antígenos. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado com HRP proveniente do kit Envision (*Dako*) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com

Verde Metila e Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (*Nikon, Tóquio, Japão*). Os cortes prostáticos de 5 homens e 5 animais senis de cada grupo foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB, o qual indica a imunoreatividade dos anticorpos. A distribuição da imunoreatividade do antígeno foi graduada como 0 para marcação negativa (0%), 1 para marcação fraca (< 33%), 2 para marcação moderada (33% - 66%) e 3 para marcação intensa (> 66%) de acordo com a frequência e positividade dos antígenos no tecido (modificado de Tomas & Kruslin, 2004).

4.4. - Microdissecção Manual

Para a microdissecção foi utilizado um sistema comercial de microdissecção manual (*MicroDissector PPMD; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha*) acoplado a um microscópio invertido (*IX71-II, Olympus, Califórnia, EUA*). O sistema consiste de uma ferramenta de corte e uma micropipeta eletrônica montadas em um *joystick* que controla os micromanipuladores motorizados em três eixos de direção. Amostras do lobo ventral foram coletadas de 5 animais senis, de cada grupo experimental, fixadas em Bouin e inclusos em parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Em seguida, os materiais fixados em Bouin foram seccionados em micrótomo (*Hyrax M60, Zeiss, Alemanha*) com espessura de 10 micrômetros. Cinco cortes por animal foram montados em lâminas para serem microdissecados. Os cortes fixados em Bouin foram desparafinados em estufa à 60°C por 1 hora e posteriormente, desidratados e lavados em xilol. Os cortes foram cobertos com 50 µl de solução basal e com o uso do microscópio, as áreas de interesse foram dissecadas, posteriormente à caracterização morfológica de cortes seriados que antecedem a microdissecção. Dez campos selecionados a partir de cortes seriados e previamente analisados morfolologicamente de cada animal, resultando

em 50 campos por grupo com objetiva de 40x foram utilizados para a microdissecção. A micropipeta e a ferramenta de corte se posicionaram próximo à área a ser dissecada, com uma distância entre a ponta da agulha e o material a ser dissecado de 10 a 20 μm . Para as análises de Western Blotting, os compartimentos epitelial e estromal dissecados foram transferidos, isoladamente, para um tubo e submetidos aos protocolos específicos para as referidas análises.

4.5. - Extração de Proteínas e western blotting

As análises de western blotting foram realizadas para o epitélio e o estroma isolados e também para o órgão inteiro (lobo ventral), conforme a molécula a ser avaliada. Para a análise das amostras microdissecadas de 5 animais, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos para a microscopia de luz. Dez campos escolhidos aleatoriamente de cada animal previamente analisados de cortes seriados, resultando em 50 campos por grupo com objetiva de 40X foram microdissecados. O epitélio e o estroma adjacente, de cada animal foram microdissecados e isolados. Aproximadamente 30.000 células do epitélio microdissecados foram coletadas e separadas em tubos isolados com tampão de extração contendo 100 mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 10% (v/v) Triton X-100 and 10 $\mu\text{l/ml}$ de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Para o órgão inteiro, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio do Polytron em tampão de extração igual ao utilizado nas amostras microdissecadas. Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (Bio-Rad protein assay) e o correspondente médio de 150 μg de proteínas foi aplicado no gel de poliacrilamida para amostras microdissecadas e 100 μg para o órgão inteiro. Após eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose (Amersham). As membranas foram então

bloqueadas com 3% BSA diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para AR, monoclonal *mouse* clone 1D5 (*Dako Cytomation Inc., Carpenteria, CA, EUA*) para ER α , policlonal *rabbit* 06-629 (*Upstate, EUA*) para ER β , policlonal *goat* (sc-7805) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para Prolactina, policlonal *rabbit* (147) (sc-79) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para FGFR2, policlonal *goat* (sc-1365) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para FGFR7, policlonal *rabbit* ab81384 (*Abcam, EUA*) para FGFR8, policlonal *rabbit* (sc-03) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para EGFR, policlonal *rabbit* (ab5694) (*Abcam, EUA*) para α -actina, monoclonal *mouse* ab8069 (*Abcam, EUA*) para vimentina para as amostras do lobo inteiro e as amostras microdissecadas foram incubadas com policlonal *rabbit* (147) (sc-79) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) para FGF-2 e policlonal *rabbit* ab81384 (*Abcam, EUA*) para FGF-8 na diluição 1:350-1000. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit*, *anti-mouse* e *anti-goat* HRP conjugados na diluição de 1:2000 em 1% BSA. Para detectar as bandas reativas, as membranas foram expostas à solução de quimiluminescência (*Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA*) por 5 min e a captura de fluorescência foi realizada utilizando-se o aparelho G-Box Chemi e o software de aquisição de imagem GeneSnap (*Syngene, Cambridge, UK*). O anticorpo para β actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens NIS-Elements: *Advanced Research* (USA).

4.6. – Dosagens Hormonais Plasmáticas

Amostras de sangue foram obtidas após 24 horas da última administração de hormônios sexuais esteróides e bloqueadores hormonais, de dez animais de cada grupo experimental, através de punção cardíaca, no ventrículo esquerdo. O plasma foi separado por centrifugação (10000 rpm, -4°C por 10 minutos) e armazenado a - 20° C para subseqüentes análises. As concentrações de testosterona e estradiol foram mensuradas por radioimunoensaio usando os *kits* Coat-a-Count total testosterone/estrogen (*Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA*). As concentrações hormonais plasmáticas foram expressas em ng/dL e pg/dL.

4.7. - Análise Estatística

Os parâmetros quantificados nas análises de Western Blotting foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos. Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% (Zar et al., 1999).

4) ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 - **“Fibroblast Growth Factor, Estrogen and Prolactin Receptor Features in Different Grades of Prostatic Adenocarcinoma in Elderly Men”**. Publicado no Periódico *Microscopy Research and Technique* em Janeiro de 2013.

4.2 - **“Perfil Morfológico e Molecular da Próstata de Ratos Senis Frente às diferentes variações hormonais”**. Será submetido ao Periódico *Micron*.

4.3 - **“Microambiente Prostático na senescência: Fatores de Crescimento Fibroblástico x Desequilíbrio Hormonal”**. Será submetido ao Periódico *Histochemistry and Cell Biology*.

Publicado no periódico *Microscopy Research and Technique* – doi: 10.1002/jemt.22170.

Fibroblast Growth Factor, Estrogen and Prolactin Receptor Features in Different Grades of Prostatic Adenocarcinoma in Elderly Men

Hetzl AC¹, Montico F¹, Lorencini RM¹, Kido LA¹, Cândido EM¹, Billis A², Ferreira U³, Cagnon VHA¹

1 - Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

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

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

Running Title: Fibroblast Growth Factors in Prostatic Cancer

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

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this study was to characterize and associate the reactivity of FGF-2, FGF-7, FGF-8, EGF, α -actin and vimentin in relation to the AR, ER α , ER β and prolactin receptors in the prostate of elderly men showing low-grade and high-grade adenocarcinoma.

METHODS: Thirty prostatic samples were taken from 60 to 90-year-old patients (mean 63 years) without prostatic lesions and with low-grade cancer and high-grade cancer per group, from the University Hospital, School of Medicine, the State University of Campinas (UNICAMP).

RESULTS: Increased FGF2, FGF7 and FGF8 reactivities and decreased AR reactivity were verified in both high-grade cancer and low-grade cancer. However, the FGF8 receptor showed greater involvement at the beginning of the malignancy alterations. Also, increased EGF reactivity and diminished α -actin immunohistochemistry were identified in the groups presenting adenocarcinoma. In addition, increased ER α , PR and vimentin receptors were verified in both cancer groups.

CONCLUSION: We can conclude that the ER α involvement in the reactive stroma activation led to a microenvironment which was favorable to cancer progression, due to maximizing stromal imbalance. Also, the prolactin could be related to cancer progression due to its interaction with ER α action, indicating that this hormone could be a relevant target to prevent the estrogenic effects in the prostatic lesions. Also, both FGFR2 and FGFR8 play a fundamental role in the early stages of prostate cancer, suggesting that these molecules could be a promising therapeutic target. Finally, we can suggest that the differential localization of the fibroblastic factors between the epithelial and stromal glandular compartments in the prostate of elderly men, who presented prostate cancer, could indicate a favorable distinction for tumoral progression.

INTRODUCTION

Biological processes of the prostate, such as regulation of cell proliferation and differentiation, mitogenic activity, tumor growth and secretory processes are regulated and / or influenced by different polypeptides such as growth factors homologous to insulin (IGF), to fibroblastic growth factors (FGF) and to epidermal growth factor (EGF) (Marszalek et al., 2005). FGF contributes to homeostasis and tissue repair as well as promotion of angiogenesis and inflammation. FGF-2 is an autocrine mitogenic agent for prostate stromal cells and contributes to angiogenesis (Garrison & Kyprianou, 2004; Kwabi-Addo et al., 2004). Thus, the FGF signaling imbalance is considered a determining factor for carcinogenesis (Ahmad et al., 2012).

Furthermore, FGF-7 has a paracrine mechanism, acting as a mitogen factor for prostate epithelial cells (Ittman & Mansukhani, 1997). FGF-8 is identified as playing a role in carcinogenesis due to its over-expression in prostate cancer cells. Also, FGF8 expression is partially regulated by androgenic action (Cotton et al., 2008). Although, the androgen receptor (AR) and FGF signaling is important in prostate development, its exact mechanism of interaction is not known (Cotton et al., 2008).

However, taking into consideration that fibroblastic growth factor receptor (FGFR) signaling is increased in advanced prostate cancer, it is possible that FGF contributes significantly to the AR activity in an androgen-independent disease. However, the mechanism responsible for how this process occurs is not clear (Kwabi-Addo et al., 2004). It is known that increased FGF signaling effects involve both cancer cells and the surrounding stroma, including the vascularization in the area presenting prostatic cancer. The prostatic cancer tissue showed increased proliferation, resistance to apoptosis, increased motility and invasiveness, increased angiogenesis and metastasis, resistance to chemotherapy and radiotherapy, and androgen independence (Cotton et al., 2008). Changes in FGF signaling and its receptors are related to the initiation and progression of different cancers, including the prostate (Cotton et al., 2008).

Androgen and estrogen importance has been linked to prostatic disease development both clinically and experimentally (Risbridger et al., 2003). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN), considered a precursor of prostate cancer, has been observed in young men and several hypotheses have been correlated to the manifestation of prostatic carcinoma (Ederveen & Attia et al., 2011). According to Cunha et al (2002), estrogens act

synergistically to testosterone, influencing the normal function of the prostate and the pathogenesis of this organ. Estrogens have anti-androgenic effects and negatively regulate the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, leading to reduced androgen production by Leydig cells and regression of prostate epithelial and stromal growth in adult animals (Weihua et al., 2002). Estrogenic effects are the result of the binding of these hormones to specific α and β estrogen receptors (ER α , ER β), which are predominantly expressed in the prostatic stroma and epithelium, respectively (Cunha et al., 2002; Ho & Habib, 2011).

Androgen ablation has an important role as a prostate cancer therapy, especially in elderly men. The androgen ablation therapy in the treatment of prostatic carcinoma has been considered to have limited effectiveness due to the possibility of androgen independent tumor development (Kwabi-Addo et al., 2004). The vast majority of androgen-independent cancers continue to express AR, suggesting that androgen independence is due to genetic changes that allow activation of this receptor at low androgen levels (Kwabi-Addo et al., 2004). Culig et al (1994) demonstrated that FGF-7 EGF and IGF expressions activate the AR transcription of prostatic cancer cells.

The association between steroid hormones and growth factors such as FGF-2, FGF-7, FGF-8, EGF, α -actin and vimentin are crucial regulators of prostatic dynamics considering the paracrine and/or autocrine signals in the glandular microenvironment. Thus, based on the important steroid hormone level imbalance during the senescence period, as well as their involvement in the development and progression of prostatic lesions, the aim of this study was to characterize and associate the reactivity of the different molecules such as FGFR-2, FGFR-7, FGFR-8, EGFR, α -actin and vimentin in relation to the AR, ER α , ER β and prolactin receptors in the prostate of elderly men showing low-grade and high-grade adenocarcinoma.

MATERIAL AND METHODS

Human Samples and Tissue Preparation

Thirty prostatic samples were taken from 60 to 90-year-old patients (mean 63 years) with and without prostatic lesions, from the University Hospital, School of Medicine, the State University of Campinas (UNICAMP). Ten prostatic samples were obtained from necropsied patients without clinical diagnosis of prostatic or other urological diseases. The samples were acquired from the parasagittal midline of the posterior surface of the prostatic peripheral zone, which showed normal glands. Another twenty prostatic samples were taken from the prostate of

patients submitted to radical retropubic prostatectomy. Areas of prostatic low-grade cancer (Gleason score <7) and prostatic high-grade cancer (Gleason score ≥ 7) were diagnosed by a senior uropathologist (AB) according to morphological criteria (Kabashima et al., 2000).

The prostate samples were divided into Standard (no lesions) and prostatic cancer of low-grade and prostatic cancer of high-grade groups. The samples were submitted to structural and immunohistochemical analyses. Ethical permission was obtained from the Research Ethics Committee, School of Medicine, the State University of Campinas/UNICAMP (number 0094.0.146.000-08).

Morphology and Immunohistochemistry

Prostatic samples from 5 patients (per group) for histological analysis were fixed in Bouin's solution, embedded in paraplast (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*), cut into 5- μ m thick sections by means of a microtome (*Hyrax M60, Zeiss, Alemanha*) and submitted to Hematoxylin-Eosin and Masson's trichrome staining. The same samples were used for Immunohistochemistry analysis. The citrate buffer (pH 6), in the microwave for 10 min, or proteinase K (10mg/mL), for 10 min, were used for antigen retrieval and nonspecific binding was blocked by incubating the sections in blocking solution for 1 h at room temperature. Primary AR-N20 antibody for the AR (sc-816) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*), monoclonal mouse clone 1D5 (*Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, EUA*) for ER α , polyclonal rabbit 06-629 (*Upstate, EUA*) for ER β , polyclonal goat (sc-7805) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) for Prolactin, polyclonal rabbit (147) (sc-79) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) for FGFR-2, polyclonal goat (sc-1365) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) for FGFR-7, polyclonal rabbit ab81384 (*Abcam, EUA*) for FGFR-8, polyclonal rabbit (sc-03) (*Santa Cruz Biotchenollogy, EUA*) for EGFR, polyclonal rabbit (ab5694) (*abcam, EUA*) for α -actin, monoclonal mouse ab8069 (*abcam, EUA*) for vimentin, were diluted in 1% BSA (1:50) and applied to the sections overnight at 4°C. After washing in TBS-T, the sections were incubated for 2 h with rabbit, mouse or goat secondary HRP-conjugated antibodies (diluted 1:100 in 1% BSA; Promega, Madison, USA). The peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen mixture (DAB) for 10 min. Sections were lightly counterstained with methyl green or Harris' hematoxylin and photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope. Lesions, in each section, were evaluated for the presence of brown DAB precipitate, an indication of antibody binding. The distribution of antigen immunoreactivity was graded as 0 for negative staining (0%), 1 for

weak staining (< 33%), 2 for moderate staining (33% - 66%) and 3 for intense staining (> 66%) according to the frequency and positivity of antigens in sectioned tissues (modified from Tomas & Kruslin, 2004). The photomicrographs were obtained using a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope.

RESULTS

Standard Group

The prostatic peripheral zone of patients without prostatic lesions was characterized by different size acini. The secretory epithelium showed two cell types, basal cell layer and a layer of columnar secretory cells (Fig. 1a, 1b). The basal layer shown in Fig. 1a is continuous throughout the acini. Thin collagen fibers were found distributed under the epithelium and intermingled with smooth muscle cells (Fig. 1b).

Intense AR immunoreactivity was observed in the epithelial and stromal cells (Fig. 2a, Table 1). Weak PR immunoreactivity was observed in the epithelial and stromal cells (Fig. 2d, Table 1). The immunolocalization for ER β was moderate in the stromal cells and weak in the epithelium (Fig. 3a, Table 1). Weak ER α and vimentin immunoreactivity was observed in the prostatic stroma (Fig. 3d, 3g, Table 1). α -actin immunolocalization was intense in the epithelium-stroma interface (Fig. 2g, Table 1). Weak immunolocalization for EGFR was observed in both prostatic compartments (Fig. 2j, Table 1). Weak FGFR-2 immunoreactivity was verified in both prostatic compartments (Fig. 4d, Table 1). FGFR-7 immunolocalization was weak in the stromal cells (Fig. 4g, Table 1). Weak FGFR-8 immunoreactivity was verified in both compartments (Fig. 4j, Table 1).

Low-grade Cancer Group

Low-grade adenocarcinoma was characterized by well-formed individual glands with absent basal cells in the peripheral zone of the prostate (Figs. 1c, 1d). The neoplastic cells showed nuclear enlargement and prominent nucleoli. The stroma showed disorganized muscle fibers and abundant collagen fibers (Fig. 1d).

Moderate AR immunoreactivity was seen in both prostatic compartments (Fig. 2b, Table 1). Moderate PR immunolocalization was observed in the epithelial and stromal cells (Fig. 2e, Table 1). ER β immunoreactivity was moderate in the stromal cells and weak in the epithelial cells (Fig. 3b, Table 4). Moderate ER α and vimentin reactivities were observed in the prostatic stroma (Fig. 3e, 3h; Table 1). Moderate α -actin immunoreactivity was

observed in the epithelium-stroma interface (Fig. 2h, Table 1). EGFR immunoreactivity was moderate in the stroma and weak in the epithelium (Fig. 2k, Table 1). FGFR-2 immunolocalization was moderate in the epithelial and stromal cells (Fig. 4e, Table 1). FGFR-7 immunoreactivity was moderate in the prostatic stroma and weak in the epithelium (Fig. 4h, Table 1). Intense FGFR-8 immunolocalization was verified in both prostatic compartments (Fig. 4k, Table 1). In general, it was demonstrated that, particularly, the PR, FGFR-2, FGFR-8, ER α and vimentin molecules increased their reactivities in relation to standard group. Also, the AR, FGFR-8, ER β molecules increased their reactivities in relation to high-grade cancer group.

High-grade Cancer Group

High-grade adenocarcinoma was characterized by infiltrative fused glands and absent basal cells in the peripheral zone of the prostate (Figs. 1e, 1f). The neoplastic cells showed nuclear enlargement and prominent nucleoli. The stroma showed disorganized muscle fibers with a serrated edge feature (Fig. 1e).

The AR immunoreactivity was moderate in the epithelium and weak in the prostatic stroma (Fig. 2c, Table 1). Intense PR immunolocalization was observed in the epithelial cells and weak in the stromal cells (Fig. 2f, Table 1). ER β immunostaining was weak in both prostatic compartments (Fig. 3c, Table 1). Intense ER α immunoreactivity and moderate vimentin immunostaining was seen in the prostatic stroma (Fig. 3f, 3i; Table 1). Weak α -actin immunoreactivity was observed in the stroma-epithelial interface (Fig. 2i, Table 1). Intense EGFR immunolocalization in the stromal cells and weak EGFR immunolocalization was observed in the epithelial cells (Fig. 2l, Table 1). Moderate FGFR-2 immunoreactivity in the stromal compartment and weak FGFR-2 immunoreactivity was observed in the epithelium (Fig. 4f, Table 1). The FGFR-7 immunoreactivity was intense in the stroma and moderate in the epithelium (Fig. 4i, Table 1). Finally, the FGFR-8 immunolocalization was moderate in the stroma and weak in the epithelium (Fig. 4l, Table 1). Highlighting, it was verified that the PR, FGFR-7, ER α and EGFR molecules increased their reactivities in relation to both standard and low-grade cancer groups. In contrast, the ER β molecule decreased its immunostaining in relation to both standard and low-grade cancer groups.

DISCUSSION

By and large, the present results showed that the ER β and AR reactivities decreased in cancer groups,

specially, in undifferentiated adenocarcinoma. Whereas, the PR and ER α reactivities increased in the cancer groups.

The pathogenic role of estrogen on the prostatic tissue of human beings could strongly increase in the senescence period (Krieg et al., 1993). Estrogens play a regulatory function in tumoral cell growth even in those cells which became androgen-independent. This is true due to a response from estrogen systemic administration and this was verified in patients showing prostate cancer, metastasis and androgen independent diseases (Ockrin et al., 2006). The exogen estrogen treatment led to atrophied prostatic epithelium, which was caused by decreased androgen systemic levels, considering the negative feedback on the hypothalamus-hypophysis axis (Härkönen & Mäkelä, 2004; Ellem & Risbridger, 2009).

In the same way, Risbridger et al (2003) demonstrated that the malignant changes in the prostate depend on estrogen and androgen actions in unison, and that one of these hormones by itself is not able to begin aberrant growth patterns which would result in glandular malignancy. In addition, the estrogen tumorigenic effect is mediated by ER α in the prostate, since rats which were treated with testosterone and ER α agonist showed various PIN grades (Attia & Ederveen et al., 2011). Also, other authors concluded that ER α and ER β showed antagonistic roles in prostate cancer pathogenesis, in which the ER α would stimulate the cancer progression and ER β would inhibit the cellular proliferation and differentiation (Attia & Ederveen et al., 2011).

In addition, studies indicated that the increase of AR heterogeneity or the decrease of prostate cancer process could be related to a high cancer grade and negative prognosis (Taplin & Ho, 2001). On the other hand, the AR overexpression could be involved in the process which would lead to an androgen-independent prostate tumor (Ruffion et al., 2003). Besides, androgen and estrogen actions in the prostate could be associated to prolactin effects (Ruffion et al., 2003). The excessive prolactin stimulation led to hypertrophied epithelia and stroma (Härkönen & Mäkelä, 2004). Also, the paracrine and autocrine glandular actions of the prolactin reduced tumoral development and growth (Härkönen & Mäkelä, 2004). Also, different authors verified that prolactin inhibition is able to prevent some of the estrogenic effects (Gilleran et al., 2003). Due to this, it can be suggested that prolactin could be associated to the estrogen activation via, not only at the systemic level but also at the cellular one, showing a mechanism in prostatic dysplastic change development (Härkönen & Mäkelä, 2004).

Thus, we can conclude that the ER α involvement in the reactive stroma activation led to a microenvironment which was favorable to cancer progression, maximizing stromal imbalance, and that ER β

contributed to inhibition of the pre-cancerous lesions in senescence. Also, the prolactin could be related to cancer progression due to its interaction with ER α action, indicating that this hormone could be a relevant target to prevent the estrogenic effects in the prostatic lesions.

Also, regarding the results related to growth factors, we can see that increased FGFR2, FGFR7 and FGFR8 reactivities were verified in both high and low grade cancer. However, the increase of FGFR2 and FGFR8 reactivities were greater in low grade cancer group. Thus, FGFR8 showed greater involvement at the beginning of the malignancy alterations. In contrast, the increase of FGFR7 and EGFR reactivities were greater in high grade cancer.

It is known that androgens signalled growth factors, which act in the paracrine and autocrine mechanisms, increasing cellular proliferation and reducing apoptosis (Marcelli et al., 2000). The FGF function alterations, modifying the signaling process could lead to organ malignancy changes (Ahmad et al., 2012).

According to Cotton et al (2008), the FGF expression is partially regulated by androgen. However, the signalling between AR and FGF is important in prostatic development, nevertheless the accuracy interaction mechanism is not entirely clear (Cotton et al., 2008).

Culig et al (1994) demonstrated that FGF-7, IGF and EGF activated the AR transcription in the cancerous prostatic cells. In addition, FGFs can promote tumor growth by means of different mechanism, acting as an angiogenic mitogen for tumoral cells or even as an apoptosis inhibitor (Cotton et al., 2008).

Authors showed that FGF7 is induced by androgens in stromal cell culture from human and rodent tissues (Kwabi-Addo et al., 2004; Cotton et al., 2008). However, the FGF7 prostatic expression could not be androgen-dependent in vivo, after analyzing castrated animals (Nemeth et al., 1998).

Also, FGF7 and FGF10 are important paracrine mediators of androgenic action in the prostatic epithelium (Cunha et al., 2003). On the other hand, the androgenic regulation of prostatic cells which will show malignant changes indicate autocrine mechanism for androgen-dependent growth, this process being due to FGF activation axis alterations (Cunha et al., 2003). According to Kwabi-Addo (2004), the FGF7 seric level is lower in men showing prostate cancer than those with benign prostate hyperplasia. Also, Ishii et al (2011) verified that stromal prostatic cells which were treated with estrogen showed decreased FGF7 expression.

Studies showed that FGF2 was found for stromal cells in prostate adenocarcinoma, indicating the paracrine

effect of this mitogen (Kwabi-Addo et al., 2004). However, Dorkin et al (1999) characterized FGF2 expression in the epithelium of prostatic adenocarcinoma. In another study showing Tramp mice which were bred from FGF2 *knockout* mice, a decrease in the metastatic process in the offspring and increased survival of the parents was verified, indicating the FGF2 role in cancer progression (Polnaszek et al., 2003). Tuxhorn et al (2002) showed that FGF2 could promote cancer progression to induce angiogenesis and reactive stroma formation. According to Smith et al (2002), the ER and AR expressions were associated with high FGF 2 and FGF 7 levels. The FGF2 and FGF7 synthesis is considered to be under androgenic control, however the correlation between FGF2 and ER suggested that the ER activation could also be involved in this synthesis (Smith et al., 2002).

Also, the FGF8 expression increases in men presenting prostate cancer (Gnanapragasam et al., 2003; Cotton et al., 2008). Valta et al (2008) analyzed prostatic cell grafts showing FGF8 overexpression and verified an increase of glandular tumor incidence and size.

In addition, according to Gnanapragasam et al (2003), the FGF8 is overexpressed in around 60% of tumor classified as Gleason 8, and in almost 92% of the tumors showing gleason 8 or more than this degree. Ahmad et al (2012) said that, some tumors depend on the imbalance of the FGF, signaling their development and progression, indicating that this molecule is an excellent therapeutic target.

In relation to EGF, Ware (1994) verified intense expression in the basal cells in the prostatic tissue from both hyperplastic glands and healthy ones, however, the great majority of prostatic adenocarcinomas did not show an increase of this factor. On the other hand, studies showed that EGFR expression in primary prostate cancer indicated a proliferative aspect and no correlation with tumor progression (Visakorpi et al., 1992). Also, despite the proliferation process of the LNCaP cells being stimulated by androgens and EGF, the androgenic action is not mediated by the increase of EGF production (Connolly & Rose, 1990).

To conclude, based on the results herewith we can say that both FGFR2 and FGFR8 play a fundamental role in the early stages of prostate cancer, suggesting that these molecules could be a promising therapeutic target. Also, we can suggest that not only FGFR7 but also EGFR were not directly signaled by ER β . Nevertheless, they could be stimulated by the ER α action.

Regarding to the results on α -actin reactivity, we can see that this molecule decreased in both cancer groups, although it was the lowest in the high-grade cancer group. On the other hand, the vimentin immunostaining increased

in the cancer groups in the same way.

Tuxhorn et al (2002) showed that the reactive stromal compartment is composed of fibroblasts and more than 50% of myofibroblasts, an activated stromal cell phenotype which is not observed in normal prostatic stroma. The myofibroblast has been described as an intermediary between fibroblasts and smooth muscle cells (Gabbiani et al. 1972). Fibroblasts in the damaged tissue alter its phenotype to the myofibroblasts, which are characterized by vimentin and α -actin expressions (Tuxhorn et al. 2001).

Undifferentiated prostatic tumor showed a high vimentin level, inasmuch as high vimentin levels are related to the invasive capacity of cancer (Salvatori et al., 2012). In addition, Salvatori et al (2012) observed that high adhesion cell levels and low vimentin molecule levels indicating cell-cell interaction and the reduction of the cellular motility. Also, the vimentin inhibition reduced tumor growth from a highly tumorigenic and metastatic cellular lineage (Zhang et al., 2009). According to Tuxhorn et al (2002), the reactive stroma in prostate cancer led to increased number of myofibroblasts and fibroblasts and decreased smooth muscle cell numbers, despite the fact that healthy prostatic tissue shows the predominance of smooth muscle cells. Thus, the reactive stroma could be induced at the beginning of tumorigenesis and could be involved in tumor progression by means of the substitution of the healthy fibro-muscular stroma (Tuxhorn et al., 2002).

Although, cellular senescence has been considered a strong tumoral suppressor mechanism, studies have shown that senescent cells developed secretory activities which can induce alterations in the tissue microenvironment, diminishing cellular behavior control and promoting tumorigenesis (Coppe et al., 2010).

Finally, the characterization of reactive stroma considering the opposite reactivities between vimentin and α -actin associated with the proliferative feature of myofibroblasts indicated the fundamental role of these cells in tissue disorganization and in prostatic adenocarcinoma development. Thus, based on this last consideration, we indicate stromal reactivity as a trigger of prostatic lesions. Finally, we can conclude that the differential localization of the fibroblastic factors between the epithelial and stromal glandular compartments in the prostate of elderly men, who presented prostate cancer, could indicate a favorable distinction for tumoral progression.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by São Paulo Research Foundation (2010/01739-1 and 2009/50396-2).

REFERENCES

- Ahmad I, Iwata T, Leung HY. 2012. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823: 850-860.
- Attia DMA, Ederveen AGH. 2011. Opposing roles of ER α and ER β in the genesis and progression of adenocarcinoma in the rat ventral prostate. *Prostate* doi: 10.1002/pros.21507.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A et al. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 5: 99-118.
- Cotton LM, O'bryan MK, Hinton BT. 2008. Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocrine Reviews* 29: 193-216.
- Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV et al. 1994. Androgen receptor activation in prostate tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Research* 54: 5474-5478.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70: 473-485.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ et al. 2003. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 107: 1-10.
- Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C et al. 1999. FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* 18: 2755-61.
- Ellem SJ, Risbridger GP. 2009. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 1155: 174-186.
- Garrison JB, Kyprianou N. 2004. Novel targeting of apoptosis pathways for prostatic cancer therapy. *Cur Cancer Drug Targets* 4: 85-95.
- Gillera JP, Putz O, Dejong M et al. 2003. The role of prolactin in the prostatic inflammatory response to neonatal estrogen. *Endocrinology* 144: 2046-54.
- Gnanapragasam VJ, Robinson MC, Marsh C et al. 2003. FGF8 isoform b expression in human prostate cancer. *Br J Cancer* 88: 1432-8.
- Härkönen PL, Mäkelä SI. 2004. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 297-305.
- Ho CK, Habib FK. 2011. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat Rev Urol* 8: 29-41.

- Ishii K, Mizokami A, Tsunoda T et al. 2011. Heterogenous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 112: 3604-3611.
- Ittman M, Mansukhani A. 1997. Expression of fibroblast growth factors (FGFs) and FGF receptors in human prostate. *J Urol* 157: 351-356.
- Kabashima A, Maehara Y, Kakehi Y. 2000. Clinicopathological features and over-expression of matrix metalloproteinases in intramural gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 6: 3581-3584.
- Krieg M, Nass R, Tunn S. 1993. Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 375-381.
- Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. 2004. The Role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 11: 709-724.
- Marcelli M, Ittmann M, Mariani S et al. 2000. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60: 944-9.
- Marszalek M, Wachter J, Ponholzer A et al. 2005. Insulin-like growth factor 1, chromogranin A and prostate specific antigen serum levels in prostate cancer patients and controls. *Eur Urol* 48: 34-39.
- Nemeth JA, Zelen DL, Lang S et al. 1998. Keratinocyte growth factor in the rat ventral prostate: androgen-independent expression. *Journal of Endocrinology* 156: 115-125.
- Ocrik J, Lalani EL-N, Abel P. 2006. Therapy Insight: parenteral estrogen treatment for prostate cancer--a new dawn for an old therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 10: 552-63.
- Polnaszek N, Kwabi-Addo B, Peterson LE et al. 2003. Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 63: 5754-60.
- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ et al. 2003. Oestrogens and prostate cancer. *Endoc Relat Cancer* 10: 187-191.
- Rose DP, Connolly JM. 1990. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res* 50: 7139-44.
- Ruffion A, Al-Sakkaf KA, Brown BL et al. 2003. The survival effect of prolactin on PC3 prostate cancer cells. *Eur Urol* 43: 301-8.
- Salvatori L, Francesca Caporuscio F, Verdina A et al. 2012. Cell-to-Cell Signaling Influences the Fate of Prostate Cancer Stem Cells and Their Potential to Generate More Aggressive Tumors. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0031467.
- Smith JA, Madden T, Vijjeswarapu M et al. 2001. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochem Pharmacol* 62, 469-72.

Taplin ME, Ho SM. 2001. Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3467-77.

Tomas D, Kruslin B. 2004. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 61: 324-31.

Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD et al. 2002. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Research* 62: 3298-3307.

Valta MP, Tuomela J, Bjartell A et al. 2008. FGF-8 is involved in bone metastasis of prostate cancer. *Int. J. Cancer* 123: 22–31.

Visakorpi T, Kallaiioniemi OP, Koivula T et al. 1992. Expression of epidermal growth factor receptor and ERBB2 (HER-2/Neu) oncoprotein in prostatic carcinomas. *Mod Pathol* 6: 643-8.

Ware JL. 1994. Prostate cancer progression. Implications of histopathology. *Am J Pathol* 145: 983-93.

Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA. 2002. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* 193: 1-5.

Zhang N, Sanders AJ, Ye L, Kynaston HG et al. 2009. Vascular endothelial growth inhibitor, expression in human prostate cancer tissue and the impact on adhesion and migration of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 35: 1473-80.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Photomicrographs of the prostatic peripheral zone from Standard, Low-grade Cancer, High-grade Cancer Groups. **A** and **B** Epithelium with secretory columnar and basal cells (*). **C** and **D** Neoplastic acini (*) with hypertrophied stroma. **E** and **F** Fused neoplastic acini (*) with infiltrative feature, hypercellular and hypertrophied stroma. **A - G:** **Ep** - epithelium, **L** - lumen and **St** – stroma.

Figure 2: Immunohistochemistry of the prostatic peripheral zone from Standard, Low-grade Cancer, High-grade Cancer Groups. **A** Intensed AR immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. **B** Moderate AR immunoreactivity (arrows) in the epithelium and in the prostatic stroma. **C** Moderate AR immunoreactivity (arrow) in the epithelium and weak in the stroma. **D** Weak PR immunoreactivity (arrow) in the epithelium and stroma. **E** Moderate PR immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. **F** Intensed PR immunoreactivity (arrows) in the epithelium and weak in the stroma. **G** Intense α -actin immunoreactivity (arrows) in the epithelium-stroma

interface. **H** Moderate α -actin immunoreactivity (arrow) in the epithelium-stroma interface. **I** Weak α -actin immunoreactivity (arrows) in the epithelium-stroma interface. **J** Weak EGFR immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. **K** Weak EGFR immunoreactivity (arrows) in the epithelium and moderate in the stroma. **L** Weak EGFR immunoreactivity (arrow) in the epithelium and intense in the stroma. **A – L: Ep** - epithelium, **L** - lumen and **St** – stroma.

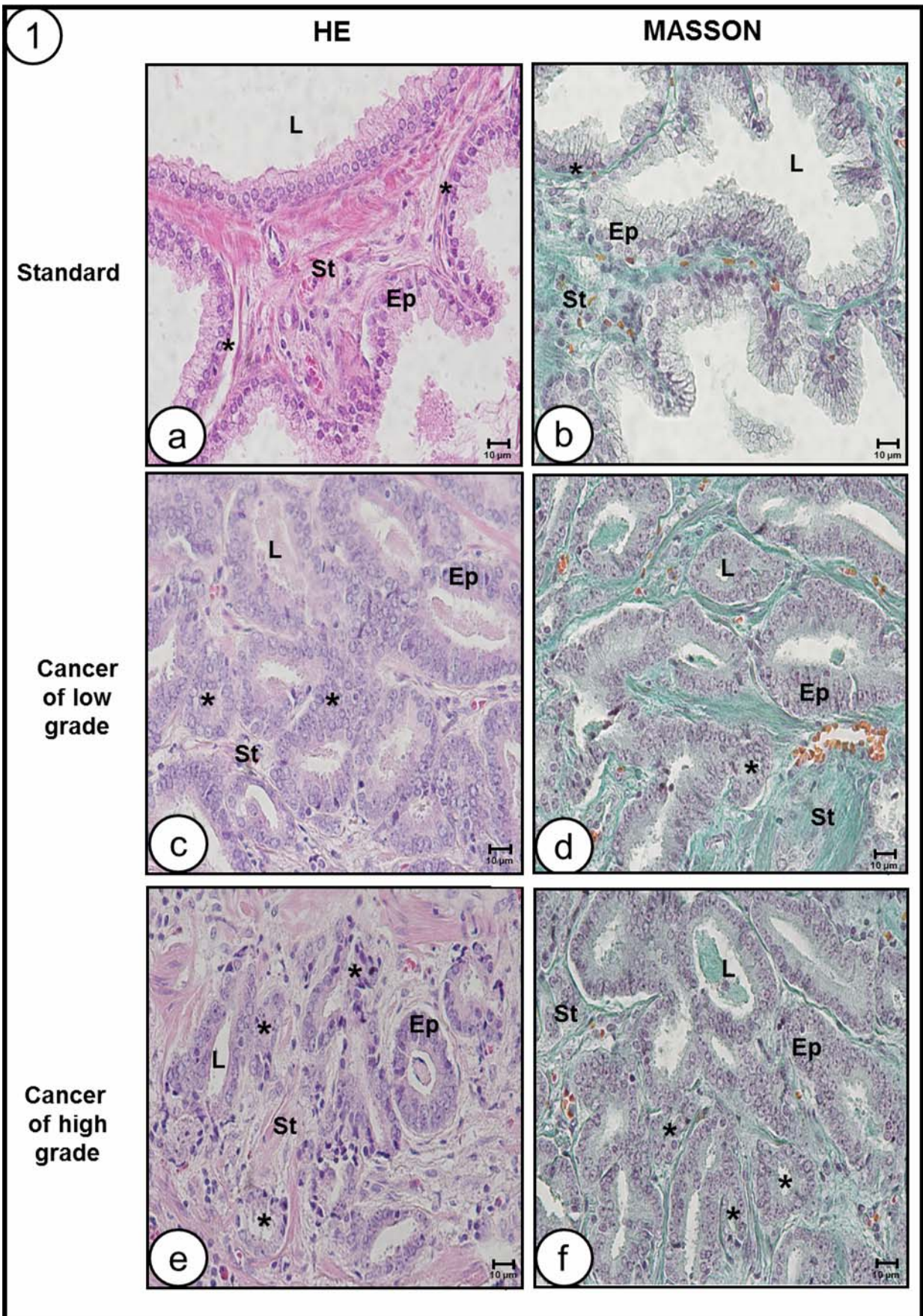
Figure 3: Immunohistochemistry of the prostatic peripheral zone from Standard, Low-grade Cancer, High-grade Cancer Groups. **A** Weak FGFR-2 immunoreactivity (arrows) in prostatic epithelial cells and stroma. **B** Moderate FGFR-2 immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. **C** Weak FGFR-2 immunoreactivity (arrows) in the epithelium and moderate in the stroma. **D** Weak FGFR-7 immunoreactivity (arrow) in the stroma and absent in the epithelium. **E** Weak FGFR-7 immunoreactivity (arrows) in the epithelium and moderate in the stroma. **F** Moderate FGFR-7 immunoreactivity (arrows) in the epithelial cells and intense in the stroma. **G** Weak FGFR-8 immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. **H** Intense FGFR-8 immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. **I** Weak FGFR-8 immunoreactivity (arrow) in the epithelium and moderate in the stroma. **A – I: Ep** - epithelium, **L** - lumen and **St** - stroma.

Figure 4: Immunohistochemistry of the prostatic peripheral zone from Standard, Low-grade Cancer, High-grade Cancer Groups. **A** Weak ER β immunoreactivity (arrows) in prostatic epithelial cells and moderate in the stroma. **B** Weak ER β immunoreactivity (arrows) in the epithelium and moderate in the stroma. **C** Weak ER β immunoreactivity (arrows) in the epithelium and stroma. **D** Weak ER α immunoreactivity (arrow) in the stroma and absent in the epithelium. **E** Moderate ER α immunoreactivity (arrows) in the stroma and absent in the epithelium. **F** Intense ER α immunoreactivity (arrows) in the stroma and absent in the epithelium. **G** Weak Vimentin immunoreactivity (arrows) in the stroma and absent in the epithelium. **H** Moderate Vimentin immunoreactivity (arrows) in the stroma and absent in the epithelium. **I** Moderate Vimentin immunoreactivity (arrow) in the stroma and absent in the epithelium. **A – I: Ep** - epithelium, **L** - lumen and **St** - stroma.

Table 1: Immunoreactivity intensity of receptors: AR, PR, ER β , FGFR-2, FGFR-7, FGFR-8, α -actin, vimentin and EGFR.

GROUPS						
Antigens	STANDARD		LOW-GRADE CANCER		HIGH-GRADE CANCER	
	Epithelium	Stroma	Epithelium	Stroma	Epithelium	Stroma
AR	3	3	2	2	2	1
PR	1	1	2	2	3	1
FGFR-2	1	1	2	2	1	2
FGFR-7	0	1	1	2	2	3
FGFR-8	1	1	3	3	1	2
α -actin	3		2		1	
EGFR	1	1	1	2	1	3
ER β	1	2	1	2	1	1
ER α	0	1	0	2	0	3
Vimentin	0	1	0	2	0	2

0 (0%), 1 (< 33%), 2 (33% - 66%), 3 (> 66%)

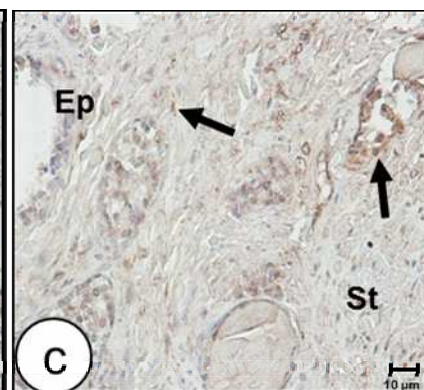
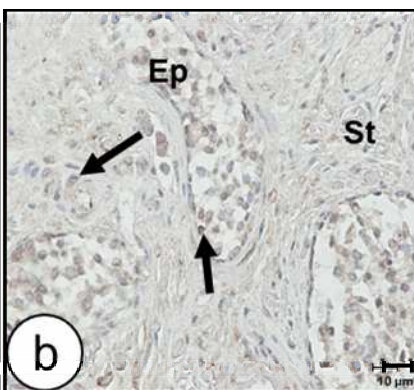
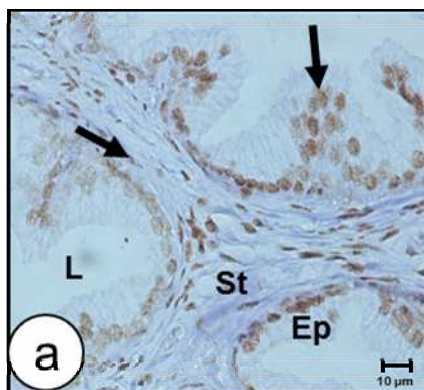


2

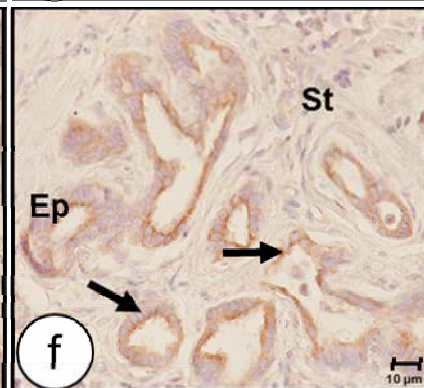
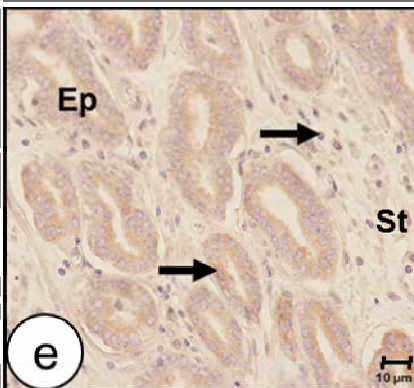
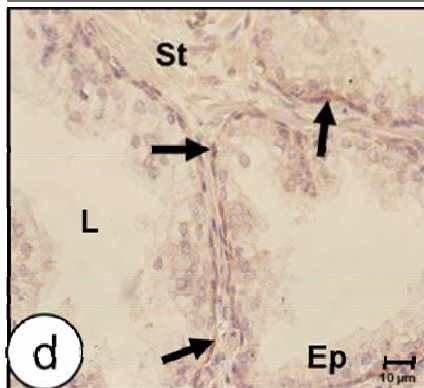
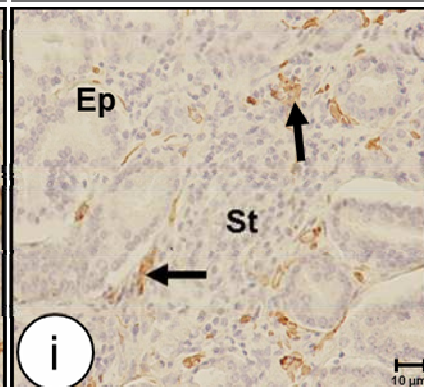
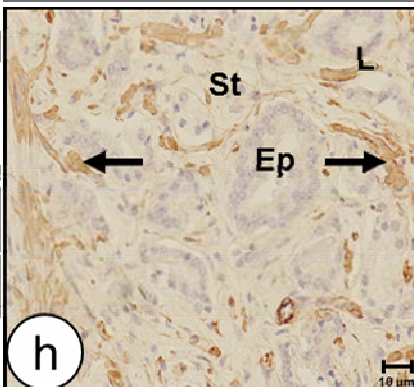
Standard

Low-Grade
CancerHigh-grade
Cancer

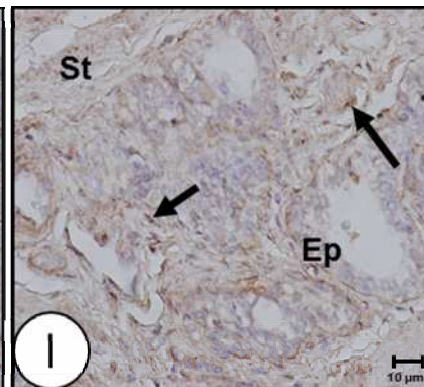
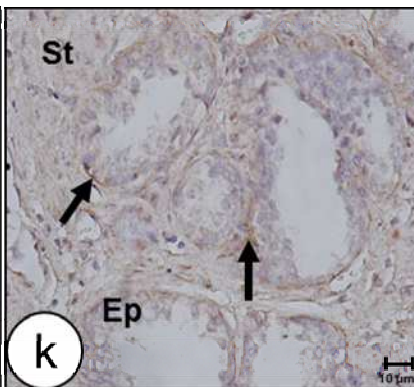
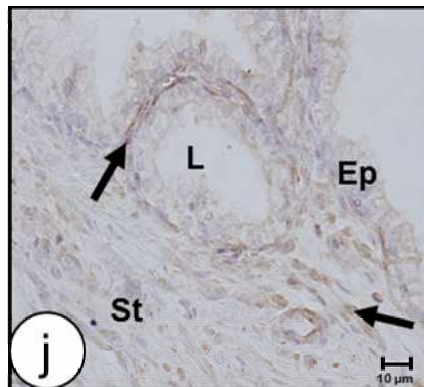
AR



PR

 α -actin

EGFR



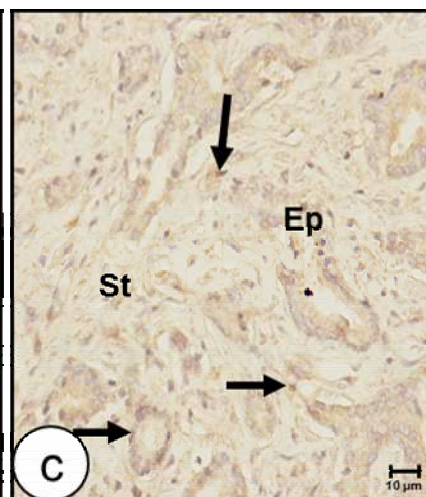
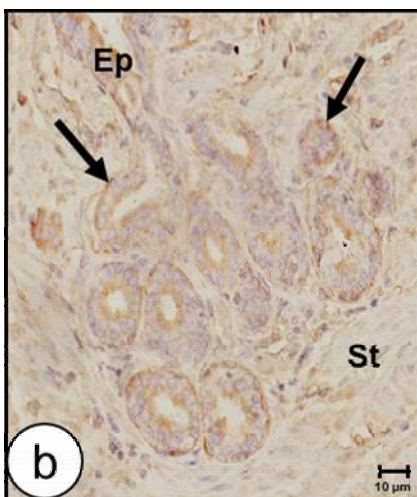
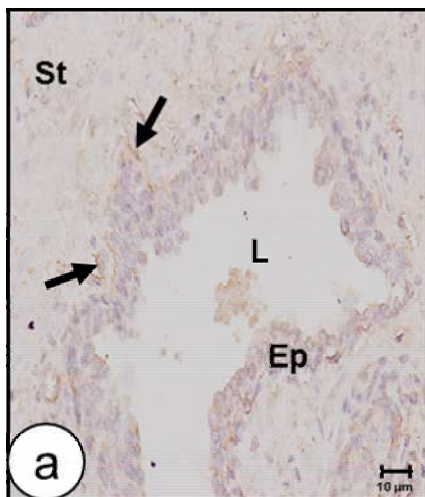
3

Standard

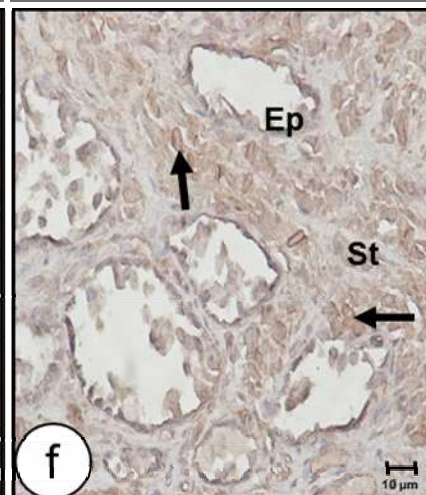
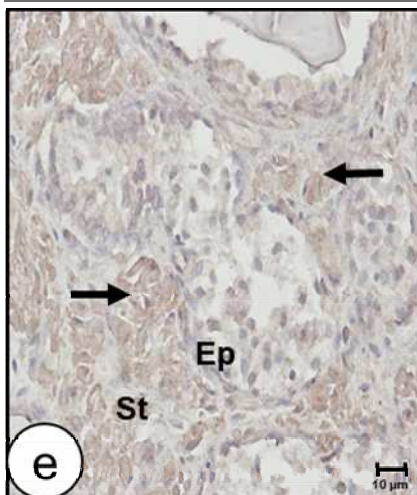
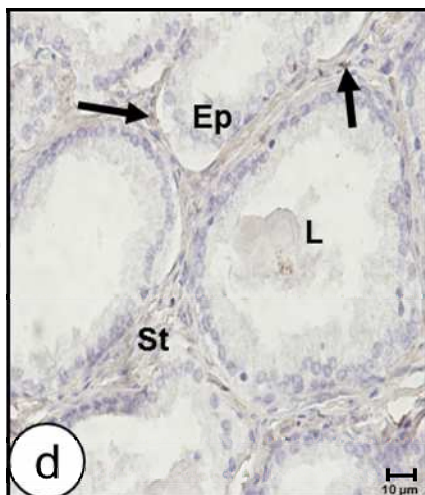
Cancer of low
grade

Cancer of high
grade

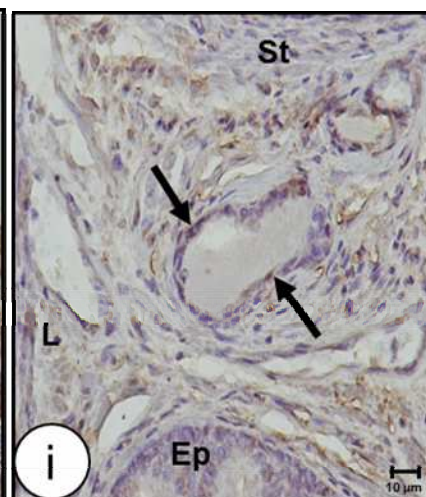
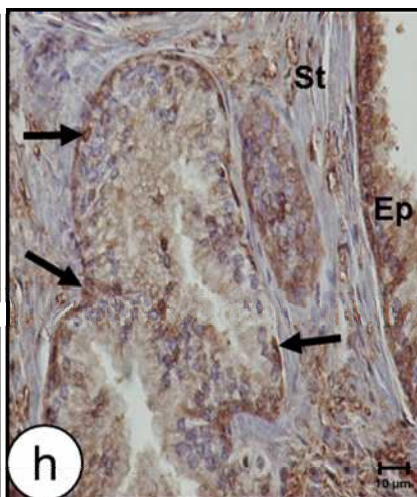
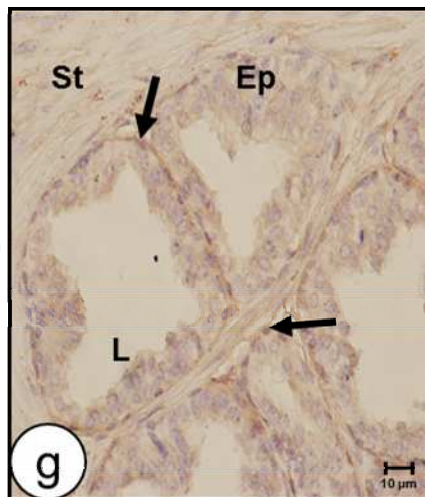
FGFR2



FGFR7

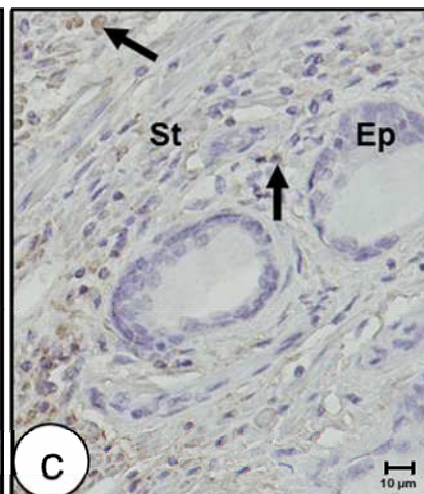
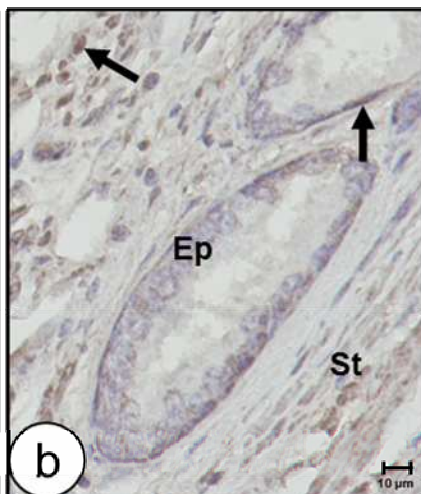
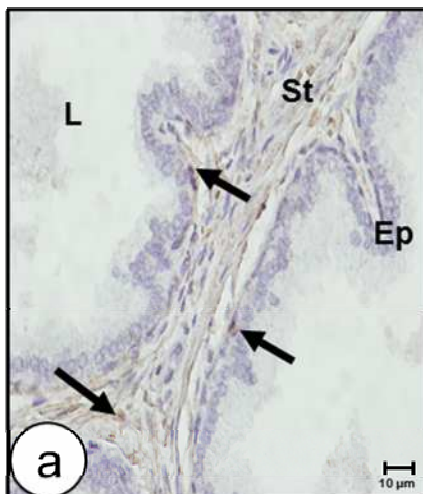
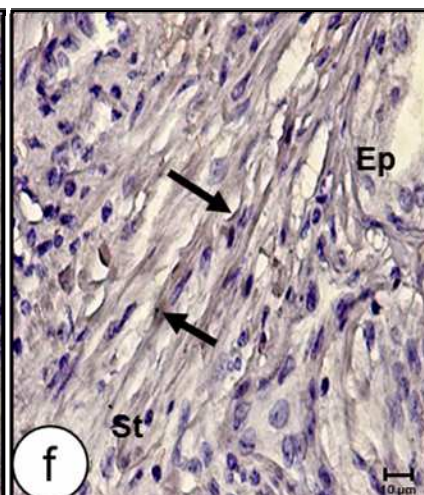
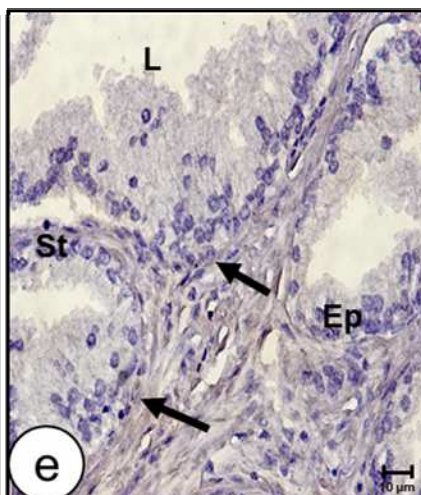
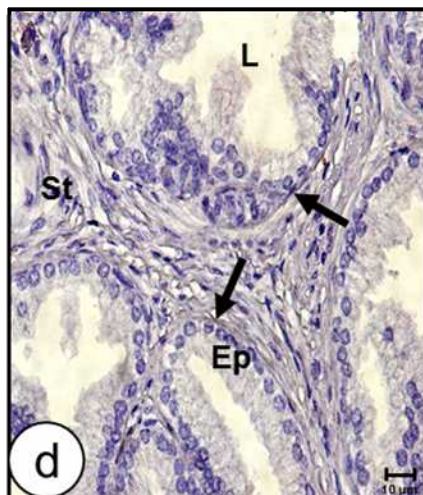


FGFR8

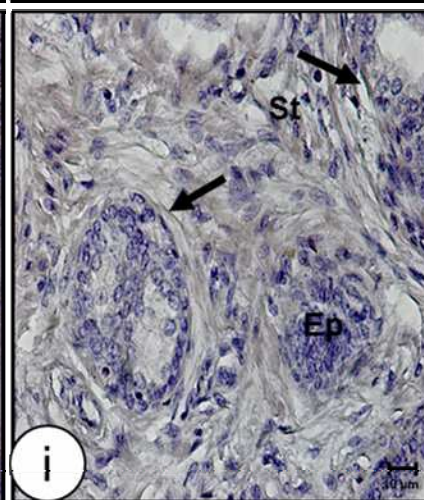
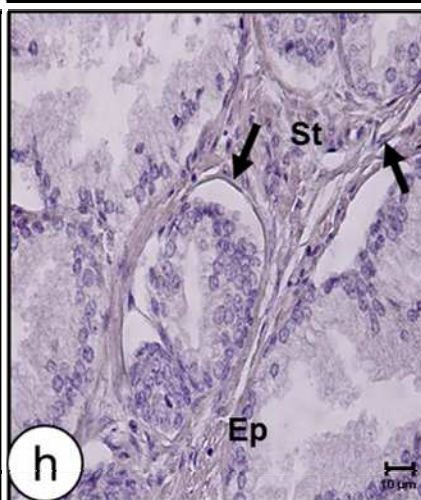
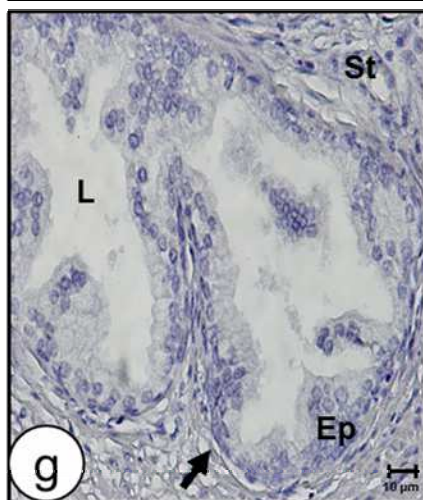


4

Standard

Low-grade
CancerHigh-grade
CancerER β ER α 

VIM



Perfil Morfológico e Molecular da Próstata de Ratos Senis Frente às Diferentes Variações Hormonais

Hetzl AC¹, Montico F¹, Lorencini RM¹, Kido LA¹, Cândido EM¹, Cagnon VHA¹

1 - Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Correspondência para: Valéria H. A. Cagnon PhD, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brazil. Telephone: +(55) 19-3521-6103. Fax: +(55) 19-3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br

RESUMO

OBJETIVO: O objetivo desse estudo foi caracterizar e correlacionar as reatividades dos receptores androgênicos (AR), estrogênicos α e β (ER α , ER β) e de prolactina em relação aos receptores para Fator de crescimento epidermal (EGF), α -actina e vimentina nos compartimentos epitelial e estromal da próstata de ratos senis frente ao desequilíbrio de hormônios esteroides.

MÉTODOS: 50 ratos senis com 10 meses de idade e 10 ratos adultos jovens com 4 meses de idade foram divididos em grupos: Jovem (JOV), Senil (SE), Castrado (CAS), Tamoxifeno-Letrozol (TAM), Tamoxifeno-Letrozol + Testosterona (RETEST), Castrado + Estradiol (REEST).

RESULTADOS: O grupo SE apresentou hipertrofia dos elementos celulares e fibrilares, além da ocorrência de células inflamatórias. Além disso, verificou-se aumento de vimentina, ER α e PR em relação ao JOV. No grupo CAS observou-se localização diferencial do PR, α -actina e EGFR em relação ao grupo senil. Por outro lado, no RETEST, observou-se recuperação do epitélio prostático e do padrão de distribuição de reatividade da α -actina, do PR e EGFR em relação ao SE. No grupo REEST foi caracterizada intensa atrofia epitelial e desorganização estrutural glandular, e foi observado aumento de ER α e ER β , além de localização diferencial destes, somando-se a diminuição α -actina e vimentina em relação aos animais senis. Já no grupo TAM foi observada diminuição de ER β e α -actina, e aumento de PR no compartimento estromal, em relação ao grupo senil.

CONCLUSÃO: A ablação hormonal em animais senis levou ao aumento na reatividade do EGFR, indicando a sinalização deste frente ao desequilíbrio hormonal tanto com predomínio de atividade androgênica como estrogênica caracterizando esses hormônios como elementos proliferativos para a próstata, porém através de diferentes vias. Ainda, pode-se concluir que receptores para EGF podem ser ativados de maneira andrógeno-independente, visto a reatividade aumentada de EGFR nos animais senis com ablação androgênica imposta pela castração. No grupo CAS verificou-se alteração do padrão de distribuição da reatividade da α -actina indicando os andrógenos como possíveis responsáveis pelo padrão estrutural de distribuição desta molécula. Dessa forma, no microambiente hiperandrogênico ocorreu a reestruturação do padrão de reatividade da α -actina, sugerindo que a localização da α -actina seja responsiva e orientada pelo andrógeno. Pode-se concluir que, o desequilíbrio causado pela ablação e/ou reposição hormonal

não somente alterou o *feedback* entre os hormônios esteróides como modificou a localização da reatividade das moléculas nos compartimentos prostáticos, alterando as sinalizações autócrinas e parácrinas dos estrógenos, EGF e prolactina, apontando esses como possíveis deflagradores da formação do estroma reativo.

INTRODUÇÃO

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos (Imamov et al., 2005). A castração é um dos métodos mais utilizados para o estudo dos mecanismos envolvendo a testosterona na manutenção e funcionamento da próstata. A deficiência androgênica leva a involução da próstata, ativação da apoptose e intensa remodelação da matriz extracelular desse órgão (Vilamaior et al., 2000). A próstata de roedores tem capacidade de sofrer sucessivos estágios de regeneração epitelial após a privação de andrógenos (castração) seguida de reposição hormonal (Taylor & Risbridger, 2008). Nas diferentes espécies animais, incluindo a humana, o desbalanço hormonal é fator comum, causando diversas alterações morfofuncionais da próstata (Roy-Burman et al., 2004). Dessa forma, as alterações dos níveis endógenos de hormônios esteróides durante o período da senescência contribuem fortemente para o desequilíbrio glandular.

Os estrógenos atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais da próstata quanto às alterações patogênicas (Cunha et al., 2002). A biossíntese de estrógenos ocorre a partir de um substrato androgênico, através da aromatização desse hormônio pela enzima aromatase (Risbridger et al., 2003). Os efeitos estrogênicos na próstata são

resultados da ligação desses hormônios em receptores estrogênicos específicos α e β (ER α , ER β), os quais são predominantemente expressos no estroma e no epitélio, respectivamente (Cunha et al., 2002; Ho & Habib, 2011). Os efeitos estrogênicos na próstata são complexos e podem envolver tanto ações diretas, através dos receptores, como indiretas, através do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Cunha et al., 2002). Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, com redução da produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002). Segundo Nellemann et al. (2005), a expressão de AR na próstata parece estar sob regulação de estrógenos e andrógenos, já que a administração conjunta de testosterona com anti-estrógeno ou a administração de estrógeno com anti-andrógeno reduziu os efeitos desses hormônios sexuais nessa glândula. As alterações causadas pelos estrógenos foram demonstradas através da proliferação de fibroblastos no estroma e metaplasia das células epiteliais basais, além de processo inflamatório. Contudo, evidenciou-se redução das células musculares lisas e das células epiteliais secretoras (Bianco et al., 2002).

Também, outro estudo utilizando camundongos estrógeno-modulados, os quais eram *Knockout* para enzima aromatase, demonstrou que doses elevadas de andrógenos têm efeitos morfológicos similares a doses elevadas de estrógenos (Jarred et al., 2002). Dessa forma, esses resultados evidenciaram que tanto os estrógenos como os andrógenos são elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes caminhos. Experimentos caracterizaram importante envolvimento dos ER β nos mecanismos prostáticos, conjuntamente as ações exercidas pelos ER α , sendo os efeitos estrogênicos produto de um balanço dinâmico entre ER α e ER β (Weihua et al., 2002).

Segundo Härkönen & Mäkelä (2004), os estrógenos têm efeito similar aos da prolactina. De acordo com esses autores, é possível que a prolactina sinalize os efeitos estrogênicos na próstata não somente de maneira sistêmica, mas também em nível celular, sendo um importante mecanismo no desenvolvimento das mudanças displásicas desse órgão (Härkönen & Mäkelä, 2004).

É conhecido que as interações epitélio-estromais tem papel importante para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo adulto da próstata (Hayward et al., 1996). Tuxhorn et al (2002) mostraram que o compartimento estromal reativo é composto de fibroblastos e mais de 50% de miofibroblastos, um fenótipo de célula estromal ativada que não é observado no estroma prostático normal. O miofibroblasto é descrito como um intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, conforme a expressão de proteína do citoesqueleto e aspectos estruturais (Gabbiani et al., 1972). Fibroblastos no tecido lesado alteram seu fenótipo para o de miofibroblasto, o qual é caracterizado pela expressão da vimentina e α -actina (Tuxhorn et al., 2001). De acordo com Tuxhorn et al (2002), a substituição do estroma normal pelo estroma reativo pode alterar as interações epitélio-estromais e afetar a progressão do câncer.

Assim, considerando a importante variação dos níveis de hormônios esteróides durante a senescência, bem como sua implicação no desenvolvimento e na evolução das lesões prostáticas, o objetivo desse estudo foi caracterizar e correlacionar as reatividades dos receptores AR, ER α , ER β e prolactina em relação aos receptores para EGF, α -actina e vimentina nos compartimentos epitelial e estromal na senescência frente ao desequilíbrio de hormônios esteróides na próstata de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos Experimentais em Amostras Prostáticas de Ratos

No presente trabalho foram utilizados 50 ratos machos senis da linhagem Sprague-Dawley, com 10 meses de idade (SE, CAS, TAM, RETEST e REEST), e 10 ratos machos adultos jovens da linhagem Sprague-Dawley com 4 meses de idade (JOV), obtidos no centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP) (Comitê de ética nº 2412-1). Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (10 animais cada):

- a. **Grupo Adulto Jovem (JOV)**: receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias;
- b. **Grupo Senil (SE)**: receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias;
- c. **Grupo Castrado (CAS)**: a remoção de andrógenos foi feita através da castração cirúrgica e química. Para a castração cirúrgica, os animais foram anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e posteriormente, castrados por incisão cirúrgica, com retirada dos testículos. Posteriormente a cirurgia, os animais foram submetidos ao tratamento de castração química com injeções subcutâneas de 10 mg/Kg de Flutamida (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA*) diluídos em 10 mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Shin et al. 2002);
- d. **Grupo Tamoxifeno-Letrozol (TAM)**: receberam injeções subcutâneas de 1mg/Kg de tamoxifeno (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*) diluídos em 1mL de óleo de

amendoim a cada 48h por 30 dias para o bloqueio dos receptores estrogênicos (ER α e ER β) (Tilley et al., 1987). Para bloquear a aromatização da testosterona resultando em estrógenos, os animais receberam injeções subcutâneas de 1mg/Kg de letrozol (*LET- Femara, Novartis-Pharma, Basiléia, Suíça*) diluídos em 1mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Tobin & Canny, 1998).

- e. **Grupo Castrado + Estrógeno (REEST):** a remoção de andrógenos foi feita através da castração cirúrgica e química. Após a castração, similar ao realizado para o grupo Castrado, os animais receberam injeções subcutâneas de 25 μ g/Kg de peso corpóreo de 17 β -estradiol (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA*) diluídos em 25 μ L de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Prins et al., 2001);
- f. **Grupo Tamoxifeno-Letrozol + Andrógeno (RETEST):** Posteriormente ao tratamento similar ao grupo Tamoxifeno-letrozol, os animais receberam injeções subcutâneas de 5mg/Kg de peso corpóreo de Cipionato de Testosterona (*Deposteron, Novaquímica, São Paulo, Brasil*) diluídos em 5 mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Sáttolo et al., 2004).

Os animais dos seis grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, PR, Brasil*). Após 30 dias de tratamento, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500, anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e posteriormente, sacrificados. Amostras do lobo ventral foram coletadas dos animais de cada grupo experimental e submetidas às análises de microscopia de luz e imunohistoquímicas, além das dosagens hormonais.

Microscopia de Luz

Amostras prostáticas de 5 animais de cada grupo foram coletadas e fixadas em solução de Bouin por doze horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus*, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais foram seccionados em micrótomo (*Hyrax M60*, Zeiss, Alemanha) com espessura de 5 micrômetros com posterior coloração em Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson (Junqueira et al., 1979) e fotografados no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400).

Imunomarcção dos Receptores Androgênicos (AR), Estrogênicos α e β (ER α e ER β), Prolactina (PR), Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (EGFR), α -actina e vimentina

Amostras prostáticas de 5 animais de cada grupo, os mesmos utilizados para a microscopia de luz, foram utilizadas para as análises de imunohistoquímica. Para isso, foram obtidos cortes com cinco micrômetros de espessura no micrótomo (*Hyrax M60*, Zeiss, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos AR, ER α , ER β , PR, EGFR, α -actina e vimentina foram

localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (*Santa Cruz Biotchnology, EUA*) para AR, monoclonal *mouse* clone 1D5 (*Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, EUA*) para ER α , policlonal *rabbit* 06-629 (*Upstate, EUA*) para ER β , policlonal *goat* (sc-7805) (*Santa Cruz Biotchnology, EUA*) para Prolactina, policlonal *rabbit* (sc-03) (*Santa Cruz Biotchnology, EUA*) para EGFR, policlonal *rabbit* (ab5694) (*Abcam, EUA*) para α -actina, monoclonal *mouse* ab8069 (*Abcam, EUA*) para vimentina diluídos (1:35-50) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O kit Envision HRP (*Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA*) foi usado para detecção dos antígenos. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kit* Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Verde Metila e Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (*Nikon, Tóquio, Japão*). Os cortes prostáticos de 5 animais senis de cada grupo foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB, caracterizando a reatividade positiva dos anticorpos. A distribuição da imunoreatividade do antígeno foi graduada como 0 para marcação negativa (0%), 1 para marcação fraca (< 33%), 2 para marcação moderada (33% - 66%) e 3 para marcação intensa (> 66%) de acordo com a frequência e positividade dos antígenos no tecido (modificado de Tomas & Kruslin, 2004).

RESULTADOS

Microscopia de Luz e Imunohistoquímica

Grupo Jovem

Ácinos com mucosa pregueada foram observados nos animais jovens (Fig. 1a, 1b). O

epitélio apresentou-se simples com células basais entremeadas às células luminais colunares altas. O estroma prostático apresentou-se distribuído de forma concêntrica ao redor do ácino com presença de células musculares lisas e pequena quantidade de fibras colágenas (Fig. 1a, 1b).

A imunolocalização de AR foi intensa nos núcleos das células epiteliais e moderada nas células estromais (Fig. 3a, Tabela 1). A imunoreatividade para ER α foi fraca tanto no epitélio prostático como no estroma (Fig. 5a, Tabela 1). Moderada imunoreatividade para ER β foi observada no epitélio e fraca no estroma prostático (Fig. 5g, Tabela 1). Fraca imunoreatividade para PR foi observada no citoplasma das células epiteliais e nas células estromais (Fig. 3d, Tabela 1). Intensa imunoreatividade para α -actina foi observada na interface epitélio-estroma (Fig. 3g, Tabela 1). Fraca imunomarcacão para vimentina foi observada no compartimento estromal (Fig. 5d, Tabela 1). A imunolocalização para EGFR foi fraca nas células epiteliais e moderada nas células estromais (Fig. 3j, Tabela 1).

Grupo Senil

Ácinos com mucosa pregueada foram observados nos animais senis, sendo esse pregueamento de menor frequência quando comparado ao grupo jovem (Fig. 1c, 1d). O epitélio secretor foi simples com células basais entremeadas às células luminais de aspecto colunar. Tais células apresentaram núcleo basal e nucléolo evidente (Fig. 1c, 1d). O estroma prostático apresentou células musculares lisas entremeadas por grande quantidade de fibras colágenas. Também, foi observada a presença de células inflamatórias no estroma (Fig. 1d).

A imunolocalização para AR foi moderada nos núcleos das células epiteliais e fraca nas células estromais (Fig. 3b, Tabela 1). A imunolocalização para ER α foi moderada no compartimento epitelial e fraca no compartimento estromal (Fig. 5b, Tabela 1). Moderada

imunomarcção para ER β foi observada no epitélio prostático (Fig. 5h, Tabela 1). Moderada imunoreatividade para PR foi observada no citoplasma das células epiteliais e fraca nas células estromais (Fig. 3e, Tabela 1). A imunolocalização para α -actina foi intensa na interface epitélio-estroma (Fig. 3h, Tabela 1). Já a imunoreatividade para Vimentina foi moderada no compartimento estromal (Fig. 5e, Tabela 1). Moderada imunomarcção para EGFR foi observada nas células epiteliais e fraca no compartimento estromal (Fig. 3k, Tabela 1).

Grupo Castrado

Atrofia glandular generalizada foi observada nos ácinos da próstata dos animais castrados (Fig. 1e). O epitélio secretor apresentou-se desorganizado, mas manteve a estrutura acinar, e atrófico, caracterizado por células luminais cúbicas e presença de microácinos (Fig. 1e, 1f). Fibras colágenas e células musculares mais espessadas foram observadas ao redor dos ácinos glandulares, evidenciando a ocorrência de hipertrofia estromal (Fig. 1f). No estroma, também foram verificadas células inflamatórias (Fig. 1e).

Fraca imunoreatividade para AR foi observada em ambos os compartimentos prostáticos (Fig. 3c, Tabela 1). A imunolocalização para ER α foi moderada nas células epiteliais e nas células estromais (Fig. 5c, Tabela 1). Fraca imunoreatividade para ER β foi observada nos compartimentos epitelial e estromal (Fig. 5i, Tabela 1). A imunolocalização para PR foi fraca nas células epiteliais e intensa no estroma (Fig. 3f, Tabela 1). A imunolocalização para α -actina foi intensa no estroma (Fig. 3i, Tabela 1). Já a imunoreatividade para vimentina foi fraca no estroma prostático (Fig. 5f, Tabela 1). Moderada imunomarcção para EGFR foi observada nas células epiteliais e intensa nas células estromais (Fig. 3l, Tabela 1).

Grupo Tamoxifeno-Letrozol

Na próstata dos animais com ablação estrogênica, os ácinos prostáticos apresentaram mucosa pouco pregueada e atrofia epitelial em algumas áreas, sendo também observados microácinos (Fig. 2a, 2b). O epitélio caracterizou-se por células luminais cúbicas e presença de células basais (Fig. 2a). Hipertrofia moderada do estroma foi observada com aumento de fibras colágenas e presença de infiltrado de células inflamatórias. (Fig. 2b).

A imunoreatividade para AR foi intensa nas células epiteliais e moderada no estroma (Fig. 4a, Tabela 2). A imunolocalização para ER α foi fraca nos dois compartimentos prostáticos (Fig. 6a, Tabela 2). Fraca imunoreatividade para ER β foi observada no epitélio e estroma prostático (Fig. 6g, Tabela 1). Intensa imunolocalização para PR foi observada no compartimento estromal e moderada no compartimento epitelial (Fig. 4d, Tabela 2). A imunomarcação para α -actina foi moderada na interface epitélio-estroma (Fig. 4g, Tabela 2). Moderada imunoreatividade para Vimentina foi observada no compartimento estromal (Fig. 6d, Tabela 2). Moderada imunolocalização para EGFR foi observada em ambos os compartimentos prostáticos (Fig. 4j, Tabela 2).

Grupo Retest

Os ácinos glandulares caracterizaram-se por mucosa pouco pregueada (Fig. 2c, 2d). O epitélio secretor apresentou células luminais colunares com núcleos evidentes, entre as quais se entremeavam células basais (Fig. 2c, 2d). Hipertrofia e hiperplasia do estroma também foram observadas, com aumento de fibras colágenas, além da presença de células musculares lisas e

vasos sanguíneos (Fig. 2c e 2d).

A imunoreatividade para AR foi intensa em ambos os compartimentos prostáticos (Fig. 4b, Tabela 2). A imunomarcção para ER α foi moderada nas células epiteliais e fraca no estroma prostático (Fig. 6b, Tabela 2). A imunoreatividade para ER β foi moderada no epitélio e fraca no estroma (Fig. 6h, Tabela 1). Moderada imunolocalização para PR foi observada nas células epiteliais e fraca nas células estromais (Fig. 4e, Tabela 2). Intensa imunoreatividade para α -actina foi verificada na interface epitélio-estroma (Fig. 4h, Tabela 2). Fraca imunoreatividade para Vimentina foi verificada no compartimento estromal (Fig. 6e, Tabela 2). Foi observada moderada imunolocalização para EGFR nas células epiteliais e fraca nas células estromais (Fig. 4k, Tabela 2).

Grupo Reest

Nesse grupo observou-se ausência de pregueamento da mucosa e presença de microácinos (Fig. 2e, 2f). Atrofia e desorganização estrutural foram verificadas no epitélio secretor, com presença de células luminais cúbicas e ocasionais células basais (Fig. 2e, 2f). O estroma glandular apresentou-se hipertrófico e hiperplásico, com espessamento e desorganização de fibras colágenas, além da presença de células musculares lisas, vasos sanguíneos e focos de células inflamatórias (Fig. 2f).

A imunoreatividade para AR foi moderada em ambos os compartimentos (Fig. 4c, Tabela 2). A imunomarcção para ER α foi intensa no compartimento estromal e moderada no epitélio prostático (Fig. 6c; Tabela 3). Moderada imunoreatividade para ER β foi observada no epitélio e estroma prostático (Fig. 6i, Tabela 2). Moderada imunolocalização para PR foi observada nas

células epiteliais e fraca nas células estromais (Fig. 4f, Tabela 2). Moderada imunomarcagem para α -actina foi observada na interface epitélio-estroma (Fig. 4i, Tabela 2). Fraca imunoreatividade para Vimentina foi verificada no compartimento estromal (Fig. 6f; Tabela 2). A imunoreatividade para EGFR foi intensa no epitélio e moderada no estroma (Fig. 4l, Tabela 2).

DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstraram que a próstata de animais senis apresentou alterações estruturais como hipertrofia dos elementos celulares e fibrilares, além da ocorrência de células inflamatórias, indicando a caracterização de um microambiente prostático favorável à lesão glandular. Além disso, verificou-se o aumento da vimentina, ER α e PR, os quais são fatores que indicam o desequilíbrio do microambiente glandular com consequente prejuízo da interação epitélio-estroma e potencialização da ocorrência de lesões. Os resultados também mostraram que tanto a ausência como o excesso dos hormônios estrogênicos e androgênicos desequilibraram estruturalmente e molecularmente o microambiente prostático, sensibilizando e/ou ativando diferentes vias sinalizadoras para a dinâmica glandular. Em adição aos resultados, a semelhança estrutural e o maior comprometimento da morfologia glandular nos grupos que foram castrados corroboram com a possibilidade de potencialização dos efeitos lesivos dos estrógenos, considerando a via de sinalização do ER α . No grupo CAS observou-se localização diferencial da PR, α -actina e EGFR indicando a atividade e/ou ação estromal dessas moléculas em relação ao grupo senil. Por outro lado, nos animais senis que receberam testosterona observou-se recuperação do epitélio prostático e do padrão de distribuição de reatividade da α -actina, da prolactina e do EGFR em relação ao grupo senil.

Na hiperestrogenização foi caracterizada intensa atrofia epitelial e desorganização estrutural glandular. Assim, conclui-se que as marcantes alterações estruturais foram evidenciadas frente à hiperestrogenização indicando a ação estrogênica, a partir dos seus receptores, como agentes promotores do desequilíbrio do microambiente estromal e comprometedores das interações epitélio-estroma, sendo os estrógenos fatores efetivos nas lesões prostáticas. Também, na hiperestrogenização foi observado aumento de ER α e ER β , além de localização diferencial destes, somando-se a diminuição α -actina e vimentina em relação aos animais senis. Já no ambiente hipoestrogênico (TAM) foi observada diminuição de ER β e α -actina, e aumento de prolactina no compartimento estromal, em relação ao grupo senil.

O desequilíbrio hormonal prostático está associado à senescência. Em homens idosos, é conhecido o declínio progressivo nos níveis de testosterona circulante, demonstrando acréscimo na conversão de andrógenos em estrógenos, sendo que o desequilíbrio hormonal potencializa os estrógenos, particularmente no estroma prostático (Krieg *et al.*, 1993; Morales, 2002; Ellem & Risbridger, 2009). Krieg *et al.* (1993) verificaram que o papel potencialmente patogênico dos estrógenos na próstata humana poderia ser acentuado ao longo do processo de senescência. Ainda, os estrógenos podem regular o crescimento da célula tumoral prostática, até mesmo das células que se tornam andrógeno-resistentes (Ockrin *et al.*, 2006).

Scarano *et al* (2006) verificaram redução dos níveis séricos de andrógenos em roedores senis quando comparados a adultos jovens. Outros autores demonstraram alterações na sensibilidade da próstata de roedores senis aos andrógenos, a qual foi atribuída à diminuição tanto de receptores androgênicos quanto à atividade da enzima 5 α -redutase no órgão, além de taxa alterada da aromatização de testosterona em estradiol (Banerjee *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2008). Outros estudos sugeriram que as células prostáticas desenvolveram independência

androgênica durante o processo de senescência, tornando a próstata menos sensível à ablação androgênica, considerando que as células não necessitariam desse hormônio para sobreviver (Banerjee et al., 2000; Morrissey *et al.*, 2002). Também, anormalidades na expressão ER α / β podem modular o crescimento da resposta do câncer à independência hormonal (Latil et al., 2001).

Estudos demonstraram a ocorrência de progressivas alterações morfológicas na próstata ventral ao longo da senescência, incluindo atipia e atrofia epiteliais, hiperplasia do epitélio e do estroma, infiltração de células inflamatórias no estroma, diminuição das projeções acinares em direção ao lúmen e presença de corpos amiláceos (Lau et al., 2003; Acosta et al., 2004). De maneira geral, as alterações morfológicas na próstata de ratos senis são semelhantes às observadas em amostras humanas de HBP e, analogamente e provavelmente como resultado do declínio nos níveis circulantes de andrógenos nas diversas linhagens durante a senilidade (Lau *et al.*, 2003).

A administração de doses crescentes de testosterona levou à hipertrofia das células epiteliais nos lobos prostáticos, tanto em animais jovens quanto nos senis (Banerjee *et al.*, 1994). Assim, sugeriu-se que o tratamento com testosterona levou à hiperplasia epitelial em animais jovens, fato este que ocorre naturalmente nos senis (Acosta *et al.*, 2004). Por outro lado, enquanto o tratamento com andrógenos manteve a integridade morfológica da próstata, a administração isolada de estrógenos causou atrofia glandular (Leav *et al.*, 1989). Segundo Cândido et al (2012), o lobo ventral de ratos senis frente à ablação androgênica e níveis aumentados de estrógenos apresentou intensa reatividade de ER α . De fato, sabe-se que o tratamento com estrógenos exógenos resulta em atrofia do epitélio prostático, induzindo indiretamente o decréscimo dos níveis sistêmicos de andrógenos por meio de *feedback* negativo

sobre o eixo hipotálamo-hipófise (Härkönen & Mäkelä, 2004; Ellem & Risbridger, 2009). Ainda, Leav *et al.* (1989) verificaram que os estrógenos são capazes de induzir proliferação epitelial apenas na presença de andrógenos. Em concordância, Risbridger *et al.* (2003) demonstraram que as alterações malignas na próstata são dependentes da ação combinada de andrógenos e estrógenos, sendo que nenhum desses hormônios isoladamente é capaz de deflagrar padrões aberrantes de crescimento que resultem em malignidade glandular.

Além disso, o efeito tumorigênico do estradiol na próstata é mediado pelo ER α , já que ratos tratados com testosterona e agonista de ER α (ERA-45) apresentaram tecido glandular com vários graus de Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP) (Attia & Ederveen *et al.*, 2011). Já, Ricke *et al.* (2008) demonstraram que somente camundongos *knockout* para ER β desenvolveram NIP após tratamento com testosterona e estradiol, enquanto que o animais *knockout* para ER α não desenvolveram tal lesão. Em concordância, outros autores concluíram que ER α e ER β têm papéis opostos na patogênese do câncer prostático, o ER α estimulando a progressão do câncer e o ER β inibindo as lesões pré-cancerosas (Attia & Ederveen *et al.*, 2011).

Os andrógenos estão envolvidos no desenvolvimento de doenças prostáticas, e seus efeitos nas células são mediados por fatores de crescimento. Esses agem através de mecanismos autócrinos e parácrinos, aumentando a proliferação celular e reduzindo a apoptose (Marcelli *et al.*, 2000). Evidências sugeriram que a expressão de EGFR nos cânceres prostáticos primários indicou aspecto proliferativo e não correlação com progressão tumoral (Visakorpi *et al.*, 1992). Embora a proliferação de células da linhagem LNCaP seja estimulada por andrógenos e EGF, a influência androgênica não é mediada pelo aumento da produção de EGF (Connoly & Rose, 1990). Segundo Davies & Eaton (1991), houve aumento da expressão de EGF após a castração. Assim, os autores sugeriram que o câncer prostático e a insensibilidade androgênica resultaram

da interrupção da integração e/ou sinalização dos efeitos androgênicos e dos fatores de crescimento na regulação da proliferação (Davies & Eaton, 1991).

Além dos andrógenos, as ações dos estrógenos na próstata podem ser associadas aos efeitos da prolactina (Ruffion et al., 2003). A prolactina regula a próstata através da estimulação da atividade secretora, proliferação e sobrevivência celular. O aumento excessivo da prolactina induz mudanças hipertróficas tanto no epitélio prostático quanto no estroma. Ainda, o bloqueio das funções autócrinas da prolactina reduz a formação e o crescimento tumoral (Härkönen & Mäkelä, 2004). Dessa forma, há uma relação entre os níveis de prolactina e o aumento de doenças prostáticas (Bartke, 2004). Outros autores observaram que a inibição da liberação de prolactina é capaz de prevenir a maioria dos efeitos estrogênicos (Gilleran et al., 2003). Dessa forma, pode-se sugerir que a prolactina está associada às vias de ativação dos estrógenos não somente em nível sistêmico, mas também em nível celular, como importante mecanismo no desenvolvimento de mudanças displásicas na próstata (Härkönen & Mäkelä, 2004). Por outro lado, Nevalainen et al. (1997) observaram que as ações tanto autócrina quanto parácrina da prolactina na próstata podem mediar algumas ações androgênicas. Assim, a síntese local de prolactina pode ser realizada por fatores que controlam a regulação androgênica de células cancerosas prostáticas durante o desenvolvimento do crescimento independente de andrógeno. Ingelmo et al. (2007) observaram que a prolactina age como fator de crescimento para o tecido prostático, tendo papel na sobrevivência das células epiteliais após a castração e inibindo a apoptose induzida pela castração (Dagvadorj et al., 2007).

Segundo Salvatori et al (2012), tumores prostáticos indiferenciados apresentaram elevada expressão de vimentina, sendo que altos níveis de vimentina podem ser correlacionados à capacidade invasiva das células cancerosas prostáticas. Salvatori et al (2012) também observaram

que a elevada expressão de moléculas de adesão e baixa expressão de vimentina indicaram interações célula-célula e redução da motilidade celular. Ainda, a inibição da vimentina reduziu significativamente o crescimento tumoral de uma linhagem celular prostática altamente tumorigênica e metastática (Zhang et al., 2009). Segundo Tuxhorn et al (2002), as células musculares lisas foram predominantes no estroma prostático normal e o estroma reativo no câncer prostático apresentou aumento de miofibroblastos e fibroblastos com a diminuição significativa de células musculares lisas. Hayward et al (1996) sugeriram que a sinalização anormal da interação célula muscular-epitélio durante a carcinogênese prostática pode levar a desdiferenciação da célula muscular lisa. Dessa forma, o estroma reativo parece ser induzido nos estágios iniciais da tumorigênese, podendo estar envolvido com a progressão do câncer prostático através da substituição do estroma fibro-muscular normal (Tuxhorn et al., 2002). Células com fenótipo de miofibroblastos aumentaram a expressão de vimentina e diminuíram a expressão de marcadores que identificaram células musculares lisas como a α -actina (Tuxhorn et al., 2002). Segundo Antonioli et al (2007), a marcação para α -actina foi presente na próstata de animais castrados, porém difusa entre as células estromais.

Embora a senescência celular seja um potente mecanismo supressor de tumor, estudos recentes mostraram que células senescentes desenvolveram atividades secretórias que podem induzir mudanças no microambiente tecidual, diminuindo seu controle sobre o comportamento celular e promovendo a tumorigênese (Coppe et al., 2010). Ainda, segundo Ahmad et al (2012), alguns tumores dependem do desequilíbrio na sinalização dos fatores de crescimento para o seu desenvolvimento e progressão, indicando tais fatores como bons alvos terapêuticos (Ahmad et al., 2012).

Concluindo, os resultados demonstraram que a administração de hormônios esteroides em

animais senis foi efetiva na próstata, levando à ocorrência de alterações estruturais e modificando o padrão de reatividade de moléculas importantes para o equilíbrio estrutural e molecular do microambiente prostático. Além disso, os resultados indicaram que a modificação do padrão de reatividade do EGFR no grupo senil colabora com o microambiente susceptível à processos proliferativos. Também, os resultados demonstraram que a ablação hormonal em animais senis, tanto androgênica quanto estrogênica, levou ao aumento na reatividade do EGFR, indicando a sinalização deste frente ao desequilíbrio hormonal tanto com predomínio de atividade androgênica como estrogênica, caracterizando esses hormônios como elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes vias ativadoras. Ainda, pode-se concluir que receptores para EGFR podem ser ativados de maneira andrógeno-independente, visto a reatividade aumentada de EGFR nos animais senis com ablação androgênica imposta pela castração. Além disso, no grupo castrado verificou-se alteração do padrão de distribuição da reatividade da α -actina indicando os andrógenos como possíveis responsáveis pelo padrão estrutural de distribuição desta molécula. Dessa forma, no microambiente hiperandrogênico ocorreu a reestruturação do padrão de reatividade da α -actina, indicando que a localização da α -actina é responsiva e orientada pela ação androgênica, garantindo integridade estrutural glandular, a qual é fundamental para a dinâmica funcional do órgão.

Além disso, a ablação estrogênica na senescência foi caracterizada pelo aumento de reatividade da prolactina indicando o desequilíbrio hormonal a favor dos andrógenos e/ou o não envolvimento direto das vias estrogênicas na atividade da prolactina. Assim, o aumento da reatividade da prolactina nesse grupo pode ser um dos fatores importantes no microambiente favorável à formação do estroma reativo, considerando simultâneo aumento de vimentina e diminuição de α -actina, o que indica aumento de miofibroblastos no tecido prostático. O

desequilíbrio causado pela ablação e/ou reposição hormonal não somente altera o feedback entre os hormônios esteróides como modifica a localização da reatividade das moléculas nos compartimentos prostáticos, alterando as sinalizações autócrinas e parácrinas dos estrógenos, EGF e prolactina, apontando esses como deflagradores da formação do estroma reativo.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp nº 2010/01739-1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA S, DIZEYI N, FEINSTEIN R, PIERZYNOWSKI S & ABRAHAMSSON PA. 2004. Long-term testosterone stimulation induces hyperplasia in the guinea-pig prostate. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7: 227-231.

AHMAD I, IWATA T, LEUNG HY. 2012. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823: 850-860.

ANTONIOLI E, CARDOSO AB, CARVALHO HF. 2007. Effects of Long-Term Castration on the Smooth Muscle Cell Phenotype of the Rat Ventral Prostate. *Journal of Andrology* 28: 777-783.

ATTIA DMA, EDERVEEN AGH. 2011. Opposing roles of ER α and ER β in the genesis and progression of adenocarcinoma in the rat ventral prostate. *Prostate* doi: 10.1002/pros.21507.

BANERJEE PP, BANERJEE S, DORSEY R, ZIRKIN BR & BROWN TR. 1994. Age- and lobe-specific responses of the Brown Norway rat prostate to androgen. *Biol Reprod.* 51: 675-684.

BANERJEE S BANERJEE PP, BROWN TR. 2000. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology* 141: 821-822.

BANERJEE PP, BANERJEE S & BROWN TR. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology* 142: 4066-4075.

BARTKE A. 2004. Prolactin in the male: 25 years later. *Journal of Andrology* 25: 661-666.

BIANCO JJ, HANDELSMAN DJ, PEDERSEN JS, RISBRIDGER GP. 2002. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology* 143: 4922-33.

- CÂNDIDO EM, FÁVARO WJ, MONTICO F, HETZL AC, CAGNON VHA. 2012. Senescence and steroid hormone receptor reactivities in accessory sex glands of elderly rats (Sprague-Dawley) following exogenous hormonal therapy. *Tissue and Cell* 44: 227-237.
- COPPÉ JP, DESPREZ PY, KRTOLICA A et al. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 5: 99-118.
- CORDEIRO RS, SCARANO WR, CAMPOS SG, SANTOS FC, VILAMAIOR PS, GÓES RM, TABOGA SR. 2008. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 39: 1312-1324.
- CUNHA GR, HAYWARD SW, WANG YZ. 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70: 473-485.
- DAGVADORJ A, COLLINS, JOMAIN JB, ABDULGHANI J et al. 2007. Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via Janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway. *Endocrinology* 148: 3089-3101.
- DAVIES P, EATON CL. 1991. Regulation of prostate growth. *J Endocrinol.* 131: 5-17.
- ELLEM SJ, RISBRIDGER GP. 2009. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 1155: 174-186.
- GABBIANI G, HIRSCHL BJ, RYAN GB. et al. 1972. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med.* 135: 719.
- GILLERAN JP, PUTZ O, DEJONG M et al. 2003. The role of prolactin in the prostatic inflammatory response to neonatal estrogen. *Endocrinology* 144: 2046-54.
- HÄRKÖNEN PL, MÄKELÄ SI. 2004. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 297-305.
- HAYWARD SW, CUNHA GR, DAHIYA R. 1996. Normal development and carcinogenesis of the prostate. A unifying hypothesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 784: 50-62.
- HO CK, HABIB FK. 2011. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat Rev Urol* 8: 29-41.
- IMAMOV O, SHIM GJ, WARNER M, GUSTAFSSON JA. 2005. Estrogen receptor beta in health and disease. *Biol. Reprod.* 73: 866-71.
- INGELMO I, GÓMEZ V, MARTÍN R, CODESAL J, RODRÍGUEZ R, POZUELO JM, SANTAMARÍA L. 2007. Effect of prolactin and bromocriptine on the population of prostate neuroendocrine cells from intact and cyproterone acetate-treated rats: stereological and immunohistochemical study. *Anat. Rec.* 290: 855-861.
- JARRED RA, McPHERSON SJ, BIANCO JJ, COUSE JF, KORACH KS, RISBRIDGER GP. 2002. Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol. Met.* 13: 163-168.

- JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, BRENTANI R. 1979. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem.* 11: 447-455.
- KRIEG M, NASS R, TUNN S. 1993. Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 375-381.
- LATIL A, BIECHE I, VIDAUD D. et al. 2001. Evaluation of androgen, estrogen (ER α and ER β), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res.* 60: 1919-26.
- LAU KM, TAM NN, THOMPSON C, CHENG RY, LEUNG YK, HO SM. 2003. Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. *Lab Invest.* 83: 743-757.
- LEAV I, MERK FB, KWAN PW, HO SM. 1989. Androgen-supported estrogen-enhanced epithelial proliferation in the prostates of intact Noble rats. *Prostate* 15:23-40.
- MARCELLI M, ITTMANN M, MARIANI S et al. 2000. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60: 944-9.
- MORALES A. 2002. Androgen replacement therapy and prostate safety. *Eur Urol.* 41: 113-120.
- MORRISSEY C, BUSER A, SCOLARO J, O'SULLIVAN J, MOQUIN A & TENNISWOOD M. 2002. Changes in hormone sensitivity in the ventral prostate of aging Sprague-Dawley rats. *J Androl.* 23: 341-351.
- NELLEMANN C, DALGAARD M, HOLST B, BONEFELD-JORGENSEN EC, VINGGAARD AM. 2005. Gene expression changes in rat prostate after activation or blocking of the androgen and estrogen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 237: 25-35.
- NEVALAINEN MT, VALVE EM, AHONEN T, YAGI A, PARANKO J, HARKONEN PL. 1997. Androgen-dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium in vivo and in organ culture. *FASEB J.* 11: 1297-1307.
- OCRIKM J, LALANI EL-N, ABEL P. 2006. Therapy Insight: parenteral estrogen treatment for prostate cancer--a new dawn for an old therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 10: 552-63.
- PRINS GS, BIRCH L, COUSE JF, CHOI I, KATZENELLENBOGEN B, KORACH KS. 2001. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res* 61: 6089-6097.
- RICKE WA, MCPHERSON SJ, BIANCO JJ, CUNHA GR, WANG Y, RISBRIDGER GP. 2008. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB J.* 22: 1512-1520.
- RISBRIDGER GP, BIANCO JJ, ELLEM SJ et al. 2003. Oestrogens and prostate cancer. *Endoc Relat Cancer* 10: 187-191.

- ROSE DP, CONNOLLY JM. 1990. Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture. *Cancer Res.* 50: 7139-44.
- 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.
- RUFFION A, AL-SAKKAF KA, BROWN BL et al. 2003. The survival effect of prolactin on PC3 prostate cancer cells. *Eur Urol* 43: 301-8.
- SALVATORI L, FRANCESCA CAPORUSCIO F, VERDINA A et al. 2012. Cell-to-Cell Signaling Influences the Fate of Prostate Cancer Stem Cells and Their Potential to Generate More Aggressive Tumors. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0031467.
- SCARANO WR, VILAMAIOR PSL & TABOGA SR. 2006. Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. *Anat Rec A*. 288: 1190-1200.
- TAYLOR RA, RISBRIDGER GP. 2008. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation* 76: 671-68.
- TOMAS D, KRUSLIN B. 2004. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 61: 324-31.
- TUXHORN JA, MCALHANY SJ, DANG TD et al. 2002. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Research* 62: 3298-3307.
- TUXHORN JA, AYALA GE, ROWLEY DR. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol.* 166: 2472-2483.
- VILAMAIOR PS, 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 :253-8.
- VISAKORPI T, KALLAIONIEMI OP, KOIVULA T et al. 1992. Expression of epidermal growth factor receptor and ERBB2 (HER-2/Neu) oncoprotein in prostatic carcinomas. *Mod Pathol* 6: 643-8.
- WEIHUA Z, WARNER M, GUSTAFSSON JA. 2002. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* 193: 1-5.
- ZHANG N, SANDERS AJ, YE L, KYNASTON HG et al. 2009. Vascular endothelial growth inhibitor, expression in human prostate cancer tissue and the impact on adhesion and migration of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 35: 1473-80.

LEGENDAS

Figura 1. Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de ratos jovens, senis e castrados. Grupo Jovem: **A e B** Ácinos glandulares com mucosa pregueada. Epitélio secretor simples com células colunares e células basais (Cb). Estroma prostático com células musculares lisas entremeadas por fibras colágenas (Col). Grupo Senil: **C e D** Epitélio secretor simples com células colunares e células basais (Cb). Estroma prostático com infiltrado de células inflamatórias (Ci). Grupo Castrado: **E e F** Ácinos com mucosa pouco pregueada e atrofia epitelial. Células luminais de aspecto cúbico. Presença de microácinos (asterisco) e células inflamatórias (Ci). **Ep:** epitélio; **Es:** estroma; **L:** lúmen.

Figura 2. Fotomicrografias do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos TAM, RETEST e REEST. Grupo TAM: **A e B** Ácinos glandulares com mucosa pouco pregueada e epitélio cúbico. Presença de microácinos (asterisco). Hipertrofia estromal. Grupo RETEST: **C e D** Epitélio secretor com células cubóides e colunares. Hipertrofia estromal. Grupo REEST: **E e F** Atrofia e desorganização do epitélio secretor. Ausência de pregueamento da mucosa e presença de microácinos (asterisco). Estroma hipertrófico e hiperplásico. **Ep:** epitélio; **Es:** estroma; **L:** lúmen.

Figuras 3 (a, d, g, i): Grupo JOV. (a) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e moderada nas células estromais. (d) Fraca imunoreatividade para PR (**setas**) no epitélio secretor e no estroma prostático. (g) Intensa imunoreatividade para α -actina (**seta**) na interface epitélio-estroma. (i) Fraca imunoreatividade para EGFR (**setas**) no epitélio secretor e moderada no estroma prostático. **a, d, g, i:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 3 (b, e, h, k): Grupo SE. (b) Moderada imunoreatividade de AR (**setas**) no núcleo das células epiteliais secretoras e fraca nas células estromais. (e) Moderada imunoreatividade de PR (**setas**) no epitélio secretor e fraca no estroma prostático. (h) Intensa imunoreatividade para α -actina (**setas**) na interface epitélio-estroma. (k) Moderada imunoreatividade para EGFR (**setas**) no epitélio e fraca no estroma prostático. **b, e, h, k:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 3 (c, f, i, l): Grupo CAS. (c) Fraca imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais e nas células estromais. (f) Fraca imunoreatividade de PR (**setas**) no epitélio e intensa no estroma prostático. (i) Intensa imunoreatividade para α -actina (**setas**) no estroma prostático. (l) Moderada imunoreatividade para EGFR (**setas**) nas células epiteliais e intensa no estroma prostático. **c, f, i, l: Ep** – epitélio secretor, **L** - lúmen e **St** – estroma.

Figuras 4 (a, d, g, j): Grupo TAM. (a) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) no epitélio prostático e moderada no estroma. (d) Moderada imunoreatividade para PR (**setas**) no epitélio e intensa no estroma. (g) Moderada imunoreatividade para α -actina (**setas**) na interface epitélio-estroma. (j) Moderada imunoreatividade para EGFR (**seta**) no epitélio secretor e no estroma prostático. **a, d, g, j: Ep** - epitélio; **L** - lúmen; **St** – estroma.

Figuras 4 (b, e, h, k): Grupo RETEST. (b) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (e) Moderada imunoreatividade para PR (**setas**) nas células epiteliais e fraca no estroma. (h) Intensa imunoreatividade para α -actina (**setas**) na interface epitélio-estroma. (k) Moderada imunoreatividade para EGFR (**seta**) no epitélio secretor e fraca no estroma. **b, e, h, k: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 4 (c, f, i, l): Grupo REEST. (c) Moderada imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (f) Moderada imunoreatividade para PR (**setas**) nas células epiteliais e fraca nas células estromais. (i) Moderada imunoreatividade para α -actina (**setas**) na interface epitélio-estroma. (l) Intensa imunoreatividade para EGFR (**seta**) no epitélio secretor e moderada no estroma. **c, f, i, l: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 5 (a, d, g): Grupo JOV. (a) Fraca imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e nas células estromais. (d) Fraca imunoreatividade para Vimentina (**setas**) no estroma prostático adjacente aos ácinos. (g) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) no compartimento epitelial e fraca no estromal. **a, d, g: Ep** – epitélio secretor, **St** – estroma.

Figuras 5 (b, e, h): Grupo SE. (b) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células

epiteliais secretoras e fraca no estroma prostático. (e) Moderada imunoreatividade para Vimentina (**setas**) no estroma adjacente aos ácinos. (h) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras. **b, e, h:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 5 (c, f, i): Grupo CAS. (c) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. (f) Fraca imunoreatividade para Vimentina (**setas**) no estroma prostático. (i) Fraca imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. **c, f, i:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 6 (a, d, g): Grupo TAM. (a) Fraca imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e nas células estromais. (d) Moderada imunoreatividade para Vimentina (**setas**) no estroma prostático adjacente aos ácinos. (g) Fraca imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e nas células estromais. **a, d, g:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen, **St** – estroma.

Figuras 6 (b, e, h): Grupo RETEST. (b) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e fraca no estroma prostático. (e) Fraca imunoreatividade para Vimentina (**setas**) no estroma adjacente aos ácinos. (h) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e fraca no estroma prostático. **b, e, h:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 6 (c, f, i): Grupo REEST. (c) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e intensa no estroma. (f) Fraca imunoreatividade para Vimentina (**setas**) no estroma prostático. (i) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. **c, f, i:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Tabela 1. Intensidade de imunoreatividade dos receptores AR, PR, ER α , ER β , EGFR, α -actina e vimentina .

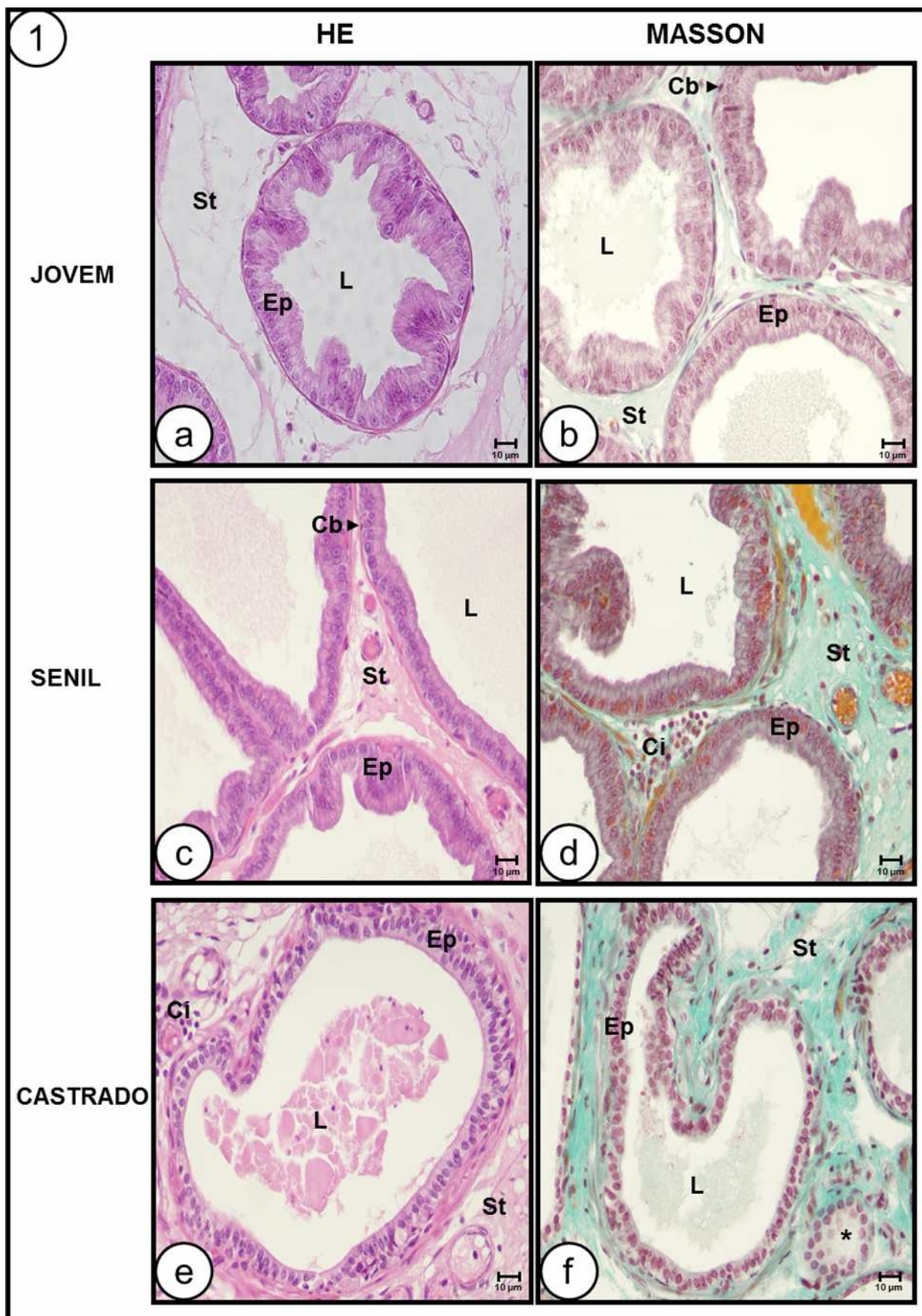
Antígenos	GRUPOS					
	JOVEM		SENIL		CASTRADO	
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma
AR	3	2	2	1	1	1
PR	1	1	2	1	1	3
ER α	1	1	2	1	2	2
ER β	2	1	2	0	1	1
EGFR	1	2	2	1	2	3
α -actina		3		3	0	3
Vimentina	0	1	0	2	0	1

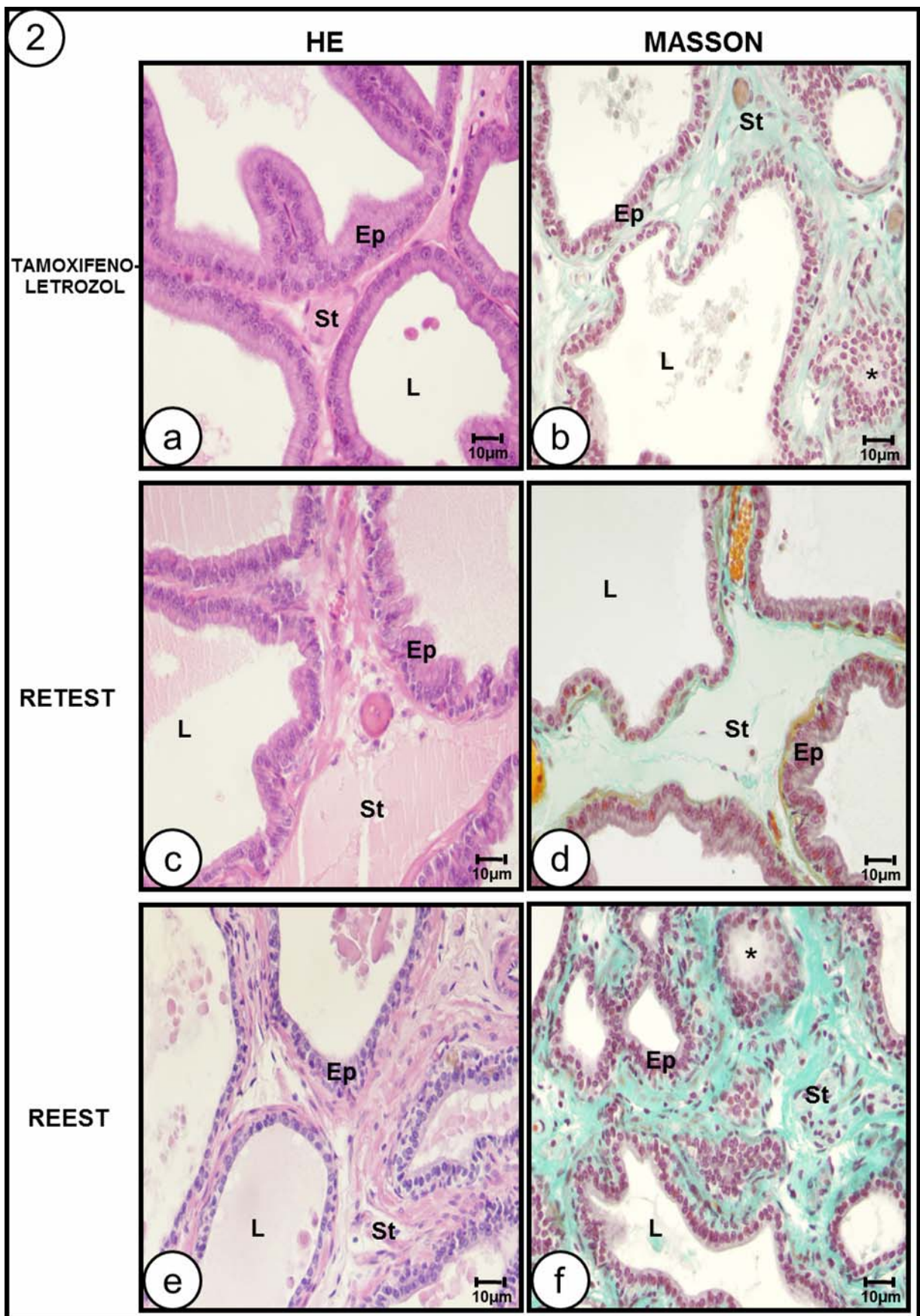
0 (0%), 1 (< 33%), 2 (33% - 66%), 3 (> 66%)

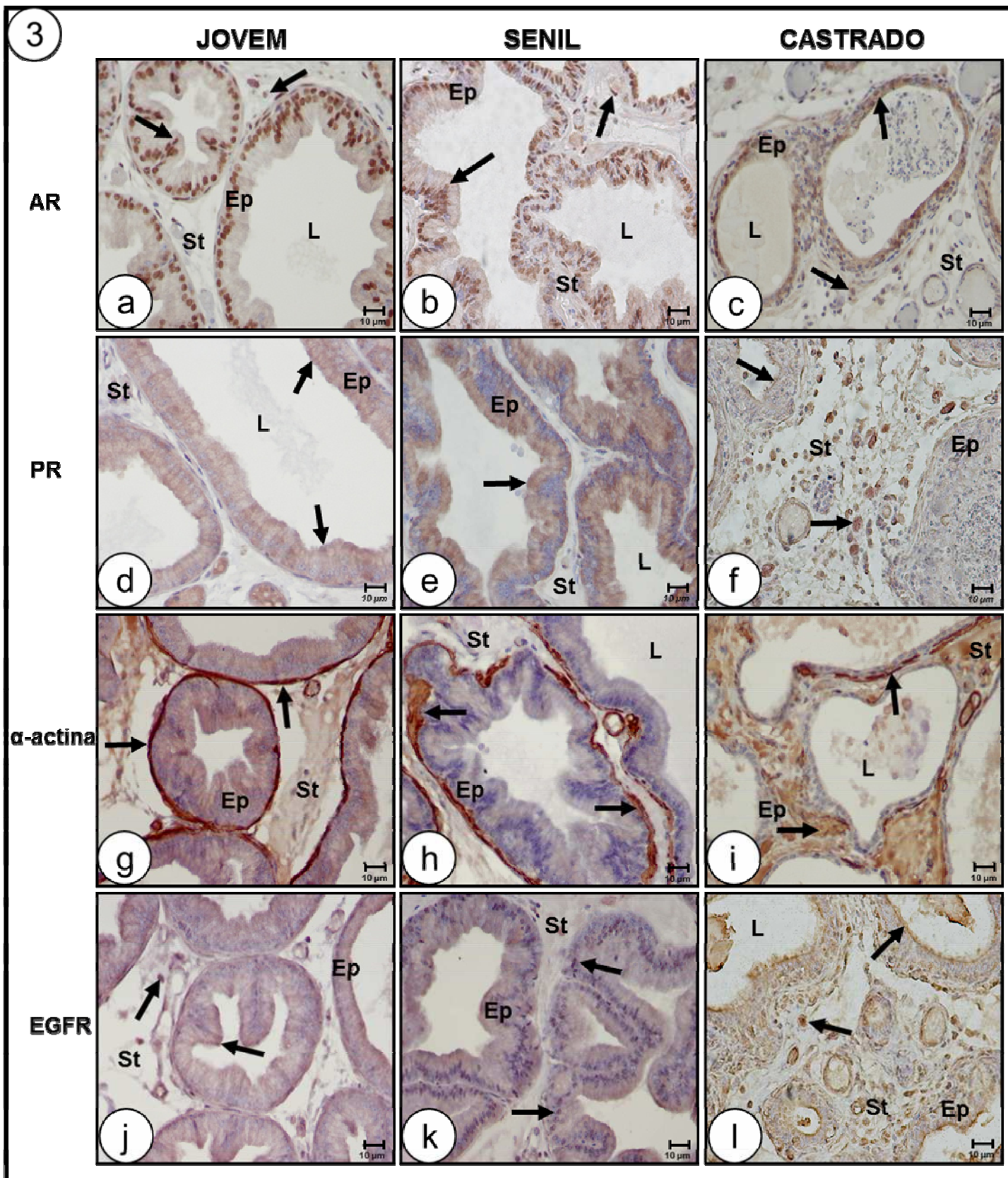
Tabela 2. Imunoreatividade dos receptores AR, PR, ER α , ER β , EGFR, α -actina e vimentina.

Antígenos	GRUPOS					
	TAM		RETEST		REEST	
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma
AR	3	2	3	3	2	2
PR	2	3	2	1	2	1
ER α	1	1	2	1	2	3
ER β	1	1	2	1	2	2
EGFR	2	2	2	1	3	2
α -actina	2		3		2	
Vimentina	0	2	0	1	0	1

0 (0%), 1 (< 33%), 2 (33% - 66%), 3 (> 66%)







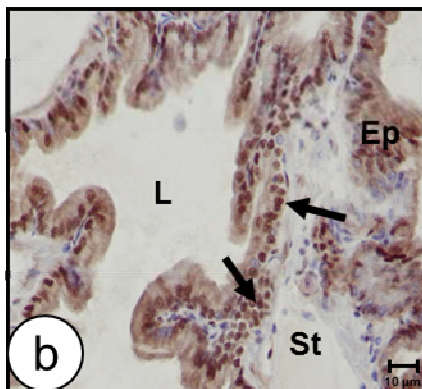
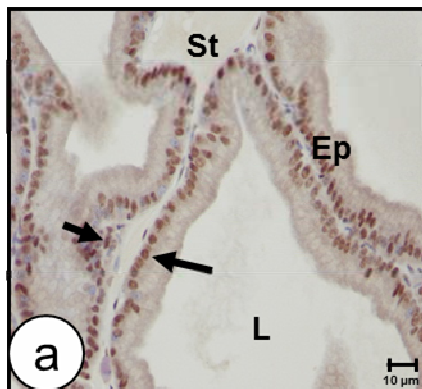
4

TAMOXIFENO

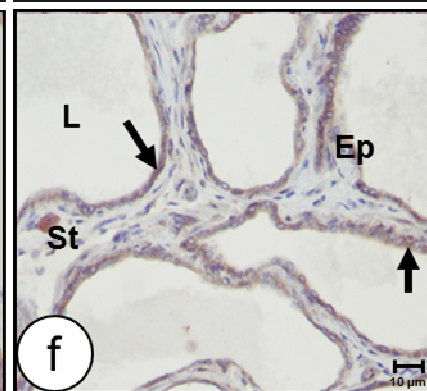
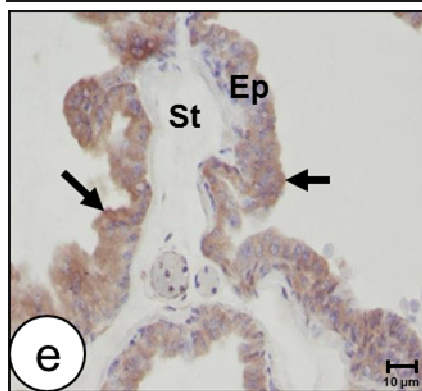
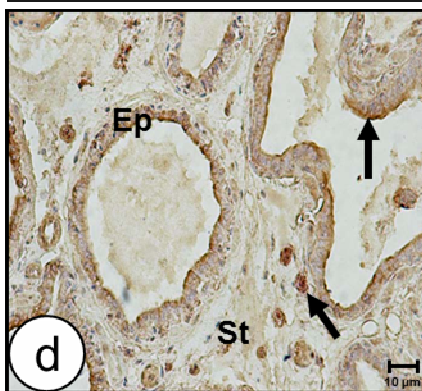
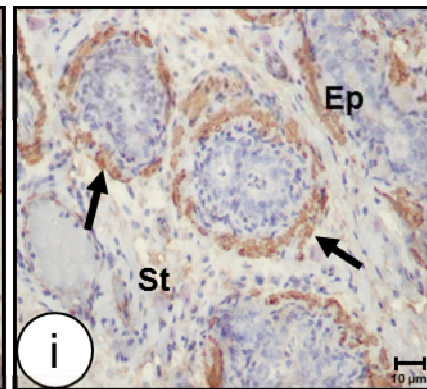
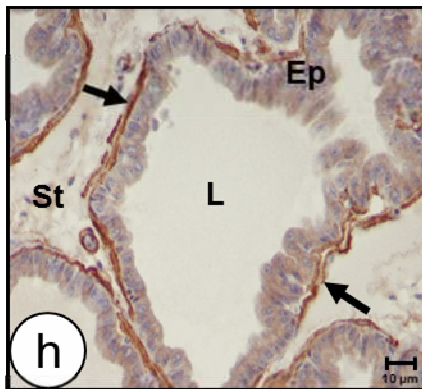
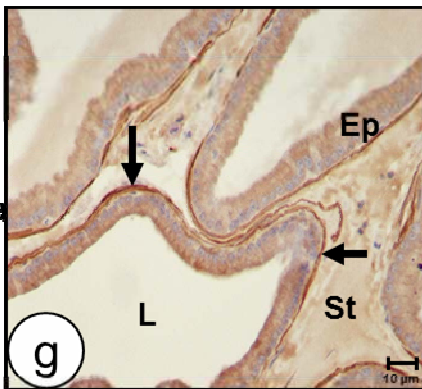
RETEST

REEST

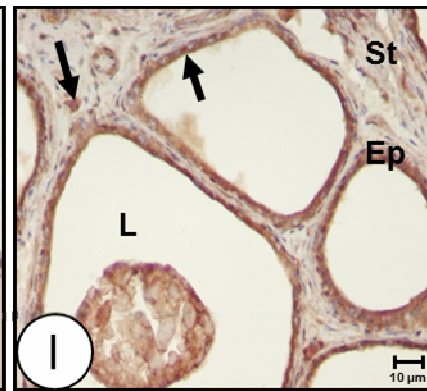
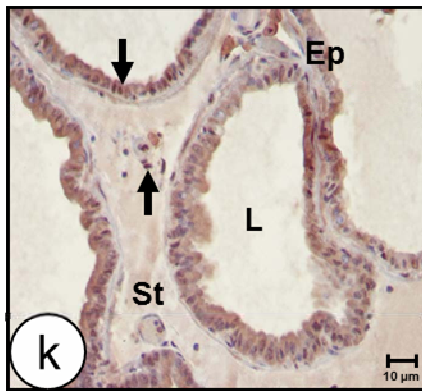
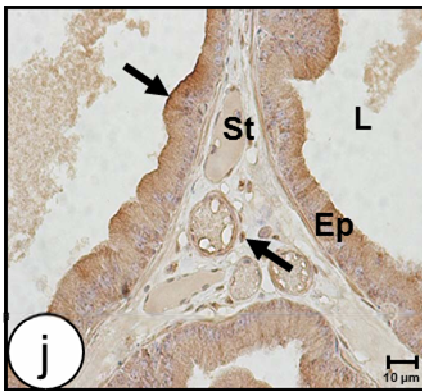
AR

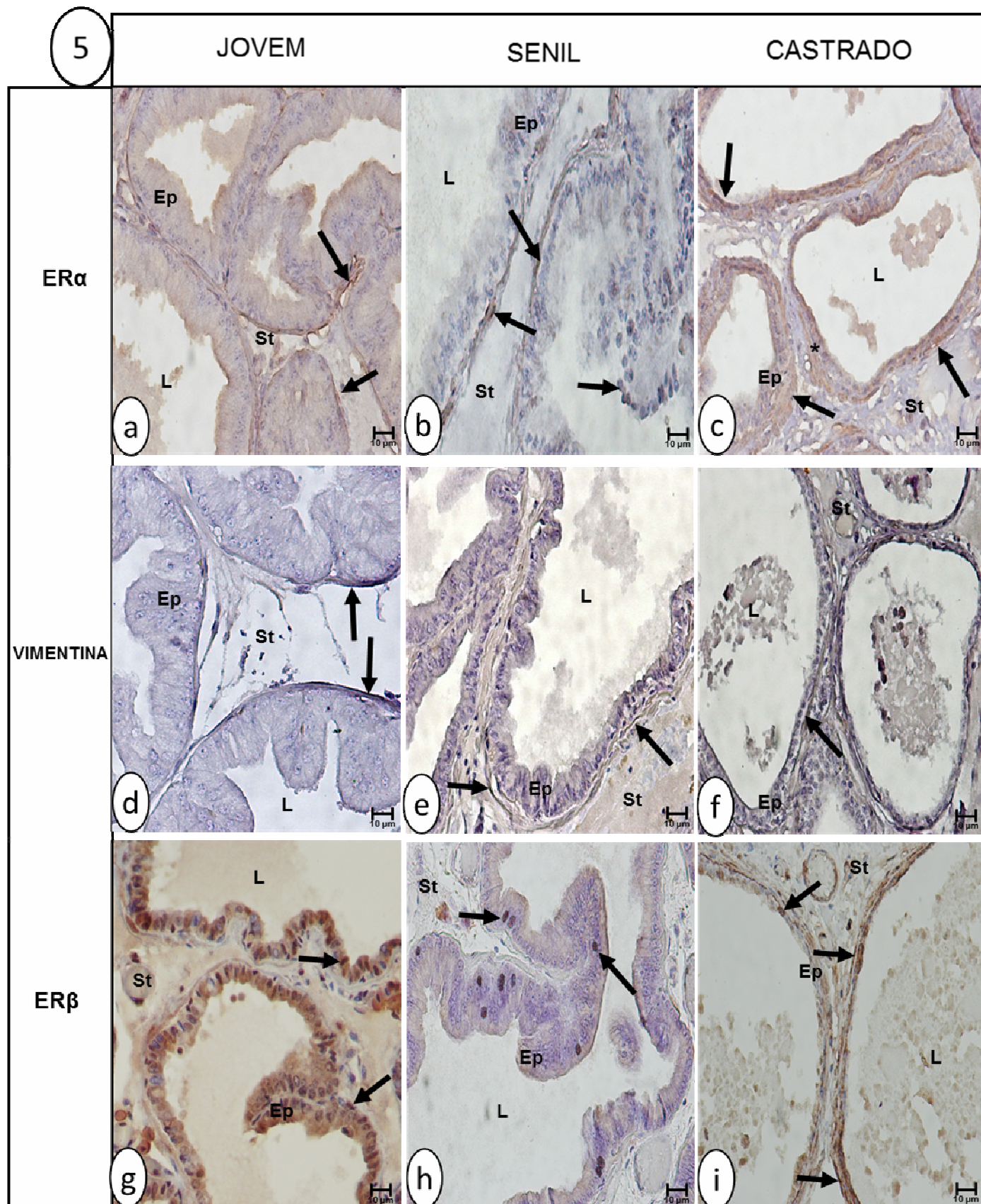


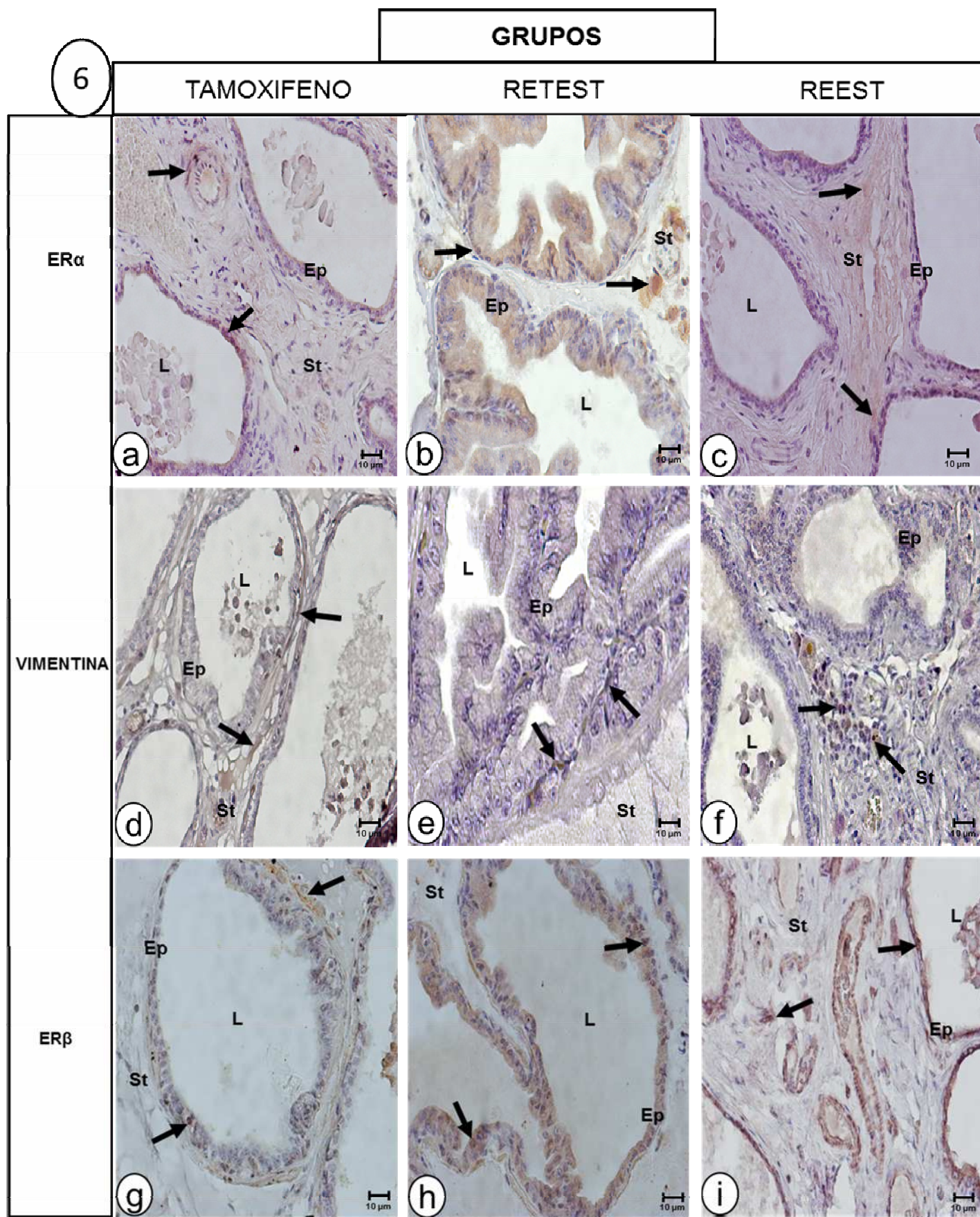
PR

 α -actina

EGFR







“Microambiente Prostático na senescência: Fatores de Crescimento Fibroblástico x Desequilíbrio Hormonal”

Hetzl AC¹, Montico F¹, Lorencini RM¹, Kido LA¹, Cândido EM¹, Cagnon VHA¹

1 – Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Short Title: Fatores de Crescimento e desequilíbrio hormonal na senescência

Correspondência para: Valéria H. A. Cagnon PhD, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brasil. Telefone: +(55) 19-3521-6103. Fax: +(55) 19-3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br

RESUMO

OBJETIVO: O objetivo desse estudo foi caracterizar e correlacionar as reatividades dos receptores androgênicos (AR) e estrogênicos α e β (ER α , ER β) aos receptores dos fatores de crescimento fibroblásticos (FGFR2, FGFR7 e FGFR8) nos compartimentos epitelial e estromal na senescência frente ao desequilíbrio de hormônios esteroides na próstata de ratos.

MÉTODOS: 50 ratos com 10 meses de idade e 10 ratos com 4 meses de idade foram divididos em 6 grupos: Jovem (JOV), Senil (SE), Castrado (CAS), Tamoxifeno-Letrozol (TAM), Tamoxifeno-Letrozol + Testosterona (RETEST), Castrado + Estradiol (REEST).

RESULTADOS: Foi observada diminuição de AR e ER β , e aumento de ER α nos animais senis. Já, na hiperestrogenização as reatividades de ER α e ER β apresentaram-se aumentadas com localização tecidual diferencial de seus receptores considerando os animais senis. No ambiente hipoestrogênico foi observada diminuição de ER α e ER β , além de aumento do AR em relação ao grupo senil. Na hiperandrogenização foi observado aumento de AR e ER- β , enquanto que no grupo castrado foi caracterizada diminuição desses receptores, e aumento de ER α em relação ao grupo senil. Os resultados mostraram aumento dos FGFRs na próstata de ratos senis, enquanto que tanto na hiperandrogenização como na hiperestrogenização verificou-se diminuição do FGFR2 em relação ao grupo senil. Já, o FGFR2 apresentou-se aumentado no estroma dos grupos CAS e TAM em relação ao SE e no epitélio do grupo TAM em relação aos demais grupos. Embora a imunolocalização para FGFR8 tenha sido aumentada nos diferentes grupos experimentais, pode-se destacar maior aumento no grupo RETEST. Entretanto, o FGFR8 apresentou-se aumentado no estroma dos grupos CAS e TAM em relação ao SE. Já no grupo RETEST, foi observado aumento de FGFR8 no epitélio.

CONCLUSÃO: A ablação hormonal nos animais senis levou ao aumento na identificação dos FGFRs, sugerindo interações entre os hormônios e suas vias de sinalização e o microambiente prostático senil. Pode-se concluir que a ativação dos FGFRs pode ser regulada de maneira andrógeno-independente, visto que esses apresentaram níveis de detecção aumentados mesmo diante da intensa depleção androgênica imposta pela castração. Tanto o excesso de andrógeno quanto de estrógeno no microambiente prostático não sinalizaram os processos proliferativos através do FGFR2. Entretanto, o aumento do FGFR2 nos grupos que sofreram ablação androgênica e estrogênica indicou que a ablação hormonal na senescência levou ao desequilíbrio da sinalização desse fator. O aumento do FGFR2 no epitélio do grupo com ablação estrogênica sugeriu que esse microambiente favoreceu a sinalização parácrina desse fator. Entretanto, o FGFR2 e FGFR8 apresentaram-se aumentados no estroma dos grupos CAS e TAM, indicando a ablação hormonal como possível sinalizadora autócrina desses fatores. Além disso, a reatividade do FGFR8 foi maior no ambiente hiperandrogênico, sugerindo um maior envolvimento do andrógeno na sinalização desse fator. Ainda, pode-se concluir que receptores para FGF7 podem ser ativados de maneira andrógeno-independente, visto a reatividade aumentada de FGFR7 nos animais senis com ablação androgênica imposta pela castração. Dessa forma, pode-se concluir que a ablação hormonal favoreceu o microambiente à ativação e/ou sinalização dos fibroblastos.

INTRODUÇÃO

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) e seus receptores (FGFRs) desenvolvem papéis importantes na regulação da proliferação celular, sobrevivência, migração e diferenciação durante o desenvolvimento e vida adulta (Wesche et al., 2011). A expressão dos FGFs é parcialmente regulada pelos andrógenos (Cotton et al., 2008). Porém, os mecanismos de ação entre AR e FGF ainda não são conhecidos (Cotton et al., 2008).

O desequilíbrio na sinalização dos FGFRs, por outro lado, tem sido associado a muitas síndromes, incluindo o câncer humano (Wesche et al., 2011). Alterações nos FGFRs são detectadas em uma variedade de cânceres humanos, tal como, câncer de mama, de bexiga, de próstata, endometrial e pulmonar (Wesche et al., 2011). Evidências apontaram que os FGFs e os FGFRs podem promover meios para a progressão do câncer através da mitogênese, angiogênese e invasão, bem como promovendo transição epitélio-mesênquima (Wesche et al., 2011). Além disso, os FGFs e FGFRs constituem um sistema complexo de sinalização que comanda muitas cadeias sinalizadoras e respostas biológicas, sendo sua regulação negativa crucial para a terapia do câncer (Wesche et al., 2011).

Os FGFs, em particular o FGF2, auxiliam na auto-renovação das células embriogênicas humanas e são rotineiramente usados para cultivar tais células em laboratório (Lanner & Rossant, 2010). Segundo Lin et al (2007), a ruptura da sinalização do FGFR2 na próstata reduziu significativamente a população de células basais. O FGF7 tem efeito negativo na manutenção das propriedades da célula basal em cultura celular por promover a diferenciação celular (Heer et al., 2006). No entanto, Lien et al (2007) sugeriram que a sinalização do FGFR2 é essencial para manutenção da população de células basais na próstata.

A relação entre células estromais/mesenquimais e células epiteliais na próstata tem papel importante durante o desenvolvimento, mas também participa na manutenção da homeostase tecidual no adulto (Wesche et al., 2011). Essa relação é fundamental na progressão do câncer prostático e metástase (Karlou et al., 2010). Os membros da família FGF/FGFR são mediadores da comunicação entre epitélio e estroma (Kwabi-Addo et al., 2004). Células estromais prostáticas normais produzem muitos FGFs, incluindo FGF2, FGF7 e FGF9, enquanto que células epiteliais expressam receptores correspondentes (Kwabi-Addo et al., 2004). A supra-regulação e liberação estromal do FGF2 tem efeito promotor de tumor nas células epiteliais vizinhas (Yang et al., 2008). A expressão dos FGFs nas

células epiteliais pode atrapalhar a interação epitélio-estroma através da sinalização autócrina no epitélio, o que pode eventualmente levar a tumorigênese (Wesche et al., 2011). Alta expressão de FGF8 no epitélio prostático tem sido associada à diminuição da sobrevivência do paciente (Dorkin et al., 1999).

O desbalanço hormonal causa diversas alterações morfofuncionais na próstata (Roy-Burman et al., 2004). Dessa forma, as alterações dos níveis endógenos de hormônios esteroides durante o período da senescência contribuem fortemente para o desequilíbrio glandular. Segundo Smith et al (2002), a expressão de AR e ER α estão associadas com altos níveis de FGF2 e FGF7. A síntese de FGF2 e FGF7 parece estar sobre controle androgênico, no entanto, a correlação entre FGF2 e ER sugere que a ativação do ER poderia estar envolvida nessa síntese.

Está claro que há diferentes componentes envolvidos na sinalização do FGF na próstata e que muitos desses são desregulados no câncer (Murphy et al., 2010). A sinalização do FGF tem papel importante no início do câncer prostático bem como na progressão (Acevedo et al., 2007; Memarzadeh et al., 2007). Dessa forma, considerando a importante variação hormonal durante a senescência, bem como seu papel no desenvolvimento e progressão das lesões prostáticas, o objetivo desse estudo foi caracterizar e correlacionar os receptores androgênicos e estrogênicos α e β em relação aos FGFR2, FGFR7 e FGFR8 nos compartimentos epitelial e estromal da próstata de animais senis sob diferentes condições hormonais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos Experimentais em Amostras Prostáticas de Ratos

No presente trabalho foram utilizados 50 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, com 10 meses de idade (SE, CAS, TAM, RETEST e REEST), e 10 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley com 4 meses de idade (JOV), obtidos no centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/ UNICAMP). Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (10 animais cada) (Comitê de ética n° 2412-1):

- a. **Grupo Jovem (JOV):** receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias;
- b. **Grupo Senil (SE):** receberam injeções subcutâneas de 5 mL/Kg de peso corpóreo de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias;

- c. **Grupo Castrado (CAS):** a remoção de andrógenos foi feita através da castração cirúrgica e química. Para a castração cirúrgica, os animais foram anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) com posterior retirada dos testículos. Posteriormente a cirurgia, os animais foram submetidos ao tratamento de castração química com injeções subcutâneas de 10 mg/Kg de Flutamida (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA*) diluídos em 10 mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Shin et al. 2002);
- d. **Grupo Tamoxifeno-Letrozol (TAM):** receberam injeções subcutâneas de 1mg/Kg de tamoxifeno (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*) diluídos em 1mL de óleo de amendoim a cada 48h por 30 dias para o bloqueio dos receptores estrogênicos (ER α e ER β) (Tilley et al., 1987). Para bloquear a aromatização da testosterona resultando em estrógenos, os animais receberam injeções subcutâneas de 1mg/Kg de letrozol (*LET-Femara, Novartis-Pharma, Basiléia, Suíça*) diluídos em 1mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Tobin & Canny, 1998).
- e. **Grupo Castrado + Estrógeno (REEST):** a remoção de andrógenos foi feita através da castração cirúrgica e química. Após a castração, similar ao realizado para o grupo Castrado, os animais receberam injeções subcutâneas de 25 μ g/Kg de peso corpóreo de 17 β -estradiol (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA*) diluídos em 25 μ L de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Prins et al., 2001);
- f. **Grupo Tamoxifeno-Letrozol + Andrógeno (RETEST):** Posteriormente ao tratamento similar ao grupo Tamoxifeno-letrozol, os animais receberam injeções subcutâneas de 5mg/Kg de peso corpóreo de Cipionato de Testosterona (*Deposteron, Novaquímica, São Paulo, Brasil*) diluídos em 5 mL de óleo de amendoim em dias alternados por 30 dias (Sáttolo et al., 2004).

Os animais dos seis grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, PR, Brasil*). Após 30 dias de tratamento, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500, anestesiados com Cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*) e posteriormente, sacrificados. Amostras do lobo ventral foram coletadas dos animais de cada grupo experimental e submetidas às análises de imunohistoquímicas e western

blotting, além das dosagens hormonais.

Imunomarcção dos Receptores Androgênicos (AR), Estrogênicos α e β (ER α e ER β), FGFR2, FGFR7 e FGFR8.

Amostras prostáticas de 5 animais senis de cada grupo foram utilizadas para as imunomarcações. A seguir cortes com cinco micrômetros de espessura foram obtidos no micrótomo (Hyrax M60, Zeiss, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos AR, ER α , ER β , FGFR2, FGFR7 e FGFR8 foram localizados através dos anticorpos: policlonal rabbit AR-N20 (sc-816) (Santa Cruz Biotchnology, EUA) para AR, monoclonal mouse clone 1D5 (Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, EUA) para ER α , policlonal rabbit 06-629 (Upstate, EUA) para ER β , policlonal rabbit (147) (sc-79) (Santa Cruz Biotchnology, EUA) para FGFR2, policlonal goat (sc-1365) (Santa Cruz Biotechnology, EUA) para FGFR7, policlonal rabbit ab81384 (Abcam, EUA) para FGFR8, diluídos (1:35-50) em BSA 1% e armazenados overnight a 4 °C. O kit Envision HRP (Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA) foi usado para detecção dos antígenos. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Verde Metila e Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão). Os cortes prostáticos dos 5 animais senis de cada grupo foram avaliados através do precipitado acastanhado de diaminobenzidina (DAB), o qual indica a imunoreatividade dos anticorpos. A distribuição da imunoreatividade do antígeno foi graduada como 0 para marcação negativa (0%), 1 para marcação fraca (< 33%), 2 para marcação moderada (33% - 66%) e 3 para marcação intensa (> 66%) de acordo com a frequência e positividade dos antígenos no tecido (modificado de Tomas & Kruslin, 2004).

Microdissecção Manual

Para a microdissecção manual foi utilizado um sistema comercial de microdissecção manual (MicroDissector PPMD; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) anexo a um microscópio invertido (IX71-II, Olympus, Califórnia, EUA). O sistema consiste de uma ferramenta de corte e uma micropipeta eletrônica montadas em um *joystick* que controla os micromanipuladores motorizados em três eixos de direção. Amostras do lobo ventral foram coletadas de 5 animais senis, de cada grupo experimental, fixadas em Bouin e inclusos em parafina e polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais fixados em Bouin foram seccionados em micrótomo (Hyrax M60, Zeiss, Alemanha) com espessura de 10 micrômetros. Cinco cortes por animal foram montados em lâminas para serem microdissecados. Os cortes fixados em Bouin foram desparafinados em estufa à 60°C por 1 hora e posteriormente, desidratados e lavados em xilol. À seguir, esses cortes foram cobertos com 50 µl de solução basal e com o uso do microscópio, as áreas de interesse foram dissecadas. Dez campos selecionados a partir de cortes seriados e previamente analisados morfológicamente de cada animal, resultando em 50 campos por grupo com objetiva de 40x foram utilizados para a microdissecção. A micropipeta e a ferramenta de corte se posicionaram próximo à área a ser dissecada, com uma distância entre a ponta da agulha e o material a ser dissecado de 10 a 20 µm. Para as análises de western blotting, os compartimentos epitelial e estromal dissecados foram transferidos, isoladamente, para um tubo e submetidos aos protocolos específicos para as referidas análises.

Extração de proteínas e western blotting

As análises de western blotting foram realizadas para o epitélio e o estroma isolados e também para o órgão inteiro (lobo ventral), conforme molécula avaliada. Para a análise das amostras microdissecadas de 05 animais, foram utilizados os mesmos descritos para a microscopia de luz. Tanto as amostras microdissecadas do epitélio quanto do estroma de cada animal foram isoladas em tubos individuais com tampão de extração contendo 100 mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 10% (v/v) Triton X-100 and 10 µl/ml de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Para o órgão inteiro, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio do Polytron em tampão de extração igual ao utilizado nas amostras microdissecadas. Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (*Bio-Rad protein assay*) e o correspondente médio de 120µg de proteínas foi aplicado no gel de poliacrilamida para amostras

microdissecadas e 100µg para o órgão inteiro. Após eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose (Amersham). As membranas foram então bloqueadas com 3% BSA diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com policlonal *rabbit* AR-N20 (sc-816) (Santa Cruz Biotchnology, EUA) para AR, monoclonal *mouse* clone 1D5 (Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, EUA) para ER α , policlonal *rabbit* 06-629 (Upstate, EUA) para ER β , policlonal *rabbit* (147) (sc-79) (Santa Cruz Biotchnology, EUA) para FGFR2 (amostras microdissecadas e lobo inteiro), policlonal *goat* (sc-1365) (Santa Cruz Biotchnology, EUA) para FGFR7, policlonal *rabbit* ab81384 (Abcam, EUA) para FGFR8 (amostras microdissecadas e lobo inteiro), na faixa de diluição de 1:350-1000. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit*, *anti-mouse* e *anti-goat* HRP conjugados na faixa de diluição de 1:2500-10000 em 1% BSA. Para detectar as bandas reativas, as membranas foram expostas à solução de quimiluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) por 5 min e a captura de fluorescência foi realizada utilizando-se o aparelho G-Box Chemi e o software de aquisição de imagem GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK). O anticorpo para β -actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens NIS-Elements: Advanced Research (USA).

Dosagens Hormonais Plasmáticas

Amostras de sangue foram obtidas após 24 horas da última administração de hormônios sexuais esteroides e bloqueadores hormonais, de dez animais de cada grupo experimental, através de punção cardíaca, no ventrículo esquerdo. O plasma foi separado por centrifugação (10000 rpm, -4°C por 10 minutos) e armazenado a -20° C para subseqüentes análises. As concentrações de testosterona e estradiol foram mensuradas por radioimunoensaio usando os kits *Coat-a-Count total testosterone/estrogen* (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA). As concentrações hormonais plasmáticas foram expressas em ng/dL e pg/dL.

Análise Estatística

Os parâmetros quantificados nas análises de Western Blotting foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos. Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de

5% (Zar et al., 1999).

RESULTADOS

Dosagens hormonais plasmáticas

Os níveis médios de testosterona do grupo SE foram significativamente maiores em relação aos encontrados nos grupos CAS, TAM e REEST, e estatisticamente menores do que os níveis do grupo JOV e RETEST (Tabela 1). Os grupos CAS e REEST não apresentaram diferenças significativas entre si, visto os níveis plasmáticos desse hormônio (Tabela 1).

Para o estradiol, os níveis plasmáticos foram significativamente menores nos grupos JOV e SE em relação aos demais grupos (Tabela 1). Os maiores níveis plasmáticos significativos de estradiol foram encontrados nos grupos CAS e REEST em relação aos demais grupos experimentais (Tabela 1). Já, os grupos TAM e RETEST apresentaram valores similares de estradiol, sendo esses estatisticamente maiores em relação aos grupos JOV e SE e significativamente menores que nos grupos CAS e REEST (Tabela 1).

Imunohistoquímica e Quantificação Proteica

Grupo Jovem

Intensa imunolocalização para AR foi verificada nos núcleos das células epiteliais e moderada nas células estromais (Fig. 1a, Tabela 2). A imunoreatividade para ER α foi fraca tanto no epitélio prostático como no estroma (Fig. 1d, Tabela 2). Moderada imunolocalização para ER β foi observada no epitélio e fraca no estroma prostático (Fig. 1g, Tabela 2). Fraca imunoreatividade para FGF-2 foi caracterizada em ambos os compartimentos prostáticos (Fig. 3a, Tabela 2). Moderada imunolocalização para FGF-7 foi verificada no citoplasma das células epiteliais e fraca nas células do compartimento estromal (Fig. 3d, Tabela 2). Já a imunoreatividade para FGF-8 foi fraca nos dois compartimentos prostáticos (Fig. 3g, Tabela 2).

A quantificação proteica de AR, ER α e ER β apresentou níveis de 21,8%, 10,8% e 81,1%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Já, a quantificação proteica de FGF2, FGF7 e FGF8 apresentou níveis de 10,9%, 13,3% e 9,6%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Em relação às amostras microdissecadas, a quantificação proteica de FGFR2Ep, FGFR2Es, FGFR8Ep e FGFR8Es apresentou níveis de

60,2%, 36,1%, 45,9% e 26,2%, respectivamente em relação ao padrão de β -actina (Fig.6).

Grupo Senil

A imunolocalização para AR foi moderada nos núcleos das células epiteliais e fraca nas células estromais (Fig. 1b, Tabela 2). A imunolocalização para ER α foi moderada no epitélio e fraca no estroma prostático (Fig. 1e, Tabela 2). A imunoreatividade para ER β foi moderada no epitélio prostático (Fig. 1h, Tabela 2). Moderada imunomarcacão para FGF-2 foi verificada tanto no compartimento epitelial quanto no estromal (Fig. 3b, Tabela 2). Já a imunomarcacão para FGF-7 foi intensa no citoplasma das células epiteliais e fraca nas células estromais (Fig. 3e, Tabela 2). Moderada imunoreatividade para FGF-8 foi observada em ambos os compartimentos (Fig. 3h, Tabela 2).

A quantificacão proteica de AR, ER α e ER β apresentaram níveis de 17,1%, 11,2% e 17,4%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Já, a quantificacão proteica de FGF2, FGF7 e FGF8 apresentaram níveis de 22,6%, 9,8% e 16,5%, respectivamente, considerando o padrão de β -actina (Fig. 5). Em relação às amostras microdissecadas, a quantificacão proteica de FGFR2Ep, FGFR2Es, FGFR8Ep e FGFR8Es apresentou níveis de 108%, 81,2%, 89,3% e 86,7%, respectivamente em relação ao padrão de β -actina (Fig. 6).

Grupo Castrado

Fraca imunoreatividade para AR foi observada em ambos os compartimentos prostáticos (Fig. 1c, Tabela 2). A imunolocalização para ER α foi moderada nas células epiteliais e nas células estromais (Fig. 1f, Tabela 2). Fraca imunoreatividade para ER β foi observada nos dois compartimentos prostáticos (Fig. 1i, Tabela 2). Moderada imunomarcacão para FGF-2 foi verificada no compartimento epitelial e intensa no compartimento estromal (Fig. 3c, Tabela 2). A imunolocalização para FGF-7 foi fraca nas células epiteliais e intensa nas células estromais (Fig. 3f, Tabela 2). Já a imunoreatividade para FGF-8 foi fraca no compartimento epitelial e intensa nas células estromais (Fig. 3i, Tabela 2).

A quantificacão proteica de AR, ER α e ER β apresentou níveis de 14,3%, 86,5% e 16,4%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Já, a quantificacão proteica de FGF2, FGF7 e FGF8 apresentou níveis de 41,8%, 21,5% e 13,7%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Em relação às amostras

microdissecadas, a quantificação proteica de FGFR2Ep, FGFR2Es, FGFR8Ep e FGFR8Es apresentou níveis de 107,4%, 102,2%, 50,6% e 109,4%, respectivamente em relação ao padrão de β -actina (Fig. 6).

Grupo Tamoxifeno-Letrozol

A imunoreatividade para AR foi intensa nas células epiteliais e moderada no estroma (Fig. 2a, Tabela 3). A imunolocalização para ER α foi fraca no epitélio e no estroma prostático (Fig. 2d, Tabela 3). A imunoreatividade para ER β foi fraca nos dois compartimentos prostáticos (Fig. 2g, Tabela 3). Intensa imunomarcacão para FGF-2 foi verificada nos dois compartimentos prostáticos (Fig. 4a, Tabela 3). A imunolocalização para FGF-7 foi intensa nas células epiteliais e moderada nas células estromais (Fig. 4d, Tabela 3). Já a imunoreatividade para FGF-8 foi fraca no epitélio e intensa no estroma (Fig. 4g, Tabela 3).

A quantificação proteica de AR, ER α e ER β apresentou níveis de 21,7%, 12,1% e 16,4%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Já, a quantificação proteica de FGF2, FGF7 e FGF8 apresentou níveis de 82%, 78,4% e 17,7%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Em relação às amostras microdissecadas, a quantificação proteica de FGFR2Ep, FGFR2Es, FGFR8Ep e FGFR8Es apresentou níveis de 112%, 104%, 48,7% e 112%, respectivamente em relação ao padrão de β -actina (Fig. 6).

Grupo Retest

A imunoreatividade para AR foi intensa em ambos compartimentos prostáticos (Fig. 2b, Tabela 3). A imunomarcacão para ER α foi moderada nas células epiteliais e fraca no estroma prostático (Fig. 2e, Tabela 3). A imunolocalização para ER β foi moderada no epitélio e fraca no estroma (Fig. 2h, Tabela 3). Fraca imunomarcacão para FGF-2 foi verificada em ambos os compartimentos prostáticos (Fig. 4b, Tabela 3). A imunoreatividade para FGF-7 foi moderada no epitélio e fraca no estroma (Fig. 4e, Tabela 3). Já, a imunolocalização para FGF-8 foi intensa no epitélio e moderada no estroma prostático (Fig. 4h, Tabela 3).

A quantificação proteica de AR, ER α e ER β apresentaram níveis de 22,6%, 11,5% e 65,2%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Já, a quantificação proteica de FGF2, FGF7 e FGF8 apresentaram níveis de 11,4%, 11,8% e 22,4%, respectivamente, em relação ao padrão de β -actina (Fig. 5). Em relação às amostras microdissecadas, a quantificação proteica de FGFR2Ep, FGFR2Es, FGFR8Ep e FGFR8Es apresentou níveis de 62%,

40,1%, 128% e 85,2%, respectivamente em relação ao padrão de β -actina (Fig. 6).

Grupo Reest

A imunoreatividade para AR foi moderada em ambos os compartimentos (Fig. 2c, Tabela 3). A imunomarcacão para ER α foi moderada no epitélio e intensa no estroma prostático (Fig. 2f, Tabela 3). Moderada imunolocalizacão para ER β foi observada nos dois compartimentos prostáticos (Fig. 2i, Tabela 3). A imunomarcacão para FGF-2 foi fraca nas células epiteliais e moderada nas células estromais (Fig. 4c, Tabela 3). Moderadas imunoreatividades para FGF-7 e FGF-8 foram verificadas nos dois compartimentos (Fig. 4f, 4i; Tabela 3).

A quantificacão proteica de AR, ER α e ER β apresentou níveis de 17%, 91,8% e 95,3%, respectivamente, em relacão ao padrão de β -actina (Fig. 5). Já, a quantificacão proteica de FGF2, FGF7 e FGF8 apresentou níveis de 22%, 17,4% e 14,3%, respectivamente, em relacão ao padrão de β -actina (Fig. 5). Em relacão às amostras microdissecadas, a quantificacão proteica de FGFR2Ep, FGFR2Es, FGFR8Ep e FGFR8Es apresentou níveis de 63,6%, 81,5%, 92,4% e 90,4%, respectivamente em relacão ao padrão de β -actina (Fig. 6).

DISCUSSÃO

Os presentes resultados apresentaram níveis plasmáticos de testosterona diminuídos no grupo senil em relacão ao grupo JOV e RETEST. Porém, esses níveis estavam aumentados em relacão aos grupos CAS, TAM e REEST. Com relacão ao estradiol, os níveis plasmáticos desse hormônio foram significativamente menores nos grupos JOV e SE em relacão aos demais grupos, e estatisticamente maiores nos grupos CAS e REEST em relacão aos outros grupos experimentais.

Nas diferentes espécies animais, incluindo a humana, o desbalanço hormonal é fator comum que leva a muitas alteracões morfofuncionais da próstata (Roy-Burman et al., 2004). Banerjee et al. (2000) demonstraram que os níveis de DHT epitelial foram decrescidos com o avanço da idade. Inversamente, os níveis de estradiol e estrona foram elevados tanto no epitélio quanto no estroma prostático. Dessa forma, as alteracões nos níveis endógenos de hormônios esteroides na senilidade contribuem fortemente para o desequilíbrio glandular (Banerjee et al, 2000). Estudos verificaram reduçao nos níveis séricos de andrógenos em roedores senis quando comparados a adultos jovens (Scarano *et al.*, 2006). Segundo Carruba (2006), os níveis circulantes de hormônios esteróides não podem ser

considerados representativos diretos das concentrações hormonais no microambiente prostático. Assim, considerando-se que os níveis hormonais teciduais são consequência da expressão e/ou atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de esteroides na próstata, eles podem levar eventualmente ao acúmulo diferencial desses hormônios e de seus metabólitos no tecido glandular (Carruba, 2006). Diversos fatores contribuem para a diminuição da sensibilidade tecidual prostática aos andrógenos na senilidade, dentre esses a redução dos níveis do receptor androgênico (Banerjee et al., 2001; Cordeiro et al., 2008). Ainda, é conhecido que a regulação da expressão de receptores androgênicos é um fenômeno complexo, podendo caracterizar respostas opostas dos níveis dessa proteína e do transcrito mediante ao estímulo androgênico (Prins & Woodham, 1995; Banerjee et al., 2001). Também, a presença de células inflamatórias no estroma prostático de animais senis pode levar ao aumento dos níveis plasmáticos de estrógenos, uma vez que as citocinas secretadas por essas células são capazes de supra-regular a expressão da aromatase prostática (Ellem & Risbridger, 2009). Visto os presentes resultados, pode-se concluir que na senescência ficou evidente a ocorrência do desequilíbrio nos níveis plasmáticos de hormônios esteroides a favor dos níveis estrogênicos. Além disso, pode-se concluir que o tratamento foi efetivo tanto em relação à administração de testosterona como de estrógeno.

Os presentes resultados revelaram diminuição de AR e ER β , e aumento de ER α confirmados pelas quantificações proteicas nos animais senis. Já, na hiperestrogenização as reatividades de ER α e ER β apresentaram-se aumentadas com localização tecidual diferencial de seus receptores considerando os animais senis. No ambiente hipoestrogênico foram observadas diminuições de reatividade e quantificação proteica de ER β e aumento de AR em relação ao grupo senil. Na hiperandrogenização foi observado aumento da imunoreatividade e dos níveis protéicos de AR e ER- β , enquanto que no grupo castrado foi caracterizada diminuição desses receptores, e aumento de ER α em relação ao grupo senil.

A senescência está associada a mudanças significativas no ambiente hormonal. Sabe-se que, em homens idosos, há um declínio progressivo nos níveis de testosterona e dehidroepiandrosterona (DHEA) circulantes, o qual é acompanhado por acréscimo na conversão de andrógenos em estrógenos (Morales, 2002). Estudos demonstraram que homens senis apresentaram acréscimo na razão entre estrógenos e andrógenos, levando ao desequilíbrio hormonal com potencialidade dos estrógenos, particularmente no estroma prostático (Krieg *et al.*, 1993; Morales, 2002; Ellem & Risbridger, 2009). Segundo Krieg *et al.* (1993), o papel potencialmente patogênico dos estrógenos na próstata

humana poderia ser acentuado ao longo do processo de senescência. Os estrógenos podem regular o crescimento da célula tumoral prostática e até mesmo as células que se tornam andrógeno-resistentes, segundo resposta à administração sistêmica de estrógenos identificada em pacientes com câncer prostático com presença de metástases e doença hormônio independente (Ockrin et al., 2006).

Autores relataram em roedores senis mudanças na sensibilidade do tecido prostático aos andrógenos, sendo essas atribuídas à diminuição dos receptores androgênicos e à atividade da enzima 5 α -redutase no órgão, além de taxas alteradas de aromatização de testosterona em estradiol (Banerjee *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2008). Outros estudos sugeriram que as células prostáticas desenvolveram independência androgênica durante o processo de senescência, tornando a próstata menos sensível à ablação androgênica (Banerjee *et al.*, 2000; Morrissey *et al.*, 2002). Segundo Carruba (2006), células tumorais podem tornar-se resistentes aos andrógenos como consequência da mutação do AR ou da alteração da sinalização androgênica, após fase inicial responsiva ao hormônio. A super-expressão de AR pode estar envolvida no processo de independência androgênica nos tumores prostáticos e, anormalidades na expressão ER α / β podem modular o crescimento da resposta do câncer à independência hormonal (Latil et al., 2001).

Os presentes resultados mostraram, de maneira geral, aumento da reatividade e dos níveis proteicos para os FGFRs na próstata de ratos senis, enquanto que tanto na hiperandrogenização como na hiperestrogenização levou à diminuição da reatividade do FGFR2 em relação ao grupo senil. Já, a quantificação proteica do FGFR2 apresentou-se aumentada no estroma dos grupos CAS e TAM em relação ao SE e no epitélio do grupo TAM em relação aos demais grupos. A imunoreatividade e o nível proteico para FGFR7 apresentaram-se aumentados nos grupos CAS, TAM e REEST, sendo demonstrada localização diferencial nos compartimentos prostáticos nesses grupos em relação ao senil. Embora a reatividade para FGFR8 tenha sido aumentada nos diferentes grupos experimentais, pode-se destacar maior aumento no grupo RETEST. Entretanto, a imunomarcacão e quantificação proteica para FGFR8 apresentou localização diferencial nos grupos CAS e TAM em relação ao SE, caracterizando aumento de FGFR8 no estroma desses grupos. Já no grupo RETEST, foi observado aumento de FGFR8 no epitélio.

Estudos indicaram que a alteração da função dos fatores de crescimento fibroblásticos, ou seja, qualquer desequilíbrio na cascata de sinalização destes pode levar ao câncer (Ahmad et al., 2012). Os FGFs podem promover o crescimento tumoral através de diferentes mecanismos, agindo como indutores angiogênicos, mitógenos para as

células tumorais, ou inibidores de apoptose (Cotton et al., 2008). Ainda, alguns tumores dependem do desequilíbrio na sinalização do FGF para o seu desenvolvimento e progressão e essas moléculas provêm bons alvos terapêuticos (Ahmad et al., 2012).

Tem sido postulado que a expressão dos FGFs é parcialmente regulada pelo receptor de andrógeno (Cotton et al., 2008). Embora as sinalizações de AR e FGF sejam importantes no desenvolvimento prostático, os exatos mecanismos de interação entre essas moléculas ainda não está totalmente estabelecido (Cotton et al., 2008). Já, segundo Story et al. (1989), a produção de FGF pelos fibroblastos pode ser regulada diretamente pelo fator de crescimento transformador- β (TGF- β), mas não pelos andrógenos. Culig et al. (1994) demonstraram que FGF-7, IGF e EGF ativaram a transcrição do AR nas células cancerosas prostáticas. No entanto, dada à evidência que a sinalização do FGFR é aumentada em câncer prostático avançado, é possível que o FGF contribua significativamente para a atividade do AR na doença andrógeno-independente, embora o mecanismo envolvido nesse processo não seja conhecido (Kwabi-Addo et al., 2004).

Ainda, há evidências que relacionaram as alterações nas sinalizações dos FGFs/FGFRs e o início da progressão de diferentes formas de câncer, incluindo o prostático (Cotton et al., 2008). Tem sido hipotizado que o FGF7 é induzido por andrógenos em cultura de células estromais prostáticas humanas e de ratos (Planz et al., 1998). Em adição, análises realizadas em animais castrados indicaram que a expressão de FGF7 na próstata pode não ser andrógeno-regulada *in vivo* (Nemeth et al., 1998). Outros autores observaram aumento da secreção de FGF7 em cultura de tecido prostático normal em resposta à andrógenos, embasando a hipótese de que a expressão de FGF7 pelas células estromais pode ser regulada, no mínimo parcialmente, pelos andrógenos, mas outros fatores podem estar envolvidos (Kwabi-Addo et al., 2004; Cotton et al., 2008). Além disso, é importante notar que enquanto o FGF7 e FGF10 são mediadores parácrinos da ação androgênica no epitélio prostático normal, a regulação androgênica das células epiteliais prostáticas seguidas de transformação maligna poderia envolver a conversão do mecanismo parácrino para autócrino no crescimento andrógeno-estimulado. Também, esse processo molecular pode estar baseado nas mudanças do eixo FGF (Cunha et al., 2003). Segundo Ishii et al. (2011), células estromais prostáticas humanas tratadas com estradiol apresentaram diminuição na expressão de FGF7. Entretanto, mais estudos são necessários para determinar se há aumento da expressão de FGF7 no câncer prostático, além da caracterização de sua capacidade em promover a progressão do tumor (Kwabi-Addo et al., 2004).

Outras análises revelaram que o FGF2 esteve presente nas células estromais do tecido canceroso prostático, em coerência com o efeito parácrino desse mitógeno (Kwabi-Addo et al., 2004). Em oposição, Dorkin et al (1999) detectaram em estágios avançados de câncer prostático a expressão de FGF2 nas células epiteliais prostáticas, sugerindo que inicialmente o FGF2 atue como fator parácrino pelas células estromais no câncer e que durante a progressão do tumor seu mecanismo de ação passa a ser autócrino (Huss et al., 2003). Por outro lado, outros estudos têm demonstrado alterações nas isoformas FGFR2 epitelial e mesenquimal no câncer prostático humano (Schwertfeger, 2009). Esse processo implica na substituição da isoforma do FGFR2 epitelial para mesenquimal, sugerindo sinalização parácrina no lugar da autócrina (Schwertfeger, 2009). As observações feitas no câncer prostático humano também foram verificadas no modelo animal de câncer prostático (TRAMP) (Schwertfeger, 2009). Animais TRAMP apresentaram aumento da expressão de FGF2 durante a progressão do câncer prostático, culminando em fenótipo celular pouco diferenciado (Huss et al., 2003). Quando camundongos TRAMP foram cruzados com camundongos *knockout* para FGF2, houve aumento significativo na sobrevivência e diminuição da metástase nos filhotes que apresentaram pelo menos um alelo *knockout* para FGF2, suportando a hipótese de que a expressão aumentada deste fator é biologicamente importante na progressão do tumor (Polnaszek et al., 2003).

A expressão de FGF8 é aumentada nas células cancerosas prostáticas humanas, enquanto que na próstata normal a expressão desse fator é baixa (Gnanapragasam et al., 2003; Cotton et al., 2008). Dorkin et al. (1999) observaram correlação entre a expressão do FGF8 com o grau do tumor e sobrevida do paciente, embora o FGF8 não seja sugerido como indicador independente de sobrevivência. Estudos avaliando modelo de metástase verificaram que enxerto de células prostáticas super-expressando FGF8 culminou em aumento da incidência e do tamanho do tumor (Valta et al., 2008).

Assim, através dos presentes resultados pode-se concluir que o microambiente prostático de animais senis, considerando-se a ablação hormonal, levou ao aumento na identificação dos FGFRs, sugerindo interações entre os hormônios e suas vias de sinalização. Sendo assim, esses resultados evidenciaram que tanto os estrógenos quanto os andrógenos são elementos proliferativos para a próstata, porém em diferentes caminhos. Por outro lado, pode-se concluir que as vias de ativação dos FGFRs podem ser sinalizadas também de maneira andrógeno-independente, uma vez que os FGFRs apresentaram níveis de detecção aumentados mesmo diante da intensa depleção androgênica imposta pela castração.

Considerando o FGFR2 e seu importante papel nos processos de proliferação, a diminuição na reatividade e nível proteico desse fator nos grupos hiperandrogênico e hiperestrogênico sugeriu que tanto o excesso de andrógeno quanto de estrógeno no microambiente prostático não sinalizaram de forma direta os processos proliferativos através do FGFR2. Entretanto, o aumento do FGFR2 nos grupos que sofreram ablação androgênica e estrogênica indicou que a intensa ablação hormonal na senescência levou ao desequilíbrio da sinalização desse fator, afetando assim a dinâmica do microambiente prostático. O aumento do FGFR2 no epitélio do grupo com ablação estrogênica sugeriu que esse microambiente favoreceu a sinalização parácrina desse fator. Entretanto, o FGFR2 e FGFR8 apresentaram-se aumentados no estroma dos grupos CAS e TAM, indicando a intensa ablação hormonal como favorável à sinalização autócrina desses fatores. Além disso, a reatividade do FGFR8 foi maior no ambiente hiperandrogênico, sugerindo um maior envolvimento do andrógeno na sinalização desse fator. Além disso, pode-se concluir que a via estrogênica, através do ER β , foi importante para a sinalização parácrina do FGFR8, especialmente no epitélio glandular considerando a hiperandrogenização. No entanto, caracterizou-se localização diferencial do FGFR8 nos grupos que sofreram ablação hormonal, indicando a ablação dos hormônios androgênicos e estrogênicos deflagradores do desequilíbrio do eixo de sinalização do FGFR8 no microambiente prostático. Ainda, pode-se concluir que receptores para FGF7 podem ser ativados de maneira andrógeno-independente, visto a reatividade aumentada de FGFR7 nos animais senis com ablação androgênica imposta pela castração. Dessa forma, pode-se concluir que a ablação hormonal em animais senis favoreceu o microambiente à ativação e/ou sinalização dos fibroblastos.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp nº 2010/01739-1).

REFERÊNCIAS

Acevedo VD, Gangula RD, Freeman KW, Li R, Zhang Y, Wang F et al (2007) Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 12:572-585.

Ahmad I, Iwata T, Leung HY (2012) Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823:850-860.

Banerjee S, Banerjee PP, Brown TR (2000) Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology* 141:821-822.

Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR (2001) Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the Brown Norway rat prostate. *Endocrinology* 142:4066-4075.

Carruba G (2006) Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* 1089:201-17.

Cordeiro RS, Scarano WR, Campos SG, Santos FC, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR (2008) Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 39:1312-24.

Cotton LM, O'bryan MK, Hinton BT (2008) Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocrine Reviews* 29:193-216.

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H (1994) Androgen receptor activation in prostate tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Research* 54: 5474-5478.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ et al (2003) Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 107:1-10.

Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C et al (1999) FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* 18:2755-61.

Ellem SJ, Risbridger GP (2009) The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 1155:174-186.

Gnanapragasam VJ, Robinson MC, Marsh C et al (2003) FGF8 isoform b expression in human prostate cancer. *Br J Cancer* 88:1432-8.

Heer R, Collins AT, Robson CN, Shenton BK, Leung HY (2006) KGF suppresses $\alpha_2\beta_1$ integrin function and promotes differentiation of the transient amplifying population in human prostatic epithelium. *J Cell Sci* 119:1416-1424.

Huss WJ, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM (2003) Differential expression of specific FGF ligand and receptor isoforms during angiogenesis associated with prostate cancer progression. *Prostate* 54:8-16.

Ishii K, Mizokami A, Tsunoda T et al (2011) Heterogenous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 112:3604-3611.

Karlou M, Tzelepi V, Efstathiou E (2010) Therapeutic targeting of the prostate cancer microenvironment. *Nat Rev Urol* 7:494-509.

Krieg M, Nass R, Tunn S (1993) Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 77:375-381.

Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M (2004) The Role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 11:709-724.

Lanner F, Rossant J (2010) The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 137:3351-3360.

- Latil A, Bieche I, Vidaud D et al (2001) Evaluation of androgen, estrogen (ER α and ER β), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res* 60:1919-26.
- Lin Y, Liu G, Zhang Y et al (2007) Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase is required for prostatic morphogenesis and the acquisition of strict androgen dependency for adult tissue homeostasis. *Development* 134:723-734.
- Memarzadeh S, Xin L, Mulholland DJ, Mansukhani A, Wu H, Teitell MA et al (2007) Enhanced paracrine FGF10 expression promotes formation of multifocal prostate adenocarcinoma and an increase in epithelial androgen receptor. *Cancer Cell* 12:572-585.
- Morales A (2002) Androgen replacement therapy and prostate safety. *Eur Urol* 41:113-120.
- Morrissey C, Buser A, Scolari J, O'sullivan J, Moquin A, Tenniswood M (2002) Changes in hormone sensitivity in the ventral prostate of aging Sprague-Dawley rats. *J Androl* 23:341-351.
- Murphy T, Darby S, Mathers ME, Gnanapragasam VJ (2010) Evidence for distinct alterations in the FGF axis in prostate cancer progression to an aggressive clinical phenotype. *Journal of Pathology* 220:452-460.
- Nemeth JA, Zelen DL, Lang S et al (1998) Keratinocyte growth factor in the rat ventral prostate: androgen-independent expression. *Journal of Endocrinology* 156:115-125.
- Ocrik J, Lalani EL-N, Abel P (2006) Therapy Insight: parenteral estrogen treatment for prostate cancer--a new dawn for an old therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 10:552-63.
- Planz B, Wang Q, Kirley SD, Lin CW, McDougal WS (1998) Androgen responsiveness of stromal cells of the human prostate: regulation of cell proliferation and keratinocyte growth factor by androgen. *J Urol* 160:1850-5.
- Polnaszek N, Kwabi-Addo B, Peterson LE et al (2003) Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 63:5754-60.
- Prins GS, Woodham C (1995) Autologous regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid in the separate lobes of the rat prostate gland. *Biol Reprod* 53:609-619.
- Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS (2001) Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res* 61:6089-6097.
- 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.
- Sáttolo S, Carvalho CAF, Cagnon VHA (2004) Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue Cell* 36:417-430.
- Scarano WR, Vilamaior PSL, Taboga SR (2006) Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. *Anat Rec A* 288:1190-1200.
- Schwertfeger K (2009) Fibroblast growth factors in development and cancer: insights for the mammary and prostate glands. *Current Drug Targets* 10:632-644.

Shin JH, Kim HS, Moon HJ, Kang H, Kim TS, Seok JH, Kim IY, Park KL, Han SY, Nam SY (2002) Effects of flutamide on puberty in male rats: an evaluation of the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *J Toxicol Environ Health A* 65:433-445.

Smith P, Rhodes NP, Ke Y, Foster CS (2002) Upregulation of estrogen and androgen receptors modulate expression of FGF-2 and FGF-7 in human, cultured, prostatic stromal cells exposed to high concentration of estradiol. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 5:105-110.

Story MT, Livingston B, Baeten L, Swartz SJ, Jacobs SC, Begun FP, Lawson RK (1989) Cultured human prostate-derived fibroblasts produce a factor that stimulates their growth with properties indistinguishable from basic fibroblast growth factor. *Prostate* 15: 355-65.

Tilley WD, Horsfall DJ, Mcgee MA, Alderman JE, Marshall VR (1987) Effects of ageing and hormonal manipulations on the level of oestrogen receptors in the guinea-pig prostate. *J Endocrinol* 112:139-144.

Tobin VA, Canny BJ (1998) The regulation of gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs by testosterone is mediated by dihydrotestosterone. *Endocrinology* 139:1038-1045.

Tomas D, Kruslin B (2004) The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 61:324-31.

Valta MP, Tuomela J, Bjartell A et al (2008) FGF-8 is involved in bone metastasis of prostate cancer. *Int. J. Cancer* 123:22-31.

Wesche J, Hagund K, Haugsten EM (2011) Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437:199-213.

Yang F, Strand DW, Rowley DR (2008) Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor- β action in prostate cancer reactive stroma TGF- β signaling in prostate cancer reactive stroma. *Oncogene* 27: 450-459.

Zar, JH (1999) *Bioestatistical Anlysis*, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall Upper.

LEGENDAS

Figuras 1a, 1d, 1g: Grupo JOV. (a) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e moderada nas células estromais. (d) Fraca imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e nas células estromais. (g) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) no compartimento epitelial e fraca no estromal. **a, d, g:** Ep – epitélio secretor, L – lúmen e St – estroma.

Figuras 1b, 1e, 1h: Grupo SE. (b) Moderada imunoreatividade de AR (**setas**) no núcleo das células epiteliais secretoras e fraca nas células estromais. (e) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e fraca no estroma prostático. (h) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras. **b, e, h:** Ep – epitélio secretor, L – lúmen e St – estroma.

Figuras 1c, 1f, 1i: Grupo CAS. (c) Fraca imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais e nas células

estromais. (f) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. (i) Fraca imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. **c, f, i: Ep** – epitélio secretor, **L** - lúmen e **St** – estroma.

Figuras 2a, 2d, 2g: Grupo TAM. (a) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) no epitélio prostático e moderada no estroma. (d) Fraca imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e nas células estromais. (g) Fraca imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e nas células estromais. **a, d, g: Ep** - epitélio; **L** - lúmen; **St** – estroma.

Figuras 2b, 2e, 2h: Grupo RETEST. (b) Intensa imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (e) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e fraca no estroma prostático. (h) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e fraca no estroma prostático. **b, e, h: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 2c, 2f, 2i: Grupo REEST. (c) Moderada imunoreatividade para AR (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (f) Moderada imunoreatividade para ER α (**setas**) nas células epiteliais secretoras e intensa no estroma prostático. (i) Moderada imunoreatividade para ER β (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. **c, f, i: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 3a, 3d, 3g: Grupo JOV. (a) Fraca imunoreatividade de FGFR2 (**setas**) nas células epiteliais secretoras e nas células estromais. (d) Moderada imunoreatividade de FGFR7 (**setas**) no epitélio secretor e fraca no estroma prostático. (g) Fraca imunoreatividade para FGFR8 (**setas**) no epitélio secretor e estroma prostático. **a, d, g: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 3b, 3e, 3h: Grupo SE. (b) Moderada imunoreatividade para FGFR2 (**setas**) nas células epiteliais secretoras e estroma prostático. (e) Intensa imunoreatividade para FGFR7 (**setas**) nas células epiteliais secretoras e fraca no estroma. (h) Moderada imunoreatividade para FGFR8 (**setas**) no epitélio secretor e estroma prostático. **b, e, h: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 3c, 3f, 3i: Grupo CAS. (c) Moderada imunoreatividade para FGFR2 (**setas**) nas células epiteliais secretoras e intensa no estroma prostático. (f) Fraca imunoreatividade para FGFR7 (**setas**) nas células epiteliais e intensa no estroma. (i) Fraca imunoreatividade para FGFR8 (**setas**) no epitélio secretor e intensa no estroma prostático. **c, f, i: Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figuras 4a, 4d, 4g: Grupo TAM. (a) Intensa imunoreatividade para FGFR2 (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. (d) Intensa imunoreatividade para FGFR7 (**setas**) nas células epiteliais e moderada no

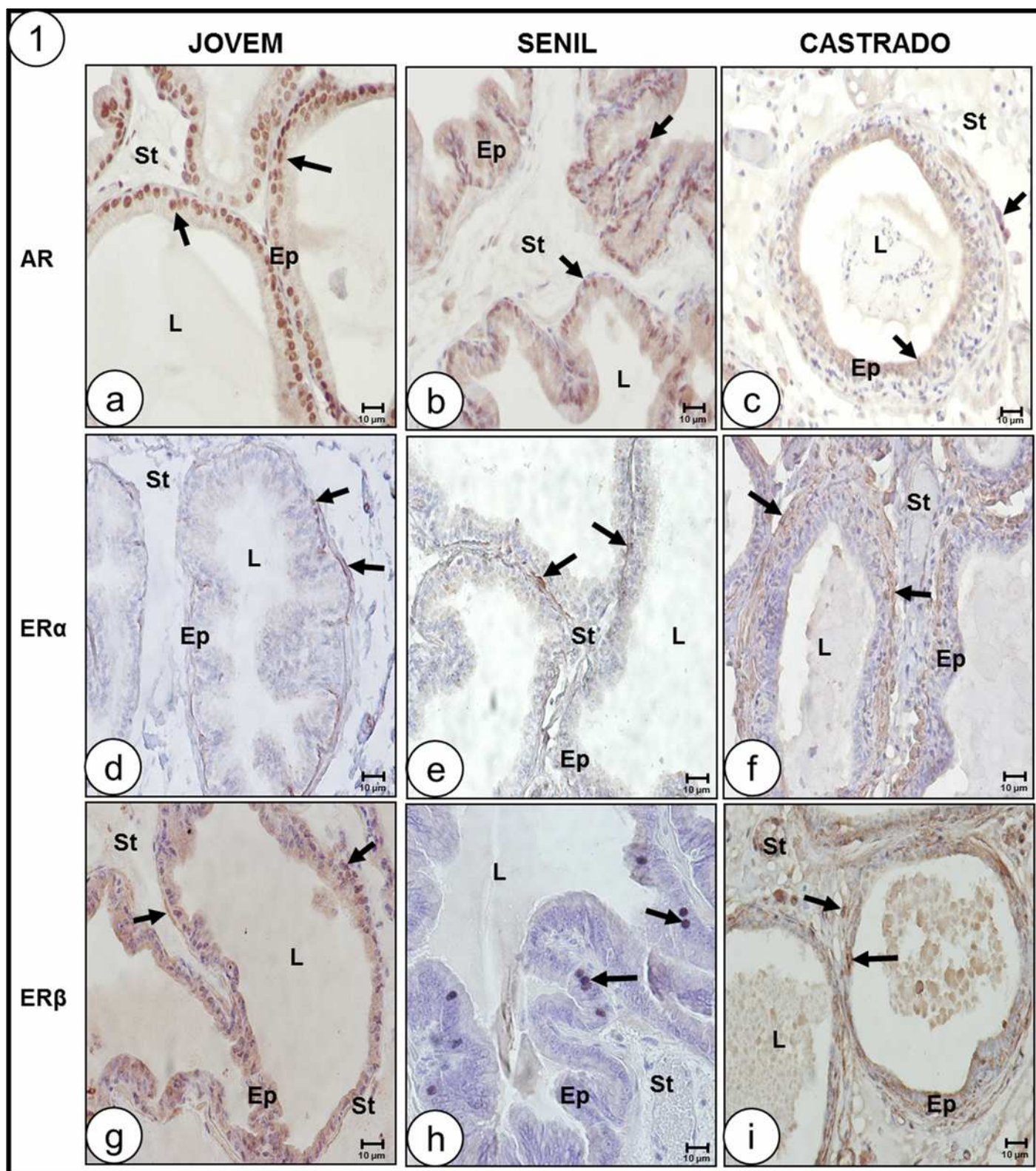
estroma. (g) Fraca imunoreatividade para FGFR8 (**setas**) no epitélio secretor e intensa no estroma prostático. **a, d, g:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

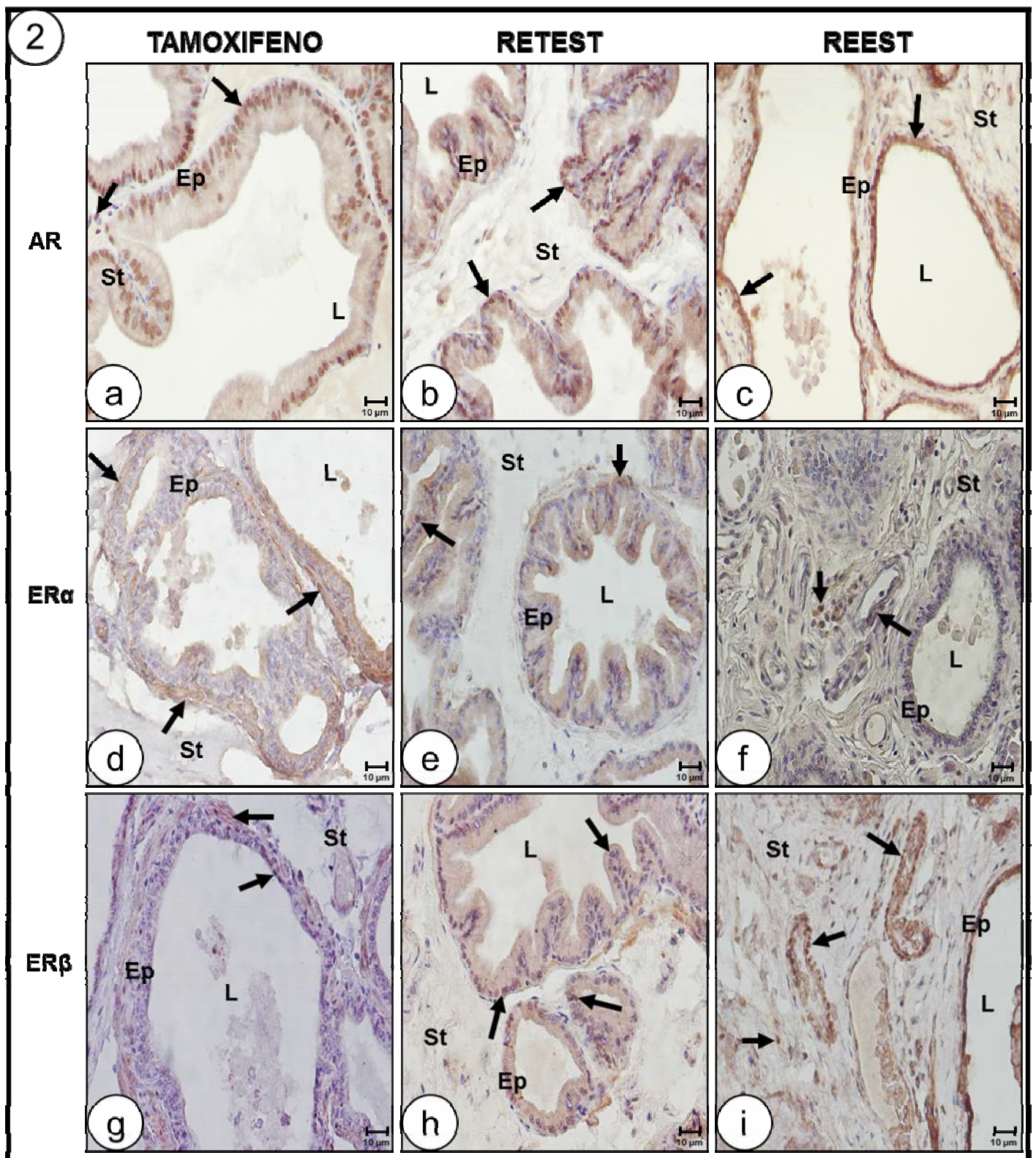
Figuras 4b, 4e, 4h: Grupo RETEST. (b) Fraca imunoreatividade para FGFR2 (**setas**) nas células epiteliais secretoras e no estroma prostático. (e) Moderada imunoreatividade para FGFR7 (**setas**) nas células epiteliais e fraca no estroma prostático. (h) Intensa imunoreatividade para FGFR8 (**setas**) no epitélio secretor e moderada no estroma prostático. **b, e, h:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

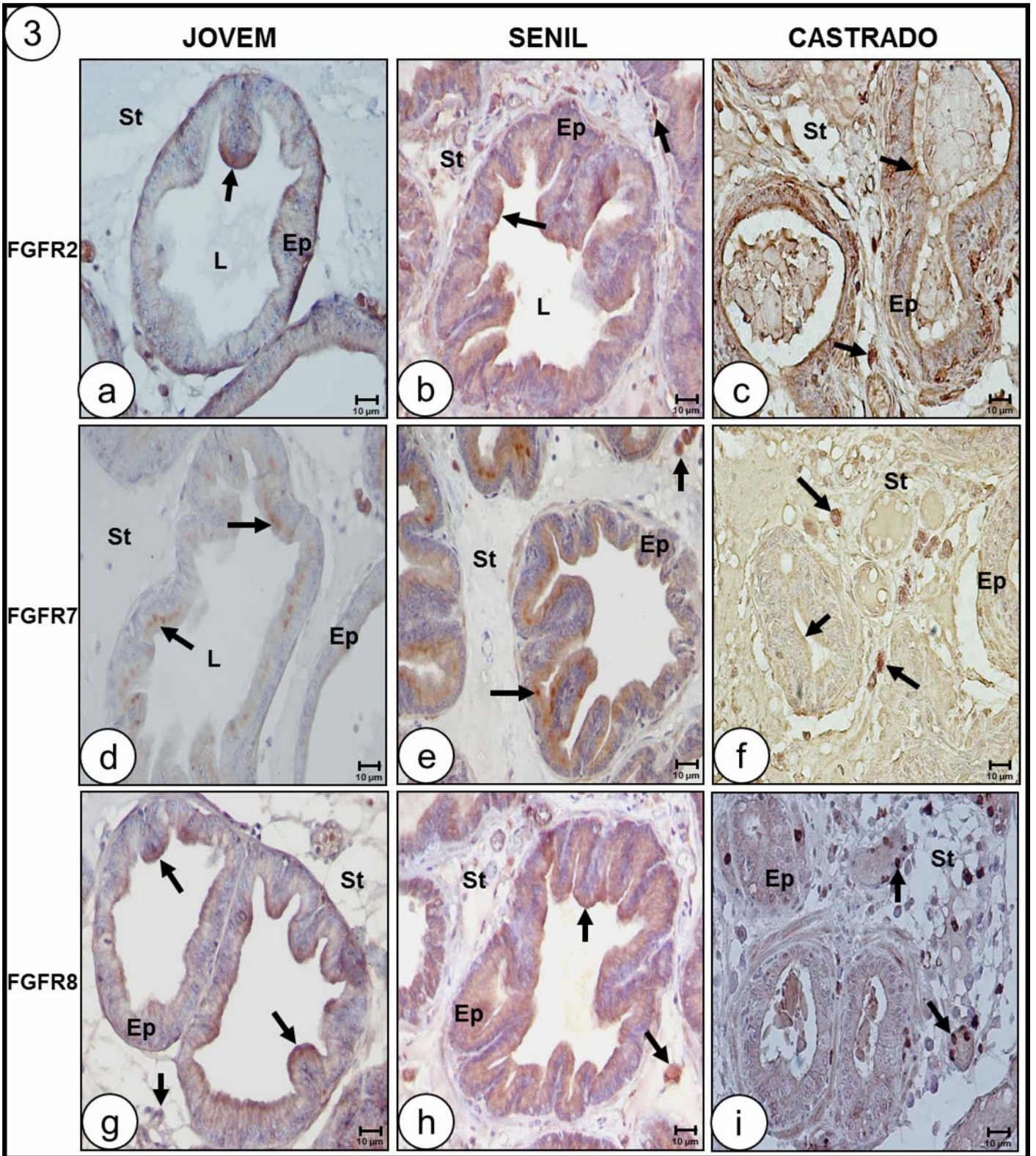
Figuras 4c, 4f, 4i: Grupo REEST. (c) Fraca imunoreatividade para FGFR2 (**setas**) nas células epiteliais secretoras e moderada no estroma prostático. (f) Moderada imunoreatividade para FGFR7 (**setas**) nas células epiteliais e no estroma prostático. (i) Moderada imunoreatividade para FGFR8 (**setas**) no epitélio secretor e no estroma prostático. **c, f, i:** **Ep** – epitélio secretor, **L** – lúmen e **St** – estroma.

Figura 5. Representação da quantificação proteica e análise estatística do western blotting para os níveis proteicos de AR, ER α , ER β , FGFR2, FGFR7 e FGFR8 no tecido prostático (órgão inteiro) dos diferentes grupos. Média da porcentagem $\pm$ desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina.

Figura 6. Representação da quantificação proteica e análise estatística do western blotting para os níveis proteicos de FGFR2 e FGFR8 nos compartimentos epitelial e estromal prostáticos nos diferentes grupos. Média da porcentagem $\pm$ desvio padrão em relação ao controle endógeno β -actina. **Ep** – epitelial, **Es**- estromal.







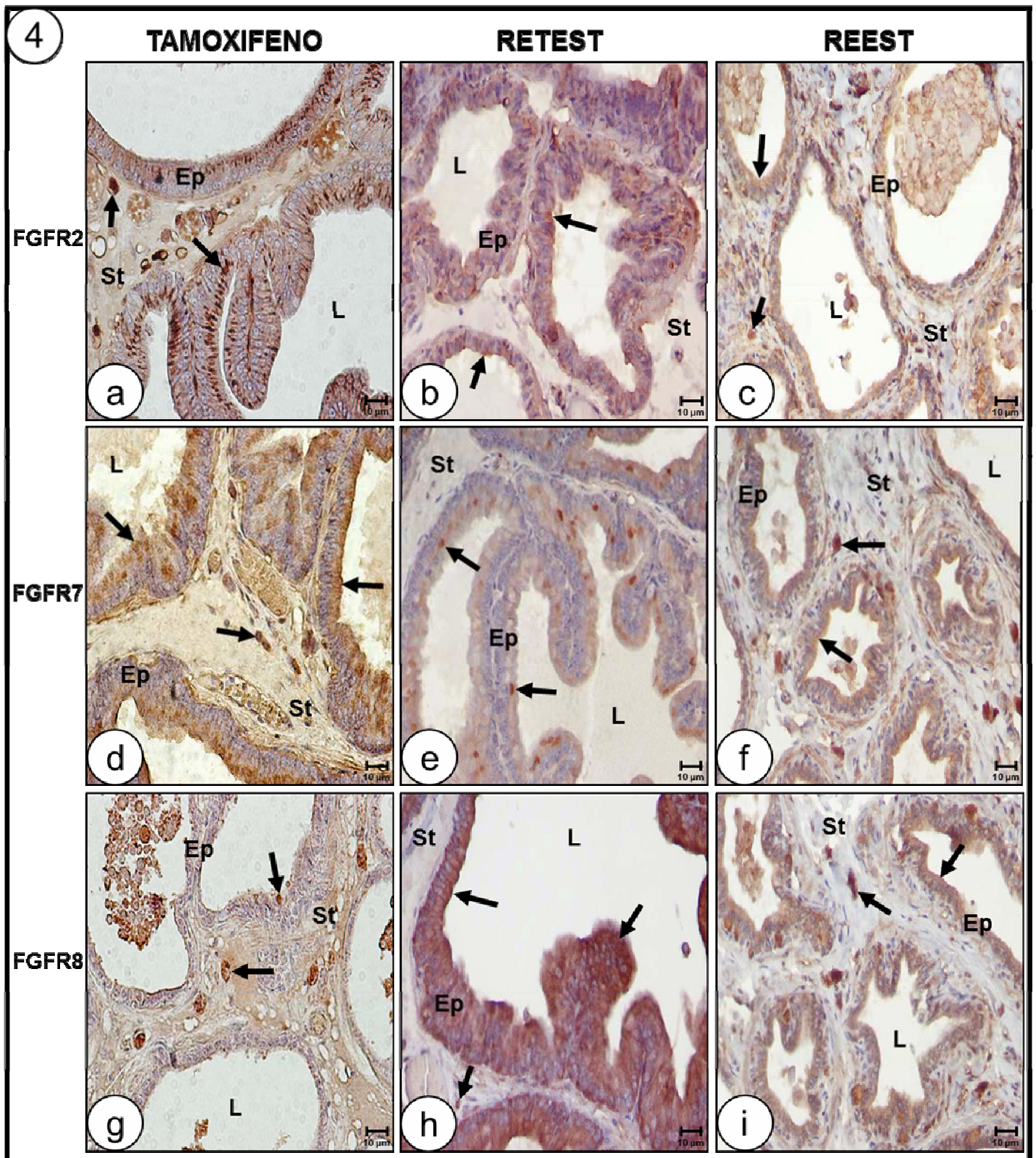
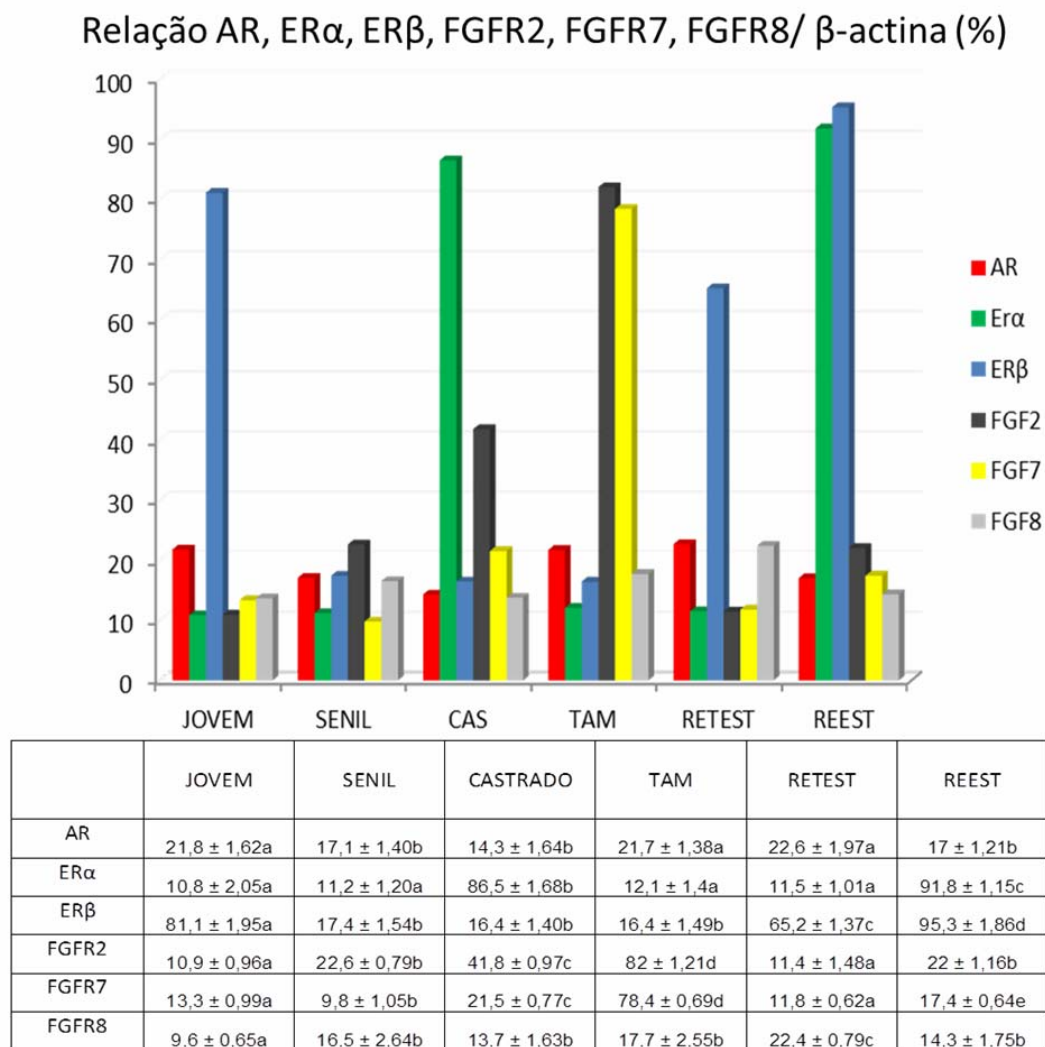


Figura 5. Representação da análise estatística do western blotting do tecido prostático.



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,01$) entre os grupos após o Teste de Tukey.

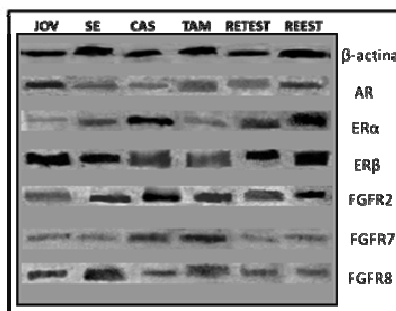
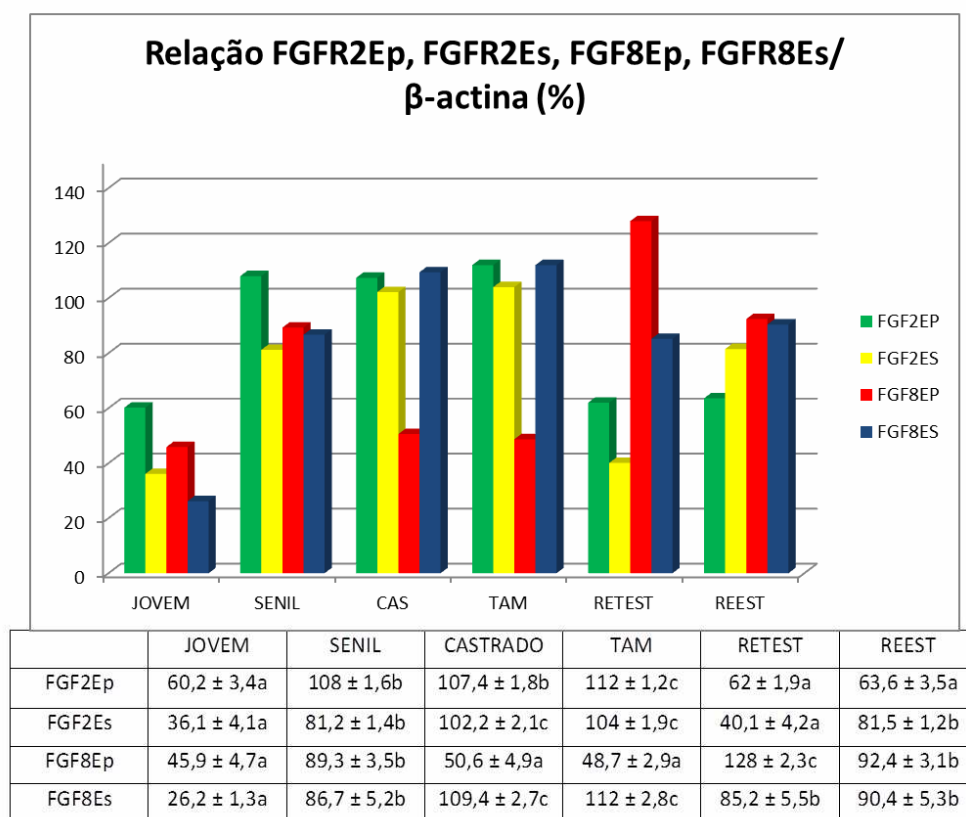


Figura 6. Representação da análise estatística do western blotting do tecido prostático microdissecado.



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos após o teste de Tukey.

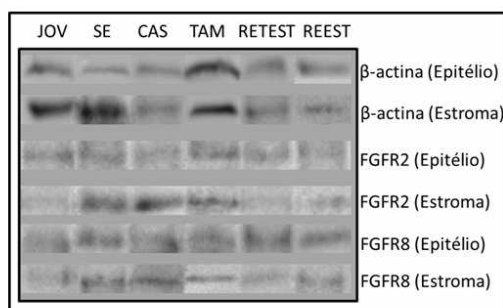


Tabela 1. Dosagens plasmáticas de testosterona (nd/mL) e estradiol (pg/mL) nos diferentes grupos experimentais.

	Grupos Experimentais					
	JOV	SE	CAS	TAM	RETEST	REEST
Testosterona	5,65 ± 2,33 ^{ad}	3,15 ± 0,34 ^a	0,04 ± 0,01 ^b	0,93 ± 0,09 ^c	4,12 ± 0,02 ^d	0,06 ± 0,04 ^b
Estradiol	0,12 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	31,4 ± 1,06 ^c	13,0 ± 4,58 ^b	19,3 ± 1,78 ^b	31,5 ± 0,01 ^c

* Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa (ANOVA seguida de Teste de Tukey, $p \leq 0.05$).

Tabela 2. Intensidade de imunoreatividade dos receptores AR, ER α , ER β , FGFR2, FGFR7 e FGFR8.

Antígenos	GRUPOS					
	JOVEM		SENIL		CASTRADO	
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma
AR	3	2	2	1	1	1
ER α	1	1	2	1	2	2
ER β	2	1	2	0	1	1
FGFR2	1	1	2	2	2	3
FGFR7	2	1	3	1	1	3
FGFR8	1	1	2	2	1	3

0 (0%), 1 (< 33%), 2 (33% - 66%), 3 (> 66%)

Tabela 3: Intensidade de imunoreatividade dos receptores AR, ER α , ER β , FGFR2, FGFR7 e FGFR8.

Antígenos	GRUPOS					
	TAM		RETEST		REEST	
	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma	Epitélio	Estroma
AR	3	2	3	3	2	2
ER α	1	1	2	1	2	3
ER β	1	1	2	1	2	2
FGFR2	3	3	1	1	1	2
FGFR7	3	2	2	1	2	2
FGFR8	1	3	3	2	2	2

0 (0%), 1 (< 33%), 2 (33% - 66%), 3 (> 66%)

5) CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS DA TESE

- Pode-se concluir que o envolvimento do ER α na ativação do estroma reativo tornou o microambiente favorável à progressão do câncer, devido à potencialização do desequilíbrio estromal, e o ER β contribuiu para a inibição das lesões pré-cancerosas em homens na senescência.
- A prolactina pode estar relacionada à progressão do câncer devido à sua interação com o ER α , indicando que esse hormônio pode ser alvo importante na prevenção dos efeitos estrogênicos nas lesões prostáticas.
- Ambos FGFR2 e FGFR8 têm papel fundamental nos estágios iniciais do câncer de próstata em homens, sugerindo que essas moléculas podem ser alvos terapêuticos promissores.
- As reatividades entre a vimentina e a α -actina associadas com o aspecto proliferativo dos miofibroblastos, indicaram a reatividade estromal como deflagradora das lesões prostáticas.
- A localização diferencial dos fatores fibroblásticos nos compartimentos epitelial e estromal da próstata de homens idosos, com caracterização de câncer prostático, pode indicar um parâmetro favorável para a progressão tumoral.
- A administração de hormônios esteróides em animais senis foi efetiva na próstata, levando à ocorrência de alterações estruturais e modificando o padrão de reatividade de moléculas importantes para o equilíbrio estrutural e molecular do microambiente prostático.
- A modificação do padrão de reatividade do EGFR no grupo senil colaborou com o microambiente susceptível a processos proliferativos. Ainda, pode-se concluir que receptores para EGFR podem ser ativados de maneira andrógeno-independente, visto a reatividade aumentada de EGFR nos animais senis com ablação androgênica imposta pela castração.
- No grupo castrado verificou-se alteração do padrão de distribuição da reatividade da α -actina indicando os andrógenos como possíveis responsáveis pelo padrão estrutural de distribuição desta

molécula. Dessa forma, no microambiente hiperandrogênico ocorreu a reestruturação do padrão de reatividade da α -actina, indicando que a localização da α -actina é responsiva e orientada pela ação androgênica, garantindo integridade estrutural glandular, a qual é fundamental para a dinâmica funcional do órgão.

- A ablação estrogênica na senescência foi caracterizada pelo aumento dos receptores de prolactina indicando o desequilíbrio hormonal a favor dos andrógenos e/ou o não envolvimento direto das vias estrogênicas na atividade da prolactina. Assim, o aumento da reatividade da prolactina nesse grupo pode ser um dos fatores importantes no microambiente favorável à formação do estroma reativo, considerando simultâneo aumento de vimentina e diminuição de α -actina, o que indica aumento de miofibroblastos no tecido prostático.
- O desequilíbrio causado pela ablação e/ou reposição hormonal não somente alterou o feedback entre os hormônios esteróides como modificou a localização da reatividade das moléculas nos compartimentos prostáticos, provavelmente interferindo nas sinalizações autócrinas e parácrinas dos estrógenos, EGF e prolactina, apontando esses como deflagradores da formação do estroma reativo.
- A ablação hormonal nos animais senis levou ao aumento da reatividade dos FGFs, sugerindo interações entre os hormônios e suas vias de sinalização e o microambiente prostático senil.
- As vias dos FGFs podem ser ativadas também de maneira andrógeno-independente, uma vez que os FGFs apresentaram níveis de detecção aumentados mesmo diante da intensa depleção androgênica imposta pela castração.
- Tanto o excesso de andrógeno quanto de estrógeno no microambiente prostático não sinalizaram os processos proliferativos através do FGFR2. Entretanto, o aumento do FGFR2 nos grupos que sofreram ablação androgênica e estrogênica indicou que a ablação hormonal na senescência levou ao desequilíbrio da sinalização desse fator.

- O aumento do FGFR2 no epitélio do grupo com ablação estrogênica sugeriu que esse microambiente favoreceu a sinalização parácrina desse fator.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.Y.; LEAV, I.; LAU, K.M.; HO, S.M.; PFLUEGER, S.M. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*; v.52, p.69-81, 2002.
- AHMAD I, IWATA T, LEUNG HY. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1823, p.850-860, 2012.
- AUMÜLLER, G.; ADLER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res.*; v.198, p.145-158, 1979.
- AUMÜLLER, G; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int. Rev. Cytol.*, v.121, p.127-231, 1990.
- BANERJEE, S.; BANERJEE, P.P.; BROWN, T.R. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology*; v.141, p.821-822, 2000.
- BARTKE, A. Prolactin in the male: 25 years later. *J. Androl.*, v. 25, p. 661-666, 2004.
- BERRY, P.A.; MAITLAND, N.J.; COLLINS, A.T. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*; v.288, p.30-37, 2008.
- BIANCO, J.J.; HANDELSMAN, D.J.; PEDERSEN, J.S.; RISBRIDGER, G.P. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*; v.143, p.4922-33, 2002.
- BLACKLOCK, N.J. The morphology of the parenchyma of the prostate. *Urol Res.*; v.5, p.155-156, 1977.
- CEDER, J.A.; JANSSON, L.; EHRNSTROM, R.A.; RONNSTRAND, L.; ABRAHAMSSON, P.A. The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate. *Eur. Urol.*; v.53, p.524-532, 2008.
- COLLINS, A.T.; MAITLAND, N.J. Prostate cancer stem cells. *Eur. J. Câncer* 2006; v.42, p.1213-1218, 2006.
- CORDEIRO, R.S.; SCARANO, W.R.; CAMPOS, S.G.; SANTOS, F.C.; VILAMAIOR, P.S.; GÓES, R.M.; TABOGA, S.R. Androgen receptor in the Mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron*; Artigo Aceito para Publicação, 2008.
- CORNELL, R.J.; ROWLEY, D.; WHELLER, T.; ALI, N.; AYALA, G. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology*; v.61, p.870-875, 2003.
- COTTON, L.M.; O'BRYAN, M.K.; HINTON, B.T. Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocrine Reviews*, v. 29, p. 193-216, 2008.

- CULIG, Z.; HOBISCH, A.; CRONAUER, M.V.; RADMAYR, C.; TRAPMAN, J.; HITTMAYER, A.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H. Androgen receptor activation in prostate tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Research*, v. 54, p. 5474-5478, 1994.
- CUNHA, G.R.; MATRISIAN, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*; v.70, p.469-472, 2002.
- CUNHA GR, HAYWARD SW, WANG YZ. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*, 70: 473-485, 2002.
- DAGVADORJ, A.; COLLINS, S.; JOMAIN, J.B.; ABDULGHANI, J.; KARRAS, J.; ZELLWEGER, T.; LI, H.; NURMI, M.; ALANEN, K.; MIRTITI, T.; VISAKORPI, T.; BUBENDORF, L.; GOFFIN, V.; NEVALAINEN, M.T. Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via Janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway. *Endocrinology*, v. 148, p. 3089-3101, 2007.
- DE MARZO, A.M.; MARCHI, V.L.; EPSTEIN, J.I.; NELSON, W.G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol*; v.155, p.1985-1992, 1999.
- EL-ALFY, M.; PELLETIER, G.; HERMO, L.S.; LABRIE, F. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microsc Res Tech*; v.51, p.436-446, 2000.
- GARRISON, J.B.; KYRPRIANOU, N. Novel targeting of apoptosis pathways for prostatic cancer therapy. *Cur. Cancer Drug. Targets*, v. 4, p. 85-95, 2004.
- HÄRKÖNEN, P.L.; MÄKELÄ, S.I. Role of estrogens in development of prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 92, p. 297-305, 2004.
- IMAMOV, O.; SHIM, G.J.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol. Reprod.*; v.73, p.866-71, 2005.
- INGELMO, I.; GÓMEZ, V.; MARTÍN, R.; CODESAL, J.; RODRÍGUEZ, R.; POZUELO, J.M.; SANTAMARÍA, L. Effect of prolactin and bromocriptine on the population of prostate neuroendocrine cells from intact and cyproterone acetate-treated rats: stereological and immunohistochemical study. *Anat. Rec.*, v. 290, p. 855-861, 2007.
- ISAACS, J.T. Control of cell proliferation and cell death in the normal and neoplastic prostate: a stem cell model. In: RODGERS, C.; COFFEY, D.; CUNHA, G.R.; GRAYHACK, J.; HINMAN, F.J.; HORTON, R. Eds. *Benign prostatic hyperplasia*. Washington, DC: Government Printing Office, p. 85-94, 1987.
- ITTMAN, M.; MANSUKHANI, A. Expression of fibroblast growth factors (FGFs) and FGF receptors in human prostate. *J. Urol.*, v. 157, p. 351-356, 1997.
- JARRED, R.A.; McPHERSON, S.J.; BIANCO, J.J.; COUSE, J.F.; KORACH, K.S.; RISBRIDGER, G.P. Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol. Met.*, v. 13, p. 163-168, 2002.
- JEYARAJ, D.A.; UDAYAKUMAR, T.S.; RAJALAKSHMI, M.; PAL, P.C.; SHARMA, R.S. Effects of Long-Term Administration of Androgens and Estrogen on Rhesus Monkey Prostate: Possible Induction of Benign Prostatic Hyperplasia. *Journal of Urology*, v.21, p. 833-844, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J. Histochem.*; v.11, p.447-455, 1979.
- KNOX, J.D.; CRESS, A.E.; CLARK, V.; MANRIQUEZ, L.; AFFINITO, K.S.; DALKIN, B.L.; NAGLE, R.B. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am J Pathol.*; v.145, p.167-74, 1994.

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

KWABI-ADDO, B.; OZEN, M.; ITTMANN, M. The Role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v.11, p. 709-724, 2004.

LAU, K.M.; TAM, N.N.; THOMPSON, C.; CHENG, R.Y.; LEUNG, Y.K.; HO, S.M. Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. *Lab Invest.*; v.83, p.743-757, 2003.

LEAV, I.; MCNEAL, J.E.; KWAN, P.W.; KOMMINOTH, P.; MERK, F.B. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate*; v.29, p.137-145, 1996.

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

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

MARSZALEK, M.; WACHTER, J.; PONHOLZER, A.; LEITHA, T.; RAUCHENWALD, M.; MADERSBACHER, S. Insulin-like growth factor 1, chromogranin A and prostate specific antigen serum levels in prostate cancer patients and controls. *Eur Urol.*; v.48, p.34-39, 2005.

McNEAL, J.E. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.*; v.12, p.619-633, 1988.

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

MORALES, A. Androgen replacement therapy and prostate safety. *Eur Urol.*; v.41, p.113-120, 2002.

MOSTOFI, F.K.; PRICE, E.B.Jr. Tumors of the Male Genital System, Atlas of Tumor Pathology, Second Series, Fascicle 8. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology 1973, 202-217.

NELLEMANN, C.; DALGAARD, M.; HOLST, B.; BONEFELD-JORGENSEN, E.C.; VINGGAARD, A.M. Gene expression changes in rat prostate after activation or blocking of the androgen and estrogen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 237, p. 25-35, 2005.

NEVALAINEN, M.T.; VALVE, E.M.; AHONEN, T.; YAGI, A.; PARANKO, J.; HARKONEN, P.L. Androgen-dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium in vivo and in organ culture. *FASEB J.*, v. 11, p. 1297-1307, 1997.

PRINS, G.S.; BIRCH, L.; COUSE, J.F.; CHOI, I.; KATZENELLENBOGEN, B.; KORACH K.S. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res.*; v.61, p.6089-6097, 2001.

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

ROY-BURMAN, P.; WU, H.; POWELL, W.C.; HAGENKORD, J.; COHEN, M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer*, v.11, pp.225-254, 2004.

SÁTTOLO, S.; CARVALHO, C.A.F.; CAGNON, V.H.A. Influence of hormonal replacement on the ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol treatment. *Tissue Cell*, v.36, p.417-430, 2004.

SINGH, P.B; MATANHELIA, S.S.; MARTIN, F.L. A potencial paradox in prostate adenocarcinoma progression: Oestrogen as the initiating driver. *European Journal of Cancer*, v. 44, p. 928-936, 2008.

SHIN, J.H.; KIM, H.S.; MOON, H.J.; KANG, H.; KIM, T.S.; SEOK, J.H.; KIM, I.Y.; PARK, K.L.; HAN, S.Y.; NAM, S.Y. Effects of flutamide on puberty in male rats: an evaluation of the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *J Toxicol Environ Health A*; v.65, p.433-445, 2002.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *Biol. Reprod.*, v.34, n.5, p.973-983, 1986.
TAYLOR R.A.; RISBRIDGER, G.P. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*; v.76, p.671-68, 2008.

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

TILLEY, W.D.; HORSFALL, D.J.; MCGEE, M.A.; ALDERMAN, J.E.; MARSHALL, V.R. Effects of ageing and hormonal manipulations on the level of oestrogen receptors in the guinea-pig prostate. *J Endocrinol.*; v.112, p.139-144, 1987.

TOBIN, V.A.; CANNY, B.J. The regulation of gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs by testosterone is mediated by dihydrotestosterone. *Endocrinology*; v.139, p.1038-1045, 1998.

TOMAS, D.; KRUSLIN, B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate*, v.61, p.324-31, 2004.

TOORIAN, A.W.; KELLEHER, S.; GOOREN, L.J.; JIMENEZ, M.; HANDELSMAN, D.J. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol Metab.*; v.88, p.5207-5211, 2003.

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

VERHAGEN, A.P.; AALDERS, T.W.; RAMAEKERS, F.C.; DEBRUYNE, F.M.; SCHALKEN, J.A. Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate*; v.13, p.25-38, 1988.

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

WALSH, P.C.; WILSON, J.D. The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. *J. Clin. Invest.*; v.57, p.1093-1097, 1976.

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

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

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

ZAR, J.H. Bioestatistical Anlysis, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall Upper, 1999.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada "Senescência e Próstata: Interações dos hormônios esteroides e dos fatores de crescimento no microambiente glandular".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____

(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2412-1, Instituição: _____

(x) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº 125/2008, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Amanda Cia Hetzl

Aluna: Amanda Cia Hetzl

[Assinatura]
Orientadora: Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

[Assinatura]
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura