

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



LARA SÍLVIA CORRADI

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS 5-ALFA REDUTASE
E AROMATASE NA PRÓSTATA DO GERBILO DA MONGÓLIA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
LARA SÍLVIA CORRADI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Campinas, 2008

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

C817i

Corradi, Lara Silvia

Inibição da atividade das enzimas 5-alfa redutase e aromatase na próstata do gerbilo da Mongólia / Lara Silvia. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Sebastião Roberto Taboga.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Testosterona 5-alfa redutase. 2. Próstata. 3. Aromatase. 4. Reprodução - Biologia. 5. Hormônios esteroídianos. I. Taboga, Sebastião Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: 5-alpha reductase and aromatase enzymatic activities inhibition in the Mongolian gerbil prostate.

Palavras-chave em inglês: 5-alpha reductase; Ventral prostate; Aromatase; Biology of reproduction; Steroids hormones.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Sebastião Roberto Taboga, José Roberto Bosqueiro, Wilson de Melo Júnior, José Carlos Mesquita, Sérgio Luis Felisbino.

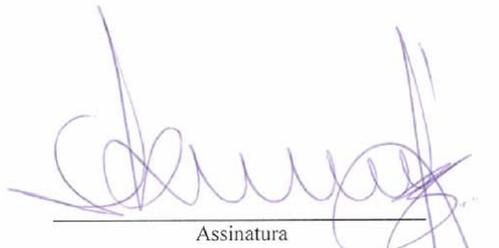
Data da defesa: 24/01/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 24 de Janeiro de 2008.

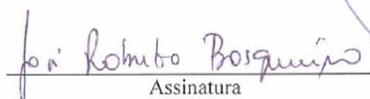
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga (Orientador)



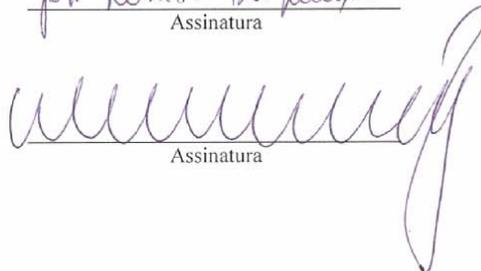
Assinatura

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro



Assinatura

Prof. Dr. Wilson de Melo Júnior

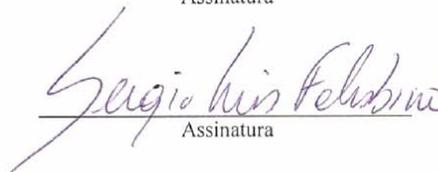


Assinatura

Prof. Dr. José Carlos Mesquita

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino



Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano



Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Assinatura

Profa. Dra. Laurecir Gomes

Assinatura

Dedicatória

*Aos Corradi e aos Olhê Blanck,
minha família.*

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

Agradecimentos

“Preciso de alguém que me olhe nos olhos quando falo. Que ouça as minhas tristezas e neuroses com paciência. E, ainda que não compreenda, respeite os meus sentimentos. Preciso de alguém, que venha brigar ao meu lado, sem precisar ser convocado. Alguém amigo o suficiente para dizer-me as verdades que não quero ouvir, mesmo sabendo que posso odiá-lo por isso. Neste mundo de céticos, preciso de alguém que creia, nessa coisa misteriosa, desacreditada, quase impossível: a amizade. Que teime em ser leal, simples e justo, que não vá embora se algum dia eu perder o meu ouro e não for mais a sensação da festa. Preciso de um amigo que receba com gratidão o meu auxílio, a minha mão estendida. Mesmo que isso seja muito pouco para suas necessidades. Preciso de um amigo que também seja companheiro, nas farras e pescarias, nas guerras e alegrias e que no meio da tempestade, grite em coro comigo: Nós ainda vamos rir muito disso tudo. E ria muito. Não pude escolher aqueles que me trouxeram ao mundo, mas posso escolher meus amigos. E nessa busca empenho minha própria alma, pois com uma amizade verdadeira, a vida se torna mais simples, mais rica e mais bela.”

Charles Chaplin

A vocês, que fazem minha vida mais simples, mais rica e mais bela,

Ana Maria Galvan Custódio, Claudia Pacheco, Cristiani Zanetoni, Daniele Ribeiro, Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, Manoel Biancardi, Maria Etelvina Pinto, Rejane Maira Góes, Renato Simões Cordeiro, Ricardo Fochi, Sabrina Rochel, Sérgio Marcelino de Oliveira, Silvana Gisele Pegorin de Campos, Wellerson Rodrigo Scarano, Hélio e Maria Astride Corradi, Hélio André Corradi, Gisele Rezende Lopes, Mariana Corradi, Paulo Eduardo Gouvêa Borges, Alfredo Saad Júnior, Lúcia e Ademar Olhê Blanck, Vanessa Gouveia Olhê Blanck, Rogério Vicentin, Patrícia e Sebastião Roberto Taboga, Ana Laura Vilamaior Taboga, Hugo Vilamaior Taboga, Lê e Luiz Roberto Falleiros Junior, Ana Maria e Genefredo Monteiro, Ana Yara Gouveia Monteiro, Anyela Gouveia Monteiro, Isabele e Diego Noronha, Karina, Cristian e Lucas Pagliusi, Marrê e Wilson Monteiro, Selma e Tufik Bauab, Solange e Antônio Luiz Folchini, Adelina Buzini da Costa e Silva, Cynthia Delboni, Líliam Panagio, Lucila Mussi, Marileila Varella-Garcia, Revmo. Pe. Francisco Janssen-MSc.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela dedicação e atenção à minha pesquisa, ao meu crescimento profissional e, principalmente, ao meu enriquecimento como pessoa.

Aos Profs. Drs. José Roberto Bosqueiro, José Carlos Mesquita, Wilson de Melo Júnior e Sérgio Luis Felisbino por contribuírem de forma ímpar para este trabalho. E ao Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano e as Profas. Dras. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini e Laurecir Gomes por fazerem parte da banca examinadora.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo imprescindível suporte financeiro nas formas de Bolsa de Doutorado (Processo nº 03/09570-2) e Auxílio à Pesquisa (Processo nº 04/01603-1).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de Bolsa de Estudos de Março a Agosto de 2004.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, na pessoa da Profa. Dra. Laurecir Gomes, por cuidar extremamente da qualidade do curso, e aos docentes do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp, por sempre incentivarem os alunos a prosseguirem com a ciência.

À Lílíam Panagio, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por sua infundável disponibilidade, eficiência e carinho.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE–UNESP, em particular ao Departamento de Biologia, pela disponibilização de todas as suas dependências.

Ao Técnico de Apoio Acadêmico do Laboratório de Microscopia e Microanálise da UNESP de São José do Rio Preto, Luiz Roberto Falleiros Júnior, por sua imensurável amizade e indispensável auxílio para a realização deste trabalho.

Ao Revmo. Pe. Francisco Janssen-MSc, por sua paz e alegria constantes, suas orações e seu exemplo cativante de amor ao próximo.

Aos meus pais, Hélio e Maria Astride e meus irmãos Hélio André e Mariana, minha família, meu maior tesouro, minha felicidade. Com vocês aprendi a amar verdadeiramente e por vocês renovo dia a dia minhas esperanças e meus sonhos.

Ao Leonardo, meu amor. Com quem minha vida passou a ter sentido e alegria. Com quem aprendi a ser forte e não desistir dos nossos sonhos. Por quem quero viver-amando eternamente...

Aos meus inesquecíveis avós Odette e Alfredo Saad, Albertina e Alcides Corradi e Binho Gouveia, sempre vivos no meu coração. Seus exemplos e ensinamentos conduzem meus passos.

À Santa Rita de Cássia pela proteção.

A Deus, sempre, por tudo e para tudo...

Os experimentos que resultaram nesse trabalho foram realizados no Departamento de Biologia e desenvolvidos no Laboratório de Microscopia e Microanálise - Centro de Microscopia “Prof. Dr. Celso Abbade Mourão”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	19
<i>Desenvolvimento e Morfologia da próstata</i>	20
A próstata do gerbilo	28
<i>Os hormônios esteróides sexuais e a próstata</i>	30
A enzima 5alfa-redutase e a Finasterida	35
A enzima Aromatase e o Letrozol	38
<i>A associação de inibidores enzimáticos</i>	42
OBJETIVOS	47
ARTIGOS	49
Artigo 1.	
5-alpha reductase and aromatase suppression change the intraprostatic cellular scenario and hormonal environment of gerbils at different postnatal ages	50
Artigo 2.	
Desbalanço hormonal induzido por bloqueio enzimático afeta a interação epitélio-estroma e contribui para o surgimento de um aparente microambiente desmoplásico na próstata	85
Artigo 3.	
Aumento da expressão de receptores de andrógenos decorrentes da inibição das enzimas 5-alfa redutase e Aromatase pode ser indicativo de atividade hormonal intraprostática alterada	113

CONCLUSÕES GERAIS	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

RESUMO

Os andrógenos têm papel central na biologia da próstata, mas os estrógenos também podem afetar o crescimento e a diferenciação desta glândula. Em tecidos específicos do corpo, a proporção entre andrógenos e estrógenos pode diferir significativamente daquela encontrada no plasma sanguíneo. As concentrações intracelulares desses esteróides nos tecidos alvos são reguladas pelo metabolismo local de hormônios, altamente dependente de enzimas específicas metabolizadoras de esteróides, como a 5 α -redutase (5 α -r) e a Aromatase (*aro*). Na próstata, a ação androgênica é acentuada devido à conversão de testosterona em dihidrotestosterona por ação da enzima 5 α -r, enquanto que a *aro* é responsável pela aromatização da testosterona em estrógenos. Assim, a síntese local destes esteróides assume grande importância em doenças que acometem tecidos glandulares, como o câncer de próstata, onde níveis anormais de hormônios promovem o desenvolvimento e o aumento de ocorrência de malignidades. Desse modo, os papéis dos andrógenos e estrógenos ativados podem ainda ser melhor compreendidos na manutenção das interações homeostáticas epitélio-estromais prostáticas. Estudos com inibidores específicos destas enzimas vêm sendo desenvolvidos a fim de se tentar esclarecer os reais papéis enzimáticos na manutenção da fisiologia prostática, assim como no surgimento e desenvolvimento de doenças. De modo geral, após 30 dias consecutivos de inibição, simultânea ou não, das enzimas 5 α -r e *aro*, respectivamente por ação da Finasterida e do Letrozol, a próstata de gerbilos jovens, adultos e velhos mostrou-se com o compartimento epitelial e o estromal alterados e reorganizados na tentativa de adaptar-se à nova condição hormonal induzida. Imediatamente após o término de administração das drogas, na fase inicial do período de pós-tratamentos, as concentrações de testosterona e estrógenos modificaram-se, as células epiteliais tiveram o padrão de atividade secretora alterada e, no estroma, a matriz extracelular ficou totalmente remodelada, além das células musculares lisas e dos fibroblastos fenotipicamente alterados. Na fase final do período de pós-tratamento, ficou evidente a tentativa da próstata em se normalizar morfológica e fisiologicamente,

porém, em nenhuma das idades isso aconteceu de modo efetivo. O bloqueio da metabolização de hormônios esteróides na próstata pode ser uma ferramenta importante para o estudo da interação epitélio-estroma tanto na fisiologia normal, quanto nas doenças da próstata. Sugere-se portanto, que o desbalanço entre as concentrações de andrógenos e estrógenos provocados pela Finasterida e de Letrozol, juntos ou separados, alterou significativamente a interação epitélio-estroma. Todos os resultados obtidos parecem ser indicativos de importantes sinais do novo cenário hormonal intraprostático. A recuperação do equilíbrio entre as concentrações hormonais da próstata fica comprometida após o bloqueio enzimático, dando, portanto, às enzimas em estudo, status de crucial importância para o desenvolvimento e manutenção da próstata. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre epitélio e estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares da próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia desta glândula.

ABSTRACT

Androgens have substantial role in the biology of the prostate, but estrogens also can affect the growth and differentiation of this gland. In specific tissues of the body, the ratio between androgens and estrogens can differ significantly from that found into plasma. The intracellular concentrations of these steroids in target tissues are mediated by a local hormone metabolism, by specific steroid-metabolizing enzymes, as the 5 α -reductase (5 α -r) and the aromatase (*aro*). In the prostate, the androgenic action is accentuated due to the conversion of testosterone into dihydrotestosterone by the activity of the 5 α -r, while *aro* enzyme is an alternative pathway for the aromatization of testosterone into estrogens. These locally synthesized steroid hormones assume thus, a great importance to the prostate cancer, where abnormal hormone levels can promote development and proliferation of malignancy to this gland. The interactions of androgens and estrogens may be better understood focusing the maintenance of homeostatic prostatic epithelial-stromal interactions. Studies conducted with inhibitors of these specific enzymes have been carried out in an effort to clarify the real role of steroid-metabolizing enzymes in the maintenance of prostatic physiology, as well as into malignant progression of prostatic cancer. After 30 consecutive days of inhibition, simultaneous or not, of the enzymes 5 α -r and *aro*, respectively by Finasteride and Letrozol, the prostate of young, adult and old gerbils revealed that epithelial and stromal compartments were totally modified and reorganized in the attempt to adapt to the new induced hormonal condition. Immediately after the end of drug administration, in the early phase of the post-treatment period, the concentrations of testosterone and estrogens had been altered, the epithelial cells had their secretory activity pattern modified and, in the stromal compartment, the extracellular matrix was totally remodeled. The smooth muscle cells and fibroblasts became phenotypically modified. In the late phase of the post-treatment period, it was evident the attempt of the prostate gland to become morphologically and physiologically as a normal gland, however, this was not achieved in any analyzed gerbil. These steroid hormone metabolism blockades seem to

be a good tool for the study of the epithelium-stroma interaction both in normal and abnormal prostate gland. Based on this data, it is suggested that the unbalance between androgens and estrogens intraprostatic concentrations provoked by Finasteride and Letrozol, together or not, interfered into the prostatic compartments interactions significantly. The results seem to be indicative of important signals of the new locally hormonal scene within the prostate gland. The recovery of balance hormonal concentrations of the prostate is damaged after the enzymatic blockade what gives, therefore, to this to 5α -r and *aro* enzymes, a status of crucial key for the normal and abnormal prostate gland. The establishment of experimental models for this kind of study and the knowledge of the cellular and macromolecular components of the prostate are also fundamental for the agreement of development, structure and physiology of prostate.

INTRODUÇÃO

Desenvolvimento e Morfologia da Próstata

A próstata, glândula sexual acessória do aparelho reprodutor masculino é responsável pela produção da maior fração do fluido seminal. O grande interesse em se compreender a biologia desta glândula deve-se tanto ao seu fascinante processo de desenvolvimento, quanto à alta incidência de doenças prostáticas, como adenocarcinoma e a hiperplasia prostática benigna (HPB) nos homens (Marker et al., 2003). O câncer de próstata é a principal e mais freqüente doença neoplásica que atinge os homens e embora represente uma causa comum de morbidade e mortalidade, é passível de prevenção e cura (Huynh et al., 2001). Entre os homens americanos, o câncer de próstata é o tipo mais comum de neoplasma não-cutâneo e a segunda maior causa de mortalidade por carcinoma. Esta malignidade tem os andrógenos e estrógenos altamente envolvidos. Porém, a patologia molecular desse problema é complexa, pois além de ser uma doença altamente relacionada à idade, fatores hereditários e andrógeno-dependente, é também influenciada por hormônios esteróides sexuais endógenos, fatores ambientais, dietas, repostas imunes e inflamatórias (Huynh et al., 2001; Carruba, 2006; De Marzo et al., 2007).

A próstata, juntamente com a glândula seminal, é dependente de andrógenos para o desenvolvimento e diferenciação durante a embriogênese e para sua manutenção durante a vida adulta. A ação destes hormônios, que também regula as ações co-dependentes das interações epitélio-estroma, é mediada via receptores hormonais específicos (Cunha et al., 1985, 1996; Hsing et al., 2002). Pesquisas mostram que na ausência de andrógenos, hormônios não-androgênicos como o estradiol, a vitamina D e fator de crescimento tipo-insulina, em combinação com os receptores de hormônios podem induzir a ação androgênica. Assim, a ação hormonal na próstata é determinada não somente pela concentração de andrógenos, mas também por vários outros fatores, como os

níveis de receptores hormonais e seus co-ativadores, presença de fatores de crescimento, e talvez outros fatores que ainda venham a ser identificados (Hsing et al., 2002).

A interação parácrina entre o epitélio e o estroma ao seu redor tem importância fundamental durante a morfogênese prostática e na homeostase do órgão adulto (Cunha, 1985; Hayward et al., 1997). As interações envolvidas no desenvolvimento da próstata acontecem de maneira recíproca: o mesoderma, derivado do seio urogenital (SU), induz a diferenciação epitelial e, este epitélio em desenvolvimento, induz a diferenciação do mesoderma em músculo liso (Cunha et al., 2002). O resultado final desta relação epitélio-mesenquimal é a formação do tecido prostático maduro, no qual o epitélio mostra-se com células de fenótipos diferenciados e o estroma composto, predominantemente, por células musculares lisas (CML). Na fase adulta de um indivíduo, interações semelhantes às acima citadas, mantêm a próstata funcionalmente ativa através da homeostase, dependente de ação androgênica, entre morte e reposição celular (Kirby et al., 1996; Cunha et al., 2002). Um desequilíbrio na interação homeostática entre epitélio e estroma prostáticos pode iniciar e promover carcinogênese neste órgão (Sung & Chung, 2002) e durante estes processos, o mecanismo de estimulação parácrina, principal responsável pelo desenvolvimento e manutenção da próstata, pode alterar-se para um mecanismo autócrino estimulado por andrógenos (Cunha et al., 2002).

Em todas as espécies de mamíferos, o desenvolvimento e o crescimento da próstata começam ainda na vida fetal e completam-se durante a maturidade sexual. A formação da próstata inicia-se a partir de uma subdivisão da cloaca, no SU, o qual é uma estrutura embrionária ambissexual, formada por uma camada epitelial derivada do endoderma, circundada por uma camada mesenquimal, de origem mesodérmica (Marker et al., 2003). A partir deste SU, em ambos os sexos, a bexiga se desenvolve. Nos machos é formada a próstata, a uretra prostática e as glândulas bulbouretrais, enquanto que nas fêmeas, somente a vagina e a uretra originam-se desta estrutura (Cunha et al., 2004a, b). Em humanos, o SU surge aproximadamente por volta da sétima semana de gestação e permanece indiferenciado até a décima ou décima-segunda semanas, quando

então se inicia a morfogênese prostática, através e dependente dos andrógenos produzidos pelos testículos fetais (Marker et al., 2003). A formação da próstata em camundongos começa por volta do décimo-sétimo dia de gestação e, em ratos, no décimo-oitavo dia (Thomson, 2001).

O primeiro sinal de desenvolvimento da próstata é o aparecimento de brotos epiteliais sólidos a partir do SU, que crescem em direção ao mesênquima circundante. Estes brotos apresentam padrão espacial de crescimento característico em cada espécie, o que deste modo, estabelece as subdivisões lobulares da próstata. Em roedores, a maioria dos ductos prostáticos não é ramificada ao nascimento. Porém, na fase neonatal, como os ductos se alongam em direção ao mesênquima, eles se bifurcam. É este processo de ramificação que, em ratos e camundongos, origina a subdivisão característica da próstata destes animais em próstata dorso-lateral, próstata ventral e próstata anterior. A morfogênese da próstata de roedores e de humanos ocorre de maneira análoga. Os lobos compõem arranjos circunferenciais ao redor da uretra prostática e apresentam características particulares de ramificação de ductos e produção de secreções protéicas. Em um mesmo lobo, os ductos prostáticos apresentam heterogeneidade regional quanto ao tipo celular, síntese e secreção de proteínas, além de distintas respostas a hormônios (Marker et al., 2003; Cunha et al., 2004a). Embora a morfologia da próstata varie significativamente entre os mamíferos, os sinais instrutivos provenientes do mesênquima do SU estão conservados entre as diferentes linhagens de espécies (Marker et al., 2003). Como mencionado anteriormente, a morfologia prostática humana de um adulto é mais compacta, sem distinção entre seus lobos. Este tipo de organização é descrito em três zonas diferentes: zona central, de transição e periférica. Em termos de homologia, nota-se que os lobos ventral e dorsal da próstata de rato correspondem, respectivamente, à zona de transição e à zona posterior da próstata humana (McNeal, 1983).

Simultaneamente, há uma citodiferenciação epitelial e mesênquima-estromal que ocorre de duas a três semanas depois do nascimento de mamíferos roedores, como ratos e camundongos (Marker et al., 2003). À medida que estes cordões epiteliais sólidos se canalizam, o epitélio se reorganiza em duas populações distintas de células: as células epiteliais basais, que se

localizam adjacentes à membrana basal, formando uma camada descontínua de células e as células luminiais colunares altas, que diferenciam-se e delimitam o lúmen ductal (Hayward et al., 1996a; Wang et al., 2001). Simultaneamente, o mesênquima-estromal prostático também se diferencia em uma camada de músculo liso que circunda as porções glandulares e os ductos prostáticos (Hayward et al., 1996b; Hayward et al., 1997). Em camundongos, a morfogênese da ramificação está quase completa duas semanas depois do nascimento (Marker et al., 2003; Cunha et al., 2004a, b). Os níveis de testosterona (T) séricos são baixos durante este período e o aumento do peso da próstata é discreto. Na puberdade, os níveis deste hormônio começam a elevar-se significativamente e o peso da glândula e a quantidade de DNA aumentam mais rápido do que durante o período perinatal. Em camundongos, as proteínas secretórias prostáticas são primeiramente detectadas pouco antes da puberdade (por volta de vinte dias após o nascimento), e aumentam concomitantemente com os níveis séricos de T. No período fetal humano há pouquíssima atividade secretora nas células prostáticas, presumivelmente devida à ação dos andrógenos testiculares fetais (Marker et al., 2003).

A expressão de receptores de andrógenos (RA) no mesênquima e do SU é um dos fatores que possibilita o desenvolvimento das glândulas do trato genital masculino. O mesênquima do SU expressa altos níveis deste receptor, enquanto que no epitélio, o mesmo é quase indetectável durante esse mesmo período. A expressão de fatores de crescimento parácrinos no mesênquima também é responsável pela morfogênese glandular e crescimento das células epiteliais na próstata em desenvolvimento (Hayward et al., 1996a, b).

A organogênese prostática é tão dependente das interações mesenquimais/epiteliais que, tanto a morfogênese quanto a diferenciação do epitélio e do estroma não acontece se estes dois tecidos forem colocados para crescer separadamente (Cunha et al., 2004a, b). Experimentos realizados com recombinação tecidual revelam que o desenvolvimento prostático é fortemente dependente de andrógenos, como resultado obrigatório das interações parácrinas entre o epitélio e o mesênquima do SU. Durante o desenvolvimento prostático, este mesênquima determina a identidade epitelial prostática, induz a formação de brotos epiteliais, permite o crescimento destes

brotos, regula a ramificação dos ductos, promove a diferenciação do epitélio secretor e especifica os tipos de proteínas secretoras expressadas. O epitélio prostático em desenvolvimento, por sua vez, induz o mesênquima do SU a se diferenciar em músculo liso (Marker et al., 2003; Cunha et al., 2004 a, b).

Na maturidade sexual, a próstata do camundongo é uma glândula multilobulada, situada ao redor da uretra, na base da bexiga (Price, 1963; Marker et al., 2003). Nos humanos, a próstata é uma glândula túbulo-alveolar, composta de ductos e ácinos, com atividade secretora principalmente ligada à porção alveolar, porém os ductos também podem secretar algumas substâncias que compõem o conteúdo final da secreção prostática (Reese et al., 1986). A camada celular epitelial consiste de quatro tipos de células: basal, secretora, intermediária e neuroendócrina que são dependentes dos hormônios esteróides e reagem diferentemente a cada um deles (De Marzo et al., 1998, Rumpold et al., 2002). As células basais formam uma camada contínua entre o epitélio secretor e a membrana basal, o que não é observado em camundongos, onde as poucas células basais aparecem em camadas descontínuas ao redor dos ductos. Além disso, recentes pesquisas com próstata de camundongos e humanos têm considerado as células basais como um tipo de célula-tronco epitelial. As células neuroendócrinas podem ser notadas na camada epitelial, tanto da próstata em desenvolvimento quanto na adulta (Marker et al., 2003). As células secretoras, as basais e as neuroendócrinas, que compõem a maior parte do epitélio prostático, além de diferirem quanto à regulação hormonal, são responsáveis pela secreção de proteínas e substâncias de baixo peso molecular que também compõem o fluido prostático (Bonkhoff et al., 1998).

O estroma prostático é um arranjo complexo de CML e fibroblastos imersos em uma matriz extracelular (MEC) ao redor dos ácinos e ductos (Tuxhorn et al., 2001). Neste compartimento encontram-se ainda macrófagos e células endoteliais vasculares. Estas células têm papel importante nos mecanismos de estimulação parácrina, especialmente sobre o epitélio (Farnsworth, 1999) e apresentam plasticidade funcional, sendo capazes de modular seu fenótipo frente a situações fisiológicas e patológicas, caracterizando-se pela mudança na expressão de genes

de proteínas específicas (Worth et al., 2001). Grande importância tem sido atribuída às CML, tanto no controle homeostático, quando no desenvolvimento e estabelecimento de neoplasias da próstata (Cunha et al., 1996; Farnsworth, 1999). O estroma prostático humano e de camundongo é composto por músculo liso, sendo esta camada mais espessa na glândula dos humanos (Marker et al., 2003). Os fibroblastos, juntamente com as CML, sintetizam os componentes teciduais e regulatórios da MEC, que é composta de fibras de colágeno, elásticas e proteoglicanos, entre outras moléculas que se associam a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas remodeladoras (Tuxhorn et al., 2001). Na próstata humana adulta, camadas de células do músculo liso circundam os ductos epiteliais e, por seu papel contrátil, promove a eliminação das secreções prostáticas no interior da uretra, durante a ejaculação (Hayward et al., 1996b).

O colágeno e as fibras elásticas fornecem resistência mecânica e flexibilidade ao tecido, além de servirem de substrato para adesão e migração celular, processos mediados por glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e laminina. Os proteoglicanos regulam a estrutura da MEC e sua permeabilidade, ligam-se a fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases (Kreis & Vale, 1999). Os fatores de crescimento, enzimas remodeladoras e seus inibidores, junto com os componentes fibrilares da MEC participam ativamente de vários processos fisiológicos e patológicos da próstata, permitindo proliferação e migração dos tipos celulares envolvidos na manutenção e reparo tecidual desse órgão (Tuxhorn et al., 2001; Thomson et al., 2002).

Estudos baseados na privação androgênica têm mostrado que a síntese e organização dos componentes da MEC, juntamente com as CML, apresentam respostas adaptativas a diversas situações hormonais sendo, em grande parte, portanto, estas repostas moduladas por andrógenos. Horsfall et al. (1994) estudando o estroma prostático durante o envelhecimento de cobaias observaram alterações nos componentes fibrilares da MEC, além de aumento da atividade sintética das CML fenotipicamente modificadas. Na próstata ventral de ratos submetidos à castração houve aumento e remodelação dos componentes estromais prostáticos, principalmente de colágeno e elastina (Carvalho et al., 1997a, b; Ílio et al., 2000). Vilamaior et al. (2000; 2005), no mesmo

modelo experimental, descreveram as modificações fenotípicas das CML, sugerindo um possível papel para estas células na remodelação e síntese dos componentes da MEC, dependentes da situação hormonal induzida pela castração.

Os estrógenos, além dos andrógenos, também estão envolvidos no crescimento da próstata e conseqüentemente têm revelado participação em patogêneses neste órgão. (Huynh et al., 2001). A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e o câncer prostático estão entre as doenças que mais freqüentemente atingem a glândula e os hormônios androgênicos, juntamente com outros fatores exercem papel importante na etiologia destas lesões (Hsing, 2002). A HPB caracteriza-se por uma predominante proliferação estromal e, embora um aumento do epitélio também ocorra, a integridade regional da glândula é mantida. O câncer de próstata, porém, é considerado uma doença do epitélio e, freqüentemente, estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). Aparentemente, o estroma é o maior alvo dos estrógenos, o que pode explicar os diferentes resultados de substituição de estrógenos na HPB (doença predominantemente estromal) e câncer (doença predominantemente epitelial) (Ekman, 2000). Quando estrógenos são administrados a indivíduos jovens, somente os elementos estromais prostáticos são aumentados, enquanto que os epiteliais regredem. Experimentalmente, o mesmo também é observado com relação ao aumento das proteínas da MEC (colágenas, não colagênicas e elastina) de ratos (Nakada et al., 1994) e cobaias (Scarano et al., 2004).

Mudanças nas concentrações dos hormônios esteróides relacionadas ao envelhecimento, também são capazes de promover alterações nos compartimentos prostáticos de várias espécies de mamíferos, uma vez que isto interfere na comunicação epitélio/estromal (Untergasser et al., 2005). Alterações histológicas proliferativas acometem a próstata em resposta ao desequilíbrio hormonal que se instala no organismo humano nesta fase da vida. Entre os fatores promotores desse evento está um acentuado declínio da concentração sanguínea de T (Bonkhoff & Remberger, 1998). Uma forte correlação entre o envelhecimento e o aparecimento de lesões proliferativas espontâneas acontece na próstata humana (Hsing & Devesa 2001; Untergasser et al.,

2005) e do gerbilo (Pegorin de Campos et al., 2006). Durante o envelhecimento do homem, muitas alterações histológicas acometem a próstata, em resposta a descompensações hormonais e à ruptura da homeostase entre epitélio e estroma. Nesta fase, mesmo com o declínio dos níveis de T, a quantidade de estrógeno circulante nos homens não diminui, o que pode causar um aumento de mais de 40% na proporção entre estradiol e T (Vermeulen et al., 2002; Risbridger et al., 2003; Untergasser et al., 2005). Há uma diminuição idade-dependente dos níveis de Dihidrotestosterona (DHT) no epitélio e um aumento concomitante de estrona e estradiol no compartimento estromal, o que pode ser de importância patogênica para o desenvolvimento da HPB, se de fato um balanço sinérgico estrógeno/andrógeno é necessário para a integridade e crescimento normal da próstata (Ito et al., 2000). Em ratos, diferenças na regulação da expressão de RA entre os lobos prostáticos somadas ao envelhecimento podem contribuir para o desenvolvimento de hiperplasia nesta espécie (Banerjee et al., 2001). No desenvolvimento da HPB, o fator envelhecimento pode ser considerado um efeito cumulativo, resultante da interação constante de fatores intrínsecos e extrínsecos à próstata (Lee et al., 1997). No estroma, há aumento da proporção estrógeno/andrógeno com o aumento da idade, tanto em homens saudáveis, quanto naqueles com HPB. Este aumento pode ser devido à aromatização da T em estrógeno ou da Androstenediona (A-dione) em Estrona. Embora não sejam efetivas, estas observações podem predizer o potencial patológico do estrógeno no desenvolvimento da HPB (Lee et al., 1997).

Alterações dos níveis androgênicos ou de suas funções, em geral devido a problemas de ligação da DHT ao RA, bem como nos níveis ou funções dos fatores de crescimento que são mediados pela DHT podem ser consideradas causas da ruptura da homeostase importante para a manutenção da próstata (Carson & Rittmaster, 2003). O bloqueio da atividade estrogênica pode causar uma ruptura na produção de fatores de crescimento que agem nas células epiteliais (Huynh et al., 2001). Várias formas de se conseguir alívio dos sintomas da HPB e promover a regressão do câncer prostático têm sido obtidas através de pesquisas das respostas da próstata aos hormônios, sob várias condições, demonstrando que as lesões prostáticas, malignas ou não, podem ser tratadas

através de estratégias hormonais (Droller, 1997; Hsing, 2002). A redução das concentrações de andrógenos pode ser alcançada pela ablação androgênica gonadal, através da castração cirúrgica, por meio de administração de estrógenos ou, ainda, por inibição da síntese e liberação do Hormônio Folículo Estimulante - FSH e do Hormônio Luteinizante - LH, pelo uso de hormônios antagonistas. Drogas anti-androgênicas, competidoras dos andrógenos pela ligação aos RA e drogas que bloqueiam enzimas importantes para a potencialização da ação de hormônios na próstata também têm se revelado como importantes instrumentos no tratamento das patologias prostáticas (Galbraith & Duchesne, 1997). Mesmo causando alguns desconfortáveis efeitos colaterais, estas drogas mostraram que a utilização de tratamentos combinados de anti-andrógenos e anti-estrógenos possibilita melhora dos sintomas dos pacientes portadores de doenças na próstata, além de esclarecer os mecanismos pelos quais os estrógenos influenciam o crescimento prostático normal, o crescimento independente de andrógenos e a metástase das células cancerígenas da próstata (Hedlund, 2000; Huynh et al., 2001).

A próstata do gerbilo

A utilização de gerbilos, roedores murídeos da subfamília Gerbillinae, é cada vez maior na pesquisa científica das áreas da imunologia (Jeffers et al., 1984; Nawa et al., 1994), fisiologia (Nolan et al., 1990), culturas de células (Moritomo et al., 1991) e de morfologia (Redecker, 1991; Aoki Komori et al., 1994; Jones et al., 1997; Santos et al., 2000; Santos e Taboga; 2002; Corradi et al., 2004; Pegorin de Campos et al., 2006). O gerbilo da espécie *Meriones unguiculatus* tem se revelado um bom modelo para o estudo da próstata (Santos et al., 2000; Santos e Taboga; 2002; Pegorin de Campos et al., 2006; Santos et al., 2007; Oliveira et al., 2007a), pois neste animal, esta glândula apresenta-se anatomicamente semelhante à próstata humana, no que se refere à compacidade e fusão de seus lobos, características ausentes no rato e no camundongo, onde os lobos ventral, dorsal e dorso-lateral são distintos (Price, 1963).

Histologicamente, a próstata dos gerbilos jovens (48 dias) é formada por ácinos secretores pequenos e ainda em formação, apresentando epitélio simples, com pequenos dobramentos em sua extensão. Este compartimento é delimitado por estroma não muscular, de tecido conjuntivo frouxo, adjacente ao epitélio acinar e, adjacente a este, há uma espessa camada de CML. Nos gerbilos adultos (112 dias), a próstata apresenta ácinos com epitélio prismático simples e altamente secretor. Entre as porções glandulares, há estroma conjuntivo vascularizado, com poucas fibras conjuntivas e elásticas, além de CML bem compactadas, dispostas ao redor de cada ácino. Ultra-estruturalmente, o epitélio prostático mostra-se heterogêneo e no estroma as CML revelam-se entremeadas por fibras de colágeno. Estas características teciduais e a disposição dos elementos epiteliais, estromais e musculares são também muito semelhantes às encontradas na próstata humana. Durante o climatério dos gerbilos (18 meses) há um aumento na incidência de alterações morfológicas espontâneas na próstata, como alterações neoplásicas intra-epiteliais, adenocarcinomas e também hiperplasia estromal e proliferação das células epiteliais (Pegorin de Campos et al., 2006). Na maioria dos homens, a partir dos 50 anos de idade, as concentrações hormonais sofrem declínio lento e gradual, o que coincide com o surgimento de várias doenças prostáticas, em resposta a estas descompensações hormonais (Ekamn, 2000; Hsing et al., 2002).

Fundamentando-se nas semelhanças morfo-funcionais até o momento já estabelecidas, pode-se criar situações experimentais e correlações com homem, devido a grande importância da próstata para a homeostase e funcionalidade de todo o aparelho reprodutor masculino. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre epitélio e estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares da próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia desta glândula.

Os Hormônios Esteróides Sexuais e a Próstata

Nas últimas décadas, epidemiologistas e pesquisadores têm concentrado esforços para explicar como os vários fatores responsáveis pelas doenças que acometem a próstata somam-se e contribuem para o surgimento e o desenvolvimento de patologias mais severas nesta glândula (Hsing & Devesa, 2001). Sabe-se que o ambiente e a dieta são prováveis de induzir significativas mudanças na concentração e no metabolismo dos hormônios esteróides sexuais, o que pode contribuir para o desenvolvimento do câncer de próstata. Com base nisso, os hormônios podem ser considerados intermediadores dos fatores exógenos, como o ambiente ou a nutrição, e os alvos moleculares do processo de iniciação, promoção e progressão do câncer (Carruba, 2006).

Resultados obtidos com estudos epidemiológicos e experimentais mostram que, além desses hormônios esteróides sexuais regularem o desenvolvimento, crescimento e funcionalidade da próstata, eles também têm papel ativo no desenvolvimento e na progressão de câncer nesse tecido (Härkönen & Mäkelä, 2004; Vihko et al., 2006). Analisando-se os efeitos sinérgicos entre andrógenos e estrógenos constatou-se que esses últimos podem aumentar a expressão de genes de resposta a andrógenos (Härkönen & Mäkelä, 2004). Assim, o equilíbrio entre esses dois hormônios é importante, não apenas para a manutenção funcional da próstata, mas também para o surgimento e o desenvolvimento de doenças (Risbridger et al., 2003).

Os andrógenos têm papel central na biologia da próstata, mas os estrógenos também exercem funções importantes para a homeostase da glândula. Os efeitos androgênicos em células prostáticas-alvo resultam da interação do hormônio com RA, sendo a produção de andrógenos regulada pelo eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (Cunha et al., 2001). O principal andrógeno circulante é a T e as células de Leydig são responsáveis pela produção de 95% desse esteróide e a supra-renal, de 5% (Hsing et al., 2002). A T é sintetizada por ação catalítica da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17HSD) tipo 3 nas células de Leydig dos testículos, a partir da

Androstenediona (A-dione), sob controle de hormônios da hipófise. Na próstata, esta mesma conversão também acontece, porém por ação de outra enzima, a 17HSD tipo 5. Nas células basais do epitélio prostático, o precursor inativo dehidroepiandrosterona (DHEA) é convertido a A-dione pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) tipo1 e, então em T por ação da enzima 17HSD tipo 5. Na próstata, o hormônio DHT é o andrógeno predominante, formado a partir de T por ação da enzima 5 α -redutase. A T e a DHT se ligam ao mesmo tipo de receptor – o RA, porém desencadeiam distintas funções fisiológicas. A T regula a diferenciação sexual, além de manter as funções sexuais e a libido, já a DHT tem papel fundamental durante a virilização embrionária puberal, além de ser responsável pela funcionalidade da próstata do indivíduo adulto (Soronen et al., 2004).

Apesar de a próstata ser o principal alvo dos andrógenos, ela também é considerada dependente de estrógenos, pois expressa receptores específicos de estrógenos (RE) alfa (RE α) e beta (RE β) (McPherson et al., 2007; Oliveira et al, 2007b). O RE β assume um papel importante na diferenciação e proliferação de células prostáticas, assim como também possibilita a modulação das fases iniciais de carcinogênese da próstata e o desenvolvimento de câncer independente de andrógenos (McPherson et al., 2007). Além de se ligar diretamente ao RA, a DHT pode também agir indiretamente através de seu metabólito 5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol). Diferentemente da DHT, este metabólito se liga aos RE, especialmente ao RE β , revelando que este produto androgênico tem ação intrínseca estrogênica. É notável que a concentração prostática do 3 β -diol é 100 vezes maior do que o estradiol, sugerindo, portanto, que ele pode ser o principal ligante do RE β nesta glândula (Oliveira et al., 2007b).

Os estrógenos regulam o desenvolvimento e a função da próstata em vários estágios da vida do homem, através de mecanismos diretos e indiretos (Cunha et al., 2001; Härkönen & Mäkelä, 2004). O crescimento, a diferenciação e as funções da próstata são primariamente controladas por andrógenos, mas os estrógenos modulam estes efeitos de dois modos: a via mais

importante é a da regulação estrogênica indireta, que interfere na produção de andrógenos por repressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Outra via de regulação indireta por estrógeno é via prolactina. Os estrógenos também têm efeitos diretos sobre a próstata, os quais podem ser alcançados pela produção local do hormônio, através da aromatização da T, por ação específica da enzima *aro* (Härkönen & Mäkelä, 2004). Apesar da alta expressão de RE β em tecidos de próstata normais, a concentração de estradiol é baixa, corroborando com dados de baixa expressão da *aro* aromatização e/ou com a ausência de produção de estrógeno (Oliveira et al., 2007b).

Na próstata, há receptores de estrógenos nos fibroblastos, nas células epiteliais basais e acinares e tanto o estrógeno quanto a DHT são capazes de diminuir a taxa de morte celular. Aumento da concentração sérica de estrógenos pode promover indiretamente o crescimento prostático, pelo aumento da produção de fatores de crescimento. Os estrógenos induzem os fibroblastos prostáticos a expressarem os receptores dos fatores de crescimento epidermal e o do fibroblasto, aumentam os níveis de RA e estimulam as células epiteliais basais a produzirem fatores de crescimento que agem nas células epiteliais (Droller, 1997). Huynh et al. (2001) sugerem que, *in vivo*, os estrógenos podem induzir a proliferação das células epiteliais prostáticas de ratos de modo autócrino ou parácrino. Já em cães, estrógenos causaram notável estimulação do crescimento prostático (Rhodes et al., 2000).

A produção localizada de hormônios (Fig. 1) vem crescentemente adquirindo grande importância para o entendimento de algumas doenças, particularmente de tecido glandulares como as mamas e a próstata, onde níveis androgênicos e/ou estrogênicos anormais podem promover o desenvolvimento e a proliferação de tumores (Risbridger et al., 2003; Carruba, 2006). As concentrações intracelulares dos esteróides nos tecidos alvos são reguladas por biossíntese e metabolismo local desses hormônios, altamente dependente de enzimas específicas metabolizadoras de esteróides (Labrie et al., 2000; Carruba, 2006). O tecido prostático conta com uma variedade de enzimas esteróides-metabolizadoras, do tipo esteróides-sulfatases, que são requeridas para a formação local de andrógenos e estrógenos ativados.

Como principal fonte para esta produção hormonal local, os esteróides derivados da supra-renal, como a DHEA e a sua forma sulfatada (DHEA-S) e A-diona, aparecem abundantemente na circulação (Fig. 1) (Labrie et al., 2000; Vihko et al., 2006). Em humanos, a contínua formação dos hormônios esteróides sexuais a partir do DHEA, nos tecidos periféricos, parece ter papel importante na manutenção de um funcionamento adequado da maioria dos tecidos. Altos níveis de DHEA e DHEA-S circulantes se tornam fontes importantes de substrato para a formação de andrógenos e estrógenos. As concentrações séricas de DHEA-S em homens e mulheres adultas chegam a ser de 100 a 500 vezes maiores do que as de T, e de 1.000 a 10.000 mais altas que as concentrações séricas de estrógenos, gerando assim um grande reservatório de substrato para a conversão local de andrógenos e estrógenos (Labrie et al., 2000). Esses esteróides tornam-se substratos nos tecidos periféricos e os hormônios, a partir deles produzidos exercem suas ações nas mesmas células onde a síntese aconteceu, sem que tenham sido necessárias liberação e diluição dos hormônios ativados no espaço extracelular ou na circulação geral, modo este chamado de intrócrino. Portanto, esses esteróides-substratos provenientes da supra-renal acabam por regular, de modo muito eficaz, a ação dos andrógenos e estrógenos ativos em nível pré-receptor das células-alvo (Vihko et al., 2006). Assim, a taxa de formação de cada hormônio esteróide sexual depende da atividade específica de enzimas metabolizadoras de andrógenos e estrógenos presentes nas células de cada tecido (Labrie et al., 1993; 2000).

Alterações no padrão de expressão destas enzimas podem modificar a concentração intracelular dos esteróides sexuais, desempenhando papel pato-fisiológico no desenvolvimento de cânceres associados aos hormônios (Labrie et al., 2000; Soronen et al., 2004; Vihko et al., 2005). No metabolismo de andrógenos e estrógenos, os produtos originados dessas reações enzimáticas são fatores que influenciam o comportamento e a fisiologia de todo o aparelho reprodutor e têm inúmeras implicações durante toda a vida do indivíduo (Lephart et al., 2001).

As enzimas responsáveis pela conversão local de T em DHT e da aromatização de T em estrógeno, respectivamente a 5α -r e a *aro*, estão presentes na fração microsomal celular e

utilizam o NADPH durante a conversão dos substratos. As enzimas moduladoras do metabolismo local dos hormônios esteróides e, conseqüentemente, da concentração dos esteróides ativos nos tecidos periféricos incluem, além da *aro* e das 5 α -r tipo 1 e tipo 2, as esteróides sulfatases, as desidrogenases do tipo 3 β -hidroxiesteróide desidrogenases (3 β -HSDs), 3 α -hidroxiesteróide desidrogenases (3 α -HSDs) e 17 β -hidroxiesteróide desidrogenases (17 β -HSDs), as sulfotranferases e sulfatases (Fig. 1) (Soronen et al., 2004; Vihko et al., 2006).

A *aro* converte andrógenos em estrógenos, preferencialmente, A-dione em estrona e a T em 17 β -estradiol. A 5 α -r tipo 2 converte, preferencialmente, a A-dione em androstanediona e a T em DHT, andrógeno muito potente e indispensável para o organismo masculino (Alléra et al., 2004). Expressões e atividades alteradas desses tipos enzimáticos podem levar a um acúmulo diferencial de derivados ativos de hormônios esteróides nos tecidos periféricos sendo, portanto, importantes para prever o impacto biológico que os hormônios esteróides sexuais sintetizados nesse local podem causar, além de revelarem seus papéis potenciais no desenvolvimento e progressão tumoral (Carruba 2006).

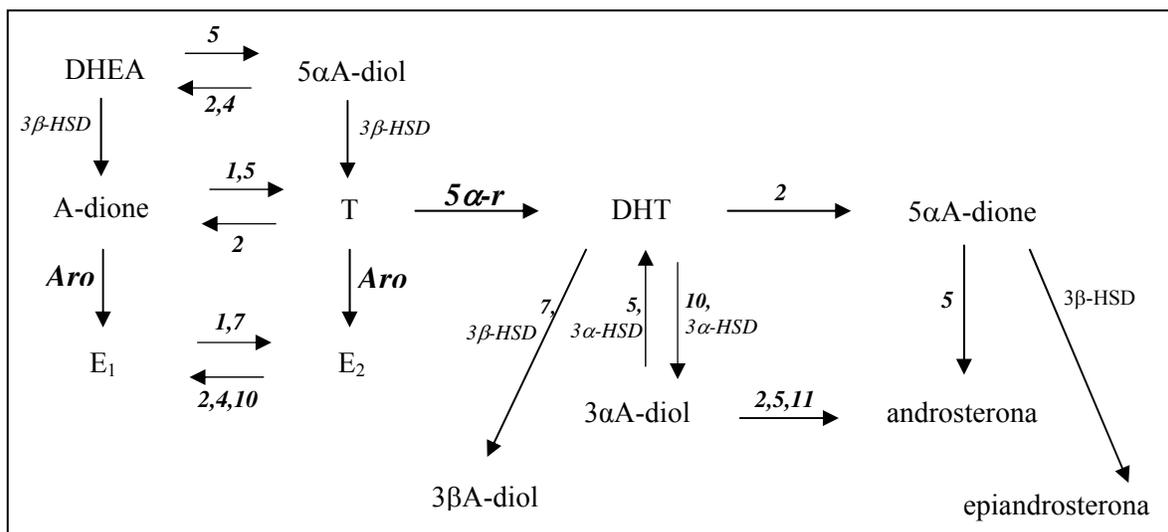


Figura 1. Metabolismo de esteróides no tecido prostático. 1, 2, 4, 5, 7, 10, e 11 são diferentes tipos de 17HSD; E₁, estrona; E₂, estradiol; Aro, Aromatase; A-dione, androstenediona; T, testosterona; DHEA, dehidroepiandrosterona; 5 α A-diol, 5 α -androstenediol; 5 α A-dione, 5 α -androstenediona; 5 α -r, 5 α -reductase; DHT, dihydrotestosterona; 3 β A-diol, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol; 3 α A-diol, 5 α -androstane-3 α , 17 α -diol; 3 β -HSD, 3 β -hidroxi-esteróide desidrogenase.

No metabolismo de andrógenos e estrogénos, as 17HSDs catalizam as reações entre compostos ativos de 17 β -hidroxi-esteróide e menos ativos de 17-ceto-esteróides. As enzimas 17HSD tipo 1 e tipo 2 pertencem à família de proteínas desidrogenase/reductase. A 17HSD tipo 1 é parte essencial da maquinaria de produção de estrógeno, já que é responsável pela redução da estrona em estradiol. Na próstata humana, esta enzima aparece somente nas células uroepiteliais (Soronen et al., 2004). A enzima 17HSD tipo 2 está envolvida na inativação do estradiol, da T e da DHT. Este tipo enzimático pode restringir o acesso de esteróides sexuais ativos na circulação e proteger os tecidos-alvo da ação hormonal da influência excessiva de hormônios, catalizando a conversão de andrógenos e estrógenos em formas menos ativas. A atividade oxidativa da 17HSD prostática, detectada em células epiteliais em cultura, tem sido marcante quando comparada com outros tecidos, uma vez que a 17HSD tipo 2 é expressa tanto em tumores benignos, quanto em malignos da próstata, em maiores concentrações no primeiro caso. Com base nestes dados, Soronen et al. (2004) sugerem que a quantidade ativa de andrógeno nas células epiteliais prostáticas pode diminuir por ação local da 17HSD tipo 2 e assim, o balanço de proliferação celular seria alterado. Uma vez que o metabolismo local de esteróides controla a biodisponibilidade das formas ativas destes hormônios na próstata, variações das enzimas metabolizadoras durante a progressão do câncer podem ser cruciais na regulação do crescimento e função da glândula.

A enzima 5 α -redutase e a Finasterida

A 5 α -r é uma enzima altamente lipofílica, presente nas membranas intracelulares, principalmente no envoltório nuclear das células basais e estromais (Steers, 2001). Existem duas isoformas desta enzima nos humanos e nos ratos: o tipo 1 e o tipo 2. A 5 α -r tipo 2 é encontrada, predominantemente, na próstata e em outros tecidos genitais. A 5 α -r tipo 1, além de aparecer nas

células secretoras da próstata humana é encontrada nos testículos, na pele e em glândulas sebáceas. Ambas isoformas são encontradas no fígado (Iehlé et al., 1999).

Estas isoenzimas têm 50% de semelhança nas seqüências de aminoácidos e diferem com relação a alguns fatores como: pH ótimo para a sua atividade (pH 5,5 para o tipo 1 e pH 7,0 para o tipo 2), localização cromossômica (o gene para o tipo 1 está no cromossomo 5 e, para o tipo 2, no cromossomo 2), resposta a inibidores (Carson & Rittmaster, 2003) e formas de ação (papel catabólico para o tipo 1 e anabólico para o tipo 2) (Jenkins et al., 1992). Na HPB, a expressão do RNAm de ambas isoenzimas está ligeiramente aumentada, sugerindo uma ativa participação da 5 α -r na patologia e manutenção desta doença (Iehlé et al., 1999).

A enzima 5 α -r é a responsável pela conversão de T em DHT, o que acentua a ação hormonal em tecidos que são andrógeno-dependentes, como a próstata (Huynh et al., 2001). A DHT quando comparada com a T, é de 5 a 10 vezes mais potente e tem maior afinidade com os RA (Rittmaster, 1994) além de ter papel importante na regulação do crescimento da glândula (Huynh et al., 2001) e na estimulação da função epitelial prostática (Wright et al., 1996). A ligação da DHT ao RA resulta em uma cascata de eventos necessários para a formação dos fatores de sinalização, tanto para o crescimento quanto para a manutenção da função prostática (Carson & Rittmaster, 2003). Em indivíduos adultos normais, a DHT, juntamente com outros andrógenos, contribui para a manutenção da homeostase entre os processos de proliferação e morte celular. Indiretamente, este hormônio controla a expressão e secreção de fatores de crescimento que modulam a proliferação celular. Do mesmo modo, a DHT afeta a atividade do fator de crescimento β , que modula a apoptose (Carson & Rittmaster, 2003).

Em ratos, a Finasterida, que inibe de maneira irreversível a 5 α -r tipo 2 e reversível da 5 α -r tipo 1, age impedindo a conversão de T em DHT, mas não afeta a ligação da DHT ao seu RA (Rittmaster, 1994; Azzolina et al., 1997). Esta droga é capaz de inibir de 80 a 90% a 5 α -r tipo 2 na próstata e reduzir o tamanho da glândula de 20 a 30%. Os níveis séricos de T são ligeiramente

elevados em homens e animais após a administração de Finasterida, enquanto que os níveis de DHT diminuem de 70% a 80%. A inabilidade da Finasterida em bloquear, de modo eficiente, as duas formas da enzima 5 α -r, justifica os 20% de DHT sérica convertida pela 5 α -r tipo 1, fracamente inibida pela Finasterida (Steers, 2001). Dutasteride, inibidor da enzima 5 α -r tipo 1 e 2, tem se revelado eficiente na supressão sérica da DHT, apesar de não aumentar de modo recíproco a concentração de T intraprostática (Wurzel et al., 2007).

A inibição da 5 α -r é freqüentemente comparada com a castração, porém há diferenças importantes entre elas. Enquanto a concentração de T e DHT na próstata são reduzidas pela castração, com a inibição enzimática a concentração de T intraprostática aumenta. A castração reduz somente a fonte testicular de andrógenos, o inibidor enzimático bloqueia a produção de DHT tanto da supra-renal, quanto de precursores gonadais. A Finasterida reduz mais a concentração intraprostática de DHT do que a castração, mas o conseqüente aumento de T intraprostática enfraquece os efeitos fisiológicos da diminuição da DHT (Geller, 1990). Além disso, altas concentrações de T podem interagir com RA similarmente a DHT (Grino et al., 1990; Lin et al., 1993). A inibição da 5 α -r em ratos causa menos morte celular, quando comparada com a castração. O aumento na concentração do Antígeno Prostático Específico (Prostatic Specific Antigen-PSA) no tecido prostático humano é maior com a inibição da 5 α -r do que com a castração cirúrgica, sugerindo que os elevados níveis intraprostáticos de T evitam a supressão da função da célula epitelial na próstata, fonte de PSA (Rittmaster, 1994), mesmo com o epitélio glandular sofrendo atrofia após o uso de Finasterida (Carson & Rittmaster, 2003).

Para o tratamento da HPB, a Finasterida tem se mostrado eficiente em reduzir o volume prostático, aumentar o fluxo urinário, melhorar os sintomas, e deter a progressão da doença (Harris & Kozarich, 1997). Com a administração da Finasterida para cães com HPB, os componentes epiteliais e estromais prostáticos sofreram significativa redução, houve aumento da proporção de estradiol em relação ao total de andrógeno e o número de células apoptóticas

aumentou somente no início do tratamento (Shibata et al., 2001). Para estes autores, a alta concentração de T intraprostática, induzida pelo bloqueio da enzima 5 α -r, provocou maior aromatização, resultando no aumento observado de estradiol. Este aumento poderia teoricamente inibir a apoptose e, potencialmente, induzir o crescimento proliferativo da próstata.

Corradi et al. (2004) notaram que a próstata de gerbilos adultos tratados por dez dias com Finasterida mostrou-se reduzida e com os componentes epiteliais e estromais intensamente reorganizados. As fibras de colágeno e as reticulares acumularam-se na base do epitélio e assumiram fenótipos bastante diferentes aos presentes nos animais controle. Os autores concluíram que este acúmulo de colágeno, além de o aumento da substância granular amorfa do compartimento estromal relacionam-se, provavelmente, com a metabolização de estrógenos a partir da elevada concentração de T intraprostática depois do tratamento com a Finasterida, como Geller (1990) e Shibata et al. (2001) demonstraram previamente. A quantidade de fibras colágenas parece ser oposta ao crescimento prostático, assumindo papel limitante de crescimento (Nakada et al., 1994; Vilamaior et al., 2000), além de ser sabido que elevada proporção entre estradiol e DHT pode resultar na proliferação não somente de fibras colágenas, mas também de proteínas não colagênicas e elásticas (Nakada et al., 1994).

A enzima Aromatase e o Letrozol

Em homens, a produção diária de estradiol é de 40-50 μ g, dos quais apenas 5-10 μ g são provenientes diretamente da secreção testicular. A maior parte dos estrógenos é derivada da aromatização de T, pela enzima *aro*, também chamada de *estrógeno-sintetase*, nos tecidos adiposos, no fígado e também na próstata (Harada et al., 1999; Ekman, 2000). A produção de estrógenos, tanto intratesticular quanto extragonadal, tem grande importância fisiológica para a vida adulta dos homens: as células de Leydig e as células da linhagem germinativa, em vários estágios, produzem estrógenos, o que é fundamental para a espermatogênese; nos ossos, a produção destes hormônios

parece ser vital para a manutenção da mineralização óssea e a prevenção de osteoporose (Simpson, 2000).

Os hormônios estrogênicos influenciam a estrutura e funcionalidade da próstata, pois podem aumentar a expressão de genes de respostas a andrógenos. Além disso, estes hormônios também podem estar envolvidos com o controle da proliferação celular e carcinogênese prostáticos (Härkonen & Mäkelä, 2004). Níveis basais de estrógenos parecem ser essenciais para o funcionamento gonadal. Em contraste, os efeitos inibitórios deste hormônio em homens somente são visíveis em níveis usualmente alcançado nas mulheres. Assim, os estrógenos não aparecem apenas como hormônios femininos, mas também como esteróides essenciais para o balanço endócrino nos homens, com um limiar de ação aparentemente diferente nos dois sexos. Além disso, como a DHT é o efector final de T, os estrógenos podem ainda ser considerados em algumas circunstâncias como um efector alternativo da ação androgênica (Séralini & Moslemi, 2001).

O desenvolvimento da próstata é particularmente sensível ao aumento dos níveis endógenos e/ou exógenos de estrógenos. O tratamento prolongado de roedores adultos com estrógenos combinados com andrógenos provoca hiperplasia epitelial, displasia e adenocarcinoma na próstata. Recentes estudos têm mostrado que a inibição direta da ação estrogênica nos tecidos da próstata pode ser uma nova estratégia para a quimioprevenção ou terapia do câncer prostático. Na próstata normal, os estrógenos parecem agir de modo sinérgico aos andrógenos. Cães castrados, quando tratados com andrógenos, apresentaram crescimento e normalização das funções prostáticas; porém, com a adição de estrógeno, os animais desenvolveram HPB. Contudo, isto somente ocorreu quando DHT foi administrada para estimular o crescimento da próstata e não enquanto a T foi administrada sozinha (Ekman, 2002). Estudos experimentais têm enfatizado o papel potencial dos estrógenos frente a HPB e sugerido que os efeitos relacionados aos estrógenos poderiam ser claramente antagonizados pelo tratamento simultâneo com inibidores da *aro* (Ito et al, 2000).

Considerando-se toda a fisiologia das células sensíveis a hormônios esteróides, a proporção entre andrógenos e estrógenos parece ser mais importante que a ação isolada destes hormônios (Séralini & Moslemi, 2001). Esta proporção é controlada pela atividade da enzima *aro*, expressa pelo gene CYP19, sendo composta por uma flavoproteína (NADHP) e pelo citocromo P450 (Kamat et al., 2002). Na próstata normal, a *aro* é expressa no compartimento estromal, enquanto que as células epiteliais não a apresentam. Porém, a atividade desta enzima foi detectada em células epiteliais de tecidos prostáticos malignos, bem como em linhagens celulares de tumor de próstata humana, indicando indução da expressão do gene com o início e/ou progressão da malignidade (Risbridger et al., 2003).

O processo de aromatização ocorre no retículo endoplasmático das células que expressam a *aro*, no qual os andrógenos são convertidos em estrógenos, através de reação de oxidação. Os substratos utilizados pela *aro* são a A-dione e a T, que são hormônios que possuem um anel aromático insaturado em suas moléculas. A T é diretamente convertida em estradiol nos tecidos periféricos, enquanto a conversão da A-dione produz a estrona, que é um hormônio fisiologicamente mais fraco do que o estradiol (Bulun et al., 2001). Durante a reação, um grupo metil do substrato é perdido como ácido fórmico, o que provoca a aromatização do anel aromático do andrógeno, formando uma estrutura com anel fenólico, que resulta na formação do estrógeno (Kamat et al., 2002). Oliveira et al (2007b) afirmam que as concentrações da *aro* e estradiol na próstata são baixas e assim, o estradiol pode não ser o único a exercer função na próstata, já que é sabido que a DHT pode ser metabolizada em 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, hormônio que se liga ao RE β , mas não ao RA.

A atividade normal da *aro* pode ser alterada em casos de patologias, como por exemplo, nos carcinomas de mama e endometrioses, que ocorrem com mais frequência em mulheres no período de pós-menopausa. Nestes casos ocorre uma aberrante expressão da *aro*, que irá converter grande parte dos andrógenos em estrógenos. Isto representa grande risco para o organismo feminino, uma vez que o crescimento do tecido tumoral é dependente de estrógenos

(Bulun et al., 2001). A supressão da biossíntese de estrógenos nos tecidos periféricos, assim como no canceroso pode ser alcançada pela inibição específica da *aro*, o que vêm sendo realizado pelo tratamento terapêutico com substâncias inibidoras capazes de se ligar ao sítio ativo da enzima, impedindo que esta se ligue aos andrógenos (Pouget, et al., 2002). Atualmente existem dois tipos principais de inibidores: os esteroidais e os não esteroidais (Séraline & Moslerni, 2001).

Os inibidores estereoidais, como o Formestane (4-hydroxiandrostenediona), são específicos e uma forma de substrato análogo ao substrato andrógeno. Essa classe de moléculas inibidoras liga-se irreversivelmente ao sítio ativo da *aro*, comportando-se como um inibidor suicida que exerce ação prolongada sobre a enzima (Séraline & Moslerni, 2001). Os inibidores não esteroidais interagem competitivamente com o grupo heme do citocromo P450, componente da *aro* e os inibidores de terceira geração desta natureza, como o Letrozol são mais potentes, melhor tolerados e mais seletivos. Este inibidor é de rápida e completa absorção depois de administrado oralmente e é um potente inibidor de Aromatases de diferentes fontes (Haynes et al., 2003). O Letrozol e o Anastrozol são mais eficientes que o anti-estrógeno Tamoxifeno e o Faslodex na redução do crescimento de tumores de camundongos (Séraline & Moslerni, 2001).

Com bases experimentais, o papel potencial dos estrógenos frente a HPB é enfatizado e sugere-se que os efeitos relacionados aos estrógenos podem ser claramente antagonizados pelo tratamento simultâneo com inibidores da *aro* (Ito et al., 2000). McPherson et al. (2001), estudando camundongos *knockout* para a enzima *aro*, verificaram aumento significativo da T, da DHT e de prolactina, com concomitante super-regulação de RA nas células epiteliais prostáticas, culminando em hiperplasia de toda a glândula. A diminuição na ativação da T e DHT e o aumento da produção de metabólitos estrogênicos no epitélio prostático poderiam aumentar a proliferação das células e, portanto, desregular o crescimento prostático, o que comprovaria a quebra na homeostase da interação epitélio/estroma (Soronen et al., 2004).

Experimentos clínicos e avaliações endócrinas de homens que apresentam mutações nos genes que codificam a *aro* ou os RE mostram que deficiências nestes hormônios, tanto

induzidas quanto ocorridas naturalmente, resultam em elevações crônicas das gonadotrofinas no plasma. Esta observação, que é indicativa de uma interrupção no feedback negativo, deixa poucas dúvidas de que os estrógenos são cruciais para o controle da secreção das gonadotrofinas nos homens (Roselli & Resko, 2001). A próstata sintetiza estrógenos via expressão local da *aro*. Quando em malignidade, há alterações no local celular de expressão da *aro* e postula-se que estas mudanças sejam importantes no aparecimento ou progressão do câncer de próstata de modo semelhante ao câncer de mama (Risbridger et al., 2003).

A Associação de Inibidores Enzimáticos

Apesar dos andrógenos e estrógenos separadamente serem capazes de alterar o crescimento normal da próstata, individualmente eles não induzem malignidade à glândula. Porém quando combinados, podem desencadear displasias, pré-malignidade e malignidade nas células prostáticas. Assim, o equilíbrio entre estes dois hormônios é crítico, não apenas para a manutenção funcional da glândula, mas também para o desenvolvimento de doenças (Risbridger et al., 2003). Rivas et al. (2002) sugerem que é o balanço na ação de andrógenos e estrógenos, em vez de seus níveis absolutos, que tem importância fundamental na determinação do desenvolvimento normal e anormal de algumas regiões do trato reprodutivo masculino, já que observaram que redução da ação androgênica sensibilizou o trato reprodutivo ao estrógeno. Há na literatura casos que revelam o papel e a importância do balanço andrógeno/estrógeno, como por exemplo, a ginecomastia em homens, que pode ser induzida ou por aumento dos níveis estrogênicos ou por diminuição dos níveis de andrógenos, uma vez que em qualquer das situações o equilíbrio andrógeno/estrógeno é alterado em favor dos estrógenos. Outro exemplo pode ser visto com a estrutura e crescimento prostático anormal, induzido por tratamento neonatal com estrógenos e, neste caso, há o envolvimento de ações alteradas de andrógenos e estrógenos (Rivas et al., 2002).

Estudos com a associação de inibidores das enzimas 5 α -r e da *aro* (Fig. 2) têm sido realizados para se analisar as mudanças e oscilações hormonais, seu impacto na fisiologia da próstata e para se compreender os papéis destas enzimas nas doenças prostáticas (Suzuki et al., 1998; Negri-Cesi et al., 1998, 1999; Cunha et al., 2001; Risbridger et al., 2003). Tobin and Canny (1998) utilizaram bloqueadores enzimáticos da 5 α -r e da *aro* para assegurar a importância da metabolização de T e seus efeitos biológicos, que podem ser mediados indiretamente pela DHT e estradiol. Suzuki et al. (1998) observaram que com a inibição da 5 α -r e da *aro*, pela Finasterida e Arimidez, respectivamente, houve aumento no volume prostático e testicular de cães. Huynh et al. (2001) mostraram que o anti-estrógeno ICI182,780 agiu sinergicamente à Finasterida quando administrados juntos, provocando redução no peso prostático e na biodisponibilidade de fatores de crescimento tipo insulina.

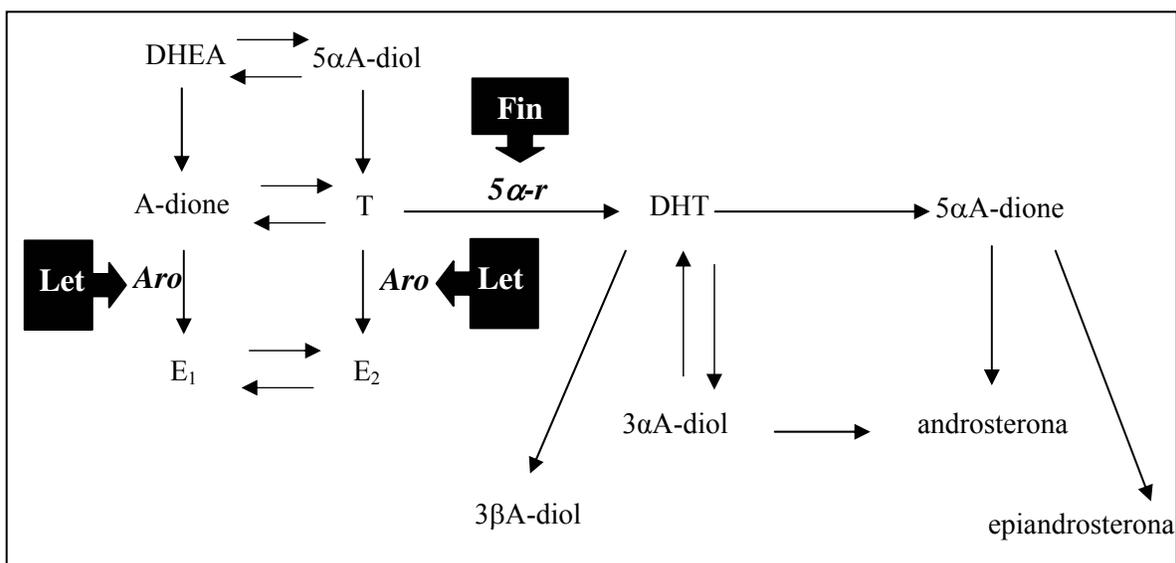


Figura 2. Ação dos inibidores enzimáticos Finasterida (Fin) e Letrozol (Let), respectivos bloqueadores da 5 α -redutase (5 α -r) e da Aromatase (Aro), nos tecidos prostáticos.

Estudos baseados na privação androgênica têm mostrado que a síntese e organização dos componentes da MEC, juntamente com as CML e os fibroblastos, também apresentam respostas adaptativas a diversas situações hormonais sendo, em grande parte portanto, estas repostas

moduladas por andrógenos e/ou estrógenos (Vilamaior et al., 2000, 2005; Corradi et al., 2004; Pegorin de Campos et al., 2006). Shibata et al (2001) e Corradi et al. (2004), notaram um novo microambiente estromal, respectivamente, na próstata de cães e gerbilos adultos depois do tratamento com Finasterida. Corradi et al. (2004) observaram que o compartimento estromal desses animais mostrou-se intensa e diferentemente remodelado. Para esses autores, os resultados asseguram que o bloqueio da atividade enzimática afetou as interações homeostáticas entre epitélio e estroma, o que pode estar criticamente envolvido com alterações hormonais. O abundante acúmulo de colágeno no estroma provavelmente relaciona-se com a metabolização de estrógenos da concentração aumentada de T intraprostática depois do tratamento com a referida droga. Semelhantes respostas adaptativas do compartimento epitelial prostático foram observadas em ratos castrados cirurgicamente (Vilamaior et al., 2000, 2005).

Experimentalmente, a terapia estrogênica em animais da espécie *Cavia porcellus* provocou aumento nos elementos do estroma prostático, principalmente das fibras colágenas, das não colagênicas e de elastina, enquanto os componentes epiteliais regrediram (Scarano et al, 2004). A exposição pré-natal de ratos e camundongos a altas ou baixas doses de estrógenos induz *imprinting* da próstata associado aos efeitos de proliferação epitelial, expressão de RA e RE, inflamação e mudanças epiteliais displásicas. Portanto, torna-se compreensível que a próstata humana com inflamação crônica pode ser reflexo de reação autoimune causada, pelo menos em parte, por estrógenos (De Marzo et al., 2007). O tratamento prolongado de roedores adultos com estrógenos e andrógenos combinados provoca hiperplasia epitelial, displasia e adenocarcinoma de próstata. Pesquisas recentes mostram que a inibição direta da ação estrogênica nos tecidos da próstata pode ser uma nova estratégia para a quimioprevenção ou terapia do câncer prostático (Soronen, et al., 2004; McPherson et al., 2007).

Enquanto a associação dos hormônios esteróides com o câncer de próstata é sustentada por evidências biológicas, estudos epidemiológicos têm mostrado dados inconclusivos. As pesquisas analíticas em que se avaliam as relações entre o risco de câncer de próstata com as

concentrações hormonais séricas em indivíduos com câncer de próstata também mostram dados inconsistentes (Hsing & Devesa, 2001). O balanço entre as concentrações de andrógenos e estrógenos nos tecidos periféricos pode diferir significativamente do encontrado no plasma sanguíneo. Embora os níveis séricos de T revelem-se mais de 90% reduzidos depois da castração, a taxa androgênica na próstata fica somente de 50 a 60% menor no tecido com câncer, sugerindo assim, a importância da produção hormonal *in situ* no câncer prostático (Risbridger et al., 2003; Mizokami et al., 2004). Em contraste, com base em dados epidemiológicos, fica claro que não há grandes diferenças entre as concentrações hormonais encontradas no sangue de homens saudáveis e naqueles diagnosticados com câncer prostático (Carruba, 2006). A concentração intraprostática de DHT e T foram maiores do que as séricas em 62% dos casos de câncer prostático e em 89% daqueles com HPB analisados (Heracek et al., 2007). Wuzel et al. (2007), porém, constaram que a utilização de Dutasterida, inibidor de ambos os tipos de enzimas 5 α -r, levou a uma quase completa supressão de DHT sérica e intraprostática em homens com HPB. Apesar destas incoerências justificarem, pelo menos em parte, os desencontros dos dados entre a ligação do risco de câncer de próstata com os andrógenos séricos, uma questão importante prevalece: Qual o grau de associação entre os níveis dos hormônios esteróides circulantes e suas respectivas concentrações intraprostáticas?

O estudo das oscilações hormonais decorrentes do bloqueio das enzimas metabolizadoras de esteróides no tecido prostático e das ações locais de T, da DHT, do estradiol são imprescindíveis para que se esclareçam as reações e respostas que causam lesões prostáticas. Um completo entendimento das ações hormonais em seus respectivos alvos necessita que se determine o mecanismo pelo qual o estroma e o epitélio normalmente se comunicam entre si e como esse padrão de comunicação é alterado pelos hormônios (Cunha et al., 2004a). A elucidação dos papéis das enzimas 5 α -r e *aro* na morfologia e fisiologia prostática, principalmente com relação às alterações fenotípicas celulares e reorganização estrutural do compartimento estromal torna-se cada vez mais necessária a fim de se buscar um melhor entendimento das oscilações hormonais que

acontecem na próstata. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo das relações entre epitélio e estroma e o conhecimento dos componentes celulares e macromoleculares da próstata tornam-se instrumentos muito importantes para o entendimento do desenvolvimento, da estrutura e da fisiologia desta glândula. Ainda há muitos passos nesse processo para serem investigados e esclarecidos, principalmente sobre a ação do bloqueio destas enzimas metabolizadoras da DHT e de estradiol. Assim, a interrelação da síntese local dos hormônios esteróides e da ação combinada dos estrógenos e andrógenos na próstata com a manutenção da homeostase entre epitélio e estroma torna-se fundamental para o esclarecimento e entendimento da biologia dessa glândula e das causas das suas afecções.

OBJETIVOS

Avaliar, por métodos histoquímicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais, as alterações ocorridas na próstata de gerbilos em diferentes idades, após a inibição da atividade das enzimas 5alfa-redutase e Aromatase visando obter maior esclarecimento das respostas celulares em diferentes situações hormonais, além de se verificar o papel destas enzimas no controle da biodisponibilidade de hormônios ativos na próstata. Estabelecer associações entre o padrão fenotípico e sinalizador das células epiteliais e dos componentes da matriz extracelular da próstata frente aos novos microambientes hormonais.

Artigo 1.

5-alpha reductase and aromatase suppression change the intraprostatic cellular scenario and hormonal environment of gerbils at different postnatal ages

Submetido para *Cell and Tissue research*

5-alpha reductase and aromatase suppression change the intraprostatic cellular scenario and hormonal environment of gerbils at different postnatal ages

Lara S Corradi¹; Rejane M Góes²; Sebastião R Taboga^{2*}

¹Campinas State University-UNICAMP, Department of Cell Biology – Institute of Biology, Campinas-SP, Brazil; ²São Paulo State University-UNESP, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences-IBILCE, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology, São José do Rio Preto-SP, Brazil

Running title: Intraprostatic steroids hormones metabolism

***Correspondence to:**

Dr. Sebastião Roberto Taboga

Departamento de Biologia – Ibilce/Unesp

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth

São José do Rio Preto, SP, Brasil

CEP 15054-000

Tel: + 55 17 3221-2386 Fax: + 55 17 3221-2390

Funded by:

São Paulo State Research (FAPESP)

Abstract

In the prostate, androgens play a central role in its biology but estrogens also affect growth and differentiation of the gland. Prostate tissue contains a numerous of steroid-metabolizing enzymes required for the local formation of active androgens and estrogens, as the 5-alpha reductase ($5\alpha-r$) and Aromatase (*aro*), respectively. In this gland, testosterone is converted to dihydrotestosterone by the $5\alpha-r$ and the *aro* provides an alternative pathway for the metabolism of testosterone to estradiol. Since local steroid metabolism controls the bioavailability of active steroids hormones in the prostate, the aim of this study, therefore, was to elucidate the differential roles and actions of these intraprostatic steroids hormones and to investigate what the absence of these enzymes provoke to the regulation of the growth and function of the prostate during the post-natal development. Data obtained after the enzymatic dual inhibition with Finasteride plus Letrozole demonstrated a marked remodeling of epithelial and stromal compartments in the early and late stages of post-treatment period. In the early stage analyses, the ventral prostate of the adult and old gerbils decreased, whereas it increased in the youngs. Surprisingly, the estradiol levels increased in animals of all ages after the administration of Letrozole. Concluding, it seems that testosterone and estradiol have synergic effects within the prostate. It is evident that the balance between androgens and estrogens action, rather than the absolute levels of either hormone, may be of fundamental importance in determining normal or abnormal development and maintenance of the prostate. The blockade of the steroid-metabolizing enzymes provided an important novel tool to study the relationship between sex steroids and reorganization in normal physiology and diseases of this gland.

Keywords: ventral prostate, 5-alpha reductase, aromatase, stroma, epithelium, gerbil

Introduction

The balance between androgens and estrogens in individual target tissues may differ significantly from that found in plasma, once those circulating steroids hormones can be locally transformed into activated forms (Labrie et al., 2000; Risbridger et al., 2003; Carruba, 2006). In particular, the assessment of local synthesis and metabolism of sex steroids has become increasingly important in the understanding of glandular cancer as breast and prostate, also because abnormal levels of estradiol and/or estrone and, especially, of some of their hydroxylated derivatives have been implicated in tumor development and progression (Oliveira et al., 2007; Carruba, 2007). Intracellular sex steroids concentrations in steroid target tissue are regulated by serum concentration of steroids and by local sex steroid biosynthesis and metabolism.

Prostate tissue contains a variety of steroid metabolizing enzymes required for local formation of active androgens and estrogens from precursor steroids provided by the adrenals, as the 5 α -reductase (5 α -r) and the Aromatase (*Aro*) (Soronen et al., 2004; Vihko et al., 2005; 2006). The enzymes 5 α -r and *Aro* are considered to play important roles as local regulators of androgens and estrogens within normal and abnormal prostatic tissue (Nakamura et al., 2005) and the products originated of these enzymatic reactions are factors that influence the behavior and physiology of the reproductive system and have innumerable implications during all the life of the individual (Lephart et al., 2001 and Soronen, et al., 2004).

In the prostate, circulating androgen, testosterone (T) is converted to dihydrotestosterone (DHT), which is five to ten times more potent than T (Bruschovsky and Wilson, 1999; Ekman, 2000, Steers, 2001). The action of two types of 5 α -r isozymes (type 1 and type 2) is responsible for the local conversion of T into DHT in both prostate and several other androgen target tissues Hsing et al., 2002; Yuan-Shan, 2005). Even though DHT acts mainly on the epithelium, up to 90% of conversion T to DHT occurs in the prostatic stromal and basal cells (Steers, 2001), after which DHT is transferred to the epithelium as part of the stromal-epithelial interactions (Ekman, 2000). Therefore, 5 α -r plays a key role in DHT-mediated effects in the

prostatic gland. Study of 5 α -r in the prostate has resulted in the development of drugs, such as Finasteride, an efficient 5 α -r type 2 inhibitor, which has been used clinically for controlling symptoms of benign prostatic hyperplasia (BPH) (Steers, 2001). Azzolina and colleagues (1997) proposed that Finasteride action happens differently between rats 5 α -r type 1 and type 2, which is a reversible inhibition of type 1 and time-dependent and irreversible the 5 α -r type 2 inhibition. The use of Finasteride and the consequently inhibition of these enzyme provoked striking prostatic epithelial and stromal changes in the ventral prostate of adult gerbil, probably a result of the imbalance of the homeostatic interaction between the epithelium and the underlying stroma (Corradi et al., 2004).

Although prostate is one of the major targets for DHT, this gland is also recognized as a nonclassical target for estrogen as it expresses both types of estrogen receptors (ER), especially ERbeta (Oliveira et al., 2007). An alternative pathway for the metabolism of T to estradiol is the local prostatic estrogen production, which depends on *Aro* enzyme, implying that androgen aromatization may be in part responsible for androgen action in nontumoral and malignant prostate (Härkönen & Mäkelä, 2004). Estradiol level in stroma of BPH increases with age, and this increase was associated with an elevated expression of *Aro* enzymes in prostatic stromal cells through the production of prostaglandin in a paracrine mechanism. (Wu et al., 2007). Aromatase inhibitors ushered in a new era in hormone ablation therapy for estrogen dependent cancers, and have paved the way for similar strategies that combat androgen dependent prostate cancer (Bruno and Njar, 2007). Therapy with the non-steroidal Letrozole provokes the inhibition of aromatase enzyme activity, thereby blocking the conversion of T into estrogen. The action of this drug promotes an additional increase of circulating androgen levels and, consequently, an estradiol decline (Risbridger et al. 2003).

Although androgens and estrogens are each separately capable of altering the normal growth of the prostate, individually they do not induce prostatic malignancy (Risbridger et al., 2003). However, it has been shown that the combination of these two sex steroids hormones can

induce dysplasia, premalignant and malignant changes to the prostatic cells, as previously described (Wang & Wong, 1998; Wang et al., 2000, 2001; Hayward et al., 2001). Rivas et al. (2002) suggest that the balance in action between androgens and estrogens rather than their absolute levels, may be of fundamental meaning to the normal and abnormal developmental of some regions of the male reproductive tracts, since a decrease of androgenic action sensitizes these tissues to the estrogens. In this regard, these finding is of utmost importance, since it underpins the concept that local steroid formation and metabolism is crucial to determine the overall biological impact of steroid hormones in individual target normal and abnormal prostate cells (Carruba, 2007).

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is a rodent known for its suitability for laboratory use since the 1960s (Corradi et al., 2004). The usefulness of this animal in biomedical research has been recognized in diversified areas, beside morphology (Santos et al., 2003; Custódio et al. 2004; Corradi et al., 2004; Scarano et al., 2006; Góes et al., 2007), and more recently, gerbil has also been suggested as a suitable model for studies on mammalian aging (Pegorin de Campos et al., 2006). The gerbil prostate has compact lobes, similar to those of the human prostate, but unlike those of rats and mice, which have distinct lobes (Price 1963; Pinheiro et al. 2003; Góes et al. 2007).

It is evident that the balance between androgens and estrogens action, rather than the absolute levels of either hormone, may be of fundamental importance in determining normal or abnormal development and maintenance of the prostate. The blockade of these steroid-metabolizing enzymes associated with a good experimental animal model provided important novel tools to study the relationship between sex steroids hormones and the normal and/or abnormal prostate gland.

Materials and Methods

Animals

Male gerbils (*Meriones unguiculatus*, Gerbilinae, Criscetidae), 100 young (48 days), 100 adults (112 days), and 100 old (78 weeks) were housed under controlled conditions of temperature (25°C), relative humidity (40–70%) and lighting (12-h light, 12-h dark cycle), and allowed free access to standard chow and water. Animal care was performed according to the ethical guidelines of the Commission for Ethics in Animal Experimentation (CEEAA) at the Campinas State University - UNICAMP, São Paulo, Brazil (process Nr 1236-1), following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH). The experiments were realized in the Microscopy and Microanalysis Laboratory, Department of Biology, IBILCE, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Experimental design

The animals received orally, for 30 consecutive days, Finasteride - 5 α -r inhibitor (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri; 10mg/kg per day in 0.1ml corn oil), based on the results previously detected by Corradi and co-workers (2004) and Letrozole - Aro inhibitor (Femara, Novartis-Pharma, Basileia, Swiss; 1 mg/kg per day in 0.1 ml corn oil), as described by Tobin and Canny (1998) and Santos and colleagues (2007). As control groups, some animals were persevered intact, while others received only the vehicle, during the same treatments period. The animals' sacrifice occurred 1, 7, 14, and 21 days after the end of the period of drugs administration and these four stages of analyzes were named as Early Phase, referring to 1 and 7 days after the end of drugs treatment period and Late Phase, representing the two last stages of animals' sacrifices. Five gerbils of experimental and control groups were used in each post-treatment stage. After being anesthetized by CO₂ inhalation, the animals were weighed and immediately decapitated. Blood samples were collected for serological analysis, and the prostatic complex was dissected out, weighed, and fixed according to various protocols as specified by Corradi and colleagues (2004, 2007).

Serum hormone assay

Circulating plasma testosterone and estradiol levels were determined by immunochemical assays. Plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C for subsequent assays. Measurements were performed in triplicate in automated equipment (Vitros-ECi, Johnson & Johnson) for ultrasensitive chemiluminescence detection. Sensitivity was 0.1–150 ng/ml for testosterone and 0.1–3.814 pg/ml for estradiol. Intra-assay variations were 1% and 1.1%, and interassay variations were 2.1% and 1.5% for testosterone and estradiol, respectively.

Structural analysis

In each stage of the pos-treatment period, entire prostate was dissected out, weighted and only the ventral lobe was fixed by immersion in Karnovsky fixative (5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) for 24 h. After fixation, the tissues were washed with running tap water, dehydrated in an ethanol series, and embedded in glycol methacrylate resin (Leica historesin embedding kit, Leica, Nussloch, Germany) and sectioned at 3 μm on a Leica automatic rotatory microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany). Histochemical sections were subjected to Hematoxylin-Eosin staining for general studies. Microscopic analyses were performed on Zeiss-Jenaval or Olympus photomicroscopes, and the microscopic fields were digitized using the Image-Pro[®]Plus version 4.5 for Windows[™] software.

Ultra-structural analysis

Prostate ventral lobes fragments were minced into small pieces and fixed by immersion with 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer, pH 7.3, containing 0.54% glucose during 24 hours (Cotta-Pereira, 1976). After washing with the same buffer, samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 hour, washed in buffer, dehydrated in graded acetone series, and embedded in Araldite resin. Ultrathin sections (50-75nm) were cut using a diamond knife and stained with 2% alcoholic uranyl acetate for 30 min and followed by 2% lead

citrate in sodium hydroxide for 10 min. Samples were evaluated by electron microscopy using a LEO – Zeiss 906 Transmission Electron Microscope operating at 80 Kv.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Statistica 6.0 software (StatSoft). The ANOVA and Tukey honest significant difference (HSD) tests were applied and $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In each group of post-development age analyzed, the prostate of animals which received only corn oil did not present either morphological or biometrics results significantly different from that of intact animals. Thus, the results obtained in these two groups were reunited all together as Control.

Body and prostatic complex weight

Tables I, II and III shows the variation in body and prostatic complex weights of young, adult and old animals, respectively. When comparing the young experimental groups to the young control group, no significant alterations could be noted in the Early Phase of analyses, except the animals' body weight of Finasteride+Letrozole observed 7 days after the end of treatment period. The relative weight of the young prostatic complex showed an increase of 15.7% and 9.7%, respectively, 1 day after the end of Letrozole and Finasteride+Letrozole treatments periods. On the other hand, in the Late Phase of analyses, significant biometrics modifications happened. The adult animals presented significant changes of the biometrical parameters analyzed in both Early and Late Phases. The same result could be noted in the old animals, but the prostate complex weight checked into 1 and 7 days after the end of treatments did not have significant modifications. The prostatic complex relative weight of the old animals which received Letrozole was increased 9.7% and 7.9%,

respectively, 1 and 21 days after the end of treatment periods. The comparisons among each stage of post-treatment period were different than the above cited, pointing less significant alterations, as showed in tables I, II and III.

Serum hormone assay

Serum steroid hormone levels are shown in Figure 1. Comparing the treatments, in the young animals, testosterone and estradiol levels were significantly ($P \leq 0.05$) higher in both stages of Early phase analyzed in Finasteride, Letrozole and Finasteride+Letrozole groups, however no significant alterations occurred later. After Finasteride+Letrozole treatment, the serologic levels of testosterone were about 2.63 times higher than those observed in control group, reaching 170.2 ± 19.1 ng/ml within 21 days following cessation of treatment. Oscillations were observed in the adult serologic levels of testosterone and estradiol in the different treatments. The only adult seric level of testosterone statistically significant was noted 21 days in the post-treatment period, although being higher in Finasteride and Finasteride+Letrozole groups. However, estradiol seric levels were statistically significant 7 and 14 days after the end of drugs' administration. In the old animals, the serologic levels of testosterone increased during post-treatment period, but this was significant only 7 and 21 days after the end of Finasteride and Letrozole administration. On the other hand, estradiol levels were statistically significant in the four post-treatment stages, being almost eight times higher than the control group.

Structural analysis

During the early phase of analyses, young animals of Control group showed an immature prostate gland, composed of some acini still in process of glandular modeling. The epithelium was formed by voluminous cells and with some signals of secretory activity. Smooth muscle cells (SMC) and fibroblasts were the main compounds in stroma, besides collagen fibers. In the late phase of post-treatment, the presence of a differentiated epithelial layer exhibiting secretory

activity, besides a more developed smooth muscle with SMC relatively more compact, scenario that reveals the beginning of sexual maturation of this animal's species. In the early and late phases of analysis, the control adult prostate presented a morphological structure completely developed and mature. An intense secretory function of the epithelial cells, which now were disposed in a single columnar pattern, probably let the acinar lumen wider. In the stroma compartment, fusiform SMC were forming concentric and densely packed layers around acini. Fibroblasts were located at the epithelium base. The control prostate of old animals was characterized by areas morphologically heterogeneous, some of them with normal histological aspect and others histopathologically compromised. In the normal acini areas, there was secretory epithelium functionally similar to that found in the adult control animal, but with small infolds. In the stromal compartment, the connective tissue adjacent to epithelial layer was denser and SMC slightly less compact.

In the Finasteride+Letrozole groups, animals of all post-natal developmental ages, the new characteristics assumed by the prostatic compartments were very similar to those caused by the exclusive use of Finasteride. In the early phase post-treatment with Finasteride and Finasteride+Letrozole, the stromal compartment was modified and remodeled, with a remarkable collagen accumulation within the connective tissue adjacent to the epithelium base. In this same area a great quantity of fibroblasts occurred, which were phenotypically altered. The cells of smooth muscle also underwent modifications, once that some SMC assumed an irregular wrinkled contour, contributing to let this smooth layer loosely rearranged, with denser collagen intersperse them. With the analyses of late phase, these above cited aspects of reorganized stromal compartment was still present. Young, adult and old animals treated with Letrozole showed similar morphological modifications in the stromal prostatic compartment; however the epithelial compartment seemed to be the main target of this action's drug. In the young prostate, epithelium Infoldings into luminal area, besides epithelial cells phenotypically altered were noted, while in the old animals, the epithelial cells became shorter, which have not returned to the normal shape until late phase of post-treatment period (Fig. 2).

Ultrastructural analysis

Ultrastructural analysis of the control ventral prostate (Fig.3) confirmed the data obtained with light microscopy. The immature prostate of young control animals showed the cytoplasm of epithelial cells with scarcity of synthetic organelles. In the stroma, collagen fibrils were intimately associated with the basal lamina, besides dispersed throughout the stroma. In the adults, the acinar epithelium was composed mostly of secretory cells, in which secretory vesicles were prominently displayed in the cytoplasm indicative of a synthetic phenotype. The collagen fibrils arranged in different directions were observed adjacent to the basal lamina. The SMC was densely packed and regularly organized into periacinar layers, with only small intercellular spaces between bundles of SMC. The prostate of old animals, the normal secretory epithelial cells presented accumulation of lipid droplets into the cytoplasm. The amount of collagen fibrils were increased at the epithelium base and arranged in disorganized manner, as also happened among SMC, contributing to the slight loose aspect of the smooth muscle.

After Finasteride (Fig.4) and Finasteride+Letrozole (Fig.5) treatments, ventral prostate of young, adult and old animals presented during the post-treatment periods the cytoplasmic volume and the amount of secretory blebs of epithelial cells decreased, but still with some secretion vesicles. In the stromal compartment, the connective tissue underlying the epithelium exhibited a striking increase in the number and thickness of collagen fibrils, accompanied by an increase in deposits of amorphous granular material adjacent to the basal lamina and in the clefts among SMC. Fibroblast cytoplasm became denser and more voluminous with an enlargement of the perinuclear space and also a notable increase of the Golgi stacks. Some fibroblasts were exhibiting a more synthetic and activated feature. Collagen fibril became accumulated in the epithelium base and among SMC in a disorganized manner. SMC of the periacinar muscle layer underwent morphological alterations, with reduced diameter and condensed cytoplasm. Other SMC had a highly irregular external contour with numerous spine-like cytoplasmic projections, which were in intimate association with collagen fibrils. After Letrozole treatment (Fig.6), the epithelial and

stromal compartments also assumed different ultrastructural patterns, with shrinkage of epithelial layer, diminished epithelial cells cytoplasm and irregular contour of nuclei. As occurred to the stromal compartment of the others treatment kinds, dilatated SMC had lost of synthetic organelles in the perinuclear area and also fibroblasts assumed active feature, besides longer projections which established close contact with other fibroblasts.

Discussion

The prostate cancer is one of the most common diseases among men and its incidence comes increasing in the last decades. Despite the high prevalence and considerable mortality indexes, the mechanisms which define the development and the progression of prostate cancer are still little known (Soronen et al., 2004). Androgens are crucial to the development and maintenance of prostate normal tissues, but estrogens are also involved with emerging and progression of cancer and other prostatic disorders (Soronen et al., 2004; Scarano et al., 2006). Moreover, evidences of the estrogens roles in this illness have been confirmed by epidemiologic (Carruba, 2006, 2007) and experimental (Risbridger et al., 2003; Ricke et al. 2007) studies. Coincidentally, serum estrogen concentration increases while testosterone level decreases during aging, phase of life where the incidence of prostatic problems affects the most men (Härkönen & Mäkelä, 2004). Rivas et al. (2002) suggest that the balance in actions between androgens and estrogens, rather than their absolute levels, may be of fundamental importance to the structural and physiological male reproductive tract.

Administration of Finasteride and Letrozole, together or not, was capable of eliciting many alterations in tissue morphology of the gerbil ventral prostate, including modifications in the tissue architecture, ultrastructure and extracellular matrix arrangement, besides to alter steroids hormone serum levels. A complete understanding of steroids hormone actions requires a more specific determination of the mechanism by stroma and epithelium prostatic compartments normally communicated and how this cross-talk can be modified by hormones (Cunha et al., 2004).

The levels of androgen and estrogen had been changed after the enzymatic blockades, inducing a different situation of T and estrogen concentrations, what cause and this may caused drastic alterations in the prostate gland of the animals through pos-natal ages studied. However, this new morphological and hormonal intraprostatic scenario assumed by prostate gland did not easily return to a normal histological feature, neither in the early phase, nor in the late phase of post-treatment period. On the other hand, prostate gland of adult animals revealed a gradual effort recovery of a balance morphological environment. Therefore, is it clear to suggest that the epithelium-stroma interaction was disturbed by 5α -r and *Aro* inhibition, what have modified the information exchange between these compartments.

In the young, during the late phase of post-treatment period with Finasteride, the attempt in establish again a normal histology and physiology state essential to the final development and maturation of the gland did not occur in the pos-natal phase. On the other hand, in adult animals, this recovery seem to be more efficient, despite prostate still not shows an normal and functional aspect as observed in the control gerbils at this age. Already, in the old animals group, the recovery term has its use implicated, because this rodent species, spontaneously during aging shows its prostate gland with pathological disorders (Pegorin de Campos al., 2006). Futhermore, after Finasteride administration to old animals, what it happened was a regression of the gland, but not an improvement of this age histopathological conditions. To Corradi and colleagues (2004) the alterations provoked by Finasteride are probably the result of an imbalance of the homeostatic interaction between the epithelium and the underlying stroma. The use of the Finasteride to inhibit 5α -r action, had provoked remarkable reduction of the prostate complex weight, what confirms the main therapeutical effect of this drug in reducing the symptoms caused by BPH (Steers, 2001). However, data obtained with analyzes of Finasteride post-treatment period reveal that when Finasteride administration was interrupted, the prostatic tissues answers in different manner to the new hormonal situation established by absence of enzymatic action. The prostatic epithelial and stromal compartments and steroids hormones serum levels had also undertaken important

modifications after Finasteride treatment. In the late phase of this post-treatment it could be observed in the area adjacent to the epithelium, a denser and evident layer of collagen surrounding each acinus, what haven't been noticed during surgical castration periods (Vilamaior et al., 2000). The new arrangement of this fibrillar stromal component associated to the hypertrophic cells of SMC seems to be involved with control and maintenance of prostatic structure and functionality, once that to Vilamaior and co-workes (2005) the SMC have active role in the reorganization of extracellular matrix fibrillar components.

Although androgens are the main steroids controlling the growth of the mammalian prostate, increasing evidence demonstrates that estrogens also regulate prostate development and growth (Mc Pherson et al., 2001; Härkönen & Mäkelä, 2004). Unexpectedly, an increase of estradiol serum concentration occurred after the Letrozole post-treatment period in young, adult and old gerbils. The elevated T serum concentration confirms the action of the drug in blocking the aromatization of it, but simultaneously emerge another question regarding the activation and functioning of parallel pathways of intacrinologic steroids metabolization (Labrie et al., 2000). This instigating data of estradiol increased levels within the experimental groups where the *Aro* enzyme was blocked can be explained based on the fact that this inhibition occurred in the estradiol direct local conversion, while those indirect pathways of estrogen metabolization have been still carried out by other specific enzymes (Soronen et al., 2004). Moreover, it has been noticed that DHT may also act indirectly through its estrogenic metabolite 5-alpha-androstane-3-beta, 17-beta-diol, besides binding strongly to the estrogen receptors (Soronen et al., 2004; Oliveira et al., 2007) what gives support to the result of increased serum estradiol levels in the Letrozole experimental groups. Histological and biometrics evaluations demonstrated enlargement of the gerbil prostate even 21 days after the end of Letrozole administrtation. McPherson et al. (2001) obtained similar results in Aromatase knockout mice, concluding that, despite a long-term elevation of androgen and prolactin, the absence of estrogen in these animals does not result in induction of malignancy in their prostate gland.

The combined administration of Finasteride+Letrozole confirms that balance between androgens and estrogens, mainly intraprostatic, are essential for maintenance of the prostate gland physiology. As the prostatic stromal compartment became predominantly more affected in the animals treated with Finasteride and, after the use of the Letrozole, the epithelial layer showed consistent alterations, the simultaneous use of these two drugs brought striking results. The separate inhibition of 5α -r and *Aro* and consequently the withdrawal of DHT or estradiol may mask the effect provoked by the hormone that has its concentration elevated. The simultaneous inhibition of 5α -r and *Aro* was capable to induce, independently of the post-natal age of the animals, significant alterations in the prostatic morphology and physiology, but each group of age answered in a specific manner to this double blockade. Although Finasterida and Letrozol individually induce their specific action, when together, the effects of this simultaneous administration resemble those provoked by Finasteride only. In adult and old animals, the known function of Finasteride in reducing the size of the gland (Steers, 2001) and prostate weight remained active when used together with Letrozole, therefore the prostate diminishes its weight. To Huynh et al. (2001), blocking of estrogen activity can also disrupt paracrine production of growth factors that act on the epithelial cells. To these authors, the lost of autocrine stimulatory activity on the stromal cells or paracrine activity on the epithelium by co-administration of Finasteride and anti-estrogen have inhibited epithelial cell activity, once the size of the prostate was reduced, as was the cytoplasmic volume of luminal cells. A synergic action between Finasteride and Letrozole may be used to indicate a new mechanism for which estrogens influence the normal growth and maintenance of the prostate.

Once that DHT, the main androgen intraprostatic form, is responsible for the functional maintenance of the gland (Labrie et al., 2000) and its production is effectively inhibited by Finasteride, the regressed prostatic weights demonstrated with the use of this drug is justified and similar to the effect of a surgical castration (Wright et al., 1999; Shibata et al., 2001; Corradi et al., 2004). Thus, as previously reported in other rodent species (Pahalada et al., 1998; Huynh, 2002)

and dogs (Shibata et al, 2001; Sirinarumitr et al, 2001), it appears that the treatment with Finasteride caused a significant decrease in intraprostatic DHT levels in the gerbil prostate and this resulted in profound consequences to the organ. Therefore, the 5 α -r enzyme has two key roles in the prostate: to convert T into DHT and to increase the intraprostatic concentration of this androgen activated form (Wright et al., 1999). These previous data added to those found with this present study support the 5 α -r key fundamental role to the maintenance of prostate homeostasis along post-natal development period of gerbils. However, despite DHT being more efficient than the T intraprostatically, T is the main serum hormone in males. Furthermore, T is essential for the development and functionality of male reproductive tract, and it can be aromatized into estrogens (Risbridger et al. 2003).

Thus, the lack of DHT and estrogen, provoked by Finasteride+Letrozole treatment, had altered the prostatic hormonal and morphological micro-environment of young, adult and old animals, as Suzuki et al. (1998), Ito et al. (2000) and Huynh et al. (2001) observed previously. Ishikawa et al. (2006) using an in vitro model to assess the production of estrogenic steroids synthesized via an Aromatase-independent pathway in non-breast cancer cells (HeLa) and in breast cancer cells, noted that when estrogens are no longer produced due to the absence of *Aro* action, the estrogenicity of other less estrogenic steroids synthesized from T is readily detected. However, this estrogenicity is reduced by additional treatment of cells with Finasteride. These effects may be occurred when Letrozole and Finasteride+Letrozole, respectively were administrated to the young, adult and old gerbils and may confirm the morphological results.

Although serum hormone levels are important in prostate cancer, the role of local synthesis of steroids has assumed increasing importance in some disease, particularly in glandular tissue, such as breast and prostate, wherein abnormal levels of estradiol promote development and proliferation in early stages of malignant transformation of epithelial cells (Risbridger et al., 2003). The effects of estrogen on prostate are complex and involve both direct and indirect actions. Studies with adult human and rodents, short-term treatments with pharmacological doses of estrogens can

induce atrophy of prostate gland. In conclusion, the evidence of the findings demonstrate that the intraprostatically balance between androgen and estrogen, dependent upon the activity of specific steroids metabolizing enzymes, including 5 α -r and *Aro* seems to be crucial for the normal prostatic biology. The blockade of these enzymes imposed to the prostate gland a totally new local hormonal condition, which probably disrupted the epithelium-stroma interaction and created a different structural microenvironment. As evidence is accumulating that the prostate gland is primarily influenced by the local hormone steroids synthesis during the post-natal development period, it might important to determine whether and/or how these enzymes act in the process of initiation, promotion and progression of prostate cancer.

Therefore, present histological and ultrastructural data, in association with the easy handling of the gerbils plus their anatomical characteristics of the prostatic complex (Pegorin de Campos et al., 2006) make this rodent an excellent model system to study the relationship between prostatic locally activated sex steroids and the normal and abnormal physiology, which has been required to demonstrate the significance of changes in the steroid-metabolizing enzymes into of prostate growth and function regulation.

Acknowledgments

This paper is part of the thesis presented by LSC to the Institute of Biology, UNICAMP, in partial fulfillment of the requirement for a PhD degree, and was supported by the Brazilian agencies FAPESP – São Paulo Research Foundation (Proc. Nr. 03/09570-2 fellowship to LSC and Proc. Nr. 04/01603-1 grant to SRT) and CNPq - Brazilian National Research and Development Council (Proc. Nr. 301111/05-7 research fellowship to SRT). The authors wish to thank to Mr. Luiz Roberto Falleiros Júnior and MSc Rosana Silistino de Souza for their technical assistance, as well as all other researchers at the Microscopy and Microanalysis Laboratory.

References

- Azzolina B, Ellsworth K, Andersson S, Geissler W, Bull HG, Harris GS (1997) Inhibition of rat 5 α -reductase by finasteride: evidence for isozyme differences in the mechanism of inhibition. *J Steroid Molec Biol* 61(1-2):55-64
- Bianco JJ, Handelsman DJ, Pedersen JS, Risbridger GP (2002) Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinol* 143(12): 4922-4933
- Bruchovsky N, Wilson JD (1999) Discovery of the role of dihydrotestosterone in androgen action. *Steroids* 64:753-759
- Bruno RD, Njar VCO (2007) Targeting Cytochrome P450 Enzymes: A New Approach in Anticancer Drug Development. *Bioorg Med Chem* 15(15):5047–5060
- Carruba G. (2006) Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* 1089:201-217
- Carruba G. (2007) Estrogen and prostate cancer: An eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J Cell Biochem* 102(4):899-911
- Corradi LS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2004) Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72(5):198-208
- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF (1976) The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol* 51:7-11
- Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP (2001) Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev* 13:285-296
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T (2004) Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Ster Bioch Molec Biol* 92(4):221-236
- Custódio AM, Góes RM, Taboga SR (2004) Acid phosphatase activity in gerbil prostate: comparative study in male and female during postnatal development. *Cell Biol Int* 28:335–344

- Ekman P (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate Suppl.*10:14-18.
- Góes RM, Zanetoni C, Tomiosso TK, Ribeiro DL, Taboga SR (2007) Histological response on dorsal and ventral gerbil prostatic lobes induced by different testosterone withdrawal procedures. *Micron* 38:231–236
- Härkönen PL, Mäkelä SI (2004) Role os estrogens in development of prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92:297-305
- Hayward SW, Wang Y, Cao M, Hom YK, Zhang B, Grossfeld GD, Sudilovsky D, Cunha GR (2001) Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res* 61:8135-8142
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ (2002) Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 52:213-235
- Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TWM (2001) Co-administration of finasterida and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J Endocrinol* 171:109-118
- Huynh H (2002) Induction of apoptosis in rat ventral prostate by finasteride is associated with alteration in MAP kinase pathways and Bcl-2 related family of proteins. *Int J Oncol* 20:1297-1303.
- Ishikawa T, Glidewell-Kenney C, Jameson JL (2006) Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 α -reductase inhibitor. *J Ster Bioch Molec Biol* 98:133-138
- Ito K, Fukabori Y, Shibata Y, Suzuki K, Mieda M, Gotanda K, Honma S, Yamanaka H (2000) Effects of a new steroidal Aromatase inhibitor, TZA-2237, and/or chlormadinone acetate on hormone-induced spontaneous canine benign prostatic hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 143:543-554

-
- Labrie F, The-Luu V, Lin SX, Simard J, Labrie C (2000) Role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in sex steroid formation in peripheral intracrine tissue. *TEM* 11(10):421-427
- Lephart ED, Lund TD, Horvath LT (2001) Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Res Ver* 37:25-37
- McPherson SJ, Wang H, Jones ME, Pedersen J, Iismaa TP, Wreford N, Simpson E, Risbridger G (2001) Elevated androgens and prolactin in Aromatase deficient mice cause enlargement, but not malignancy of the prostate gland. *Endocrinol* 142: 2458-2467
- Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H (2005) In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 12:101-107
- Oliveira A, Coelho PH, Guedes FD, Mahecha GAB, Hess RA, Oliveira C (2007) 5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol), an estrogenic metabolite of 5 α -dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ER β expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids* 72(14):914-922
- Pegorin de Campos SG, Zanetoni C, Góes RM, Taboga SR (2006) Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat Rec A Discv Mol Cell Biol* 288:723-733
- Prahalada S, Rhodes L, Grossman SJ, Heggan D, Keenan KP, Cukiersky MA, Hoe CM, Berman C, Zwieten MJ (1998) Morphological and hormonal changes in the ventral and dorsolateral prostatic lobes of rats treated with finasteride, a 5-alpha reductase inhibitor. *Prostate* 35:157-164
- Pinheiro PFF, Almeida CCD, Segatelli TM, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE (2003) Structure of the pelvic and penile urethra relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Anat* 202:431-444
- Price D (1963) Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat Can Inst Monogr* 12:1-27
- Ricke WA, Wang Y, Cunha GR (2007) Steroid hormones and carcinogenesis of the prostate: the role of estrogens. *Differentiation* 75(9):871-882

- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mc Pherson SJ (2003) Oestrogens and prostate cancer. *Endocrine-related Cancer* 10:187-191
- Rivas A, Fisher JS, McKinnell C, Atanassova N, Sharpe RM (2002) Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinol* 143 (12): 4797-4808
- Santos FCA, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2003) Structure, histochemistry and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 35:447-457
- Santos FCA, Falleiros-Júnior LR, Corradi LS, Vilamaior PSL, Taboga SR (2007) Experimental endocrine therapies promote epithelial cytodifferentiation and ciliogenesis in the gerbil female prostate. *Cell Tissue Res* 328:617-624
- Scarano WR, Vilamaior PS, 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* 288(11):1190-200
- Sirinarumitr K, Johnston SD, Kustritz MV, Johnston GR, Sarkar DK, Memon MA (2001) Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hyperplasia. *J Am Vet Med Assoc* 218(8):1275-1279
- Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko I (2004) Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92:281-286
- Suzuki K, Okazaki H, Kurokawa K, Suzuki T, Onuma E, Takanashi H, Mamiya Y, Yamanaka H (1998) Effects of dual inhibition of 5-alpha-reductase and Aromatase on spontaneously developed canine prostatic hypertrophy. *Prostate* 37 (2):70-76.

- Shibata Y, Fukabori Y, Ito K, Suzuki K, Yamanaka H (2001) Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. *J Urol* 165:289-293
- Steers WD (2001) 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology* 58 (Suppl 6A): 17-24
- Tobin VA, Canny BJ (1998) The regulation of gonadotropin-releasing hormone induce calcium signals in male rat gonadotrophs by testosterone is mediated by dihydrotestosterone. *Endocrinology* 139:1038-1045
- Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A, Li Y, Patrikainen L, Pulkka A, Soronen P, Törn (2005) Enzymes as modulators in malignant transformation. *J Steroid Biochem Mol Bio* 1 93:277-283
- Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A (2006) Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSDs. *Mol Cell Endocrinol* 248:141-148
- Vilamaior PSL, Felisbino SR, Taboga SR, Carvalho HF (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: An possible role for the smooth muscle cells. *Prostate* 45:253-258
- Vilamaior PSL, Carvalho HF, Taboga SR (2005) Modulation of smooth muscle cells function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Inter* 29(9):809-816
- Yuan-Shan Z (2005) Molecular Basis of Steroid Action in the Prostate. *Cellscience* 1(4): 27–55
- Yuen MT, Leung LK, Wang J, Wong YC, Chan F (2005) Enhanced induction of prostatic dysplasia and carcinoma in Noble rats model of combination of neonatal estrogen exposure and hormonal treatments at adulthood. *Inter J Oncol* 27:1685-1695
- Wang YZ & Wong YC (1998) Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* 35:165-177

Wang Y, Hayward SW, Donjacour AA, Young P, Jacks T, Sage J, Dahiya R, Cardiff RD, Day ML, Cunha GR (2000) Sex hormone-induce carcinogenesis in Rb-deficient prostate tissue. *Cancer Res* 60:6008-6017

Wang Y, Sudilovsky D, Zhang B, Haugney PC, Rosen MA, Wu DS, Cunha TJ, Dahiya R, Cunha GR, Hayward SW (2001) A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. *Cancer Res* 61:6064-6072

Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS (1999) Androgen-induced regrowth in the castrated rat central prostate: role of 5 α -reductase. *Endocrinol* 140 (10): 4509-4515

Wu Q, Zhou Y, Chen L, Shi J, Wang CY, Miao L, Klocker H, Park I, Lee C, Zhang J (2007) Benign prostatic hyperplasia (BPH) epithelial cell line BPH-1 induces aromatase expression in prostatic stromal cells via prostaglandin E2. *J Endocrinol* 195(1):89-94

Figures Legends

Fig. 1 – Mean variation of Testosterone and Estradiol serum concentration following post-treatment periods of young, adult and old animals.

Fig. 2 –*Hematoxylin-Eosin stained sections of Mongolian gerbil ventral prostatic lobe regions.* The control prostate tissue of all ages in study presented a characteristic development of epithelium (ep) and lumen (L) and stromal compartment (s). Treatments promoted important changes in the epithelial and stromal compartments, mainly in the connective tissue at subepithelial region (*), besides an increase of fibroblasts (arrows) within this area. Morphological modifications occurred in the smooth muscle cells (SMC) during aging and post-treatment periods. Barr = 40µm.

Fig. 3 – *Transmission Electron Microscopy of control Mongolian gerbil ventral prostatic lobe regions.* **Young.** Epithelium cells (ep) with few synthetic and secretory organelles. Smooth muscle cells (SMC) interspersed by some collagen fibrils (CO). Scant fusiform fibroblasts (FB) emitting short cytoplasmic projections. Epithelial basement membrane (white arrows). **Adult.** Cytoplasm of epithelium cells (ep) with numerous synthetic organelles and secretory vesicles. Collagen fibrils (CO). Basement membrane (white arrows). SMC presenting a contractile pattern with characteristic basement membrane (black arrows). **Old.** The secreting cells presented a notable decrease of synthetic organelles and secretory vesicles. Stroma with increased collagen fibrils (CO) and amorphous unfibrillar material (*). Fibroblast cytoplasm projection (FB) was associated with collagen fibrils. Basement membrane (white arrow).

Fig. 4 – *Transmission Electron Microscopy of Finasteride-treated Mongolian gerbil ventral prostatic lobe regions.* **Young.** Epithelial secretory cells (EP) with enlargement of rough endoplasmic reticulum (RER) and secretory vesicles in cell's apices (arrow). Cellularity increase, including fibroblasts (FB) at the subepithelial region. **Adult.** Enlarged cistern of the RER in the

basal perinuclear region. Collagen fibrils (CO) increase at epithelium base. **Old.** Secretory cells with decrease of synthetic organelles in the basal cytoplasm and numerous infoldings were merged to the basement membrane compounds (BM). Great amount of lipid droplets (LD). Smooth muscle cells assumed a spinous-like aspect in its contour (SMC) and became interspersed by collagen fibrils.

Fig. 5 – Transmission Electron Microscopy of Letrozole-treated Mongolian gerbil ventral prostatic lobe regions. **Young.** Epithelial layer (EP) presented a variation of cellular phenotypes, besides inconspicuous secretory organelles. Numerous smooth muscle cells (SMC) and collagen fibrils (CO). *Inset:* Detailed view of an activated fibroblast forming cytoplasm projections with focal adhesions (arrows). **Adult.** Cellular heterogeneity RER enlarged cisterns in the basal perinuclear region. Fibroblast (FB) showing a large Golgi complex (arrow). **Old.** Smooth muscle cells (SMC) loosely packed and became interspersed by collagen fibrils. Blood vessel (V). Activated fibroblast adjacent to epithelium base with enlarged RER and mitochondria.

Fig. 6 – Transmission Electron Microscopy of Finasteride+Letrozol treated Mongolian gerbil ventral prostatic lobe regions. **Young.** Great amount of enlargement of rough endoplasmic reticulum (RER) and secretory vesicles in cell apices. In the subepithelial area collagen fibrils (CO) increased. **Adult.** RER enlarged cistern occupied the most area of the epithelial cytoplasm cells. Increased collagen fibrils (CO) at the epithelial base. Elastic fiber (white arrow). **Old.** Basal region of epithelium cells (EP) exhibiting infoldings. Increased amorphous unfibrillar material (*), collagen fibrils (CO) and fibroblasts (FB) at the subepithelial base. Stroma with increased collagen fibrils (CO) and amorphous unfibrillar material (*).

Table I. Weight body values (BW), prostatite absolute (PW) and relative (RPW) weights and percentage of relative weight variation of young animals.

Post Treatment Periods (days)	Biometrics Parameters (N=5)	Experimental Groups				
		Control	Finasteride	Letrozole	Finasteride + Letrozole	
Early	1	WB (gr)	51.4±0.3	51.2±2.0 ₁	48.5±0.9 ₁	50.3±0.7 ₁
		WP (gr)	0.155±0.08	0,117±0.1 ₁	0.168±0.2	0.167±0.3 ₁
		RP (%)	100.0±5.2	75.7±8.4 ₁	115.7±18.4	109.7±20.5 ₁
		Variation of RP (%)*	-	24.3	+15.7	+9.7
	7	WB (gr)	52.9±2.8 ^a	50.7±1.6 ^a ₁	50.8±1.9 ^a ₁	43.2±1.4 ^b ₂
		WP (gr)	0.163±0.1	0.092±0.02 ₁	0.158±0.05	0.084±0.03 ₁
		RP (%)	100.4±12.4	59.3±12.1 ₁	99.7±28.0	64.5±21.1 ₁
		Variation of RP (%)*	+0.4	41.1	0.7	35.9
Late	14	WB (gr)	52.2±2.7 ^a	38.5±2.1 ^b ₂	46.2±1.7 ^a _{1,2}	47.4±0.8 ^{a,c} _{1,2}
		WP (gr)	0.170±0.02 ^a	0.04±0.01 ^b ₂	0.085±0.03 ^b	0.054±0.1 ^b ₂
		RP (%)	106.6±5.3 ^a	30.1±04.7 ^b ₂	54.9±15.5 ^b	35.6±7.8 ^b ₂
		Variation of RP (%)*	+6.6	76.5	51.7	71
	21	WB (gr)	57.1±1.4	54.6±1.9 ₁	55.2±2.4 _{1,3}	52.0±1.5 _{1,3}
		WP (gr)	0.198±0.04	0.075±0.08 ₁	0.154±0.04	0.102±0.03 ₁
		RP (%)	115.3±22.1 ^a	39.3±2.9 ^b ₂	79.7±21.9 ^a	56.6±17.4 ^a ₁
		Variation of RP (%)*	+15.3	76	35.5	58.7

Values represent Mean± Standard Error. p<0.05.

Prostatic relative weight (RP) corresponds to the ratio between the WP and that of WB

*Relative weight variation is shown with respect to the control, which was taken as 100%

Alphabetic superindice (a, b, c) indicate inter-groups differences, when comparing treatments kind.

Numeric superindice (1, 2, 3) indicate inter-groups differences, when comparing stages of post-treatment period.

Table II. Weight body values (BW), prostatitic absolute (PW) and relative (RPW) weights and percentage of relative weight variation of adult animals.

Post Treatment Periods (days)	Biometrics Parameters (N=5)	Experimental Groups				
		Control	Finasteride	Letrozole	Finasteride + Letrozole	
Early	1	WB (gr)	74.4±4.6 ₁	67.9±4.6	76.5±4.6	80.9±2.3 ₁
		WP (gr)	0.588±0.1 ₁ ^a	0.279±0.05 ^b	0.562±0.1 ^{a,c}	0.358±0.04 ₁ ^b
		RP (%)	100.0±6.9 ^a	50.7±7.5 ^b	92.6±7.2 ^{a,c}	55.9±5.4 ^b
		Variation of RP (%)*	-	49.2	7.3	44.1
	7	WB (gr)	79.5±2.7 _{1,2} ^a	74.7±3.0 ^a	78.8±2.1 ^a	69.3±1.9 ₂ ^b
		WP (gr)	0.613±0.1 ₁ ^a	0.361±0.03 ^b	0.534±0.04 ^b	0.286±0.04 ₁ ^c
		RP (%)	97.4±7.2 ^a	62.7±2.5 ^b	93.6±4.4 ^{a,c}	60.9±4.7 ^b
		Variation of RP (%)*	2.6	34.7	3.7	36.5
Late	14	WB (gr)	90.9±1.7 ₂ ^a	79.8±2.1 ^b	75.8±3.2 ^b	72.4±0.7 ₂ ^b
		WP (gr)	0.765±0.05 ₁ ^a	0.470±0.1 ^b	0.480±0.04 ^b	0.373±0.04 ₁ ^b
		RP (%)	106.9±7.9 ₁ ^a	69.1±7.4 ^b	73.4±3.9 ^b	69.6±1.9 ^b
		Variation of RP (%)*	+6.9	37.8	33.5	37.3
	21	WB (gr)	92.1±3.2 ₂ ^a	70.5±3.7 ^b	76.8±2.9 ^b	75.4±2.6 ₁ ^b
		WP (gr)	0.876±0.03 ₂ ^a	0.320±0.05 ^b	0.645±0.1 ^c	0.517±0.01 ₂ ^c
		RP (%)	121.4±6.0 ^a	46.9±5.7 ^b	86.8±5.4 ^c	72.3±4.0 ^c
		Variation of RP (%)*	+21.4	74.5	34.6	49.1

Values represent Mean± Standard Error. p<0.05.

Prostatic relative weight (RP) corresponds to the ratio between the WP and that of WB

*Relative weight variation is shown with respect to the control, which was taken as 100%

Alphabetic superindice (a, b, c) indicate inter-groups differences, when comparing treatments kind.

Numeric superindice (1, 2, 3) indicate inter-groups differences, when comparing stages of post-treatment period.

Table III. Weight body values (BW), prostatitic absolute (PW) and relative (RPW) weights and percentage of relative weight variation of old animals.

Post Treatment Periods (days)	Biometrics Parameters (N=5)	Experimental Groups				
		Control	Finasteride	Letrozole	Finasteride + Letrozole	
Early	1	WB (gr)	92.3±.37	89.8±1.9	86.3±2.5	78.1±5.8
		WP (gr)	0.763±0.1 ^a	0.481±0.01 ^b	0.778±0.02 ^{a,c} ₁	0.450±0.05 ^b
		RP (%)	100.0±4.7 ^a	65.3±1.8 ^b ₁	109.7±1.6 ^{a,c} ₁	69.5±4.2 ^b ₁
		Variation of RP (%)*	-	34.7	+9.7	30.5
	7	WB (gr)	91.6±1.7 ^a	82.5±2.3 ^b	85.4±1.5 ^a	78.9±1.6 ^b
		WP (gr)	0.823±0.05 ^a	0.501±0.01 ^b	0.654±0.02 ^c ₂	0.410±0.03 ^b
		RP (%)	109.1±5.5 ^a	67.3±2.8 ^b ₁	85.4±1.9 ^c ₂	59.2±4.0 ^b _{1,2}
		Variation of RP (%)*	+9.1	41.8	23.7	49.9
Late	14	WB (gr)	87.3±1.4	84.2±5.5	85.6±3.3	74.9±6.0
		WP (gr)	0.764±0.01 ^a	0.605±0.04 ^b	0.670±0.02 ^a _{1,2}	0.571±0.02 ^b
		RP (%)	106.6±1.1 ^a	82.1±2.5 ^b ₂	93.4±4.4 ^a ₂	88.7±5.3 ^b _{1,3}
		Variation of RP (%)*	+6.6	24.5	13.2	17.9
	21	WB (gr)	95.4±2.5	82.8±4.0	91.9±4.8	80.1±6.2
		WP (gr)	0.834±0.04 ^a	0.530±0.05 ^b	0.923±0.04 ^{a,c} ₃	0.542±0.1 ^b
		RP (%)	106.8±6.2 ^a	72.8±5.7 ^b ₁	114.7±1.4 ^{a,c} ₁	75.1±9.7 ^b ₁
		Variation of RP (%)*	+6.8	33.9	+7.9	31.6

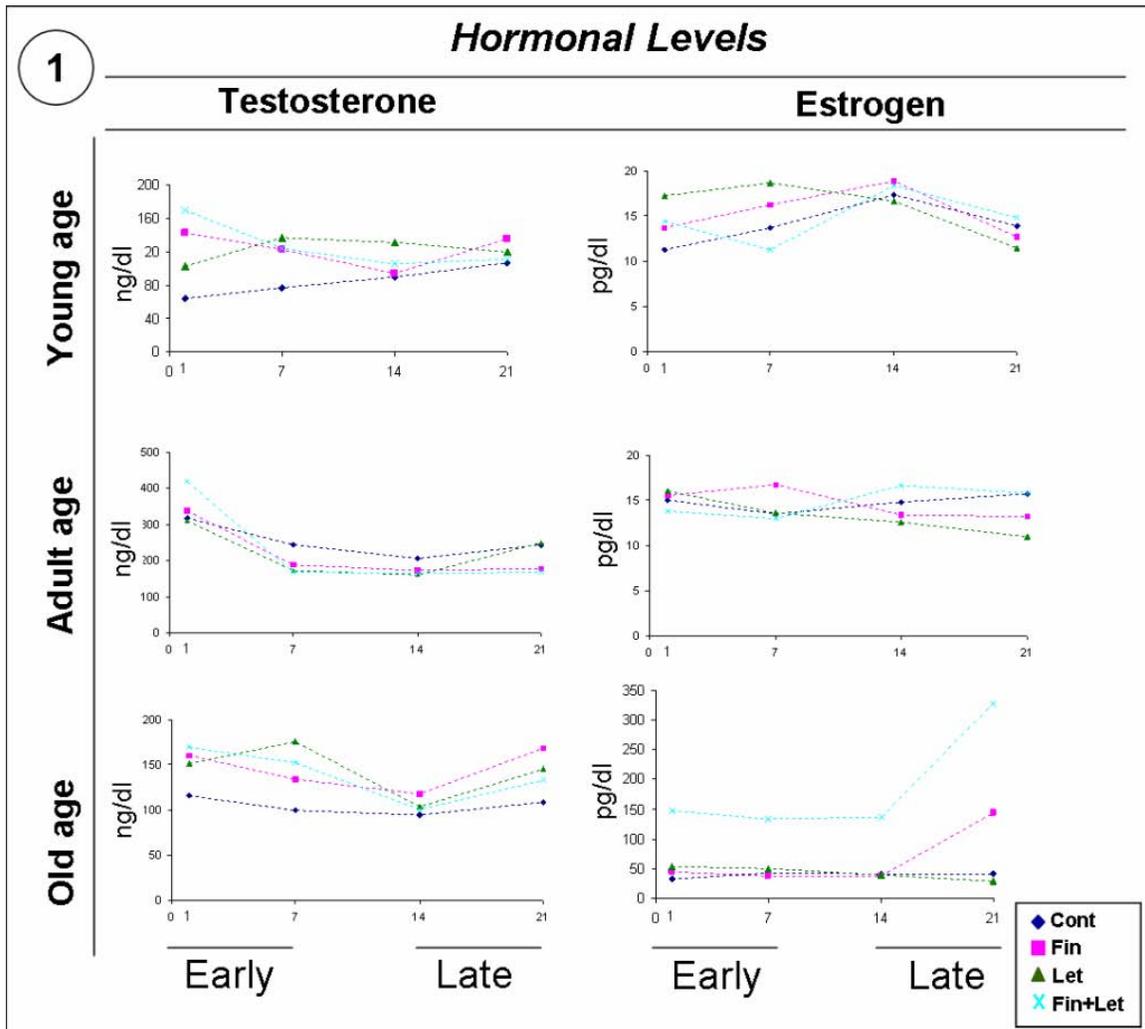
Values represent Mean± Standard Error. $p \leq 0.05$.

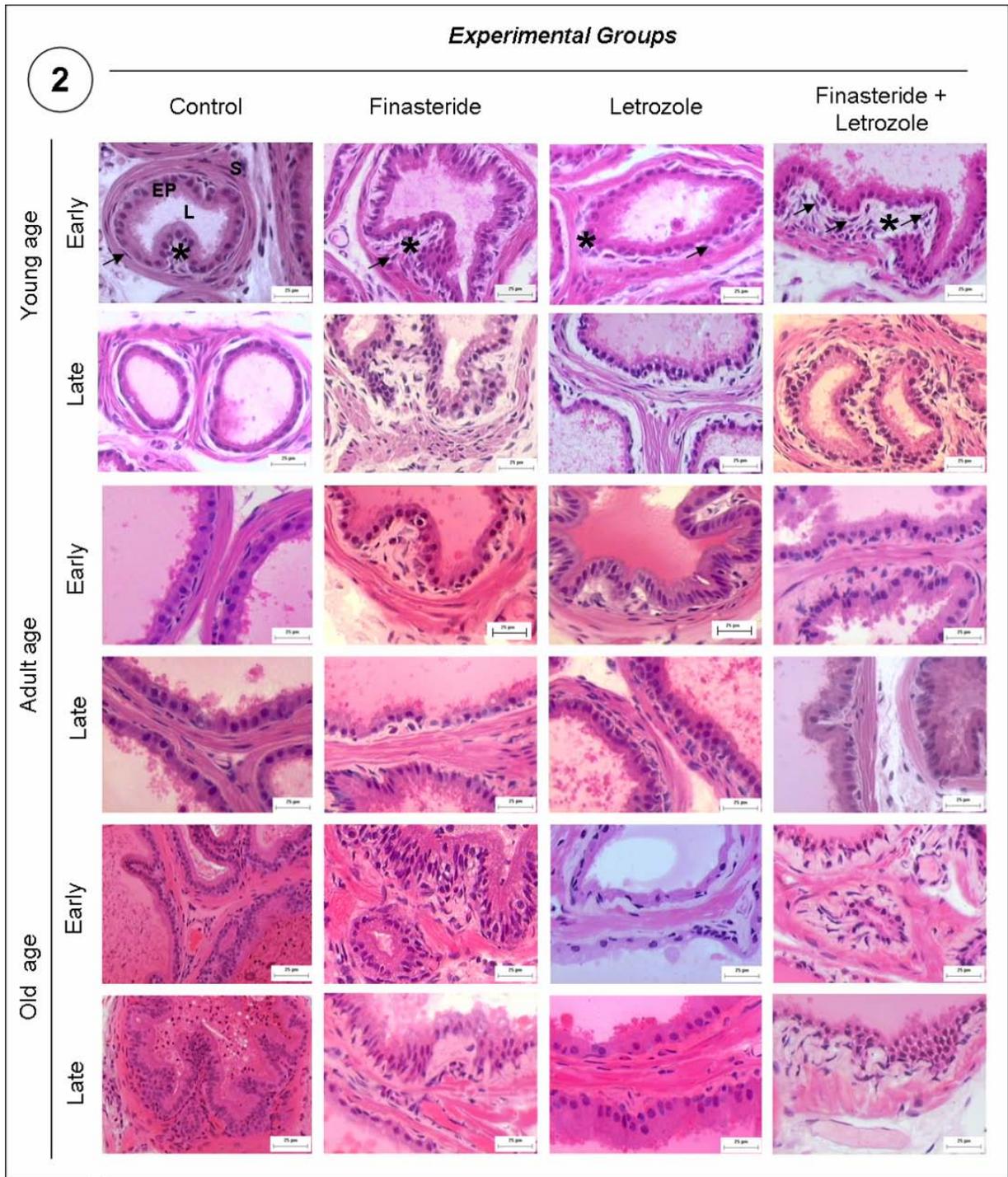
Prostatic relative weight (RP) corresponds to the ratio between the WP and that of WB

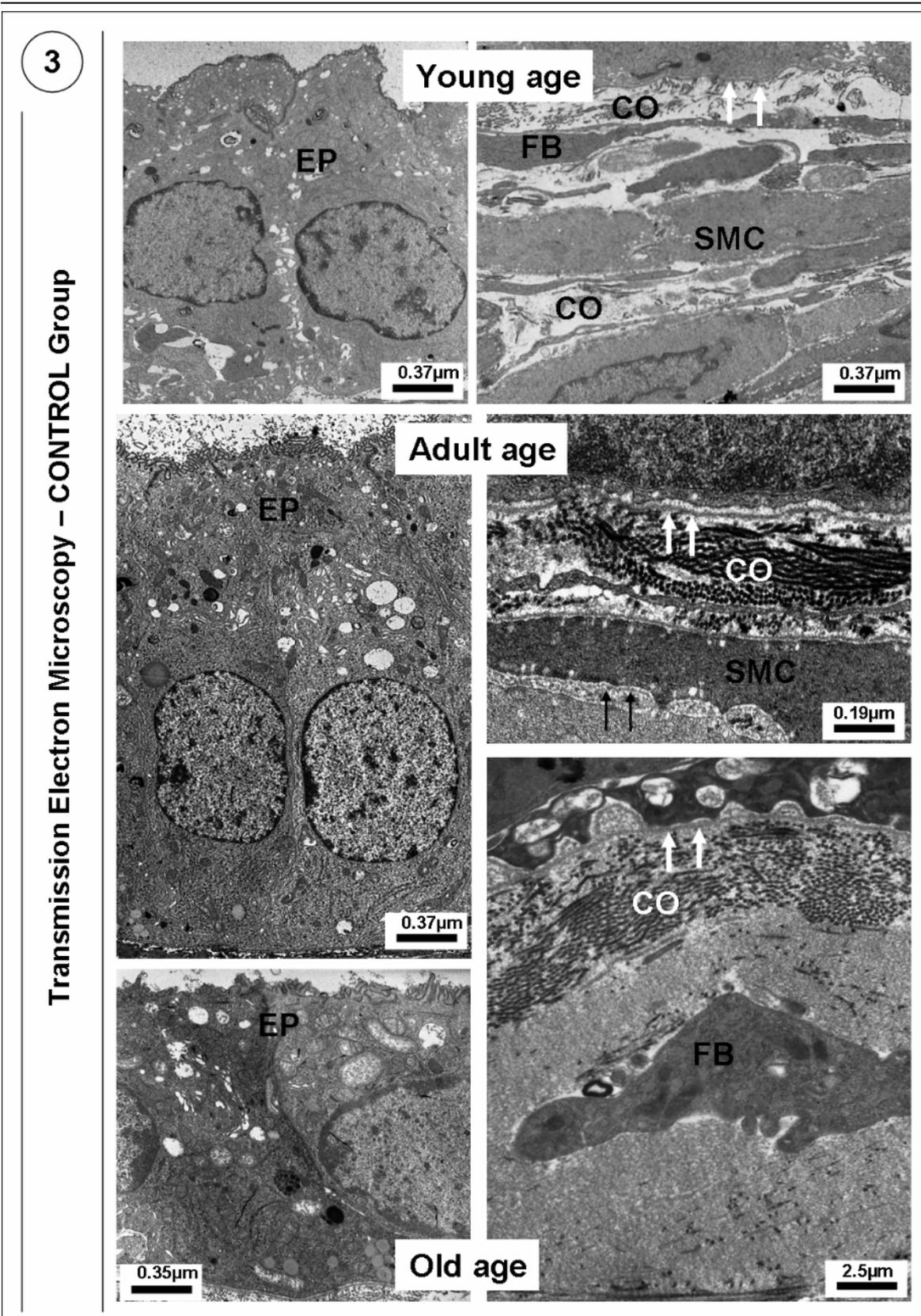
*Relative weight variation is shown with respect to the control, which was taken as 100%

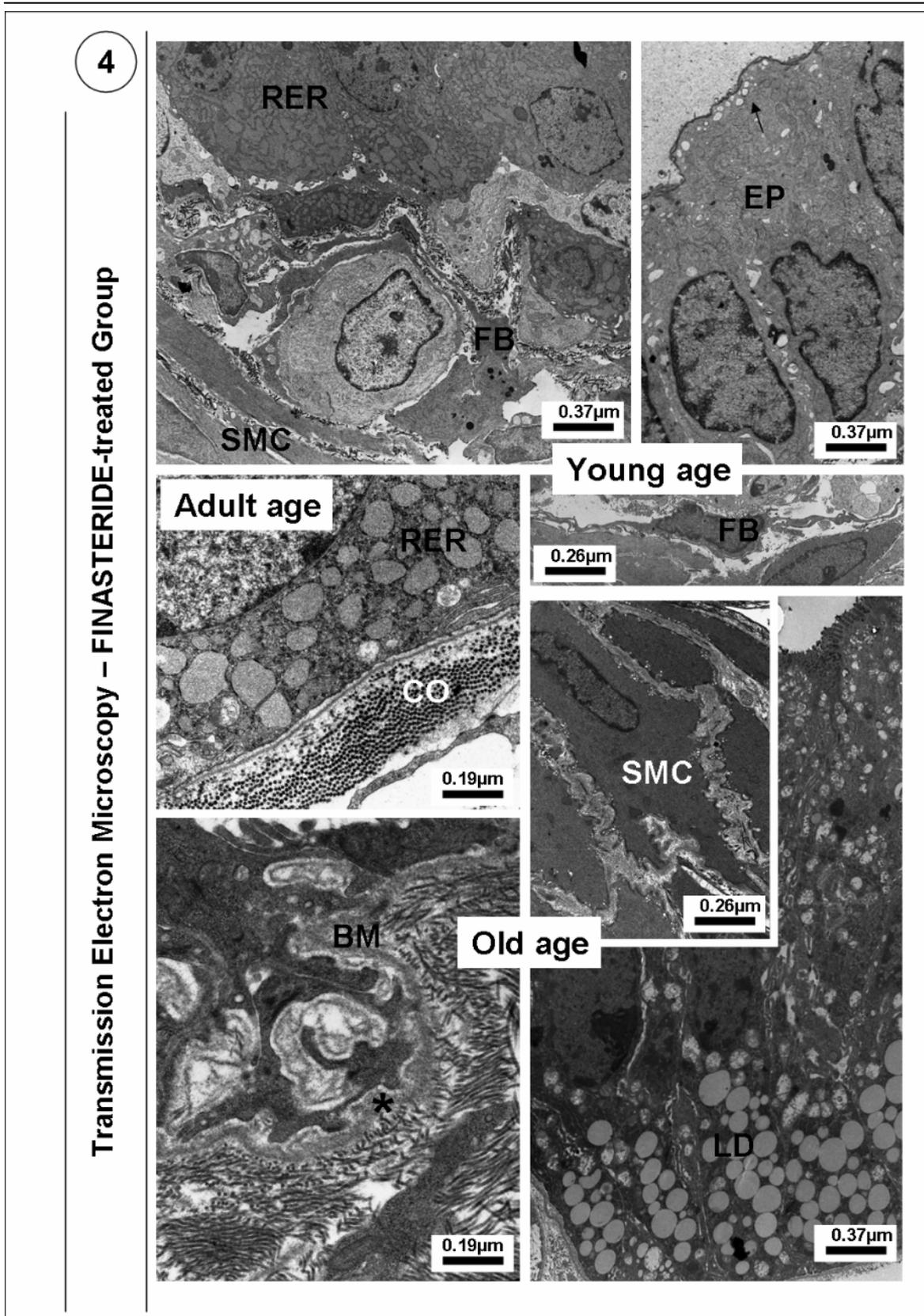
Alphabetic superindice (a, b, c) indicate inter-groups differences, when comparing treatments kind.

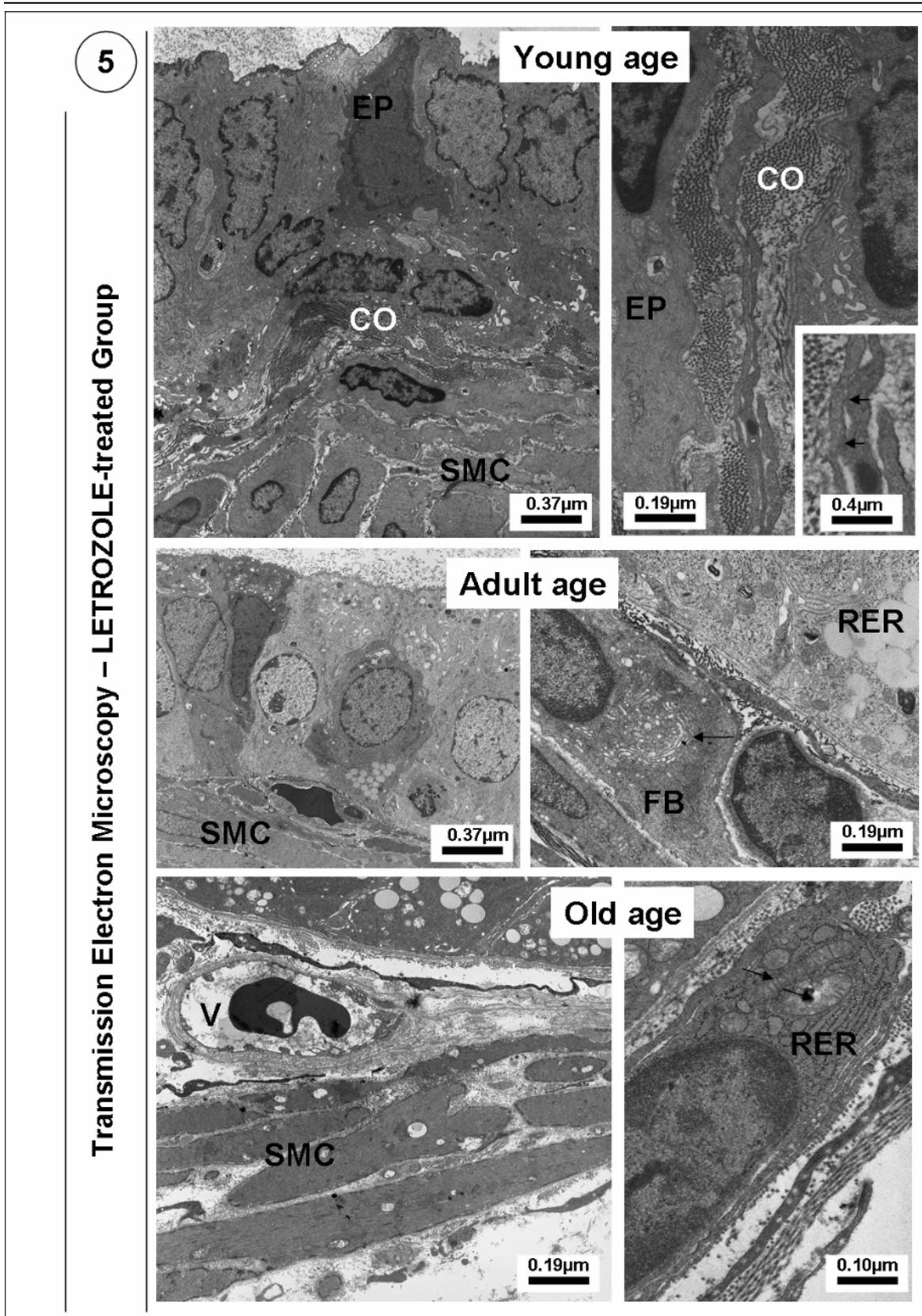
Numeric superindice (1, 2, 3) indicate inter-groups differences, when comparing stages of post-treatment period.

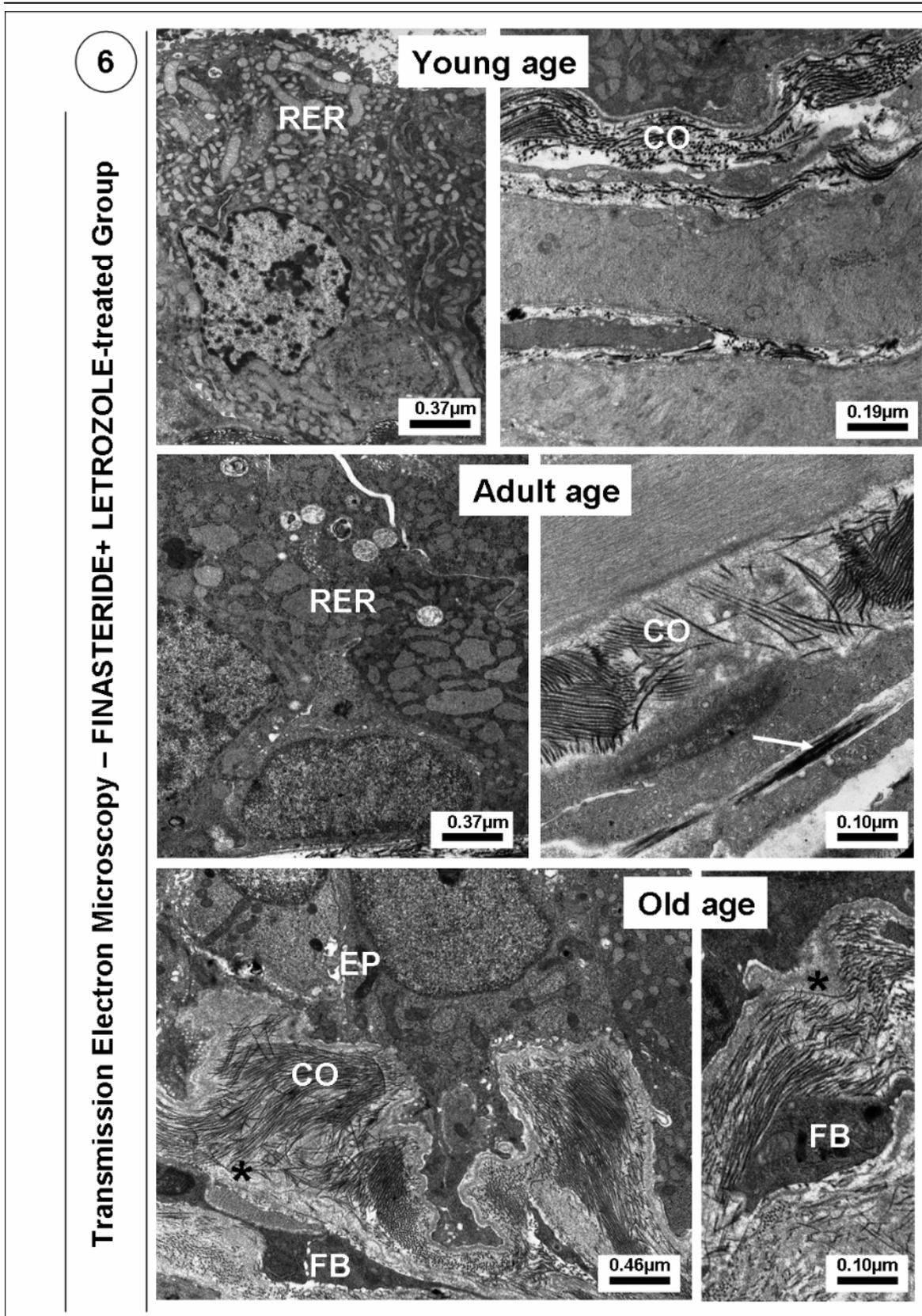












Artigo 2.

Desbalanço hormonal induzido por bloqueio enzimático afeta a interação epitélio-estroma e contribui para o surgimento de um aparente microambiente desmoplásico na próstata

A ser submetido para a revista *Differentiation*

**Induced hormonal unbalance by enzymatic inhibition affects epithelial-stromal interaction
contributing to the generation of a desmoplastic microenvironment in the prostate**

Corradi, LS¹ and Taboga, SR^{2*}

¹Campinas State University-UNICAMP, Department of Cell Biology – Institute of Biology, Campinas-SP, Brazil; ²São Paulo State University-UNESP, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences-IBILCE, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology, São José do Rio Preto-SP, Brazil

Running title: Hormonal unbalance affects prostate epithelium-stroma interaction

***Correspondence to:**

Dr. Sebastião Roberto Taboga

Departamento de Biologia – Ibilce/Unesp

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth

São José do Rio Preto, SP, Brasil

CEP 15054-000

Tel: + 55 17 3221-2386 Fax: + 55 17 3221-2390

Funded by:

São Paulo State Research (FAPESP)

Abstract

The objective of this study was to investigate the reorganization feature of epithelial and stromal compartments after the induced hormonal unbalance in an effort to comprehend the relationship between stromal-epithelial “cross-talk” mechanisms and sex steroids. Young, adult and old gerbils were treated with Finasteride and Letrozol (5 α -reductase and Aromatase enzymes inhibitors, respectively) and the prostatic fragments were analyzed in the post-treatments period. In comparison with the drugs administration separately, the data obtained after enzymatic dual inhibition demonstrated a marked remodeling of stromal compartment with an increased deposition of extracellular matrix proteins. There was a remarkable collagen accumulation around the epithelium base where numerous phenotypically altered and active fibroblasts could be noted, such as in a desmoplastic tissue tumours. In the experimental groups treated by drugs separately the stromal compartment also assumed a new organizational feature, in both cases occupying a larger area where collagen and reticular fibers were in an altered morphological feature. Clusters of reticular fibers and a slight collagen accumulation adjacent to the epithelium base could be noted in the prostatic stroma of animals treated with Finasteride only, while in Letrozole-treated group these kind of fibrillar component was scantily observed and the reticular fibers revealed with a discontinued aspect. Once that extracellular matrix fibrillar components acts as mediators between the prostatic compartments, a desmoplasia phenomenon appears to be installed in gerbil prostate , which confirms the breakdown of epithelium-stromal interaction when disruption of the balance between androgen/estrogen levels was provoked simultaneously or not. Moreover, this evident new increased extracellular matrix fibers reorganization plus the activated fibroblasts reveals that the blockade of theses hormones metabolization within the prostate may be a powerful tool to study normal physiology and diseases of this gland.

Keywords: ventral prostate, 5-alpha reductase, Aromatase, desmoplasia, stroma, gerbil

Introdução

A progressão de um câncer é um processo complexo, de múltiplos passos, que começa com a transformação de células epiteliais e estromais, passa por uma remodelação da matriz extracelular (MEC), formação de novos vasos sanguíneos e influxo de vários tipos de células imunes, principalmente macrófagos e depois, ainda continua com o crescimento, invasão e metástase do tumor, sendo isto não exclusivamente desencadeado por ativação de oncogenes e inibição dos genes supressores de tumor (Tuxhorn et al., 2001). Evidências sugerem que o desenvolvimento do câncer também é altamente dependente da criação, a partir do compartimento estromal, de um microambiente permissivo e promotor da tumorigênese (Tuxhorn et al., 2002). Alguns estudos têm mostrado que o crescimento de células prostáticas cancerígenas pode ser estimulado ou inibido em ambientes estromais específicos (Condon, 2005).

Um desequilíbrio na interação homeostática entre epitélio e estroma prostático pode iniciar e promover carcinogênese nesse órgão (Sung & Chung, 2002) e durante esses processos, o mecanismo de estimulação parácrina, principal responsável pelo desenvolvimento e manutenção da próstata, pode alterar-se para um mecanismo autócrino, estimulado por andrógenos (Cunha et al., 2002). As células musculares lisas (CML) e os fibroblastos têm participação central nos mecanismos de estimulação parácrina, especialmente sobre o epitélio e apresentam plasticidade funcional, sendo capazes de modular seu fenótipo frente a situações fisiológicas e patológicas (Farnsworth, 1999; Worth et al., 2001). Como principal fonte de constituintes da MEC, os fibroblastos vêm sendo alvo de muitos estudos para esclarecer como esse tipo celular é capaz de induzir as alterações que o compartimento estromal sofre para permitir o aparecimento e desenvolvimento de patologias na próstata (Kalluri & Zeisberg, 2006).

O compartimento estromal responde de várias formas às inúmeras situações anormais, criando um microambiente claramente diferente do estroma encontrado nos tecidos normais (Tuxhorn et al., 2001). As modificações dos fenótipos celulares estromais e da composição da MEC

são observadas em muitos tipos de cânceres, principalmente nos de mama, cólon e próstata (Tuxhorn et al., 2001; 2002; Tomas & Kruslin, 2004). Estas alterações são conhecidas como *desmoplasia, reação estromal ou estroma reativo* (Tuxhorn et al., 2001; 2002; Tomas & Kruslin, 2004; Kalluri & Zeisberg, 2006). Kalluri & Zeisberg (2006) referem-se a *desmoplasia* nos tecidos em que o estroma torna-se muito vascularizado e com abundante quantidade de fibrilas de colágeno, fibronectina, proteoglicanos e tenascina C, sendo esta última, ausente do estroma de tecidos normais. Tuxhorn et al. (2001) usam o termo *estroma reativo* para descrever a gênese de um novo microambiente estromal que é criado em resposta ao carcinoma e que acompanha a progressão tumoral. Em geral, um estroma desmoplásico ou reativo típico contém células estromais fenotipicamente alteradas, MEC remodelada, aumento da biodisponibilidade de fatores de crescimento, alta atividade de proteases, maior vascularização e influxo de células inflamatórias (Tuxhorn et al., 2001; 2002; Tomas & Kruslin, 2004; Kalluri & Zeisberg, 2006).

Os andrógenos têm papel central na biologia da próstata, mas os estrógenos também exercem funções importantes para a homeostase da glândula (Ricke et al., 2007; Carruba, 2006). Resultados obtidos com estudos epidemiológicos e experimentais evidenciam que estes hormônios têm papel ativo no desenvolvimento e na progressão de câncer na próstata (Härkönen & Mäkelä, 2004; Vihko et al., 2006). O equilíbrio entre esses dois hormônios é importante, não apenas para a manutenção funcional da próstata, mas também para o surgimento e desenvolvimento de doenças neste órgão (Risbridger et al., 2003). A produção localizada de hormônios esteróides vem crescentemente adquirindo grande importância para o entendimento de algumas doenças, onde níveis androgênicos e/ou estrogênicos anormais promovem o desenvolvimento e a proliferação de tumores, principalmente em tecidos glandulares (Risbridger et al., 2003; Carruba, 2006). Na próstata, a dihidrotestosterona (DHT) é o andrógeno predominante, formado a partir da Testosterona (T) por ação da enzima 5 α -redutase (5 α -r) (Labrie et al., 2000; Steers, 2001). A maior parte dos estrógenos presentes no homem é derivada da aromatização da T, pela enzima Aromatase (*aro*), nos tecidos adiposos, fígado e na próstata (Ekman, 2000; Härkönen & Mäkelä, 2004). Uma

vez que o metabolismo local de esteróides controla as formas ativas dos hormônios na próstata, variações das enzimas metabolizadoras durante a progressão do câncer podem ser cruciais na regulação do crescimento e função da próstata (Soronen et al., 2004). Alterações nos padrões de expressão das enzimas 5α -r e *aro* podem modificar a concentração intracelular dos esteróides sexuais, desempenhando papel pato-fisiológico no desenvolvimento de cânceres associados a hormônios (Labrie et al., 2000; Risbridger et al., 2003; Soronen et al., 2004; Vihko et al., 2005; Ricke et al., 2007).

Há grande interesse em compreender as diferenças entre um compartimento estromal normal e o estroma reativo. Esse novo compartimento formado surge como alvo de estudo para novas terapias e diagnósticos de câncer de próstata (Tuxhorn et al., 2002). As variações e alterações das enzimas responsáveis por esse metabolismo, durante o início e progressão do câncer, podem também ser parâmetros essenciais para aprofundar-se o entendimento da biologia da próstata (Vihko et al., 2005). A ativação do compartimento estromal prediz ser um passo crítico para o crescimento e progressão de adenocarcinoma na próstata, porém, os mecanismos específicos desta ativação estromal e até que ponto o estroma regula a tumorigênese, não estão ainda completamente esclarecidos (Tuxhorn et al., 2002).

É evidente que as interações epitélio/estroma são importantes para o desenvolvimento da próstata e sua manutenção na vida adulta e, sendo assim, a troca do compartimento estromal normal por um estroma reativo pode alterar esta interação tão necessária para a biologia desta glândula e, conseqüentemente, afetar a progressão do câncer prostático (Tuxhorn et al., 2002; McAlhany et al., 2004). Assim, as interrelações da síntese local dos hormônios esteróides, da ação combinada dos estrógenos e andrógenos na próstata com a manutenção da homeostase entre epitélio e estroma tornam-se fundamentais para o esclarecimento e entendimento do funcionamento da próstata e das causas das suas patologias.

Material e Métodos

Animais

Gerbilos machos (*Meriones unguiculatus*) sendo 100 jovens (7 semanas-48 dias), 100 adultos (16 semanas-112 dias) e 100 velhos (18 meses-78 semanas) (Pegorin de Campos et al., 2006) ficaram mantidos sob condições controladas de luminosidade (12 horas-luz e 12 horas-escuro) e temperatura (25°C) e alimentados com ração e água *ad libitum*.

Delineamento Experimental

Em cada fase do desenvolvimento pós-natal, os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos experimentais (n=20), de acordo com o tratamento a que seriam submetidos, Finasterida (Fin), Letrozol (Let), Finasterida+Letrozol (Fin+Let). Dois grupos controles (n=20) foram formados, um contendo animais intactos (Ct) e outro, onde os animais receberam apenas o veículo diluidor das drogas (Ct-óleo). A Finasterida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), droga inibidora da enzima 5 α -r, e o Letrozol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), inibidor da enzima Aromatase foram diluídos em 0.1ml de óleo de milho e dosados baseando-se na média do peso corpo corpóreo dos animais: os jovens receberam 0.5mg/kg/dia de Fin e 0.25mg/kg/dia de Let; Adultos receberam 1.0mg/kg/dia de Fin e 0.5mg/kg/dia de Let; Velhos receberam 1.5mg/kg/dia de Fin e 0.75mg/kg/dia de Let. Todos os animais foram tratados uma vez por dia, por gavagem, durante 30 dias consecutivos. O sacrifício dos animais ocorreu 1, 7, 14, e 21 dias depois de terminado o período de administração das drogas. Cinco animais de cada grupo experimental e dos grupos controles foram usados em cada etapa de pós-tratamento e para isso, foram colocados em câmara de CO₂ e imediatamente depois de sacrificados, foram decapitados para coleta de sangue e então, dissecados.

Microscopia de Luz

Em cada uma das 4 etapas de sacrifício realizadas após os tratamentos, todos os complexos prostáticos (próstata ventral e dorsal) dos animais jovens, adultos e velhos foram removidos, pesados e fixados em Karnovsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2 - 0,1M), lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol e incluídos em historresina (*Leica historesin embedding kit*). Cortes com espessura de 3µm do material corados pela Hematoxilina-Eosina (H&E) para estudos morfológicos gerais da próstata e pela impregnação da Reticulina de Gomori para estudo das fibras colágenas e reticulares. As documentações fotográficas foram feitas no Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus da Media Cybernetics.

Análise quantitativa

Dentro de cada um dos três grupos etários, 30 campos histológicos corados com HE de cada etapa de pós-tratamento foram capturados e as análises estereológicas foram obtidas segundo o método de Weibel (1963). Por este método, a partir de contagem de pontos e linhas em um retículo de 168 pontos são calculadas as porcentagens que são transformadas em densidade de volume. As comparações foram feitas com base nos resultados obtidos nos animais do grupo Ct. A partir deste teste obteve-se a proporção relativa dos componentes teciduais da próstata, como o epitélio, lúmen, células musculares lisas e estroma fibrovascular.

Dosagem Hormonal Sérica

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de 4ml com gel de separação. O material foi centrifugado a 3.000 rpm, e o soro separado e congelado para posterior análise. A análise sérica foi realizada em aparelho automatizado (VITROS ECi-Johnson & Johnson de Análise quimioluminescente heterogênea ultra-sensível). Foram processados ensaios para a dosagem de Testosterona (T) (limite de detecção entre 0,1-150,0 ng/dl) e Estradiol (E₂) (limite de

detecção entre 0,0-3814,0 pg/ml) e a proporção entre eles foi obtida dividindo o valor médio da concentração do primeiro, pelo valor médio da concentração do segundo hormônio.

Estatística

A análise estatística dos dados coletas foi realizada em planilhas e gráficos do software Statistica 6.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). Os testes ANOVA e Tukey HSD foram utilizados para a obtenção da significância dos resultados sendo $p \leq 0,05$.

Resultados

Em cada um dos três grupos etários estudados, a próstata dos animais dos grupos Ct-óleo, que receberam apenas o veículo diluidor da droga, não apresentaram dados quantitativos nem tão pouco morfológicos que fossem significativamente diferentes daqueles observados nos animais do grupo Ct, comportando-se assim, de modo semelhante entre estes dois grupos. Portanto, os resultados obtidos nos grupos Ct e Ct-óleo foram mencionados como um único grupo, o grupo Ct. Além disso, as análises estruturais e quantitativas das quatro etapas do período de pós-tratamento com as drogas (1, 7, 14 e 21 dias depois do final dos tratamentos) revelaram, surpreendentemente, muitas similaridades entre as duas primeiras etapas e entre as duas últimas. Com base nisto, os resultados foram agrupados em duas fases de análises do período de pós-tratamentos: a Fase Inicial, referente às etapas 1 e 7; e a Fase Final, referente às etapas 14 e 21.

Análises Quantitativas

Na etapa inicial do pós-tratamento com Fin e com Fin+Let, quando comparados com o grupo Ct, a porcentagem de tecido epitelial diminuiu nos animais jovens (Tab.I) e velhos (Tab.III), enquanto apareceu maior nos gerbilos adultos (Tab.II), situação que, durante o período de pós-tratamentos, inverteu-se somente nos velhos na fase final de análise. Nas etapas inicial do período

de pós-tratamentos com Fin e com Fin+Let, a proporção de área luminal aumentou nos jovens e velhos, e diminuiu na fase final. Nos gerbilos adultos manteve-se menor que o grupo Ct durante todo o período de análise. Já o compartimento estromal dos animais jovens tratados com Fin e Fin+Let, teve a porcentagem de CML menor do que o grupo Ct durante todo o período de pós-tratamento, enquanto que a proporção do estroma fibrovascular aumentou na etapa inicial e diminuiu na etapa final de análises. Os animais adultos tratados com Fin e Fin+Let tiveram as porcentagens de CML e estroma fibrovascular maiores na etapa inicial e final do pós-tratamento com estas drogas. Já a porcentagem de CML da próstata dos animais velhos que receberam Fin e Fin+Let aumentou na fase inicial de análise e permaneceu assim somente na fase final de análise dos animais do grupo Fin, diminuindo nos animais velhos do grupo Fin+Let, nesta mesma etapa. O estroma fibrovascular destes animais, na fase inicial, aumentou e depois diminuiu na fase final de análise, com estes dois tipos de tratamento. Já o tratamento com Let, na fase inicial do pós-tratamento, teve a porcentagem da camada epitelial dos animais jovens e adultos aumentada e nos animais velhos, diminuída. A porcentagem de área do lúmen na próstata dos animais jovens e velhos aumentou, nas etapas inicial e final, oscilando nos adultos. Em todo o período de pós-tratamento com o Let, a porcentagem de CML e de estroma fibrovascular dos animais jovens diminuiu e dos animais velhos aumentou em relação ao grupo Ct. Nos animais adultos do grupo Let, tanto a porcentagem de CML quanto de estroma fibrovascular diminuíram na fase inicial e depois aumentaram na fase final de análise.

Análise Sorológica

Os animais jovens (Tab.I), independentemente do tipo de tratamento a que foram submetidos, apresentaram um aumento da relação T/E₂ sanguínea, em relação aos grupos Ct, a qual foi mantida durante todo o período de pós-tratamentos. Os aumentos mais expressivos foram observados nos grupos que receberam Fin e Fin+Let. A proporção de T e E₂ nos animais adultos (Tab.II) diminuiu em todos os grupos experimentais, durante os períodos de pós-tratamentos.

Houve um ligeiro aumento assim que terminou a administração Fin+Let, porém, depois desta etapa, a razão entre estes dois hormônios ficou bem mais baixa do que a constatada no grupo Ct. Nos animais velhos (Tab.III) a razão entre as concentrações de T e E₂ aumentaram nos grupos Fin e Let, enquanto diminuiu no grupo Fin+Let.

Análise Estrutural

Nas análises morfológicas gerais dos animais jovens do grupo Ct, a glândula era imatura e ainda pouco desenvolvida, apesar de volumosas células epiteliais apresentarem alguma atividade secretora e núcleo ocupando a maior parte do citoplasma. Adjacente ao epitélio, a camada fina de tecido conjuntivo tinha pouca vascularização e alguns fibroblastos. As CML estavam frouxamente compactadas ao redor dos ácinos (Fig.1), entremeadas por fibras de colágenos e reticulares (Fig. 2). Já os animais adultos do grupo Ct apresentaram uma estrutura morfológica mais desenvolvida e madura, com ácinos maiores, além de alta atividade secretora, evidenciada por muitos grânulos de secreção acumulados no ápice do epitélio (Fig.1). O estroma ficou agora mais compacto, apresentando, na base do epitélio, fina camada de tecido conjuntivo, rico em colágeno (Fig.2) e CML densamente compactadas ao redor de cada ácino. A próstata dos animais velhos do grupo Ct revelou-se com áreas heterogêneas, sendo algumas morfológicamente normais enquanto outras, histo-patologicamente comprometidas. Nas porções acinares normais, a camada epitelial tinha pequenas dobras e grande acúmulo de gotículas de gordura no citoplasma (Fig.1). O tecido conjuntivo adjacente a esta camada ficou mais espesso (Fig.2) e a maioria das CML fenotipicamente alterada, o que, conseqüentemente, contribuiu para um desarranjo do músculo liso.

Independentemente da idade dos animais analisados, as alterações observadas no período de pós-tratamento com Fin e Fin+Let foram muito semelhantes e aparentemente mais relevantes no compartimento estromal (Fig.2). As fibras de colágeno e reticulares estavam agora com aspecto fenotípico alterado, sem uma organização específica, principalmente entre as CML, além da grande quantidade acumulada na base epitelial (Fig.2). Apesar de nos animais adultos ter

sido mais brand, o este aumento de colágeno na região sub-epitelial aconteceu de maneira marcante, principalmente na fase inicial das análises pós-tratamentos (fig.2). Também neste local houve um aumento considerável de fibroblastos os quais por sua vez, sem seu aspecto fusiforme característico (Fig.1). Houve ainda um ligeiro aumento da vascularização desta área totalmente modificada. As CML ficaram, na sua maioria, hipertrofiadas e menos compactadas ao redor dos ácinos (Fig.1), o que pode ser também conseqüência do evidente aumento de fibras colagênicas e reticulares entre elas (Fig.2). A próstata dos gerbilos de diferentes idades, tratadas com Let, tiveram um rearranjo estromal aparentemente semelhante ao previamente descrito, porém apenas nos jovens e velhos as mesmas observações puderam ser claramente observadas, uma vez que nos adultos, as fibras de colágeno e reticulares estavam fenotipicamente modificadas, mas em quantidade não tão maiores do que no grupo Ct (Fig.2). Já a camada epitelial dos gerbilos do grupo tratado com Let, independentemente da idade, respondeu de forma mais marcante, onde o fenótipo celular ficou alterado. Estas células apresentaram-se mais alta nos animais jovens e adultos, mas no final da análise, estavam novamente mais baixas do que no grupo Ct (Fig.1).

Discussão

As oscilações ocorridas entre os níveis de andrógenos e estrógenos, decorrentes principalmente da ação combinada de Fin e Let, foram capazes de quebrar a interação epitélio/estroma da próstata dos gerbilos jovens, adultos e velhos, o que ficou evidente pela remodelação estromal e pela reorganização das fibras colagênicas e reticulares da MEC. Estas mudanças foram muito significativas e profundas, pois durante todo o período após a administração das drogas em que as análises foram feitas, nenhum gerbilo jovem, adulto ou velho apresentou a próstata morfológica, nem tão pouco histologicamente normal outra vez. Fica claro, portanto, que a interação epitélio/estroma foi perturbada e a troca de informações entre estes compartimentos acabou gerando um novo microambiente hormonal, celular e molecular. O compartimento estromal

modificou-se tão expressivamente que passou a ficar reativo e capaz de promover o início de uma proliferação descontrolada de células prostáticas. É evidente que as interações epitélio-estroma são importantes para o desenvolvimento da próstata e sua manutenção na vida adulta (Cunha et al., 2004a) e, sendo assim, a troca do compartimento estromal normal por um estroma reativo pode alterar esta interação tão necessária para a biologia da glândula e, conseqüentemente, afetar a progressão do câncer prostático (Tuxhorn et al., 2002).

Ricciardeli et al. (2007) constataram que células de câncer de próstata são capazes de recrutarem componentes estromais para remodelarem seu ambiente pericelular e promover sua motilidade. As interações epitélio-mesenquimais, fundamentais para o desenvolvimento intra-embriônico da próstata, que continuam durante toda a vida do indivíduo como interação epitélio/estroma, têm função na regulação hormonal, celular e molecular da próstata. Perturbações que interferem nesta comunicação recíproca e quebram a interação entre estes compartimentos relacionam-se fortemente com o surgimento e o desenvolvimento da carcinogênese prostática (Cunha et al., 2004a). Segundo Cunha et al. (2004b), as alterações nas interações homeostáticas epitélio-estroma contribuem para a formação dos estágios iniciais e tardios da formação do câncer prostático e a continuação desta interação desregulada das células cancerígenas com o novo microambiente estromal formado tem papel importante na próstata. Os resultados obtidos com o presente estudo apontam este novo compartimento como uma possível ferramenta para estudo de novas terapias e diagnósticos do câncer de próstata, conforme Tuxhorn et al. (2002) também propõe.

O desenvolvimento de um microambiente estromal modificado, em resposta a um carcinoma é uma característica comum em muitos tumores. A progressão do câncer é um processo complexo de múltiplos passos que começa com a transformação de células normais e continua com o crescimento tumoral, invasão e metástase. Além das células cancerígenas transformadas, os tumores também apresentam células estromais, MEC, vasos sanguíneos recém-formados e componentes imunes diferentemente arranjados do que aquelas de um estroma normal (Tuxhorn et

al., 2001; 2002). Este novo ambiente de estroma reativo aumenta a tumorigenese, por dar suporte a sobrevivência, proliferação e migração das células cancerígenas, além de induzir angiogênese. Portanto, a progressão do câncer não é exclusivamente regulada por um desequilíbrio entre a expressão de oncogenes e genes supressores de tumor. O crescimento de um tecido cancerígeno também depende do compartimento estromal criar um ambiente mais favorável à proliferação tumoral (Tuxhorn et al., 2002).

Algumas das características propostas por Tuxhorn et al. (2001, 2002), Tomas & Kruslin (2004) e Kalluri & Zeisberg (2006) para um típico estroma reativo com células fenotipicamente alteradas, MEC remodelada, aumento da disponibilidade de fatores de crescimento, alta atividade de proteases, maior vascularização e influxo de células inflamatórias, parecem estar presentes no tecido prostático dos gerbilos jovens, adultos e velhos depois do bloqueio das enzimas metabolizadoras de esteróides, *5 α -r* e *aro*. O compartimento estromal modificou-se tão expressivamente que passou a apresentar características de um estroma ativado ou desmoplásico e, portanto, capaz de promover o início de uma proliferação descontrolada de células prostáticas. Esse cenário de reação estromal, com acúmulo de fibras de colágeno e reticulares fenotipicamente modificada, numerosos e aparentemente fibroblastos ativados e CML hipertrofiadas e frouxamente organizadas ao redor de um compartimento epitelial, o qual também estava alterado, ainda estava presente na próstata de gerbilos na última fase de análise do período de pós-tratamentos.

Um mecanismo de transição epitelial-mesenquimal vem sendo cada vez mais reconhecido nas células cancerosas como um importante determinador de progressão tumoral. Durante esse processo, células epiteliais perdem o contato e adquirem propriedades mesenquimais, capacidade invasiva e habilidade migratória. Esta modificação fenotípica das células epiteliais pode ainda modular a progressão cancerígena, servindo como fonte adicional de células tipo fibroblasto com genoma alterado. Em focos malignos de câncer, estas novas células recém alteradas podem contribuir para o aumento dos fibroblastos ativados, em resposta a estímulos do novo microambiente estromal (McAlhany et al., 2004; Kalluri & Zeisberg, 2006).

Os bloqueios enzimáticos da 5 α -r e aro, separadamente ou não, provocaram na próstata dos gerbilos jovens, adultos e velhos, um aumento do número de fibroblastos, principalmente na região sub-epitelial. Além de aparecerem mais numerosos, estas células não estavam mais com o padrão fusiforme característico e sim, com fenótipo ativado e altamente sintético. Experimentalmente, fibroblastos isolados de focos de cicatrização de ferimentos, de tecidos com fibrose ou de regiões de carcinoma são capazes de se proliferar em larga escala e de secretar altas taxas de constituintes da MEC, sendo então chamados de ativados. Nestas situações, os fibroblastos ativados passam a sintetizar altas taxas de proteases degradadoras de matriz, como as metaloproteinases MMP2, MMP3 e MMP9, diversos fatores de crescimento e moduladores de respostas imunes, como as interleucinas I, além de expressar α -actina de músculo liso (Kalluri & Zeisberg, 2006). Assim, com base nestes dados, o expressivo aumento do número de fibroblastos e de colágeno observado durante os períodos de pós-tratamentos com Fin e Fin+Let torna-se fortemente sustentado e justificável.

Como principal fonte de constituintes da MEC, os fibroblastos têm sido alvo de muitos estudos para se esclarecer como esse tipo celular é capaz de induzir as alterações que o compartimento estromal sofre para permitir o aparecimento e desenvolvimento de patologias na próstata. Os fibroblastos são importantes para a síntese de componentes da MEC, principalmente colágenos do tipo I, II e IV, fibronectina, além de atuarem na regulação da diferenciação epitelial e no processo de inflamação e para o processo de cicatrização de ferimentos. Além disso, os fibroblastos secretam fatores de crescimento que direcionam as interações epitélio/stroma (Kalluri & Zeisberg, 2006). Grande importância tem sido atribuída às CML, tanto no controle homeostático, quando no desenvolvimento e estabelecimento de neoplasias da próstata (Farnsworth, 1999; Marker et al., 2003; Cunha et al., 2004b). As CML e os fibroblastos são células estromais dotadas de uma plasticidade via variação fenotípica de fibroblastos para miofibroblastos e para CML, de acordo com os estímulos, sendo que os miofibroblastos parecem ser o tipo celular principal encontrado em condições patológicas (Tuxhorn et al., 2001; 2002).

Estudos baseados na privação androgênica têm mostrado que a síntese e organização dos componentes da MEC, juntamente com as CML e os fibroblastos, também apresentam respostas adaptativas a diversas situações hormonais sendo, em grande parte, portanto, estas repostas moduladas por andrógenos e/ou estrógenos (Vilamaior et al., 2000, 2005; Corradi et al., 2004; Pegorin de Campos et al., 2006). Shibata et al (2001) com experimentos em cães e Corradi et al. (2004) em gerbilos adultos notaram um novo microambiente estromal na próstata depois do tratamento com Fin. Corradi et al. (2004) observaram que o compartimento estromal da próstata dos gerbilos adultos mostrou-se intensa e diferentemente remodelado. Para esses autores, esses resultados confirmam que o bloqueio da atividade enzimática afeta as interações homeostáticas entre epitélio e estroma prostáticos, podendo estar criticamente envolvido com as alterações hormonais induzidas pela ausência das atividades enzimáticas da 5α -r e *aro*. Como já previamente proposto por Corradi et al. (2004), o notável acúmulo de colágeno no estroma prostático decorrente do uso da Fin e do Let neste estudo, relaciona-se provavelmente com a metabolização de estrógenos da aumentada concentração de T intraprostática, conseqüência do bloqueio da metabolização local de hormônios esteróides. Respostas adaptativas semelhantes do compartimento estromal prostático de gerbilos velhos foram observadas por Pegorin de Campos et al. (2006) uma vez que constataram alterações patológicas espontâneas da idade nestes animais.

Mudanças nas concentrações dos hormônios esteróides relacionadas ao envelhecimento também são capazes de promover alterações nos compartimentos prostáticos de várias espécies de mamíferos, uma vez que isto interfere na comunicação epitélio/estromal (Untergasser et al., 2005). Uma forte correlação entre o envelhecimento e o aparecimento de lesões proliferativas espontâneas acontece na próstata humana e do gerbilo (Hsing & Devesa 2001; Untergasser et al., 2005; Pegorin de Campos et al., 2006). Durante o envelhecimento do homem, muitas alterações histológicas acometem a próstata em resposta as descompensações hormonais e à ruptura da homeostase entre epitélio e estroma. Nesta fase, mesmo com o declínio dos níveis de T, a quantidade de estrógeno circulante nos homens não diminui, causando um aumento de mais de 40% na proporção entre T e

E₂ (Vermeulen et al., 2002; Risbridger et al., 2003; Untergasser et al., 2005). Há uma diminuição idade-dependente dos níveis de DHT no epitélio e um aumento concomitante de estrona e E₂ no compartimento estromal, o que pode ser de importância patogênica para o desenvolvimento da Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), se de fato um balanço sinérgico estrógeno/andrógeno é necessário para a integridade e crescimento normal da próstata (Ito et al., 2000).

Apesar de cada droga ser responsável por provocar alterações específicas, quando juntas, os efeitos desta administração concomitante repetem aqueles provocados somente pelo uso da Fin. Independente da idade do animal analisado, a combinação de Fin+Let causou nítidas alterações nos compartimentos prostáticos. A perda da estimulação autócrina das células estromais ou parácrina no epitélio, a partir do bloqueio simultâneo da metabolização de DHT e estrógeno, pode inibir a atividade celular epitelial, com subsequente redução do tamanho da glândula. Assim, o bloqueador de estrógeno age sinérgicamente a Fin e diminui a biodisponibilidade de fatores de crescimento, o que parece dar novas respostas sobre o mecanismo pelo qual os estrógenos influenciam o crescimento normal da glândula, o crescimento independente de andrógeno e as metástases das células prostáticas cancerosas (Huynh et al., 2001). Ishikawa et al. (2006) demonstraram, por meio de estudo *in vitro* com células de câncer de mama e células normais, que uma não produção de estrógenos decorrentes da ausência da atividade da enzima *aro* leva a uma rápida detecção da estrogenicidade de outros compostos estrogênicos mais fracos, sintetizados a partir da testosterona. Depois, ao utilizarem Fin, esta estrogenicidade fica reduzida novamente. Assim, com base nestes dados, pode-se supor que o mesmo aconteceu nas células prostáticas dos gerbilos tratados com a combinação de Fin e Let, reduzindo os hormônios estrogênicos intraprostáticos.

São claros os resultados de que as mudanças hormonais ocorridas localmente na próstata, devido ao bloqueio de específicas enzimas metabolizadoras de esteróides, comprometeram a homeostase do órgão e afetaram a troca de informação entre os compartimentos epitelial e estromal, independentemente da idade do animal. Além disso, a nítida instalação e

permanência de um estroma desmoplásico, mesmo após o final da inibição da enzima 5 α -r e aro sustenta, portanto, a grande importância de um melhor entendimento do controle hormonal intraprostático e sua relação com a manutenção da interação epitélio-estromal deste órgão.

Referências Bibliográficas

- Carruba G. (2006) Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* 1089:201-217.
- Carruba G. (2007) Estrogen and Prostate Cancer: an eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J Cell Biochem* 102:899-911.
- Condon MS (2005) The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Seminars in Cancer Biology* 15:132-137.
- Corradi LS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2004) Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72(5):198-208.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ (2002) Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70:473-485.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. (2004a) Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Ster Bioch Molec Biol* 92(4):221-236.
- Cunha GR, Cooke PS, Kurita T (2004b) Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 67(5):417-434.
- Ekman P. (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate Suppl.*10:14-18.
- Farnsworth, WE (1999) Prostate stroma: physiology. *Prostate* 38:60-72.

- Härkönen PL & Mäkelä SI (2004) Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92:297-305.
- Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TWM (2001) Co-administration of finasterida and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J Endocrinol* 171:109-118.
- Hsing AW & Devesa SS (2001) Trends and patterns of prostate cancer: What do they suggest? *Epidemiol Rev* 23:3-13.
- Ishikawa T, Glidewell-Kenney C, Jameson JL (2006) Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 α -reductase inhibitor. *J Ster Biochem Molec Biol* 98:133-138.
- Ito K, Fukabori Y, Shibata Y, Suzuki K, Mieda M, Gotanda K, Honma S, Yamanaka H (2000) Effects of a new steroidal Aromatase inhibitor, TZA-2237, and/or chlormadinone acetate on hormone-induced spontaneous canine benign prostatic hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 143:543-554.
- Kalluri R & Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nature Rev Can* 6(5):392-401
- Labrie F, The-Luu V, Lin SX, Simard J, Labrie C (2000) Role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in sex steroid formation in peripheral intracrine tissue. *TEM* 11(10):421-427.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003) Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Develop Biol*, 253:165-174.
- McAlhany SJ, Ayala G, Frolov A, Ressler S, Wheeler TM, Watson JE, Collins C, Rowley D (2004) Decreased stromal expression and increased epithelial expression of WFDC1/ps20 in prostate cancer is associated with reduced recurrence-free survival. *Prostate* 61:182-191.
- Pegorin de Campos SG, Zanetoni C, Góes RM, Taboga SR (2006) Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat Rec A Discv Mol Cell Biol* 288:723-733

- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mc Pherson SJ (2003) Oestrogens and prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 10:187-191.
- Ricke WA, Wang Y, Cunha GR (2007) Steroid hormones and carcinogenesis of the prostate: the role of estrogens. *Differentiation* 75 (9): *in press*.
- Ricciardelli C, Russell DL, Ween MP, Mayne K, Suwiwat S, Byers S, Marshall VR, Tilley W, Horsfall DJ (2007) Formation of hyaluronan and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *J Bio Chem* 282(14): 10814-10825.
- Shibata Y, Fukabori Y, Ito K, Suzuki K, Yamanaka H (2001) Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. *The Journal of Urology* 165:289-293.
- Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko I (2004) Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92:281-286.
- Steers W (2001) 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology* 58 (Suppl. 6A): 17-24.
- Sung SY & Chung W (2002) Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation* 70: 506-521.
- Tomas D & Kruslin B (2004) The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 61:324-331.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR (2001) Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166:2472-2483.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clinical Cancer Research* 8:2912-2923.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P (2005) benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Geront* 40:121-128.

Vermeulen A, Kaufman JM, Goemaere S, Pottelberg (2002) Estradiol in elderly men. *Aging Male* 5:98-102.

Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A, Li Y, Patrikainen L, Pulkka A, Soronen P, Törn (2005) Enzymes as modulators in malignant transformation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:277-283.

Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A (2006) Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSDs. *Mol Cell Endocrinol* 248:141-148.

Vilamaior PSL, Felisbino SR, Taboga SR, Carvalho HF (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: An possible role for the smooth muscle cells. *Prostate* 45:253-258.

Vilamaior PSL, Carvalho HF, Taboga SR (2005) Modulation of smooth muscle cells function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Inter* 29(9):809-816.

Weibel ER (1963) Principles and methods for morphometric study of lung and other organs. *Lab Invest* 12:131-155.

Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbel GR (2001) Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganization of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 49: 130-145.

Legenda das figuras

Fig. 1 – Regiões do lobo ventral prostático do gerbilo da Mongólia corados com Hematoxilina-Eosina. O epitélio (EP), o lúmen (L) e o estromal (S) dos animais dos grupos controle, ao longo do período pós-natal, apresentaram padrão histológico de desenvolvimento normal da glândula. O epitélio era pouco secretor nos jovens, altamente funcional nos adultos e, em decorrência da idade, com acúmulo de gordura nos velhos. As células musculares lisas (SMC) compactaram-se ao redor dos ácinos nos adultos, enquanto que nos animais jovens e velhos, ficaram mais frouxamente organizadas, por estarem entremeadas por matriz extracelular. Os diferentes tratamentos deixaram as células da camada epitelial (EP) mais altas ou mais baixas, porém nunca sem nenhuma atividade secretora, evidente pela presença de blebs de secreção no ápice celular. Aumento do colágeno (*) e do número de fibroblastos (seta) adjacentes à base do epitélio foi marcante. As SMC fenotipicamente alteradas, modificaram as características do músculo liso. Vaso sanguíneo (v).

Escalas: 100µm

Fig. 2 – Regiões do lobo ventral prostático do gerbilo da Mongólia corados com Reticulina de Gomori. Nos animais do grupo controle, as fibras colágenas e reticulares da matriz extracelular acompanharam o padrão desenvolvimento normal da glândula, estando ligeiramente em maior quantidade na base epitelial (EP) dos jovens e velhos. O mesmo também acontece com as fibras de colágeno e reticulares presentes entre as células musculares lisas no estroma (S). As fibras colágenas e reticulares do compartimento estromal destes animais estavam distribuídas e organizadas de maneira uniforme e linear. Nos animais velhos, o estroma prostático mostra-se com um aumento acentuado de fibras colágenas e reticulares, característico da idade. Os três tratamentos por sua vez causaram alterações fenotípicas e de distribuição destas fibras, as quais tornaram-se mais espessas e excessivamente acumuladas na região subepitelial. As fibras de colágeno e reticulares assumiram aspecto mais ondulado e irregular entre as células do músculo liso. **Escala** - 40µm.

Tabela I - Porcentagem dos compartimentos teciduais prostáticos dos animais jovens

Etapas pós-tratamentos		Compartimentos teciduais	Tratamentos			
			Ct	Fin	Let	Fin + Let
I	1	Epitélio	22.2±0.7 ₁	19.9±0.9 ₁	23.0±0.9 ₁	21.5±0.8 ₁
		Lumen	19.6±1.7 ₁ ^a	40.8±1.5 ₁ ^b	27.5±2.3 ₁ ^c	25.4±1.1 ₁ ^{a,c}
		SMC	26.0±0.8 ₁ ^a	19.9±0.8 ₁ ^b	22.5±1.1 ^b	24.7±0.9 ₁ ^a
		Estroma Fibrovascular	32.2±1.6 ₁ ^a	19.4±1.3 ₁ ^b	26.9±1.5 ₁ ^a	28.3±1.5 ₁ ^a
	7	Epitélio	18.2±0.7 ₂ ^a	20.1±1.1 ₁ ^{a,b}	22.5±0.9 ₁ ^b	23.5±1.2 ₁ ^b
		Lumen	26.8±2.3 ₁ ^a	34.2±2.2 ₁ ^a	28.2±2.6 ₁ ^a	11.9±1.9 ₂ ^b
		SMC	23.6±1.2 ₁ ^a	21.0±1.3 ₁ ^a	19.1±0.9 ^b	28.3±1.1 ₁ ^c
		Estroma Fibrovascular	31.2±1.6 ^a	24.6±1.3 ₁ ^{a,b}	30.2±2.0 ₁ ^a	36.3±2.3 ₂ ^{a,c}
F	14	Epitélio	18.9±0.8 ₂	21.7±0.8 _{1,2}	19.6±0.9 ₂	21.8±0.9 ₁
		Lumen	34.4±2.6 ₂ ^a	18.0±1.5 ₂ ^b	32.1±1.8 _{1,2}	16.2±1.9 ₃ ^b
		SMC	20.2±1.1 ₂ ^a	27.9±0.9 ₂ ^b	18.7±1.0 ^a	31.4±1.6 ₂ ^b
		Estroma Fibrovascular	26.5±1.6	32.2±1.5 ₂	29.5±1.7 ₁	30.6±1.4 ₁
	21	Epitélio	21.3±1.0 ₁ ^a	18.2±0.9 _{1,3} ^a	20.4±0.8 ₁ ^a	16.3±0.8 ₂ ^b
		Lumen	21.3±2.1 ₁	20.2±1.9 ₂	22.3±1.9 _{1,3}	18.0±1.3 ₃
		SMC	29.5±1.3 _{1,2} ^a	25.1±1.3 ₂ ^b	21.9±1.3 ^b	24.5±1.1 ₁ ^b
		Estroma Fibrovascular	27.8±1.5 ^a	36.4±1.6 ₂ ^a	35.3±2.1 ₂ ^b	41.1±1.5 ₂ ^b

Valores representam média±erro padrão. $p \leq 0,05$. A análise estatística baseou-se nos testes ANOVA e Tukey. Super-índice alfabético (a, b, c) indica as diferenças inter-grupos, quando comparados os tratamentos e o super-índice numérico (1, 2, 3) indica as diferenças inter-grupos, quando comparadas as etapas de pós-tratamento. I: Fase inicial do período de pós-tratamentos. F: fase final do período de pós-tratamentos.

Tabela II - Porcentagem dos compartimentos teciduais prostáticos dos animais adultos

Etapas pós-tratamentos	Compartimentos teciduais	Tratamentos				
		Ct	Fin	Let	Fin + Let	
I	1	Epitélio	18.8±0.9 ₁ ^a	19.6±0.8 ₁ ^a	14.5±0.9 ₁ ^b	20.8±0.7 ₁ ^a
		Lúmen	49.9±2.3 ^a	44.2±2.1 ₁ ^a	61.9±1.7 ₁ ^b	38.7±1.6 ₁ ^b
		SMC	12.8±0.7 ^a	14.2±0.9 ₁ ^{a,c}	8.8±0.3 ₁ ^b	16.3±1.0 ₁ ^c
		Estroma Fibrovascular	19.0±1.5 ^a	22.3±1.7 ^{a,b}	14.8±1.0 ₁ ^a	24.2±1.1 ^b
	7	Epitélio	16.7±0.7 _{1,2} ^a	26.3±1.2 ₂ ^b	19.0±0.8 ₂ ^a	24.4±0.8 ₁ ^b
		Lumen	49.5±2.3 ^a	36.7±2.4 ₁ ^b	54.3±2.2 ₂ ^a	35.0±1.7 ₁ ^b
		SMC	11.8±0.6 ^a	12.6±0.6 ₁ ^{a,b}	9.6±0.7 ₁ ^a	14.6±0.7 _{1,2} ^b
		Estroma Fibrovascular	22.0±1.7 ^a	24.4±1.6 ^a	16.7±1.3 ₁ ^b	25.9±1.0 ^a
F	14	Epitélio	20.4±1.3 ₁ ^a	18.8±0.7 ₁ ^a	20.9±0.8 ₃ ^a	28.7±0.7 ₂ ^b
		Lumen	50.9±2.9 ^a	45.2±1.9 ₁ ^a	47.2±1.7 ₃ ^a	31.2±1.2 ₂ ^b
		SMC	12.1±1.0 ^a	9.9±0.7 ₂ ^{a,b}	11.9±0.7 ₂ ^a	14.0±0.6 _{1,2} ^{a,c}
		Estroma Fibrovascular	16.9±1.4 ^a	26.0±1.8 ^b	19.8±1.1 ₂ ^a	26.1±1.1 ^b
	21	Epitélio	22.0±0.9 _{1,3} ^a	24.7±0.9 ₂ ^a	22.9±0.6 ₃ ^a	28.3±0.8 ₂ ^b
		Lumen	48.9±2.0 ^a	29.6±2.6 ₂ ^b	44.5±1.7 ₃ ^a	31.1±1.3 ₂ ^b
		SMC	11.6±0.6 ^a	21.1±7.1 ₃ ^b	13.2±0.7 ₂ ^a	18.3±0.9 _{1,3} ^b
		Estroma Fibrovascular	17.4±1.2 ^a	23.8±8.1 ^b	19.0±1.3 ₁ ^a	22.5±0.7 ^b

Valores representam média±erro padrão. $p \leq 0,05$. A análise estatística baseou-se nos testes ANOVA e Tukey. Super-índice alfabético (a, b, c) indica as diferenças inter-grupos, quando comparados os tratamentos e o super-índice numérico (1, 2, 3) indica as diferenças inter-grupos, quando comparadas as etapas de pós-tratamento. I: Fase inicial do período de pós-tratamentos. F: fase final do período de pós-tratamentos.

Tabela III - Porcentagem dos compartimentos teciduais prostáticos dos animais velhos

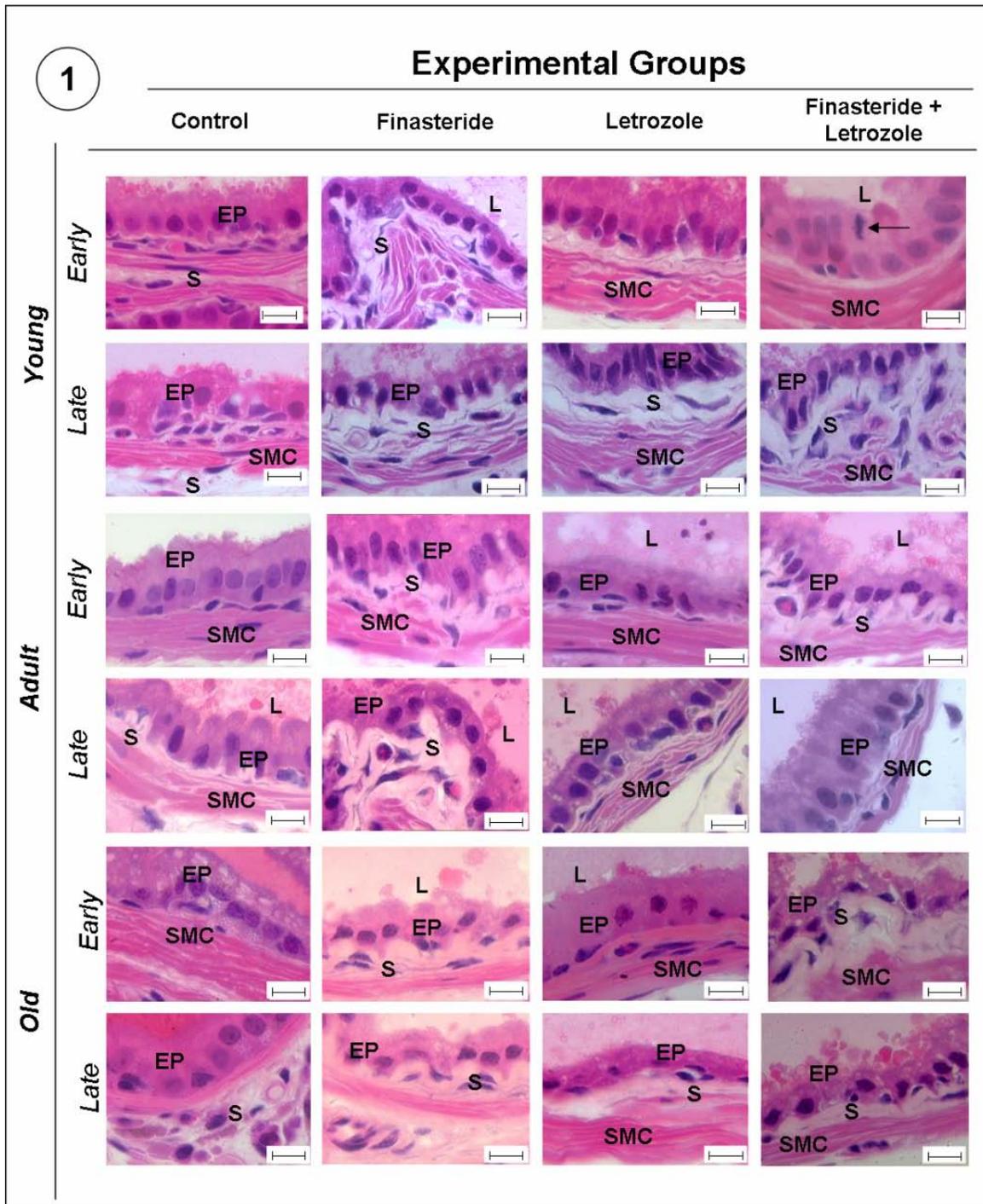
Etapas pós-tratamentos	Compartimentos teciduais	Tratamentos				
		Ct	Fin	Let	Fin + Let	
I	1	Epitélio	26.1±1.1 ₁ ^a	25.5±0.7 ^a	19.0±1.0 ₁ ^b	21.5±0.9 ^b
		Lúmen	39.4±1.7 ^a	29.3±1.6 ₁ ^b	38.1±2.3 ^a	32.7±1.8 ₁ ^{a,b}
		SMC	10.4±0.4 ₁ ^a	16.6±0.7 ^b	16.4±0.8 ₁ ^b	18.3±0.8 ₁ ^b
		Estroma Fibrovascular	23.6±0.9 ₁	28.5±1.3 ₁	26.5±1.6 ₁	28.2±1.4 ₁
	7	Epitélio	24.5±0.9 ₁	23.6±0.8	22.9±1.1 ₂	22.9±0.8
		Lumen	42.9±1.2 ^a	35.0±1.4 ₂ ^b	36.2±1.6 ^b	29.2±1.3 ₁ ^c
		SMC	13.7±0.5 ₂ ^a	16.8±0.4 ^b	13.6±0.6 ₂ ^a	17.1±0.6 ₁ ^b
		Estroma Fibrovascular	18.8±0.9 ₂ ^a	24.8±1.3 ₁ ^b	27.4±1.0 ₁ ^{b,c}	30.5±1.1 ₁ ^c
F	14	Epitélio	23.3±0.9 ₁	24.4±0.9	21.8±1.1 ₁	23.4±0.7
		Lumen	40.8±1.5 ^a	34.7±1.2 ₂ ^b	43.1±1.7 ^a	34.3±1.6 ₁ ^b
		SMC	13.9±0.6 ₂ ^a	16.8±0.4 ^b	13.6±0.6 ₂ ^a	15.6±0.6 ₂ ^{a,b}
		Estroma Fibrovascular	21.9±0.9 ₁ ^a	23.9±1.3 ₂ ^{a,b}	21.6±0.8 ₂ ^a	26.6±1.4 ₁ ^b
	21	Epitélio	22.1±1.1 ₂ ^a	26.9±1.1 ^b	21.2±0.8 ₁ ^a	22.3±0.6 ^a
		Lumen	39.1±1.9 ^a	33.8±1.1 ₁ ^{a,b}	41.8±1.8 ^{a,c}	40.4±1.2 ₂ ^{a,c}
		SMC	14.1±0.7 ₂ ^a	17.7±0.6 ^b	15.3±0.8 ₁ ^a	14.1±0.5 ₂ ^a
		Estroma Fibrovascular	24.3±1.0 ₁	21.6±0.9 ₂	21.6±1.0 ₂	23.2±1.4 ₂

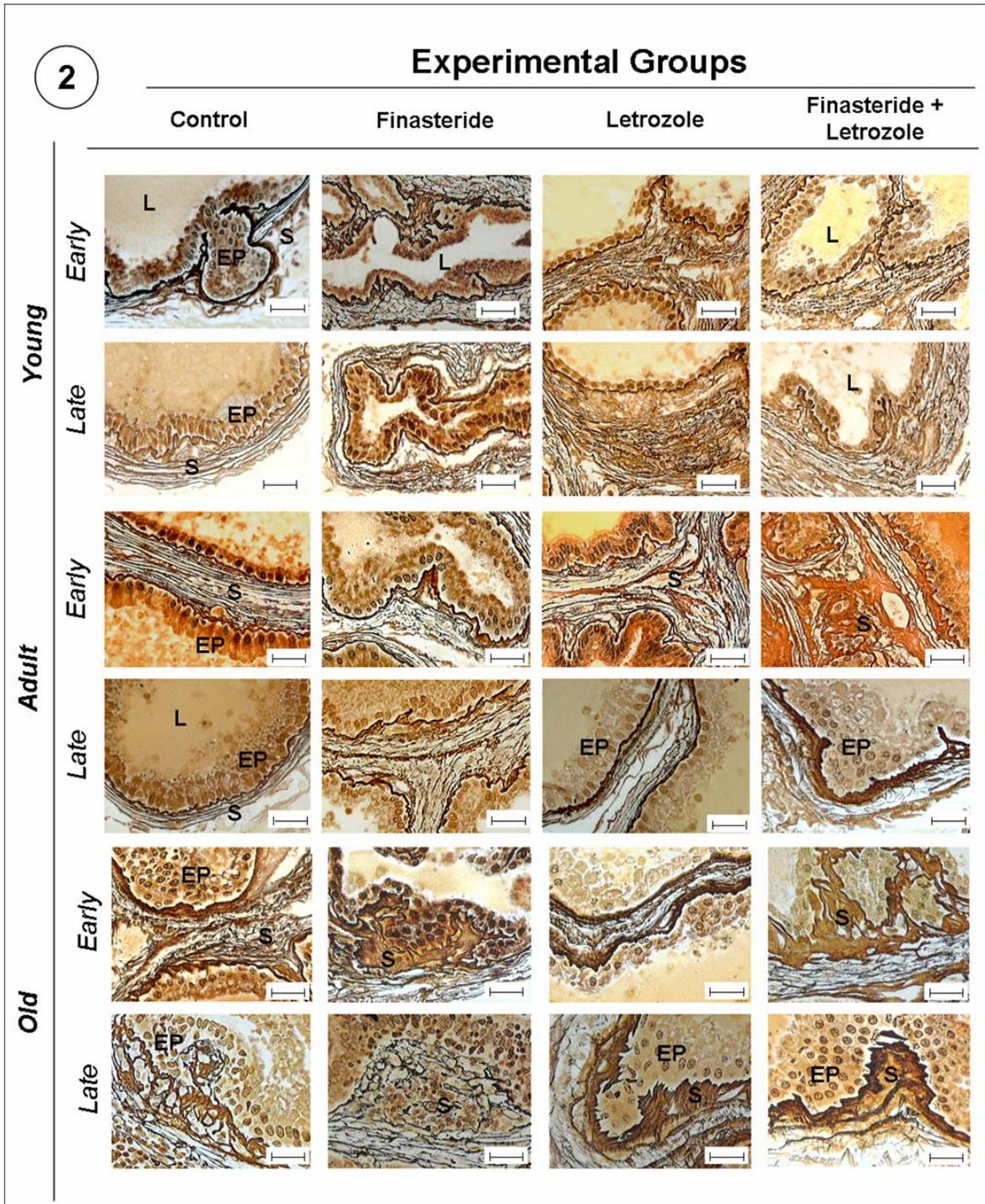
Valores representam média±erro padrão. $p \leq 0,05$. A análise estatística baseou-se nos testes ANOVA e Tukey. Super-índice alfabético (a, b, c) indica as diferenças inter-grupos, quando comparados os tratamentos e o super-índice numérico (1, 2, 3) indica as diferenças inter-grupos, quando comparadas as etapas de pós-tratamento. I: Fase inicial do período de pós-tratamentos. F: fase final do período de pós-tratamentos.

Tabela IV – Valores da proporção entre Testosterona e Estradiol.

Post-Natal Ages	Post-Treatment Period	Experimental Groups			
		Control	Finasteride	Letrozole	Finasteride+ Letrozole
Young	<i>Early</i>	5.65	9.17	6.69	11.40
	<i>Late</i>	6.45	7.93	9.13	6.60
Adult	<i>Early</i>	20.55	16.43	15.99	18.77
	<i>Late</i>	14.66	13.12	13.64	10.22
Old	<i>Early</i>	2.72	3.50	3.35	1.15
	<i>Late</i>	2.48	3.91	3.90	0.57

Valores obtidos da divisão do valor médio da concentração sérica de Testosterona pelo valor médio da concentração sérica de Estradiol. Early: Fase inicial do período de pós-tratamentos. Late: Fase final do período de pós-tratamentos.





Artigo 3.

**Aumento da expressão de receptores de andrógenos decorrentes da inibição das enzimas 5-
alfa redutase e Aromatase pode ser indicativo de atividade hormonal intraprostática alterada**

A ser submetido para a revista *Prostate*

Increase of androgen receptors expression after inhibition of Aromatase and 5-alpha reductase may be indicative of altered intrapostatic activated hormones activity

Corradi, LS¹ and Taboga, SR^{2*}

¹Campinas State University-UNICAMP, Department of Cell Biology – Institute of Biology, Campinas-SP, Brazil; ²São Paulo State University-UNESP, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences-IBILCE, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology, São José do Rio Preto-SP, Brazil

Running title: Over-expression of androgen receptor in the gerbil prostate

***Correspondence to:**

Dr. Sebastião Roberto Taboga

Departamento de Biologia – Ibilce/Unesp

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth

São José do Rio Preto, SP, Brasil

CEP 15054-000

Tel: + 55 17 3221-2386

Fax: + 55 17 3221-2390

Funded by:

São Paulo State Research (FAPESP)

Abstract

The in situ production of androgens has been proposed to exert a critical role in the development and pathogenesis of prostatic cancer. A variety of steroid-metabolizing enzymes exist within the prostate for local formation of activated androgens and estrogens. Dihydrotestosterone (DHT) is a more potent form of Testosterone (T), which is converted by the 5 α -reductase (5 α -r) enzyme. The actions of these hormones are mediated by the intracellular androgen receptor (AR). Besides, the Aromatase (*Aro*) enzyme provides an alternative pathway for estrogen producing within the prostate. It is important, therefore, to examine the status of this locally androgen metabolism in order to evaluate the possible roles of these enzymes in normal and abnormal prostatic biology. The aim of this study was to elucidate what the absence of 5 α -r and *Aro* provoke to the expression of AR, since local steroid metabolism controls the bioavailability of active hormones in the prostate. Young, adult and old male gerbils were received Finasteride and Letrozol (5 α -r and *Aro* enzymes inhibitors, respectively) simultaneously or not and analyzed in post-treatment period. The content and intensity of AR immunostaining were notable elevated in both early and late phases of post-treatment. In the early phase, the expression of AR was notable increased in prostatic epithelium and stroma of the Finasteride-treated animals. In this same group the elevated AR expression was also observed in the last phase of post-treatment. It is known that Finasteride blockade the in situ androgen activation, once its action prevents DHT formation. Letrozol also altered the locally synthesis of active steroids hormones due to its aromatization blockade of T. Together these two drugs are able to elevate the levels of intraprostatic T, which may, consequently, be confirmed by the AR over-expression. Besides this androgenic receptor over-expression might reflects a new hormonal status in the prostate. The recovery of a hormonal micro-environment seems to be difficult to happen after the enzymatic blockade, what gives to the 5 α -r and *Aro* enzymes a status of crucial importance to the intraprostatic hormonal balance's maintenance.

Keyword: androgen receptor, 5 α -reductase, Aromatase, gerbil, ventral prostate

Introdução

Os andrógenos têm papel central na biologia da próstata, mas os estrógenos também exercem funções importantes para a homeostase da glândula. Os efeitos androgênicos em células prostáticas-alvo resultam da interação do hormônio com seus receptores específicos, os receptores de andrógenos (RA), sendo a produção destes esteróides regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Cunha et al., 2001). Durante a maturação da glândula, o RA começa a ser expresso pelas células epiteliais e, na próstata adulta, além destas, as células estromais também expressam este receptor (Schulz et al., 2003). A ativação deste receptor requer a ligação de um andrógeno e no núcleo celular, este complexo receptor-andrógeno regula o processo transcrição de genes específicos se ligando a elementos-resposta do DNA, pois facilita a iniciação deste mecanismo. Em geral, o RA também conta com o auxílio de muitos complexos de proteínas, conhecidas como co-ativadoras e co-expressoras (Marika & Visakorpi, 2004).

O principal andrógeno circulante é a Testosterona (T) e as células de Leydig são responsáveis pela produção de 95% desse esteróide e a adrenal, em torno de 5% (Hsing et al., 2002). Na próstata, a dihidrotestosterona (DHT) é o andrógeno predominante, formado a partir da T por ação da enzima 5 α -redutase (5 α -r) (Steers, 2001). A T e a DHT se ligam ao mesmo tipo de RA, porém desencadeiam funções fisiológicas distintas. A T regula a diferenciação sexual, além de manter as funções sexuais e a libido, já a DHT tem papel fundamental durante a virilização embrionária e puberal, além de manter a funcionalidade da próstata do indivíduo adulto (Labrie et al., 2000; Soronen et al., 2004).

Na próstata, os estrógenos também agem via receptores específicos, os receptores de estrógenos alfa e beta (RE α e RE β), exercendo ações diretas e indiretas no crescimento e diferenciação desta glândula (McPherson et al., 2007). Os estrógenos regulam o desenvolvimento e a função da próstata em vários estágios da vida do homem, através de mecanismos diretos e indiretos (Cunha et al., 2001; Härkönen & Mäkelä, 2004; Carruba 2006). Em homens, a produção

diária de estradiol é de 40-50µg, dos quais apenas de 5-10µg são provenientes da secreção testicular. Grande parte dos estrógenos presentes nesses organismos é derivada da aromatização da T, por ação da enzima Aromatase (*Aro*), na próstata e também nos tecidos periféricos (Ekman, 2000; Härkönen & Mäkelä, 2004). Em situações anormais, a expressão local da *Aro* pode alterar-se de várias formas e, assim, postula-se que estas mudanças sejam críticas para o aparecimento ou a progressão do câncer de próstata de modo semelhante ao observado no câncer de mama (Risbridger et al., 2003).

Pesquisas mostram que na ausência de andrógenos o estradiol, a vitamina D e fator de crescimento tipo-insulina, em combinação com os RA podem induzir a ação androgênica. Assim, a ação hormonal na próstata é determinada não somente pela concentração de andrógenos, mas também por vários outros fatores, como expressão de RA e seus co-ativadores, presença de fatores de crescimento, e talvez outros fatores que ainda venham a ser identificados (Hsing & Devesa, 2001).

Alterações dos níveis androgênicos ou de suas funções devido a problemas de ligação da DHT ou da T ao RA, assim como das funções dos fatores de crescimentos que são mediados pela DHT, podem ser consideradas causas da ruptura da homeostase essencial para a manutenção da funcionalidade da próstata (Carson & Rittmaster, 2003). O bloqueio da atividade estrogênica pode provocar um desequilíbrio na produção de fatores de crescimento que agem nas células epiteliais, provocando também quebra na interação entre o compartimento epitelial e estromal da próstata (Huynh et al., 2001). A exposição pré-natal de ratos e camundongos a altas ou baixas doses de estrógenos induz *imprinting* da próstata associado aos efeitos de proliferação epitelial, expressão de RA e RE, inflamação e mudanças epiteliais displásicas. Portanto, torna-se compreensível que a próstata humana com inflamação crônica pode ser reflexo de uma reação autoimune causada, pelo menos em parte, por estrógenos (De Marzo et al., 2007). O tratamento prolongado de roedores adultos com estrógenos e andrógenos combinados provoca hiperplasia epitelial, displasia e adenocarcinoma de próstata. Pesquisas recentes mostram que a inibição direta da ação estrogênica

nos tecidos da próstata pode ser uma nova estratégia para a quimioprevenção ou terapia do câncer prostático (Soronen, et al., 2004; McPherson et al., 2007). Tanto o câncer prostático dependente de andrógeno, quanto aquele independente expressam RA (Suzuki et al., 2003).

Assim, a produção *in situ* de andrógenos parece desempenhar um papel crítico para a patogênese do câncer prostático humano (Nakamura et al., 2005) e anormalidades na função ou expressão dos RA interferem na progressão desta doença (Suzuki et al., 2005). Embora os níveis séricos de T revelem-se mais de 90% reduzidos depois da castração, a taxa androgênica na próstata fica somente de 50 a 60% menor no tecido com câncer, sugerindo assim, a importância da produção hormonal local no câncer prostático (Labrie 1991; Risbridger et al., 2003; Mizokami et al., 2004). Além disso, a supressão da secreção de hormônios esteróides e/ou o bloqueio de suas funções representam a base de muitas formas de tratamento efetivo de pacientes diagnosticados com esta doença (Negri-Cesi et al., 1998). A determinação do status da expressão de enzimas metabolizadoras de andrógenos em pacientes com câncer de próstata torna-se fundamental para a obtenção de um melhor entendimento dos possíveis papéis da produção e ação intraprostática dos hormônios esteróides (Nakamura et al., 2005).

Estudos com a associação de inibidores das enzimas 5 α -r e *Aro* têm sido realizados para se estudar o que e como a ausência de suas ações afeta as mudanças hormonais e a fisiologia da próstata, além de se buscar compreender os papéis destas enzimas nas doenças que acometem esta glândula (Suzuki et al., 1998; Negri-Cesi et al., 1999; Cunha et al., 2001; Risbridger et al., 2003). Tobin and Canny (1998) utilizaram bloqueadores enzimáticos da 5 α -r e da *Aro* para assegurar a importância da metabolização de T e seus efeitos biológicos, que podem ser mediados indiretamente pela DHT e estradiol. Suzuki et al. (1998) observaram com a inibição da 5 α -r e da *Aro* aumento no volume prostático e testicular de cães. Estas enzimas podem, portanto, restringir o acesso de hormônios esteróides sexuais ativos na circulação e proteger os tecidos alvos de ação hormonal de uma influência excessiva de hormônios, catalisando a conversão de andrógenos e estrógenos em formas menos ativas.

Alterações no padrão de expressão destas enzimas podem modificar a concentração intracelular dos esteróides sexuais, desempenhando papel pato-fisiológico no desenvolvimento de cânceres associados aos hormônios (Labrie et al., 2000; Soronen et al., 2004; Vihko et al., 2005). Para Ricciardelli et al. (2005) o RA tem envolvimento direto com o desenvolvimento de metástases de câncer de próstata e segundo Zhang et al. (2003), RA têm total participação em câncer prostático recorrente, o que sustenta, portanto, o aprofundamento do estudo dos níveis desses receptores como indicadores do estágio da doença. Uma vez que as sinalizações dos RA permanecem em células tumorais resistentes às terapias, a bloqueio das funções destes receptores específicos pode ser foco promissor para o tratamento de metástase, câncer recorrente na próstata, já que inibe o crescimento e apoptose (Chatterjee, 2003). Portanto, como o metabolismo local de andrógenos e estrógenos controla as formas ativas dos hormônios esteróides na próstata, variações das enzimas 5 α -r e da *Aro* durante a progressão do câncer podem ser cruciais na regulação do crescimento e função da glândula (Soronon et al., 2004) e os RA podem responder diferentemente a este novo microambiente hormonal intraprostático.

Material e Métodos

Animais

Gerbilos machos (*Meriones unguiculatus*) sendo 100 jovens (7 semanas-48 dias), 100 adultos (16 semanas-112 dias) e 100 velhos (18 meses-78 semanas) (Pegorin de Campos et al., 2006) ficaram mantidos sob condições controladas de luminosidade (12 horas-luz e 12 horas-escuro) e temperatura (25°C) e alimentados com ração e água *ad libitum*.

Delineamento Experimental

Em cada fase do desenvolvimento pós-natal, os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos experimentais (n=20), de acordo com o tratamento a que seriam submetidos,

Finasterida (Fin), Letrozol (Let), Finasterida+Letrozol (Fin+Let). Dois grupos controles (n=20) foram formados, um contendo animais intactos (Ct) e outro, onde os animais receberam apenas o veículo diluidor das drogas (Ct-óleo). A Finasterida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), droga inibidora da enzima 5 α -r, e o Letrozol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), inibidor da enzima Aromatase foram diluídos em 0.1ml de óleo de milho e dosados baseando-se na média do peso corpo corpóreo dos animais: os jovens receberam 0.5mg/kg/dia de Fin e 0.25mg/kg/dia de Let; Adultos receberam 1.0mg/kg/dia de Fin e 0.5mg/kg/dia de Let; Velhos receberam 1.5mg/kg/dia de Fin e 0.75mg/kg/dia de Let. Todos os animais foram tratados uma vez por dia, por gavagem, durante 30 dias consecutivos. O sacrifício dos animais ocorreu 1, 7, 14, e 21 dias depois de terminado o período de administração das drogas. Cinco animais de cada grupo experimental e dos grupos controles foram usados em cada etapa de pós-tratamento e para isso, foram colocados em câmara de CO₂ e imediatamente depois de sacrificados, foram decapitados para coleta de sangue e então, dissecados.

Dosagem Hormonal Sérica

Amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de 4ml com gel de separação. O material foi centrifugado a 3.000 rpm, e o soro separado e congelado para posterior análise. A análise sérica foi realizada em aparelho automatizado (VITROS ECi-Johnson & Johnson de Análise quimioluminescente heterogênea ultra-sensível). Foram processados ensaios para a dosagem de Testosterona (T) (limite de detecção entre 0,1-150,0 ng/dl) e Estradiol (E₂) (limite de detecção entre 0,0-3814,0 pg/ml).

Microscopia de Luz

Em cada uma das 4 etapas de sacrifício realizadas após os tratamentos, todos os complexos prostáticos (próstata ventral e dorsal) dos animais jovens, adultos e velhos foram removidos, pesados e fixados por imersão em formalina tamponada e incluídos em paraplast, para

futura realização de análises imunohistoquímicas. Outros fragmentos prostáticos dos grupos controle e dos grupos experimentais também foram fixados em Karnovsky (solução de paraformaldeído a 5% e de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato Sörensen pH 7,2 - 0,1M), lavados em água, desidratados em etanol, clarificados em xilol para então serem incluídos em historresina (*Leica historesin embedding kit*) e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) para análise morfológica geral da próstata.

Imuno-histoquímica

O procedimento da imuno-histoquímica para a marcação de receptores de andrógenos foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit: *Recuperação Antigênica*: Tampão citrato (pH 6,0), no microondas, 2 ciclos, 3 minutos cada. *Bloqueio da Atividade da Peroxidase Endógena*: PBS por 3 vezes de 5 minutos e, em seguida, 30 minutos em solução de Peróxido de Hidrogênio a 3% diluído em água destilada. *Bloqueio dos sítios de ligação não-específico*: PBS por 5 minutos e incubados em câmara úmida e escura com 3% de soro bovino fetal (BSA) por 1 hora. *Incubação com anticorpo primário* - AR (N-20): sc-816 rabbit polyclonal antibody da Santa Cruz Biotechnology: 4°C, overnight e diluição de 1:100 em PBS com 3% de soro bovino fetal (BSA). *Incubação do Anticorpo Secundário + Complexo Avidina-Biotina Peroxidase*: O complexo antígeno-anticorpo foi detectado por um anticorpo secundário conjugado à biotina – Anti-Rabbit IgG (*Sigma*): 3 horas em câmara úmida e diluição de 1:200 em PBS com 3% de soro bovino fetal (BSA). *Revelação da Imunoreatividade – Cromogênio DAB (3,3 diaminobenzidina)*: Foram diluídos 5mg de DAB em 7,5ml de água destilada, 2,5ml de tampão fosfato 100ml e 10µl de água oxigenada (3%). As lâminas foram mergulhadas na solução do Cromogênio-DAB por aproximadamente 2 minutos ou até a visualização macroscópica da cor marrom-dourada. *Contra-coloração*: Hematoxilina, por 1 minuto. As documentações fotográficas foram feitas no Analisador de Imagens, com o programa Image-Pro-Plus da Media Cybernetics.

Estatística

A análise estatística dos dados coletas foi realizada em planilhas e gráficos do software Statistica 6.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-1996). Os testes ANOVA e Tukey HSD foram utilizados para a obtenção da significância dos resultados sendo $p \leq 0,05$.

Resultados

Em cada um dos três grupos etários estudados, a próstata dos animais dos grupos Ct-óleo, que receberam apenas o veículo diluidor da droga, não apresentaram dados quantitativos nem tão pouco morfológicos que fossem significativamente diferentes daqueles observados nos animais do grupo Ct, comportando-se assim, de modo semelhante entre estes dois grupos. Portanto, os resultados obtidos nos grupos Ct e Ct-óleo foram agrupados e mencionados como um único grupo, o grupo Ct. Além disso, as análises estruturais e quantitativas das quatro etapas do período de pós-tratamento com as drogas (1, 7, 14 e 21 dias depois do final dos tratamentos) revelaram, surpreendentemente, muitas similaridades entre as duas primeiras etapas e entre as duas últimas. Com base nisto, os resultados foram agrupados em duas fases de análises do período de pós-tratamentos: a Fase Inicial, referente às etapas 1 e 7; e a Fase Final, referente às etapas 14 e 21.

Análise Sorológica

Na fase inicial do período de pós-tratamentos, a concentração sérica de T aumentou, quando comparada com os grupos Ct, nos jovens (Tab.I), adultos (Tab. II) e velhos (Tab.III) tratados simultaneamente ou não com Fin e Let. Os gerbilos adultos tratados com Let ficaram com a concentração de T ligeiramente menor que o grupo Ct. Já a fase final de análises revelou, nos animais jovens e velhos, uma concentração de T ainda maior do que o grupo Ct, e novamente, os

animais adultos foram exceção, pois somente no grupo Let o nível T estava discretamente maior que no grupo Ct. Nas três idades estudadas, a maior concentração sérica de T apareceu nos animais tratados com Fin+Let durante a fase inicial do pós-tratamento, enquanto que na fase final, o nível de T ainda era o mais elevado nos animais jovens e velhos do grupo Fin. Os animais adultos, tanto do grupo Fin, quanto do grupo Fin+Let, tinham concentração de T menor que o grupo Ct. Os níveis séricos de E₂ também aumentaram na fase inicial do período de pós-tratamentos, nos jovens (Tab.I), adultos (Tab. II) e velhos (Tab.III) tratados simultaneamente ou não com Fin e Let, com exceção dos animais adultos do grupo Fin+Let, quem apresentaram concentração de E₂ menor do que o grupo Ct. Na fase inicial de análise, os gerbilos jovens e adultos do grupo Let tinham o mais elevado nível de E₂. Nos velhos, a maior concentração de E₂ na fase inicial do pós-tratamento foram os animais do grupo Fin+Let. Na fase final de análises, os animais jovens e velhos do grupo Fin+Let ainda tinham a concentração sanguínea de E₂ mais alta do que o grupo Ct, o que também aconteceu, porém com menos evidência, com os animais adultos submetidos a este mesmo tratamento. Nesta fase, a menor concentração de E₂ apareceu nos animais jovens, adultos e velhos tratados com Let.

Análise Estrutural

Nos jovens, a glândula era imatura, com porções acinares pequenas, apresentando na camada de tecido conjuntivo adjacente ao epitélio pouca vascularização e baixo número de fibroblastos. As células musculares lisas (CML) estavam frouxamente compactadas ao redor dos ácinos, deixando esta camada muscular mais espessa. Os animais adultos mostravam a próstata completamente desenvolvida, com ácinos maiores do que aos observados nos jovens do grupo Ct dos animais jovem, alta atividade secretora e lúmen acinar amplo e com muitos grânulos de secreção acumulados no ápice do epitélio O estroma ficou mais compacto, com estreita camada de tecido conjuntivo, rico em colágeno e fibroblastos, na base do epitélio e com CML fusiformes agora densamente compactadas. A próstata dos animais velhos do grupo Ct revelou-se com áreas

heterogêneas, algumas morfologicamente normais enquanto outras, histo-patologicamente comprometidas. Nas porções acinares normais, a camada epitelial estava com dobras e células epiteliais modificadas. O tecido conjuntivo adjacente a esta camada estava mais espesso e a maioria das CML apresentava-se alterada, contribuindo para um desarranjo do músculo liso. Nos animais jovens, adultos e velhos, as alterações observadas no período de pós-tratamento com Fin e Fin+Let foram muito semelhantes e aparentemente maiores no compartimento estromal, onde houve acúmulo de colágeno e aumento do número de fibroblastos na região subepitelial. O tratamento com Let provocou no compartimento prostático dos animais, independentemente da idade estudada, modificações semelhantes às descritas acima, porém de modo mais brando. Já a camada epitelial dos animais jovens, adultos e velhos que receberam Let, teve uma resposta mais evidente, onde o fenótipo celular observado no grupo Ct ficou totalmente remodelado, apresentando células mais alta nos animais jovens e adultos, mas no final da análise, estavam novamente mais baixas do que no grupo Ct (Fig.1).

Análise Imunohistoquímica

A expressão dos RA nitidamente alterou-se depois dos bloqueios enzimáticos, separados ou não, das enzimas 5α -r e da *Aro*. Comparando-se com o grupo Ct, em todas as idades a quantidade e a intensidade de marcação imunohistoquímica ficaram maiores no período de pós-tratamentos. Nos animais jovens do grupo Ct, praticamente não houve marcação de RA na fase inicial de análise, porém, na fase final, havia pequena expressão de RA no núcleo das células epitelial e estromal. Durante as etapas de análise, nos adultos do grupo Ct, esta marcação estava relativamente maior e evidente exclusivamente no núcleo das células da camada epitelial. Nos animais velhos do grupo Ct, analisados na fase inicial, tinham uma notável marcação de RA no núcleo das células epiteliais enquanto que na fase final de análise, além da expressão epitelial, houve imunolocalização de RA no núcleo de CML (Fig.2).

Os animais jovens do grupo Fin e Fin+Let apresentaram maior marcação de RA no núcleo das células epiteliais, do que nos animais jovens do grupo Let, o que permaneceu até a fase final do pós-tratamento com Fin. Já nos jovens dos grupos Fin e Let, nas fases inicial e final de análises, uma discreta expressão destes receptores aconteceu nas células estromais. Na fase inicial de análise dos animais adultos do grupo Fin, a expressão de RA aumentou no compartimento epitelial e estromal da próstata, estando localizada principalmente no núcleo das células. Alguma marcação pode ser notada também no citoplasma das células destes compartimentos. Apesar do aumento da expressão e da intensidade da imunolocalização de RA na fase inicial do pós-tratamento com Let e com Fin+Let, este padrão de marcação ficou ainda mais acentuado na fase final do período de pós-tratamento com estas drogas. Nesta fase de análise, os animais do grupo Let apresentaram a mais forte marcação de RA no núcleo das células epiteliais, enquanto que não houve expressão nas células do compartimento estromal. Por outro lado, na próstata dos animais adultos do grupo Fin+Let uma maior expressão de RA no núcleo de células epiteliais e estromais pode ser vista tanto na fase inicial, quanto final do pós-tratamento. Nos animais velhos, a intensidade da marcação e a expressão de RA nas células epiteliais ficaram maiores nos grupo Fin, Let e Fin+Let, enquanto que uma discreta expressão apareceu no compartimento estromal. Os animais velhos dos grupos Let apresentaram, durante todo o período de análise do pós-tratamento, uma intensa expressão nuclear de RA, além de alguma marcação citoplasmática. Na região adjacente a camada epitelial, pode-se observar também imunomarcação de RA no citoplasma dos fibroblastos presentes nesta região (Fig.2).

Discussão

Considerando-se cada tratamento, pode-se observar que a associação da Finasterida com o Letrozol provocou modificações significativas no micro-ambiente prostático, assim como também, a administração separada destas duas drogas. Os resultados obtidos na fase inicial do

período de pós-tratamento são claros e evidentes de que as drogas exerceram seus efeitos específicos enquanto administradas. Já a fase final das análises pareceu ser um período de recuperação do estado funcional normal da próstata, do que de consequência dos efeitos das drogas administradas. A não diminuição da expressão de RA na próstata dos animais independentemente da idade e do tratamento a que foram submetidos pode ser sustentada com base no proposto por Zhang et al. (2003) que RA é totalmente funcional em câncer recorrente. Para eles, a natural resposta do câncer prostático a retirada da ação da DHT é a transição para o estado recorrente, possibilitando de alguma forma, a ativação de receptores na ausência de níveis fisiológicos de DHT. Como o RA é expresso tanto no câncer de próstata dependente de andrógeno quanto no independente, estes receptores podem desempenhar papel importante na progressão para esta independência androgênica do câncer (Suzuki et al., 2003).

A ação sinérgica da Finasterida com o Letrozol se assemelha, em todas as idades, com a ação isolada da Finasterida, uma vez que quando estas duas drogas são administradas sozinhas, elas provocam alterações distintas. Estes dados puderam ser vistos nas três idades estudadas e o que ficou evidente foi que a próstata dos animais jovens e velhos teve uma maior dificuldade em recuperar o seu estado fisiológico normal. Já a próstata dos animais adultos mostrou-se com capacidade de recuperação mais equilibrada e menos oscilatória. Assim, com base nos dados obtidos, pode-se sugerir que, o desbalanço entre as concentrações de andrógenos e estrógenos provocados pelo bloqueio da enzima 5-alfa redutase e Aromatase, separados ou não, alterou significativamente a expressão de RA na próstata dos gerbilos jovens, adultos e velhos, refletindo, portanto, o novo status hormonal intraprostático adquirido pela ausência da ação destas enzimas.

A DHT quando comparada com a T, é de 5 a 10 vezes mais potente e tem maior afinidade com RA (Rittmaster, 1994) além de ter papel importante na regulação do crescimento da glândula (Huynh et al., 2001) e na estimulação da função epitelial prostática (Wright et al., 1996). A ligação da DHT ao RA resulta em uma cascata de eventos necessários para a formação dos fatores

de sinalização, tanto para o crescimento quanto para a manutenção da função prostática (Carson & Rittmater, 2003). Portanto, como a inibição da produção intraprostática da DHT é efetiva na presença da Finasterida, e este hormônio, por sua vez, é o principal responsável pela manutenção da intracrinologia da glândula (Labrie et al., 2000) a regressão da próstata frente ao uso desta droga é justificável e semelhante aos efeitos de uma castração cirúrgica (Wright et al., 1996; 1999; Shibata et al., 2001; Corradi et al., 2004). Contudo, mesmo a DHT sendo mais eficiente que a T, é este último o principal andrógeno circulante nos machos, pois, além de ser essencial para o desenvolvimento e manutenção de todo o aparelho reprodutor masculino, ela pode ainda ser aromatizado em estradiol (Wright et al., 1999; Shibata et al., 2001) o que sustenta o aumento deste hormônio esteróide após o uso da Finasterida, justificando assim, a maior expressividade dos RA encontrada neste grupo experimental.

Durante as etapas de análise do pós-tratamento com Letrozol, os animais adultos tiveram a concentração de T menor que os animais intactos. Altos níveis sérios de estrógenos e prolactina, associados com baixas concentrações de T em camundongos transgênicos para a super expressão de *Aro* ou em camundongos deficientes para esta mesma enzima, não induziram hiperplasia, o que enfatiza a necessidade de uma ação combinada entre andrógenos e estrógenos (Härkönen & Mäkela, 2004). A baixa concentração sérica de T, apresentada pelos animais adultos onde a não aromatização da T ocorreu em função do bloqueio da *Aro*, associada a elevada expressão de RA reflete aparecimento do novo status hormonal intraprostático. Ito et al. (2000) administraram inibidor da *Aro* para cães com HBP induzida e espontânea e obtiveram resultados hormonais semelhantes. Provavelmente, este hormônio tornou-se uma fonte a mais de substrato para ser metabolizado pela 5α -r ou outras enzimas metabolizadoras de esteróides, como proposto por Soronen et al. (2004), Ishikawa et al. (2006) e Oliveira et al. (2007).

Drogas anti-androgênicas, competidoras dos andrógenos pela ligação ao RA e drogas que bloqueiam enzimas importantes para a potencialização da ação de hormônios na próstata revelam-se como importantes instrumentos para tratamento das patologias prostáticas (Galbraith &

Duchesne, 1997). Huynh et al (2001) mostraram que a utilização de tratamentos combinados de anti-andrógenos e anti-estrógenos para as patologias prostáticas permite melhorar os sintomas dos pacientes portadores destas doenças, além de ajudar a esclarecer os mecanismos pelo quais os estrógenos influenciam o crescimento normal, o crescimento independente de andrógenos e a metástase das células cancerígenas da próstata. Apesar do crescimento, da diferenciação e funcionalidade prostática serem essencialmente controladas por andrógenos, os estrógenos podem modular os efeitos destes hormônios de várias maneiras (Härkönen & Mäkelä, 2004).

A elevada concentração sérica de T nos animais jovens e velhos e da expressão de RA notada após o uso do Letrozol confirma ação da droga em bloquear a aromatização deste hormônio, mas simultaneamente levanta outra questão a respeito da ativação e do funcionamento de vias paralelas da metabolização intracrinológica de esteróides (Labrie et al., 2000). O fato dos níveis sistêmicos de estrógeno aparecerem em maior concentração exatamente nos grupos experimentais onde a enzima responsável pela aromatização de T estava sendo bloqueada, pode ser explicado por esta inibição estar acontecendo na conversão direta e local do estradiol, enquanto que as metabolizações hormonais indiretas realizadas por outras enzimas específicas ainda continuaram ativas (Soronen et al., 2004). O bloqueio da aromatização da T na próstata impediu a ação dos efeitos diretos do estrógeno na glândula, porém, pode ter conseqüentemente provocado um aumento da conversão intraprostática da T em DHT. Além de se ligar diretamente ao RA, a DHT pode também agir indiretamente através de seu metabólito 5α -Androstane- $3\beta,17\beta$ -diol (3β -diol), cuja conversão é realizada pela enzima 3β -HSD. Diferentemente da DHT, este metabólito se liga aos RE, especialmente ao RE β , revelando que este produto androgênico tem ação intrínseca estrogênica (Oliveira et al., 2007). A diminuição na ativação da T e DHT e o aumento da produção de metabólitos estrogênicos no epitélio prostático poderiam aumentar a proliferação das células e, portanto, alterar o crescimento prostático (Soronen et al, 2004).

O eixo sinalizador dos andrógenos regula o desenvolvimento, a função e o crescimento da próstata e tem papel importante na predisposição e progressão do câncer prostático (Buchanan et

al., 2001). Um dos componentes críticos deste eixo é o RA, fator de transcrição nuclear que regula várias funções celulares na próstata incluindo diferenciação, morfogênese, angiogênese, proliferação e apoptose. A presença de RA funcional é essencial para a resposta de tumores prostáticos ao bloqueio androgênico, uma vez que o nível de expressão dos receptores pode indicar esta ação (Ricciardelli et al., 2005). O aumento dos níveis de RA na próstata associa-se ao aumento da sinalização de função destes receptores e ao perfil alterado de genes reguladores de andrógenos, incluindo aqueles que codificam fatores angiogênicos, moléculas de adesão celular e reguladores do ciclo celular, os quais potencialmente contribuem para metástase e crescimento do tumor (Culig et al., 2002).

As concentrações intracelulares dos esteróides nos tecidos alvos são reguladas por biossíntese e metabolismo local desses hormônios, altamente dependente destas enzimas metabolizadoras de esteróides específicas (Labrie et al., 2000; Vihko et al., 2006; Carruba, 2006). Como principal fonte para esta produção hormonal local, há esteróides derivados da adrenal, como a Deidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada (DHEA-S) e A-dione, as quais aparecem abundantemente na circulação (Labrie et al., 2000; Vihko et al., 2006). Em humanos, a contínua formação dos hormônios esteróides sexuais a partir do DHEA nos tecidos periféricos tem papel importante na manutenção do funcionamento da maioria dos tecidos (Labrie et al., 2000). Portanto, esses esteróides-substratos provenientes da adrenal também regulam, de modo muito eficaz, a influência dos andrógenos e dos estrógenos ativos nas células-alvo (Vihko et al., 2006). Assim, a taxa de formação de cada hormônio esteróide sexual depende da atividade específica de enzimas metabolizadoras de andrógenos e de estrógenos presentes nas células de cada tecido (Labrie et al., 2000). Segundo Suzuki et al. (2003), alguns tipos tumorais com amplificação de RA conservam um alto grau de dependência de andrógenos residuais, ainda presentes no sangue depois das monoterapias, o que indica que a perda da sensibilidade androgênica nestes pacientes foi causada pelo crescimento de clones de câncer, estimulados por andrógenos produzidos pela adrenal.

Os altos níveis encontrados de RA nos grupos experimentais deste estudo podem ser também justificados se considerarmos a participação efetiva dos hormônios produzidos pelas adrenais.

A produção localizada de hormônios vem crescentemente adquirindo grande importância para o entendimento de doenças onde níveis anormais androgênicos e/ou estrogênicos podem promover a proliferação de tumores (Risbridger et al., 2003; Carruba, 2006). Estas enzimas podem, portanto, restringir o acesso de hormônios esteróides sexuais ativos na circulação e proteger os tecidos alvos de ação hormonal de influência excessiva de hormônios, catalisando a conversão de andrógenos e estrógenos em formas menos ativas. Uma vez que o metabolismo local de esteróides controla as formas ativadas dos hormônios esteróides na próstata, variações destas enzimas durante a progressão do câncer podem ser cruciais na regulação do crescimento e funcionalidade da glândula (Soronen et al., 2004). Alterações no padrão de expressão destas enzimas podem modificar a concentração intracelular dos esteróides sexuais, desempenhando papel pato-fisiológico no desenvolvimento de cânceres associados a hormônios (Labrie et al., 2000; Soronen et al., 2004; Vihko et al., 2005). No metabolismo de andrógenos e estrógenos, os produtos originados dessas reações enzimáticas são fatores que influenciam o comportamento e a fisiologia de todo o aparelho reprodutivo e têm inúmeras implicações durante toda a vida do indivíduo (Lephart et al., 2001).

Embora os mecanismos que contribuíram para o aumento da expressão de RA neste estudo ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que pode ser resultado da amplificação do gene do RA, ou de uma super-regulação da função do RA ou ainda, de alterada estabilidade do RNAm ou da proteína do RA (Ricciardelli et al., 2005). Como a Finasterida bloqueia a ativação *in situ* de andrógenos e o Letrozol, por sua vez, também provoca alteração na síntese localizada de esteróides ativados por inibir a aromatização da T. Juntas estas duas drogas podem ser capazes de elevar os níveis intraprostáticos de T e, portanto, aumentar a expressão de RA nos tecidos prostáticos submetidos a estes tratamentos. Apesar disso, os resultados obtidos com este trabalho podem ser indicativos de importantes sinais do cenário hormonal intraprostático decorrente da

ausência da atividade de enzimas metabolizadoras de esteróides. A avaliação dos níveis de expressão de RA e sua distribuição tecidual prostática evidenciam os papéis destas enzimas na regulação da atividade androgênica, dando a elas, portanto, papel de crucial importância para a manutenção do balanço hormonal intraprostático, já que a recuperação deste um equilíbrio no microambiente prostático ficou totalmente comprometida depois dos bloqueios enzimáticos.

Ainda há muitos passos nesse processo para serem investigados e esclarecidos, principalmente sobre a ação do bloqueio destas enzimas metabolizadoras para a manutenção da concentração intraprostática hormonal. Além disso, o RA parece estar mais diretamente envolvido no controle dos hormônios sintetizados localmente do que com aqueles presentes no plasma. Assim, a interrelação da síntese local dos hormônios esteróides e sua efetiva ação dependente dos receptores hormonais torna-se fundamental para o esclarecimento e entendimento da biologia dessa glândula e das causas das suas patologias.

Referências Bibliográficas

- Buchanan G, Irvine RA, Coetzee Ga, Tilley WD (2001) Contribution of the androgen receptor to prostate cancer predisposition and progression. *Cancer Metastasis Rev* 20:207-223.
- Carruba G. (2006) Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* 1089:201-217.
- Carson C & Rittmaster R (2003) The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61 (Suppl 4):2-7.
- Chatterjee B (2003) The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem* 253: 89-101.
- Corradi LS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2004) Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72(5):198-208.
- Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP. (2001) Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev* 13:285-296.

- Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobish A (2002) Androgen receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 9: 155-170.
- De Marzo AM, Platz EA, Stueliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaac W, Nelson W (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev* 7(4):256-269.
- Ekman P. (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate Suppl.*10:14-18.
- Galbraith, SM & Duchesne, GM (1997) Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. *European Journal of Cancer* 13 (4): 545-554.
- Härkönen PL & Mäkelä SI (2004) Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92:297-305.
- Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TWM (2001) Co-administration of finasterida and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J Endocrinol* 171:109-118.
- Hsing AW & Devesa SS (2001) Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemol Rev* 23:3-13.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ (2002) Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 52:213-235.
- Ishikawa T, Glidewell-Kenney C, Jameson JL (2006) Aromatase-independent testosterone conversion into estrogenic steroids is inhibited by a 5 α -reductase inhibitor. *J Ster Bioch Molec Biol* 98:133-138.
- Ito K, Fukabori Y, Shibata Y, Suzuki K, Mieda M, Gotanda K, Honma S, Yamanaka H (2000) Effects of a new steroidal Aromatase inhibitor, TZA-2237, and/or chlormadinone acetate on hormone-induced spontaneous canine benign prostatic hyperplasia. *Eur J Endocrinol*143:543-554.
- Labrie F. (1991) Endocrine therapy for prostate cancer. *Endocrinol Metab Clin North America* 20:845-872.
- Labrie F, The-Luu V, Lin SX, Simard J, Labrie C (2000) Role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in sex steroid formation in peripheral intracrine tissue. *TEM* 11(10):421-427.

- Lephart ED, Lund TD, Horvath LT (2001) Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Res* 37:25-37.
- Marika JL & Visakorpi T (2004) Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 255-264.
- McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzsche KH, Risbridger GP (2007) Essential role for estrogen receptor β in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 148(2):566-574.
- Mizokami A, Koh E, Fujita H, Maeda Y, Egawa M, Koshida K, Honma S, Keller ET, Namiki M. (2004) The adrenal androgen androstenediol is present in prostate cancer tissue after androgen deprivation therapy and activates mutated receptor. *Cancer Res* 64:765-771.
- Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto K, Mikami Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H (2005) In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer *Endocr Relat Cancer* 12:101-107.
- Negri-Cesi P, Poletti A, Colciago A, Magni P, Martini P, Mota M (1998) Presence of 5-alpha-reductase and Aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue. *Prostate* 34(4): 283-291.
- Negri-Cesi P, Colciago A, Mota M (1999) 5-alpha-reductase isozymes and Aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate* 41(4): 224-232.
- Oliveira A, Coelho PH, Guedes FD, Mahecha GAB, Hess RA, Oliveira C (2007) 5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol), an estrogenic metabolite of 5 α -dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ER β expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids* 72 (14):914-922.

- Ricciardelli C, Choong C, Buchanan G, Vivekanandan S, Neufing P, Stahl J, Marshall V, Horfall D, Tilley W (2005) Androgen receptor levels in prostate cancer epithelial and peritumoral stromal cells identify non-organ confined disease. *The Prostate* 63:19-28.
- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mc Pherson SJ (2003) Oestrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 10:187-191.
- Rittmaster RS (1994). Finasteride (review article). *The New England Journal of Medicine* 330(2): 120-125.
- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003) Molecular Biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9(8): 437-448.
- Shibata Y, Fukabori Y, Ito K, Suzuki K, Yamanaka H (2001) Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. *The Journal of Urology* 165:289-293.
- Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko I (2004) Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92:281-286.
- Steers W (2001) 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology* 58 (Suppl. 6A): 17-24.
- Suzuki K, Okazaki H, Kurokawa K, Suzuki T, Onuma E, Takanashi H, Mamiya Y, Yamanaka H (1998) Effects of dual inhibition of 5-alpha-reductase and Aromatase on spontaneously developed canine prostatic hypertrophy. *Prostate* 37 (2):70-76.
- Suzuki H, Ueda T, Ishiwawa T, Ito T (2003) Androgen receptor in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 10:209-216.
- Tobin VA & Canny BJ (1998) The regulation of gonadotrophin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs by testosterone is mediated by dihydrotestosterone. *Endocrinol* 139(3):1038-1045.
- Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A, Li Y, Patrikainen L, Pulkka A, Soronen P, Törn (2005) Enzymes as modulators in malignant transformation. *J Steriod Biochem Mol Bio* 1 93:277-283.

- Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A (2006) Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSDs. *Mol Cell Endocrinol* 248:141-148.
- Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS (1996) Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of castrated rat. *J Clin Invest* 98(11):2558-2563.
- Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS (1999) Androgen-induced regrowth in the castrated rat central prostate: role of 5 α -reductase. *Endocrinol* 140 (10): 4509-4515.
- Yuen MT, Leung LK, Wang J, Wong YC, Chan F (2005) Enhanced induction of prostatic dysplasia and carcinoma in Noble rats model of combination of neonatal estrogen exposure and hormonal treatments at adulthood. *Inter J Oncol* 27: 1685-1695.
- Zhang L, Johnson M, Le K, Sato M, Hagan R, Iyer M, Gambhir S, Wu L, Carey M (2003) Interrogating androgen receptor function in recurrent prostate cancer. *Cancer Res* 63: 4552-4560.

Figures Legends

Fig. 1 – Regiões do lobo ventral prostático do gerbilo da Mongólia corados com Hematoxilina-Eosina. O compartimento acinar (A) e estromal (S) dos animais dos grupos controle, ao longo do período pós-natal, apresentaram padrão histológicas de desenvolvimento normal da glândula. O pequeno ácino circundado um denso estroma na próstata dos animais jovens, ficou mais dilatado nos adultos em decorrência da maturação da glândula e o estroma, mais compactado. Nos velhos, os ácinos tinham a camada epitelial com varias dobras e, o estroma, novamente com aspecto mais denso, em decorrência da idade. Os tratamentos alteraram as características destes compartimentos, principalmente por provocarem um aumento do colágeno adjacente à camada epitelial (*), o que deixou o estroma rearranjado diferentemente. A atividade secretora não cessou completamente, pois

os ácinos tinham bleds de secreção no ápice das células epiteliais e vesículas no lúmen (L). Como ocorre espontaneamente nesta espécie o aparecimento de patologias na próstata, mesmo com os tratamentos isto não deixou de acontecer, como pode ser notado pela presença de regiões de inflamação (seta). **Escala:** 20 μ m

Fig. 2 – *Imuno-histoquímica da expressão do receptor de andrógeno (RA) em regiões do lobo ventral prostático do gerbilo da Mongólia.* As células do compartimento epitelial e estromal dos animais dos grupos controle, ao longo do período pós-natal, apresentaram expressão de RA de acordo com sua fase de desenvolvimento pos-natal. Nos jovens, a presença e a intensidade de marcação de RA foram baixas, enquanto nos adultos foi mais evidente. Já nos animais velhos, tanto a expressão quanto a intensidade de marcação foram maiores em decorrência da idade, principalmente no núcleo das células epiteliais. Os tratamentos causaram alterações da presença e intensidade de marcação de RA. Um nítido aumento da expressão e intensidade da imunomarcação do RA aconteceu independentemente da idade e do tipo de tratamento. Nos jovens, houve um aumento da expressão de RA no núcleo das células estromais, além do aumento observado no compartimento epitelial, em todos os tipos de tratamentos. Nos adultos, o mesmo aconteceu, porém houve uma expressão de RA nos fibroblastos presentes na aumentada região subepitelial. Nesta idade, o tratamento com Letrozol causou a maior e mais forte expressão do receptor. Nos velhos, a intensidade da expressão de RA ficou evidentemente maior, principalmente no núcleo das células epiteliais, porém uma ligeira marcação citoplasmática do RA aconteceu nos animais desta idade do grupo que recebeu Letrozol. **Escala:** 40 μ m. **Insets:** Houve principalmente nos animais adultos, diferentes intensidades de marcação da expressão do RA no núcleo das células epiteliais. **Escala:** 100 μ m.

Tabela I - Níveis hormonais séricos dos animais jovens.

Etapas Pós-tratamento		Hormônios	Tratamentos			
			Ct	Fin	Let	Fin + Let
I	1	T	64.6±3.8 ₁ ^a	147.2±23.8 ^b	102.2±7.7 ^{a,c}	170.2±19.1 ₁ ^b
		E ₂	11.2±0.8 ₁ ^a	13.7±1.1 ₁ ^a	17.2±1.0 ₁ ^b	14.5±0.7 ₁ ^a
	7	T	76.6±4.9 ₁ ^a	123.2±16.0 ^a	137.7±20.6 ^b	124.0±11.6 ₁ ^a
		E ₂	13.7±0.8 ₁ ^a	16.2±1.3 ₁ ^a	18.5±21.9 ₁ ^{a,b}	11.2±0.5 _{1,2} ^{a,c}
F	14	T	90.5±3.8 ₂	93.8±3.9	131.0±19.0	105.2±14.2 ₂
		E ₂	17.3±1.5 ₂	98.9±1.3 ₂	16.7±1.2 ₁	18.4±0.7 _{1,3}
	21	T	106.7±7.6 ₂	135.2±13.0	120.0±23.9	110.9±8.9 ₂
		E ₂	13.9±1.7 ₁	12.7±0.8 ₂	11.5±0.5 ₂	14.8±1.8 ₁

Valores representam média±erro padrão. $p < 0,05$. A análise estatística baseou-se nos testes ANOVA e Tukey. Super-índice alfabético (a, b, c) indica as diferenças inter-grupos, quando comparados os tratamentos e o super-índice numérico (1, 2, 3) indica as diferenças inter-grupos, quando comparadas as etapas de pós-tratamento. I: Fase inicial do período de pós-tratamentos. F: fase final do período de pós-tratamentos.

Tabela II - Níveis hormonais séricos dos animais adultos.

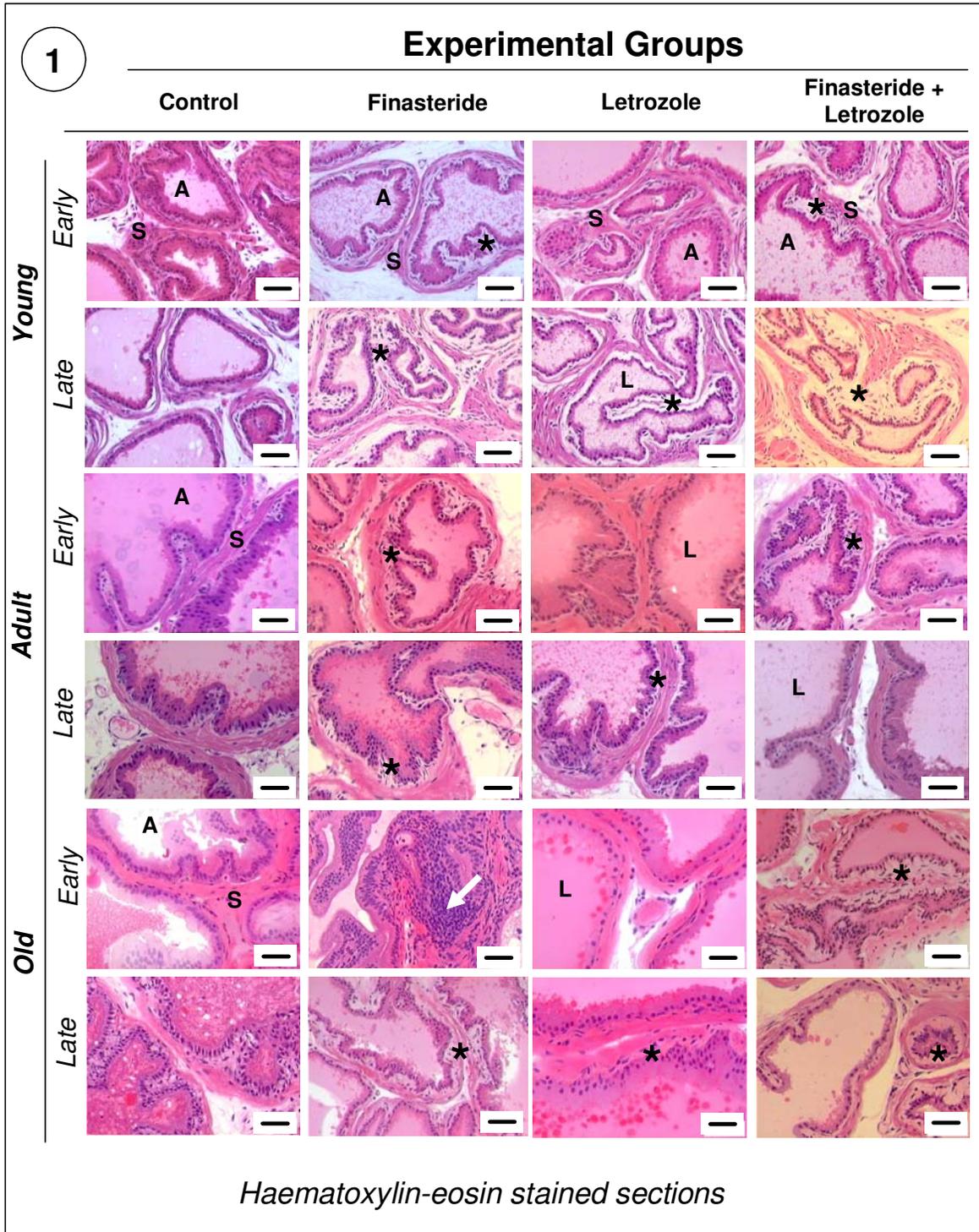
Etapas Pós-tratamento		Hormônios	Tratamentos			
			Ct	Fin	Let	Fin + Let
I	1	T	336.2±32.9	337.0±34.6 ₁	309.6±29.9 ₁	339.4±20.8 ₁
		E ₂	15.0±0.7	15.5±0.6 ₁	16.0±1.1	13.8±0.8 ₁
	7	T	244.0±35.7	187.8±17.5 ₂	172±26.8 ₂	168.4±29.6 ₂
		E ₂	13.5±0.5 ^a	16.8±0.7 ^{a,b} _{1,2}	13.6±0.5 ^a	13.0±1.3 ^{a,c} ₁
F	14	T	204.6±36.3	171.4±19.9 ₂	158.8±5.4 ₂	164.4±16.9 ₂
		E ₂	14.8±0.4 ^a	13.4±1.0 ^{a,b} _{1,2}	12.6±0.5 ^{a,b}	16.6±0.5 ^{a,c} ₁
	21	T	243.2±36.6 ^a	177.4±4.9 ^a ₂	249.6±23.4 ^a ₁	166.8±3.0 ^a ₂
		E ₂	15.7±1.1	13.2±0.9 _{1,3}	17.0±1.6	15.8±0.9 ₁

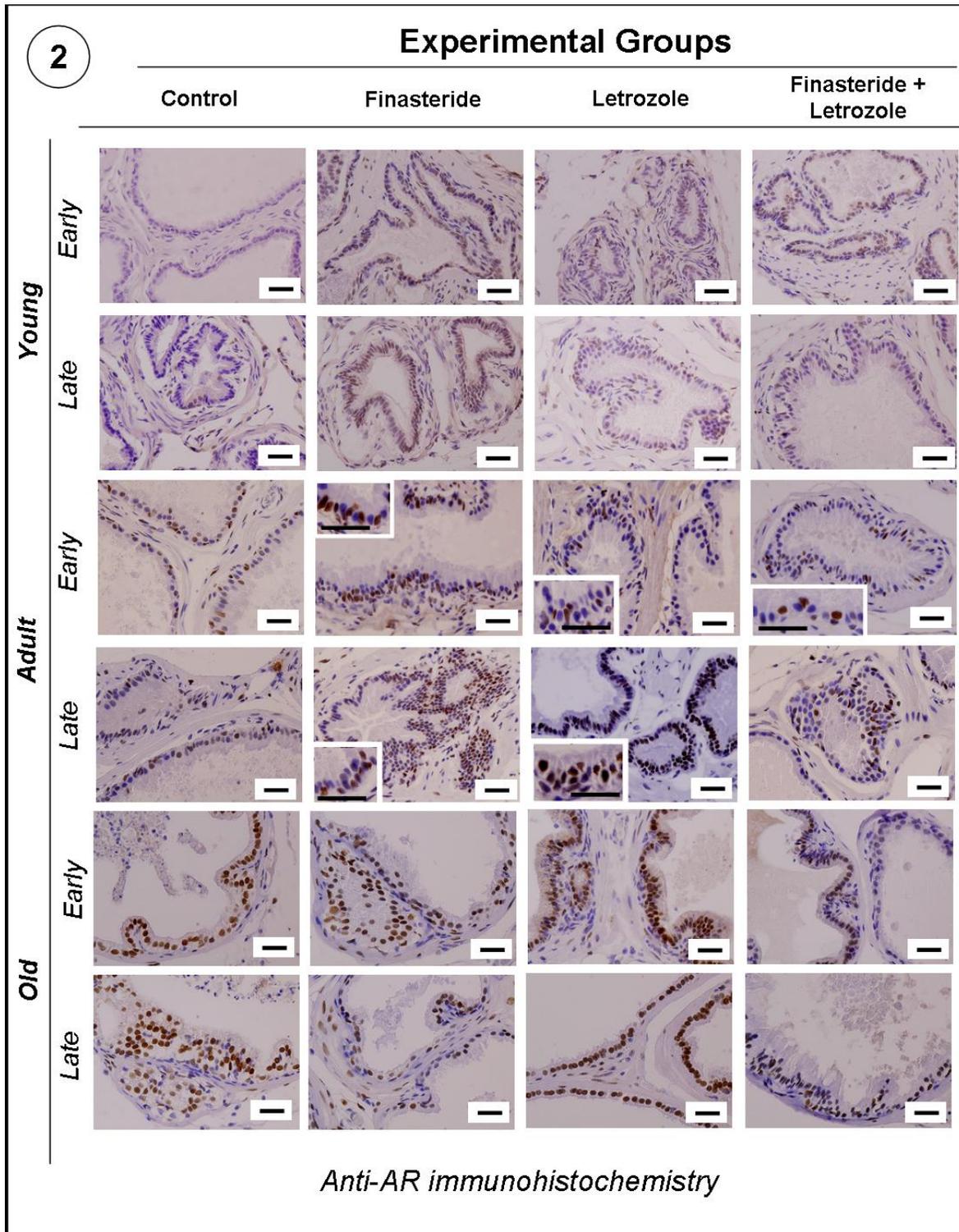
Valores representam média±erro padrão. p?0,05. A análise estatística baseou-se nos testes ANOVA e Tukey. Super-índice alfabético (a, b, c) indica as diferenças inter-grupos, quando comparados os tratamentos e o super-índice numérico (1, 2, 3) indica as diferenças inter-grupos, quando comparadas as etapas de pós-tratamento. I: Fase inicial do período de pós-tratamentos. F: fase final do período de pós-tratamentos.

Tabela III - Níveis hormonais séricos dos animais velhos.

Etapas Pós-tratamento		Hormônios	Tratamentos			
			Ct	Fin	Let	Fin + Let
I	1	T	98.1±9.1 ₁	160.2±18.5	163.4±11.8 ₁	169.5±16.8 ₁
		E ₂	31.5±1.6 ₁ ^a	43.6±2.9 ₁ ^a	50.5±3.5 ₁ ^a	147.6±19.0 ₁ ^a
	7	T	99.5±2.3 ₁ ^a	134.4±8.9 ^b	175.3±9.8 _{1,2} ^c	152.6±4.3 ₁ ^b
		E ₂	42.7±1.8 ₂ ^a	37.2±3.6 ₁ ^a	50.5±4.2 ₁ ^{a,c}	132.7±0.5 ₂ ^{a,c}
F	14	T	97.2±4.4 ₂	117.4±15.8	103.2±2.8 _{1,3}	100.5±1.7 ₁
		E ₂	40.7±1.9 ₁ ^a	36.9±1.5 ₁ ^a	38.7±0.4 ₂ ^a	136.8±1.4 ₁
	21	T	108.3±0.8 ₁ ^a	168.5±11.9 ^b	144.9±19.5 ₁ ^a	132.7±16.4 ₂ ^b
		E ₂	41.7±3.9 ₁ ^a	43.3±8.3 ₂ ^b	28.0±4.4 ₂ ^a	328.7±27.4 ₂ ^b

Valores representam média±erro padrão. $p < 0,05$. A análise estatística baseou-se nos testes ANOVA e Tukey. Super-índice alfabético (a, b, c) indica as diferenças inter-grupos, quando comparados os tratamentos e o super-índice numérico (1, 2, 3) indica as diferenças inter-grupos, quando comparadas as etapas de pós-tratamento. I: Fase inicial do período de pós-tratamentos. F: fase final do período de pós-tratamentos.





CONCLUSÕES GERAIS

O bloqueio individual ou simultâneo das enzimas 5 α -r e Aro, respectivamente por ação da Finasterida e do Letrozol, causou na próstata dos animais analisados, independentemente da idade, notáveis modificações histológicas e fisiológicas.

Tanto a Finasterida, quanto o Letrozol, exerceram os efeitos específicos enquanto eram administrados, o que ficou evidente na fase inicial de análises do período de pós-tratamento. Já a fase final de análise, mostrou-se mais como um período de tentativa de recuperação de um estado funcional mais próximo do normal, do que de consequência dos efeitos das drogas administradas. Com a inibição enzimática simultânea das enzimas 5 α -r e Aro pôde-se notar uma ação sinérgica da Finasterida e do Letrozol que se assemelhava, em todas as idades estudadas, com ação isolada da Finasterida.

Nos animais adultos, as alterações decorrentes dos bloqueios enzimáticos e a tentativa gradual de estabelecer novamente os padrões normais da glândula justificam-se pelo fato do sistema endócrino destes animais ser mais maduro e equilibrado, capaz de se adaptar mais facilmente às novas situações hormonais. Porém, nos animais jovens e velhos a próstata teve uma maior dificuldade em retornar aos padrões morfológicos e fisiológicos normais, provavelmente por serem, nesta fase do desenvolvimento pós-natal, influenciados por um sistema hormonal mais sensível e menos estabilizado, o que ficou ainda mais desequilibrado após os bloqueios enzimáticos.

As concentrações séricas de testosterona e estradiol modificaram-se e oscilaram-se após os tratamentos, porém estes dados reforçam a hipótese de que as enzimas 5 α -r e Aro são essenciais para a manutenção do micro-ambiente hormonal intraprostático durante todo o período pós-natal do animal, uma vez que as alterações morfológicas encontradas nos compartimentos epitelial e estromal da próstata destes animais, independentemente da idade, foram muito semelhantes.

Na próstata dos animais em todas as idades estudadas, a ruptura da interação epitélio-estroma, marcada pela instalação de aparentes regiões desmoplásicas, com aumento e reorganização

de fibras da matriz extracelular e maior número de fibroblastos fenotipicamente modificados e ativados, sustenta a importância destas enzimas na manutenção do balanço entre andrógenos e estrógenos na próstata, fundamentais para o equilíbrio homeostático da glândula.

O bloqueio de enzimas responsáveis pela metabolização de andrógenos parece ser uma ferramenta eficaz para o estudo das relações entre as ações dos hormônios esteróides intraprostáticos e a manutenção da interação epitélio-estroma, uma vez que o desequilíbrio dos níveis androgênico e estrogênico localmente ativados pode dar início a uma reorganização tecidual prostática a partir das regiões desmoplásicas neo-formadas. Fica evidente assim, que a troca de informação entre os compartimentos epitelial e estromal é dependente da ação das enzimas 5 α -r e *Aro*, já que são elas as responsáveis pela ativação hormonal intraprostática.

O aumento observado na expressão de receptores de andrógeno nas células prostáticas dos animais nas diferentes idades, durante o período de pós-tratamento é um indicativo importante da situação hormonal intraprostática. Os novos padrões de expressão dos receptores de andrógeno dão suporte à premissa de que as enzimas são peças fundamentais para regulação da atividade androgênica intraprostática.

O uso do gerbilo *Meriones unguiculatus* para o estudo das relações entre epitélio e estroma e dos componentes celulares e macromoleculares da próstata mostrou-se um excelente modelo experimental. Nossos resultados foram expressivos e reveladores, capazes de contribuir para o entendimento da biologia e etiologia das lesões prostáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alléra A, Lo S, King I, Steglich F, Klingmüller D (2004) Impact of androgenic/antiandrogenic compounds (AAC) on human sex steroids metabolizing key enzymes. *Toxicol* 205:75-85.
- Aoki-Komori S, Sayto TR, Takahashi KW, Tanigushi K (1994) Lectin histochemical studies on the scent gland in the Syrian hamster and Mongolian gerbil. *Jikken Dobutsu* 43(2): 181-190.
- Azzolina B, Ellsworth K, Andersson S, Geissler W, Bull HG, Harris GS (1997) Inhibition of rat α -reductase by finasteride: evidence for isozyme differences in the mechanism of inhibition. *J Steroid Molec Biol* 61(1-2): 55-64.
- Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR (2001) Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of Brown Norway rat prostate. *Endocrinol* 142(9); 4066-4075.
- Bonkhoff H, Fixemer T, Remberger K (1998) Relation between Bcl-2, cell proliferation and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. *Prostate* 34: 251-258.
- Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M (2001) Role of Aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79: 19-25.
- Carson C & Rittmaster R (2003) The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 61 (Suppl 4): 2-7.
- Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior PSL (1997a) Collagen type VI is a component of extracellular matrix microfibril network of prostatic stroma. *Tissue Cell* 29: 163-170.
- Carvalho HF, Vilamaior PSL, Taboga SR (1997b) Elastic system of the ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate* 32: 27-34.
- Carruba G. (2006) Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* 1089:201-217.

- Corradi LS, Góes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2004) Inhibition of 5-alpha-reductase activity as an inductor of stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate. *Differentiation* 72(5): 198-208.
- Cunha GR, Bigsby RM, Cooke PS, Sugimura Y (1985) Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell differ* 17: 137-148.
- Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA. (1996) Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat* 155: 5-17.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ (2002) Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70: 473-485.
- Cunha GR, Wang YZ, Hayward SW, Risbridger GP (2001) Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. *Reprod Fertil Dev* 13:285-296
- Cunha GR, Cooke PS, Kurita T (2004a) Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*, 67(5): 417-434.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. (2004b) Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Ster Bioch Molec Biol* 92(4): 221-236.
- De Marzo AM, Meeker AL, Epstein JI, Coffey DS (1998) Prostate stem cell compartment: Expression of the cell cycle inhibitor p27^{kip1} in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol* 153(3): 911-919.
- De Marzo AM, Platz EA, Stueliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaac W, Nelson W (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev* 7(4):256-269.
- Droller MJ (1997) Medical approaches in the management of prostatic disease. *British J Urol* 79 (Suppl2):42-52.
- Ekman P (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate Suppl*.10: 14-18.
- Farnsworth, WE (1999) Prostate stroma: physiology. *Prostate* 38: 60-72.

- Galbraith, SM & Duchesne, GM (1997) Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. *European Journal of Cancer* 13 (4): 545-554.
- Geller J (1990) Effects of finasteride, a 5-alpha-reductase inhibitor, on prostate tissue androgen and prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1552-1555.
- Grino PB, Griffin JE, Wilson JD (1990) Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126:1165-1172.
- Harada N, Honda S-I, Hatano O (1999) Aromatase inhibitor and enzyme stability. *Endocrine-Related Cancer* 6: 211-218.
- Härkönen PL & Mäkelä SI (2004) Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92: 297-305.
- Harris GS & Kozarich J.W. (1997) Steroid 5 α -reductase inhibitors in androgen-dependent disorders. *Current opinion in chemical biology* 1: 254-259.
- Haynes BP, Dowsett M, Miller WR, Dixon JM, Bhatnagar AS (2003) The pharmacology of letrozole. *J Steroids Biochem Mol Biol* 87: 35-45.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR (1996a). Epithelial development in rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat* 155: 81-93.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR (1996b). Stromal development in ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat* 155: 94-103.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR (1997) Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 79 (Suppl.): 18-26.
- Hedlund PO (2000) Side effects of endocrine treatment and their mechanism: castration, antiandrogens and estrogens. *Prostate Suppl* 10: 32-37.

- Heracek J, Richard H, Martin H, Luboslav S, Jana S, Jitka K, Vaclav E, Michael U, Vlacav M (2007) Tissue and serum levels of principal androgens in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Steroids* 72(4):375-80.
- Hsing AW & Devesa SS (2001) Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemol Rev* 23:3-13.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ (2002) Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 52:213-235.
- Horsfall DJ, Mayne K, Ricciardelli C, Rao M, Skinner JM, Henderson DW, Marshall VR, Tilley WD (1994) Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab Invest* 70 (Suppl.): 753-793.
- Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TWM (2001) Co-administration of Finasterida and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J Endocrinol* 171: 109-118.
- Iehlé C, Radvanyi F, Medina SGD, Ouafik LH, Gerard H, Chopin D, Raynaud J, Martin PM (1999) Differences in steroid 5 α -reductase iso-enzyme expression between normal and pathological human prostate tissue. *J Steroid Bioch Mol Biol* 68: 189-195.
- Ilio KY, Nemeth JA, Sensibar SL, Lee C (2000) Prostatic ductal system in rats: changes in regional distribuion of extracellular matrix proteins during castration-induced regression. *Prostate* 42: 3-10.
- Ito K, Fukabori Y, Shibata Y, Suzuki K, Mieda M, Gotanda K, Honma S, Yamanaka H (2000) Effects of a new steroidal Aromatase inhibitor, TZA-2237, and/or chlormadinone acetate on hormone-induced spontaneous canine benign prostatic hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 143:543-554.
- Jeffers GW, Klei TR, Enright FM (1984) Activation of the jird (*Meriones unguiculatus*) macrophages by the filarial parasite *Brugia paghangi*. *Infect. Immun.*, 43(1): 43-48.

- Jenkins EP, Anderson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell D (1992) Genetic and pharmacological evidences for more than one human steroid 5 α -reductase. *J Clin Invest* 89:293-300.
- Jones D, Gonzales LF, Crews D, Galef BGJr & Clark MM (1997) Effects of the intrauterine position on the metabolic capacity of the hypothalamus of female gerbils. *Physiol Behav* 61(4): 513-519.
- Kamat A, Hinshelwood M, Murry BA, Medelson CR (2002) Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. *Trends in Endoc Metab* 13 (3): 122-128.
- Kirby RS, Christmas TS, Brawer M (1996) *Prostate cancer*. Mosby ed. London, 170p.
- Kreis, T & Vale, R (1999) *Guidebook to the extracellular matrix anchor, and adhesion proteins*. New York: Oxford University Press.
- Labrie F. (1993) Intracrinology: the basis for the rational design of endocrine therapy at all stages of prostate cancer. *Eur Urol* 24 (Suppl 2): 94-105.
- Labrie F, The-Luu V, Lin SX, Simard J, Labrie C (2000) Role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in sex steroid formation in peripheral intracrine tissue. *TEM* 11(10):421-427.
- Lee C, Kozlowski JM, Grayhack JT (1997) Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 31: 131-138.
- Lephart ED, Lund TD, Horvath LT (2001) Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Res* 37:25-37.
- Lin MC, Rajfer J, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF (1993) Testosterone down-regulates the levels of androgen receptors mRNA in smooth muscle cells from the rat corpora cavernosa via aromatization to estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45(5): 333-343.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR (2003) Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, 253: 165-174.
- McNeal JE. (1983) The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr Urol* 4: 3-37.

-
- McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzemeier KH, Risbridger GP (2007) Essential role for estrogen receptor β in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinaol* 148(2):566-574.
- Mizokami A, Koh E, Fujita H, Maeda Y, Egawa M, Koshida K, Honma S, Keller ET, Namiki M. (2004) The adrenal androgen androstenediol is present in prostate cancer tissue after androgen deprivation therapy and activates mutated receptor. *Cancer Res* 64:765-771.
- Moritomo T, Saito H, Watanabe T, Mochizuki K. (1991) Tissue culture on Mongolian gerbil's (*Meriones unguiculatus*) malignant melanoma. *Jikken Dobtsu* 40(3): 385-388.
- Nakada T, Kubota Y, Sasaqawa I, Suzuki H, Watanabe M, Suzuki Y (1994) The effects of oestradiol-17beta on connective tissue protein in rat prostate. *Int Urol Nephrol* 26:327-335.
- Nawa Y, Horii Y, Okada M, Arizono N (1994) Histochemical and cytochemical characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Int Arch Allergy Immunol* 104(3): 249-254.
- Negri-Cesi P, Poleti A, Colciago A, Magni P, Martini P, Mota M (1998) Presence of 5-alpha-reductase and Aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue. *Prostate* 34(4): 283-291.
- Negri-Cesi P, Colciago A, Mota M (1999) 5-alpha-reductase isozymes and Aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate* 41(4): 224-232.
- Nolan, C.C., Brown, A.W. & Cavanagh, J.B. (1990) regional variations in nerve cell response to trimethyltin intoxication in Mongolian gerbil. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 81(2): 204-212.
- Oliveira SM, Leite Vilamaior PS, Corradi LS, Góes RM, Taboga SR. (2007a) Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. *Cell Biol Int. Mar* 31(3): 235-45.

- Oliveira A, Coelho PH, Guedes FD, Mahecha GAB, Hess RA, Oliveira C (2007b) 5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol), an estrogenic metabolite of 5 α -dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ER β expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids in press*.
- Pegorin de Campos SG, Zanetoni C, Góes RM, Taboga SR (2006) Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat Rec A Discv Mol Cell Biol* 288; 723-733
- Pouget C, Fagnere C, Basly J, Habrioux G, Chulia A (2002) New Aromatase inhibitors. Synthesis and inhibitory activity of pyridinyl-substituted flavanone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 12:1059-1061.
- Price, D (1963) Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat Can Inst Monogr* 12: 1-27.
- Redecker, P (1991) Ultrastructural demonstration of neuhaemal contacts in the internal zone of the median eminence of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): correlation with synaptophysin immunohistochemistry. *Histochem* 95(5): 503-511.
- Reese JH, McNeal JE, Redwine EA, Samloff IM, Stamey TA (1986) Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesical. *J. Urol.* 136:1148-1152.
- Rhodes L, Ding VD, Kemp RK, Khan MS, Nakhla AM, Pikounis B, Rosner W, Saunders HM, Feeney WP (2000) Estradiol causes a dose-dependent stimulation of prostate growth in castrated beagle dogs. *Prostate* 44:8-18.
- Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, Mc Pherson SJ (2003) Oestrogens and prostate cancer. *Endocrine-related Cancer* 10:187-191.
- Rittmaster RS (1994). Finasteride (review article). *The New England Journal of Medicine* 330(2): 120-125.
- Rivas A, Fisher JS, McKinnell C, Atanassova N, Sharpe RM (2002) Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in

- combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinol* 143 (12): 4797-4808.
- Roselli CE & Resko JA (2001) Cytochrome P450 Aromatase (CPY19) in the non-human primate brain: distribution, regulation and functional significance. *J Steroid Biochem & Molec Biol* 79: 247-253.
- Rumpold H, Untergasser G, Madersbacher S, Berger P (2002) The development of benign prostatic hyperplasia by trans-differentiation of prostatic stromal cells. *Experimental Gerontology* 37: 1001-1004.
- Santos FCA, Corradi LS, Martinez FE, Taboga SR (2000) Aspectos morfológicos da próstata residual em fêmeas do esquilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*). *Braz J Morphol Sci* 17(s):56.
- Santos FCA & Taboga SR (2002) Interações Epitélio-Estroma na Próstata Feminina: Estudos Experimentais em Gerbilos. In: ME Bauer & EA Jeckel-Neto Ed. *Avanços em Biologia Celular*. EDIPUCRS, Porto Alegre. p.131-135.
- Scarano WR, Cordeiro RS, Góes RM, Taboga SR (2004) Intraepithelial alterations in the Guinea Pig lateral prostate at different ages estradiol treatment. *J Submicrosc Cytol Pathol* 36(2): 141-148.
- Séralini EG & Moslemi S (2001) Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol Cell Endocrinol* 178: 117-131.
- Shibata Y, Fukabori Y, Ito K, Suzuki K, Yamanaka H (2001) Comparison of histological compositions and apoptosis in canine spontaneous benign prostatic hyperplasia treated with androgen suppressive agents chlormadinone acetate and finasteride. *J Urol* 165: 289-293.
- Simpson ER (200) Role of Aromatase in sex steroids action. *J Molec Endocrinol* 25: 149-156.
- Soronen P, Laiti M, Törn S, Härkönen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko i. (2004). Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol* 92: 281-286.

- Steers W (2001) 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology* 58 (Suppl. 6A): 17-24.
- Sung SY & Chung W (2002) Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. *Differentiation* 70: 506-521.
- Suzuki K, Okazaki H, Kurokawa K, Suzuki T, Onuma E, Takanashi H, Mamiya Y, Yamanaka H (1998) Effects of dual inhibition of 5-alpha-reductase and Aromatase on spontaneously developed canine prostatic hypertrophy. *Prostate* 37 (2):70-76.
- Thomson AA (2001) Role of androgen and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction* 121:187-195.
- Thomson AA, Timms BG, Baton L, Cunha GR (2002) The role of smooth muscle in regulation prostatic induction. *Development* 129:1905-1912.
- Tobin VA & Canny BJ (1998) The regulation of gonadotrophin-releasing hormone-induced calcium signals in male rat gonadotrophs by testosterone is mediated by dihydrotestosterone. *Endocrinol* 139(3):1038-1045.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR (2001) Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166: 2472-2483.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P (2005) Benign prostatic hyperplasia; age-related tissue-remodeling. *Experimental Gerontology* 40:121-128.
- Vermeulen A, Kaufman JM, Goemaere S, Pottelberg (2002) Estradiol in elderly men. *Aging Male* 5:98-102.
- Vihko P, Herrala A, Härkönen P, Isomaa V, Kaija H, Kurkela R, Pulkka A (2006) Control of cell proliferation by steroids: The role of 17HSDs. *Mol Cell Endocrinol* 248:141-148.
- Vilamaior PSL, Felisbino SR, Taboga SR, Carvalho HF (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: An possible role for the smooth muscle cells. *Prostate* 45: 253-258.

- Vilamaior PSL, Carvalho HF, Taboga SR (2005) Modulation of smooth muscle cells function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biol Inter* 29(9):809-816
- Wang YC, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha Gr. (2001) Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 68, 270-279.
- Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbel GR (2001) Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganization of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 49: 130-145.
- Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS (1996) Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of castrated rat. *J Clin Invest* 98(11):2558-2563.
- Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS (1999) Androgen-induced regrowth in the castrated rat central prostate: role of 5 α -reductase. *Endocrinol* 140 (10): 4509-4515.
- Wurzel R, Ray P, Major-Wlaker K, Shannon J, Rittmaster R (2007) The effect of dutasteride on intraprostatic concentrations in men with benign prostatic hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 10(2): 49-154.
- Zhang J, Hess MW, Thurnher M, Hobisch A, Radmayr C, Cronauer MV, Hittmair A, Culig Z, Bartsch G, Klocker H. (1997) Human prostatic smooth muscle cells in culture; estradiol enhances expression of smooth muscle cell-specific markers. *Prostate* 30: 117-129.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada **“Inibição da atividade das enzimas 5-alfa-redutase e aromatase na próstata do gerbilo da Mongólia”**

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

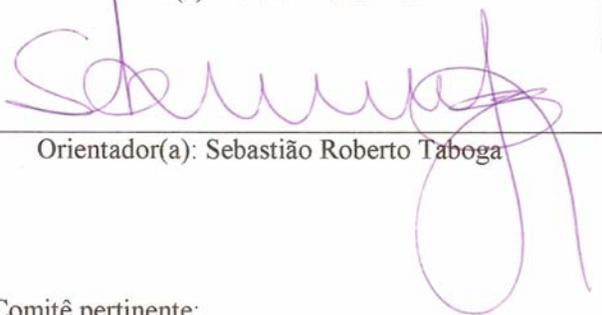
() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº1236-1).

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



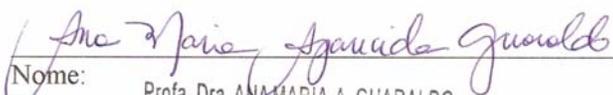
Aluno(a): Lara Silvia Corradi



Orientador(a): Sebastião Roberto Taboga

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Função: Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP