SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIELE LISBOA RIBEIRO

"EFEITOS DA RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA E DO DIABETES NA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS"

Este	e exemplar corresponde à redação fina	al
da D	ese defendida pelo(a) candidato (a mide histor Liberro	1)
6	Lijauely des	
eap	provada 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.

ientadora: Profa. Dra. Rejane Maira Góes -Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

Campinas, 2008

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

R354e	Ribeiro, Daniele Lisboa Efeitos da resistência periférica à insulina e do diabetes na próstata ventral de ratos / Daniele Lisboa Ribeiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientadores: Rejane Maira Góes, Sebastião Roberto Taboga. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Próstata. 2. Diabetes. 3. Resistência à insulina. Células estromais. I. Góes, Rejane Maira. II. Taboga, Sebastião Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
	(rcdt/ib)

Título em inglês: Effects of peripheral insulin resistance and diabetes in the rat ventral prostate. Palavras-chave em inglês: Prostate; Diabetes; Insulin resistance; Stromal cells. Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Rejane Maira Góes, Telma Maria Tenório Zorn, Patrícia Maluf Cury, Eduardo Melani Rocha, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete. Data da defesa: 30/05/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 30 de maio de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rejane Maira Góes (Orientadora)

Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha

Profa. Dra. Patricia Maluf Cury

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Profa. Dra. Débora Damasceno

aul Assinatura there 400 Assinatora Assinatura

@ duardo pilo Assinatura

Assinatura

Assinatura Assinatura

Assinatura

Dedicatória

Á Deus, por me abrir muitas portas, me guiar e dar forças em todos os momentos da vida.

Á minha família: meus pais Pedro e Lúcia; meus irmãos Patrícia e Luiz, Marcelo e Janaina; e queridos sobrinhos Gabriel, João Marcelo, Guilherme, Vinícius e Júlia, pelo carinho e amor que me dão forças para seguir em frente e vencer.

Ao meu amor, Mauricio, por ser meu grande companheiro e fazer parte da minha vida.

Agradeciment os

Aos professores que participaram da pré-banca e da banca examinadora, pela disponibilidade e preciosas contribuições para esse trabalho: Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn, Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino, Profa Dra. Wilma de Grava Kempinas; Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, Profa. Dra. Valéria H. A. Cagnon Quitete, Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel e Profa. Dra. Débora Damasceno.

A minha orientadora Profa. Dra. Rejane Maira Góes, pela generosidade no compartilhamento do conhecimento científico; pela orientação minuciosa desse trabalho, por sua confiança e amizade. Obrigada por compreender os inúmeros contratempos, por ter acreditado nesse projeto e se proposto a aprender comigo uma nova linha de pesquisa.

Ao co-orientador Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por toda ajuda dispendida nesse trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Per-Anders Abrahamsson e Dra. Nishtman Dizeyi, por ter me disponibilizado seu laboratório na Universidade de Lund para a realização do estágio de Doutorado no Exterior.

Ao Prof. Dr. Antônio José Manzato, pela assessoria est at ística.

Ao Prof. Dr. César Tadeu Spadella pela colaboração na indução do diabetes e disponibilização de seu laboratório na Faculdade de Medicina de Botucatu.

Ao amigo Luiz Roberto Faleiros Jr, pelo auxílio técnico e por fazer o dia-dia no laboratório mais alegre e descontraído.

Aos amigos: Ana Maria, Ricardo, Sabrina, Silvana, Fernanda, Manoel, Sérgio, Ana Paula, Lara, Wellerson, Lívia, Fanny e Marina pela convivência, colaboração e amizade.

Em especial, à Tatiana, Maê e Alberto, pela amizade sincera, carinho e por me aguentar nos momentos difíceis.

À secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, Liliam A. Panagio, pela dedicação durante todos esses anos.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida e pela oportunidade de participar no Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE).

Sumário

Capítulo 1- Resumo	8
Capítulo 2- Abstract	10
Capítulo 3- Introdução	11
Capítulo 4- Objetivos	20
Capítulo 5- Artigos científicos	21
5.1- Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid treated rats	21
5.2- Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats	32
5.3- Diabetes induz remodelação estromal e aumento de proteoglicanos de condroitim	
sulfato na próstata ventral de ratos	58
Capítulo 6- Conclusões e Considerações Finais	83
Capítulo 7- Referências Bibliográficas	85

RESUMO

O diabetes mellitus leva a complicações em diversos órgãos, incluindo as glândulas acessórias do sistema genital masculino. Na próstata, é bem estabelecido que essa doenca acarreta atrofia epitelial, mas ainda não é claro o seu efeito sobre os componentes estromais e sua associação com alterações patológicas. Esse estudo visa esclarecer três aspectos controversos referentes ao impacto do diabetes sobre a próstata: 1) como as condições metabólicas do diabetes crônico não tratado afeta o compartimento estromal, em especial os componentes da matriz extracelular; 2) as possíveis associações entre essa doença e a incidência de alterações neoplásicas e 3) examinar as alterações prostáticas causadas pela resistência à insulina em comparação com o diabetes. A resistência à insulina, induzida pela administração do glicocorticóide dexametasona (1mg mg/Kg pc, durante 5 dias) causa, em curto prazo, efeitos semelhantes aos do diabetes, tais como a atrofia epitelial e alteração fenotípica das células musculares lisas (cml). Contudo, esta situação difere do diabetes pela atrofia das cml e ativação dos fibroblastos. Os efeitos do diabetes (90 dias), induzido experimentalmente pela administração de aloxana (45 mg/Kg pc), foram examinados com microscopia de luz, imunocitoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. Nesta situação experimental observou-se uma incidência de 64% de neoplasia intraepitelial (NIP) e 35% de adenocarcinoma. Também se verificou uma ampla variação da resposta histológica da próstata entre os indivíduos diabéticos. Assim, três grupos foram diferenciados segundo a gravidade das alterações teciduais: 1) modificações leves; 2) intensa atrofia e 3) ocorrência de lesões pré-malignas (NIP e atrofia inflamatória proliferativa- PIA) e malignas (adenocarcinomas). Nos dois primeiros grupos, a remodelação estromal caracteriza-se por um aumento da espessura da membrana basal acinar, maior ocorrência de colágeno e de grandes proteoglicanos de condroitim sulfato. Esses dados em conjunto indicam que o diabetes induzido experimentalmente modifica o ambiente estromal de maneira a favorecer o desenvolvimento de lesões patológicas na próstata. Devido a complexidade das interações metabólicas relacionadas ao diabetes, torna-se difícil definir os principais fatores responsáveis pelas alterações acima mencionadas. Entretanto, é possível

afirmar os efeitos prejudiciais da resistência à insulina e do diabetes para a morfofisiologia prostática.

Capítulo 2

ABSTRACT

Diabetes mellitus leads to complications in several organs including acessory glands of the male genital system. In the prostate, it is well established that diabetes causes epithelial atrophy, but its effects on the stromal components is not defined, as well as its relation with pathological alterations in the prostate. This study aims to elucidate three controversial aspects decurrent from the impact of diabetes in the prostate:1) How the metabolic conditions of chronic diabetes affects the stromal compartiment, specially extracellular matriz components; 2) the possible association between diabetes and prostatic neoplasic alterations and 3) Evaluate prostatic changes caused by insulin resistence in comparison to diabetes. Insulin resistence, induced by administration of the glucocorticoid dexamethasone (1mg mg/Kg bw, 5 days) causes, in short term, similar effects to diabetes, such as epithelial atrophy and phenotypical alteration in the smooth muscle cells (smc). However, this situation is different from diabetes regarding the smc atrophy and fibroblast activation. The effects of chronic diabetes (90 days), induced experimentally by alloxan (45 mg/Kg bw), were examined by light microscopy, imunohistochemistry and transmission electron microscopy. In this experimental situation, it was observed the incidence of 64% of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and 35% of adenocarcinoma. It was also analysed a wide variation in the histological answer between diabetic individuals. Thus, three groups was determined according to the severity of their tissue alterations: 1) light modifications; 2) intense atrophy and 3) occurrency of pre-malignant (PIN and proliferative inflammaotry atrophy-PIA) and malignant lesions (adenocarcinoma). In the first two groups, the stromal remodelation characterize for thickning of acini basement membrane, higher distribution of collagen and large proteoglycans of chondroitin sulphate. Together these data indicates that induced diabetes changes the stromal environment and consequently promotes the development of pathological lesions in the prostate. Due to the complexity of metabolic interactions related to diabetes, it is not possible to define the main factors responsible for those changes above mentioned. However, it is possible to confirm the injurious effects of insulin resistence and diabetes for the prostatic morfophisiology

INTRODUÇÃO

3.1 Considerações sobre o diabetes mellitus

O diabetes já era uma doenca conhecida séculos antes de Cristo. Foi Areteu da Capadócia quem, no século II da era cristã, deu a esta afecção o nome de diabetes, que em grego significa sifão, referindo-se à eliminação excessiva de água pelo rim visto que a água entrava e saía do organismo sem fixar-se nele (polidipsia e poliúria, respectivamente). Nos séculos posteriores, não se encontram, nos escritos médicos, referências ao diabetes, até que após um longo intervalo, Thomas Willis em 1679, fez uma descrição magistral dessa doença. Foi ele quem, referindo-se ao sabor doce da urina, lhe deu o nome de diabetes mellitus (sabor de mel). Em 1775, Dopson relacionou o sabor doce da urina à presenca de glicose (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007). Os primeiros trabalhos experimentais relacionados com o metabolismo dos carboidratos foram realizados por Claude Bernard, quem descobriu, em 1848, o glicogênio hepático e provocou a aparição de glicose na urina por meio da excitação dos centros bulbares de cães. Segundo Schellini (1992), a relação do diabetes com o pâncreas só foi provada por Meris e Minkowski, em 1889, quando removeram o pâncreas de cães e notaram o surgimento de diabetes, confirmando a relação de algum hormônio pancreático com o desenvolvimento da doenca. A partir desse trabalho, a busca do suposto hormônio produzido pelas ilhotas de Langerhans, iniciou-se de imediato. Então, os jovens canadenses Frederick Banting e Charles Best, conseguiram, em 1921, isolar a insulina e demonstrar seu efeito hipoglicêmico. Esta descoberta significou uma das maiores conquistas médicas do século XX porque transformou as expectativas médicas e a vida dos diabéticos ampliando horizontes no campo experimental e biológico para o estudo da diabetes e do metabolismo dos glicídios (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007).

Mais do que qualquer outra desordem, o *diabetes mellitus* (DM) tem se tornado um representante da doença do mundo moderno. Sua expansão global espelha mudanças sócio-econômicas, principalmente no que se refere ao estilo de vida ocidental. É estimado que a incidência mundial de diabéticos altere de 250 milhões, em 2007, para 380 milhões em 2025

(Rosengren, 2007). No Brasil, a prevalência em 2000 era de 4,5 milhões e a perspectiva para 30 anos é de 11 milhões de pacientes diabéticos (Organização Mundial de Saúde, 2007).

O DM é uma desordem de etiologia múltipla, decorrente de lesões nas ilhotas de Lagerhans e conseqüente ausência de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos (Lernmark, 1985). Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Ozturk *et al.*, 1996). Normalmente, a glicemia é controlada através de ações opostas de hormônios como a insulina e o glucagon (Anderson *et al*, 1994). Após a ingestão de comida, os níveis de glicose aumentam e a insulina promove a captação periférica de glicose no fígado, tecido adiposo e células musculares. Assim, ela inibe a glicogenólise e a neoglicogênese hepática e aumenta a síntese protéica e lipídica, garantindo que a energia esteja salva para futura utilização (Fuchs & Wannmacher, 1992). Em condições de jejum, o glucagon promove a mobilização da energia estocada, principalmente através da produção hepática de glicose. Dessa maneira, a insulina é um hormônio essencialmente anabólico e o glucagon, catabólico. A ação da insulina está perturbada em condições diabéticas, causando severos prejuízos nas funções fundamentais do corpo (Migliorini & Kettelhut, 1999).

Duas maiores formas de DM são tradicionalmente reconhecidas. O **diabetes tipo 1** normalmente é diagnosticado em indivíduos jovens e resulta de uma destruição autoimune das células beta produtoras de insulina no pâncreas. Ela é distinguida pelos seus baixos ou ausentes níveis de insulina no sangue, sendo necessário o tratamento diário com insulina para a sobrevivência desses pacientes. **O diabetes tipo 2** é a forma mais comum e tipicamente afeta os indivíduos com estilo de vida sedentário e obesos (Zimmet, 1998; Zimmet *et al*, 2001). Sob essas condições, a resistência à ação da insulina nos tecidos periféricos é freqüentemente predominante. Na maioria dos casos de resistência à insulina, a normoglicemia é mantida através do aumento da secreção de insulina pelas células beta. Entretanto, se essas células falham ao se adaptar a nova demanda de insulina, por danos inatos ou defeitos adquiridos, ocorre uma piora na deficiência da insulina e o diabetes tipo 2 se desenvolve (Bell & Polonsky, 2001).

Os sintomas clássicos do DM são perda de peso, polidpsia e poliúria. Entretanto, um alto grau de hiperglicemia pode ocasionar alterações funcionais ou patológicas antes que o diagnóstico seja estabelecido (Organização Mundial de Saúde, 1999). As conseqüências do DM

em longo prazo incluem disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins (nefrosclerose e glomerulonefrite), olhos (retinopatia, catarata e glaucoma), nervos, coração e vasos sanguíneos (hipertensão, aterosclerose e risco de infarto do miocárdio e até gangrena) (Stefan, 1996). No sistema genital, tem sido descrito que o DM diminui o peso das glândulas sexuais acessórias, provoca impotência sexual e infertilidade associada à diminuição da quantidade e qualidade dos espermatozóides (Kolodny *et al.*, 1974; Steger & Rabe, 1997, Scarano *et al.*, 2006)

Drogas hiperglicêmicas

Vários estudos têm sido realizados para elucidar os efeitos deletérios do diabetes nos principais sistemas orgânicos. Para isso, a utilização de modelos animais que desenvolvem o diabetes espontaneamente ou por indução com drogas específicas é muito comum (Ozturk et al, 1996). Existem alguns agentes hiperglicêmicos que inibem a secreção de insulina permitindo que o nível de glicose no sangue se eleve. Dentre eles, destacam-se o diazóxido, estreptozotocina, fenitocina e aloxana (Gilman & Goodman 1975). Compostos químicos, tais como a aloxana e estreptozotocina, tem o poder de induzir o diabetes em animais e servem como modelos para o estudo dos múltiplos aspectos da doença. A droga aloxana (5,6 dioxiuracil monohidrato) causa efeitos citotóxicos nas células beta das ilhotas de Langerhans pancreáticas, levando a um estado irreversível de diabetes (Kovacs et al., 1998; Avedano et al., 1999). Ao induzir o DM em ratos com o uso da aloxana, são constatadas alterações histológicas que resultam em necrose e completo desaparecimento das células beta nas ilhotas pancreáticas (Duarte, 1996). A inibição da secreção de insulina causada pela aloxana é bem documentada, mas os mecanismos pelos quais ocorre a toxicidade nas células beta ainda não são bem entendidos. Entretanto, estudos mostram que a aloxana se acumula seletivamente nas células β afetando o potencial de membranas bem como os canais de íons e levando-as a apoptose (Herson & Arshford, 1997).

3.2 Estrutura Prostática

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino com função exócrina, que circunda a parte proximal da uretra pélvica, tanto em homens quanto em roedores (Price, 1963). A próstata humana apresenta três regiões bastante distintas no que se refere à organização histológica e incidência patológica, designadas zonas de transição, zona central e

zona periférica (McNeal, 1988a). Esta última constitui cerca de 70% da massa prostática (McNeal, 1988a). Nos roedores observa-se um complexo prostático formado por quatro pares de lobos os quais drenam suas secreções através de ductos para a uretra e são designados, segundo a sua posição, anterior, ventral, lateral e dorsal (Jesik *et al.*,1982). Uma considerável heterogeneidade é observada, quanto à sensibilidade androgênica, entre os diferentes lobos prostáticos, sendo o lobo ventral o que apresenta resposta mais semelhante à próstata humana (Prins *et al.*, 1992).

A próstata é composta por uma parte epitelial e outra estromal que em conjunto formam os túbulos secretores e ácinos da glândula (McNeal, 1988b). O epitélio é constituído predominantemente pelas *células luminais secretoras*, incluindo também um pequeno número de *células neuroendócrinas* e as *células basais*, em freqüência intermediária (di Sant'Agnese, 1991; Singh *et al.*, 2006). Este último tipo celular localiza-se entre a membrana basal e as células luminais e exibe maior potencial proliferativo. Além disso, entre esta população de células encontram-se as células-tronco (Singh *et al.*, 2006). Estudos recentes propõem que as células-tronco (andrógeno independentes) dão origem a dois tipos celulares: outras células-tronco e células "transit amplify", ambas andrógeno independentes. Essas últimas apresentam um fenótipo intermediário entre as células basais e luminais e se dividem rapidamente, formando novas células com limitada capacidade proliferativa que se diferenciam em células luminais (Miki & Rhim, 2007).

Cada tipo celular apresenta um fenótipo distinto e uma função específica (Wang et al., 1979). As células luminais secretoras produzem fosfatases ácidas, PSP-94 (βmicroseminoproteína) e o antígeno específico prostático (PSA). O PSA é uma glicoproteína que funciona como protease para a liquefação do sêmen aumentando a motilidade dos espermatozóides (Lilja et al., 1987; Costello & Franklin, 1994). Desde que o PSA foi descoberto, ele é alvo de investigações básicas e clínicas, pois seus níveis séricos elevados estão associados com desordens prostáticas (Denmead & Isaacs., 2004). As células neuroendócrinas secretam peptídeos e fazem parte do sistema endócrino disperso, também conhecido como APUD (di Sant'Agnese, 1992). Elas estão dispostas entre as demais células epiteliais ou podem formar agregados, sendo preferencialmente identificadas na porção ductal da próstata, principalmente nos ductos periuretral e uretral. (Delellis & Dayal, 1992). A natureza molecular dos peptídeos secretados pelas células neuroendócrinas tem sido amplamente identificada. Entretanto, o papel funcional que essas células exercem na próstata ainda é pouco conhecido, sendo sugerido que elas participem ativamente no desenvolvimento normal da glândula. Estudos com células tumorais prostáticas *in vitro* têm demonstrado que os fatores produzidos pelas células neuroendócrinas podem ter um potencial proliferativo (Dizeyi *et al.*, 2002) indicando, conforme sugerido anteriormente (Cohen *et al.*, 1993) que elas podem estar envolvidas na modulação dos processos patológicos da próstata.

3.3 Fisiologia da próstata

O funcionamento prostático é dependente da ação constante de andrógenos. A produção destes esteróides sexuais é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. O hormônio gonadotrófico- GnRH- é secretado em pulsos no hipotálamo estimulando a secreção do hormônio luteinizante- LH- na hipófise (Dufau, 1988). O LH age nas células de Leydig dos testículos induzindo a produção de andrógenos. O principal andrógeno circulante no homem é a testosterona, sendo a sua maior porção produzida pelos testículos (95%) e uma menor porção (5%) gerada pelo precursor de andrógenos a dihidroepiandrostenediona (DHEA) nas adrenais (Labrie et al., 2001). Na próstata, a testosterona é convertida em um andrógeno mais potente, a 5alfa- dihidrotestosterona, pela enzima 5-alfa-redutase (Wilson, 2001). Existem duas formas da enzima, que são designadas tipo 1 e tipo 2, sendo esta última considerada mais específica para as células epiteliais prostáticas, enquanto a tipo 1 está relacionada com doenças prostáticas (Thomas et al., 2005). A testosterona livre entra na célula onde é convertida em dihidrotestosterona - DHT. Ambos os tipos de andrógenos podem se ligar ao receptor de andrógeno que está localizado no núcleo, porém a DHT forma um complexo mais estável com o receptor sendo, portanto, 3-10 vezes mais potente que a testosterona. A ligação dos andrógenos leva a uma ativação dos receptores específicos (AR), por um processo que inclui a dissociação de "heat-shock- proteínas" (HSP), hiperfosforilação, mudanças conformacionais e a dimerização do AR (Huang et al., 2002).

O AR é um membro da superfamília de receptores esteróides e é constituído de 3 domínios: 1- domínio de ativação transcricional; 2- domínio de ligação ao DNA e 3- domínio de ligação do andrógeno no terminal carboxílico (Carson-Jurica *et al.*, 1990). O complexo

andrógeno-receptor se liga a uma seqüência específica do DNA, chamada elemento responsivo aos andrógenos (ARE), e esse evento leva a alterações na expressão gênica e síntese protéica, modulando as ações celulares dependentes de andrógenos como, por exemplo, a produção de PSA (Lindzey *et al.*, 1994).

O desenvolvimento e crescimento normal da próstata bem como a sua manutenção adulta dependem de interações críticas entre as células epiteliais e o estroma, moduladas principalmente por andrógenos (Cunha *et al.*, 2003). Desse modo, os processos biológicos que ocorrem nas células epiteliais são controlados indiretamente por mediadores dependentes de andrógenos de origem estromal (Hayward & Cunha, 2000). Uma vez que o estímulo androgênico atua no estroma, esse último age no epitélio, que por sua vez produz fatores de crescimento que apresentam efeito tanto localmente como no estroma. Esse mecanismo é denominado interação epitélio-estroma e é de fundamental importância na manutenção morfofisiológica da glândula (Marker *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2004).

Ainda que os andrógenos, sem dúvida, sejam essenciais para o funcionamento da próstata, recentes estudos vêm demonstrando que outros hormônios não androgênicos exercem papel na regulação da homeostase prostática. Risbridger *et al.* (2003) relataram que os estrógenos também podem afetar o crescimento e a diferenciação desta glândula, sendo o balanço entre andrógenos e estrógenos fundamental, não apenas para sua manutenção funcional, mas também para o desenvolvimento de doenças. Além dos hormônios esteróides sexuais, a insulina e os glicocorticóides (Cleutjens *et al.*, 1997; Steger & Rabe, 1997) têm sido descritos como importantes hormônios na regulação da fisiologia prostática. A observação de que a cultura de células prostáticas é mais satisfatória quando a testosterona e a insulina são usadas simultaneamente (Lostroh, 1971) reforça a importância deste hormônio no funcionamento da glândula. Estudos recentes mostram que o diabetes promove redução no peso da próstata ventral e atrofia no epitélio secretor em camundongos indicando que a ausência de insulina, a hiperglicemia e a queda androgênica decorrentes do diabetes afetam o funcionamento da glândula (Cagnon *et al.*, 2000, Ribeiro *et al.*, 2006).

3.4 Compartimento estromal

Recentemente, uma série de evidências tem atribuído um papel significativo ao compartimento estromal para a fisiologia prostática e para o desenvolvimento de patologias nessa glândula (Ricke *et al.*, 2005). Esse compartimento compreende vários tipos celulares tais como, células musculares lisas, fibroblastos, linfócitos, granulócitos, macrófagos e uma abundância de fibras nervosas (Lin & Bissel, 1993). A principal função das células estromais, em especial os fibroblastos, é sintetizar os componentes da matriz extracelular enquanto as células musculares lisas são responsáveis pela contração da glândula e pela interação epitélio- estromal (Aumüller & Seitz, 1990; Cunha *et al.*, 2004).

A matriz extracelular corresponde a um ambiente dinâmico formado por um complexo arranjo de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (Tuxhorn et al., 2001). Os componentes estruturais tais como colágeno e fibras elásticas, proporcionam rigidez mecânica e flexibilidade ao tecido, servindo também como substrato para a adesão celular e migração, as quais são mediadas pelas glicoproteínas adesivas laminina e fibronectina (FN) (Carvalho et al., 1997). A FN promove a adesão e migração celular desempenhando papel fundamental na morfogênese e diferenciação de células e tecidos em diferentes sistemas. Além disso, a FN influencia diversos processos biológicos, tais como a inflamação, reparo tecidual e trombose (Romberger, 1997). Embora seja descrito que a FN é sintetizada principalmente pelos fibroblastos, pouco se sabe sobre a sua função na próstata (Albrecht et al., 1999). Os proteoglicanos são moléculas híbridas, de uma ampla diversidade bioquímica e funcional compostas por pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicano (GAG) ligado covalentemente a um core protéico (Iozzo, 1998). Os GAGs são polissacarídeos complexos formados por unidades repetidas de dissacarídeos, nos quais um açúcar é uma hexamina (glucosamina ou galactosamina) e o outro é um açúcar neutro ou o ácido hexurônico (ácido glicurônico ou idurônico) (Wight et al 1991). Até o momento, quatro tipos de GAGs foram descritos para a próstata humana normal, sendo o condroitim e o dermatam sulfato predominantes (Deklerk, 1983). Os proteoglicanos podem se ligar aos componentes da matriz extracelular, mediar a ligação de células a matriz extracelular e capturar moléculas solúveis como fatores de crescimento (Ruoslahti, 1989). Por esse motivo, desempenham um amplo espectro de funções, incluindo os eventos mais dinâmicos da vida celular como o reconhecimento, crescimento, diferenciação e proliferação celular, sendo,

portanto, considerados importantes elementos moduladores da função epitelial (Hay, 1995; Park *et al*, 2000; Stepp *et al.*, 2002).

Separando o compartimento epitelial do estromal existe uma camada amorfa de matriz extracelular, conhecida como membrana basal. Além de promover a adesão mecânica das células aos demais componentes estromais, a membrana basal influencia o comportamento celular de várias maneiras controlando a adesão, a expressão gênica, a migração, a proliferação e a morte celular (Timpl, 1996). A rede tridimensional da membrana basal é formada de filamentos eletrondensos constituídos de quatro componentes: colágeno IV, laminina, nidogênio e proteoglicano de heparam sulfato. (Leblond & Inoue, 1988; Inoue & Leblond 1989). O colágeno tipo IV, principal componente estrutural da membrana basal, devido às suas características moleculares, se auto-agrega para formar uma trama com os demais componentes (Aumailley & Gayraud, 1998). As lamininas são glicoproteínas adesivas típicas desta região, que também possuem capacidade de auto-agregação e podem interagir com a fibronectina (Timpl, 1996).

Os trabalhos sobre as variações nos componentes da membrana basal da próstata de animais diabéticos são inexistentes na literatura. Entretanto, estudos em outros sistemas têm demonstrado um envolvimento dos proteoglicanos de heparam sulfato perlecam, típico das membranas basais, em complicações decorrentes do diabetes (Bollineni *et al.*, 1997). Conde-Knape (2001) relatou que durante essa doença, a estrutura e a composição da membrana basal dos capilares de glomérulos renais sofrem profundas alterações, tais como espessamento acompanhado da diminuição de cargas negativas dos proteoglicanos, prejudicando a filtração glomerular e acarretando nefropatias (Edge & Spiro, 2000). Outros estudos mostram que o diabetes causa um aumento na deposição de matriz extracelular nos rins, relacionando esse evento com alterações patológicas renais (Cadaval *et al.*, 2000). A literatura revela ainda, que o diabetes promove alterações nos proteoglicanos não só da membrana basal dos capilares do tecido muscular podendo, por isso, prejudicar também outros tecidos (Yokoyama *et al.*, 1997).

3.5 Justificativa

Considerando-se que as desordens metabólicas, tais como obesidade, diabetes e a resistência à insulina são relatos freqüentes da população mundial, os estudos sobre os efeitos do diabetes nos diferentes sistemas orgânicos são de grande importância. Estudos recentes têm demonstrado importantes alterações no epitélio (Cagnon *et al.*, 2000) e no estroma da próstata de camundongos diabéticos, como o espessamento da membrana basal, remodelação das fibras da matriz extracelular e modificações morfológicas na célula muscular lisa (Ribeiro *et al.*, 2006). Esses achados foram acompanhados de um aumento da incidência de neoplasias intraepiteliais, fato que sugere um comprometimento da interação epitélio-estromal nos animais diabéticos. Contudo, esses trabalhos não relacionam essas alterações morfológicas com as possíveis variações na expressão de componentes específicos da matriz extracelular. Assim, sabendo-se da importância do ambiente extracelular para a estrutura tecidual e modulação das atividades celulares, torna-se interessante avaliar em detalhes suas alterações na próstata de animais diabéticos.

Alguns trabalhos sugerem que o diabetes leva à piora dos sintomas do trato urinário e favorece a incidência de câncer de próstata, entretanto, esse assunto ainda é bastante controverso (Ilic *et al*, 1996; Weiderpass *et al.*, 2002). Desse modo, nesse momento, é essencial o esclarecimento sobre a relação do diabetes com a incidência de lesões malignas na próstata.

As situações experimentais envolvendo o diabetes inevitavelmente geram a dúvida sobre o papel da hiperglicemia e da insulina nas alterações observadas. Os glicocorticóides são hormônios conhecidos como agentes diabetogênicos, causando resistência periférica à insulina, hiperglicemia e dependendo da dosagem, diabetes tipo 2 (Rafacho *et al.*, 2007). Os trabalhos que relatam os efeitos do uso de glicocorticóide bem como da resistência à insulina na morfofisiologia prostática são inexistentes na literatura. A utilização de diferentes situações da ação da insulina tais como o diabetes (redução de insulina) e a resistência à insulina (excesso e baixa eficiência de insulina) são importantes para o esclarecimento da sua ação e importância no funcionamento da próstata. Desse modo, adicionalmente ao modelo experimental de diabetes induzido pela aloxana, optamos, no decorrer do trabalho, pela utilização do modelo de resistência à insulina, induzida pelo glicocorticóide dexametasona, para a comparação dos dados.

Capítulo 4

OBJETIVOS

O presente estudo consiste de três frentes de investigação que visam ampliar o conhecimento a respeito dos efeitos do diabetes sobre a morfofisiologia prostática e esclarecer três aspectos ainda controversos referentes a esse assunto: 1) como as condições metabólicas do diabetes crônico não tratado afetam o compartimento estromal da glândula e em especial os componentes da matriz extracelular; 2) as possíveis associações entre essa doença e a incidência de alterações neoplásicas e 3) examinar as alterações prostáticas frente à outra situação de ineficiência de insulina (resistência à insulina) em comparação com o diabetes.

Capítulo 5

ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1- Artigo 1

Ribeiro DL, Rafacho A, Bosqueiro JR, Taboga SR, Góes RM. 2008. Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid treated rats. *Cell & Tissue Research*. (in press)

REGULAR ARTICLE

Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid-treated rats

D. L. Ribeiro & A. Rafacho & J. R. Bosqueiro & S. R. Taboga & R. M. Góes

Received: 8 October 2007 / Accepted: 10 January 2008 # Springer-Verlag 2008

Abstract Glucocorticoid hormones (GCs) have been widely used for the treatment of prostate cancer because of their inhibitory property against tumour growth. However, their mechanism of action in the prostate has received little attention. Excess GCs can lead to peripheral insulin resistance resulting in hyperglycaemia and hyperinsulinaemia. Insulin plays an important role as a cellular stimulant and high levels are related to low levels of androgens. Our objective has been to describe the effects of insulin resistance induced by dexamethasone treatment on the

This work formed a part of the doctoral thesis of D.L. Ribeiro and was supported by CAPES (Coordinating Body for Training), CNPq (Brazilian National Research and Development Council), and FAPESP (State of São Paulo Research Foundation).

D. L. Ribeiro Department of Cell Biology, State University of Campinas, UNICAMP,

A. Rafacho Department of Physiology and Biophysics, State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil

J. R. Bosqueiro Department of Physical Education, São Paulo State University - UNESP, Bauru, Brazil

S. R. Taboga R. M. Góes Department of Biology, São Paulo State University, UNESP, São José do Rio Preto, Brazil

R. M. Góes (🍏

Department of Biology, São Paulo State University, UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265 Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo 15054–000, Brazil e-mail: remagoes@ibilce.unesp.br

morphology of rat ventral prostate. Male adult Wistar rats received daily intraperitoneal injections of dexamethasone or saline for five consecutive days after which the rats were killed and the ventral prostate was removed, weighed and prepared for conventional and transmission electron microscopy (TEM). Dexamethasone treatment resulted in atrophy and decreased proliferative activity of prostatic epithelial cells. TEM analysis revealed changes in the epithelium-stroma interface, with some interruptions in the basement membrane. Fibroblasts showed a secretory phenotype with dilated endoplasmic reticulum. Smooth muscle cells exhibited a contractile pattern with 50% atrophy, an irregular membrane and twisted nuclei. Mitochondrial alterations, such as enlarged size and high electron density in the mitochondrial matrix, were also detected in smooth muscle cells. Insulin resistance induced by dexamethasone is thus associated with epithelial atrophy similar to that described for diabetic rats. However, GCs are responsible for morphological changes in the stromal cell population suggesting the activation of fibroblasts and atrophy of the smooth muscle cells.

Keywords Prostate · Insulin resistance · Glucocorticoids · Stroma · Smooth muscle cell · Rat (Wistar)

Introduction

The prostate is the most studied accessory gland of male reproductive system because of the high incidence of pathologies including prostate cancer and benign hyperplasia. Prostate cancer now surpasses lung cancer as the most commonly diagnosed cancer in men living in the United States and is the second leading cause of cancer death (Ross and Kantoff 2007). Androgens play a key role in prostate function and promote paracrine interactions between the epithelium and stroma to ensure morpho-physiological maintenance within this gland (Hayward and Cunha 2000). Moreover, androgens are related to the progression of benign and malignant diseases in the gland (Cunha et al. 2003). Androgen dependency in prostate cancer is well documented, although recent studies have shown that various nonandrogenic hormones, such as oestrogen, prolactin, insulin and glucocorticoids (GC), can also interfere in prostatic homeostasis and modulate cellular activity (Bodker et al. 1999; Reiter et al. 1999).

>GCs are natural steroid hormones produced by the adrenal glands and are found at high levels after physical activity or emotional stress (Andrews et al. 1999; Albrecht et al. 2002). They interfere with important cellular mechanisms, such as proliferation and extracellular matrix synthesis, and respond to external factors (Durant et al. 1986). Furthermore, GCs are known as diabetogenic hormones because they can stimulate hepatic glucose production and induce peripheral insulin resistance and type 2 diabetes (Jeong et al. 2001). When an impairment of peripheral insulin action (in muscle, adipose and hepatic tissues) occurs, the endocrine pancreas exhibits an adaptation characterized by increased insulin secretion in order to maintain blood glucose levels at normal ranges. However, when this loop is disrupted, i.e. during type 2 diabetes, the pancreatic B cells are overstimulated and cellular damage is established (Porte 1999).

GCs are widely used in the treatment of advanced prostate cancer because they have palliative effects, decrease prostate-specific antigen levels and improve symptoms (Saika et al. 2001). The therapeutic role of hormones including oestrogen and androgens in prostate cancer is well established and their tissue effects have been widely studied. Althought some clinical studies using GC as a palliative drug have been reported, the effects of these hormones on prostatic morphology are still poorly understood (Saika et al. 2001; Albrecht et al. 2002).

Except for some work related to diabetes, few studies have described the role of insulin action in prostate function. Recent studies have shown drastic changes caused by type 1 diabetes in the prostate of mice but whether these changes are attributable to insulin or androgen deficiency is difficult to determine (Carvalho et al. 2003; Ribeiro et al. 2006). Use of a model of decreased insulin sensitivity induced by 5-day dexamethasone (DEXA) administration provides a hyperinsulinaemic environment and may be useful for the elucidation of the effect of insulin on prostatic homeostasis. Thus, the purpose of this work has been to evaluate the morphology of ventral rat prostate in a model of insulin resistance induced by DEXA.

Materials and methods

Animals and DEXA treatment

Experiments with animals were approved by the institutional (UNESP) Committee for Ethics in Animal Experimentation and conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85–23, revised 1996). Groups of five male Wistar rats (3 months old) from the University of Campinas Animal Breeding Centre were kept at 24°C on a 12 hr light/dark cycle. The rats had free access to food and water. The experimental group received daily injection of DEXA-phosphate (Decadron; 1 mg/kg body weight intraperitoneally for 5 days), whereas control rats received saline (0.9% NaCl; 1 ml/kg body weight intraperitoneally for 5 days). Following treatment, animals of both group were anaesthetized with CO₂ inhalation and killed by decapitation.

Serum analysis

On the day following the last DEXA administration, the blood from fasted (12–14 hr) rats was collected from the tail for the measurement of blood glucose levels with a glucometer (One Touch; Johnson & Johnson). The serum, obtained by centrifugation, was used to measure insulin levels by radioimmunoassay with a rabbit anti-rat insulin antibody and rat insulin as standard (Scott et al. 1981).

Prostate morphology

The ventral lobe of the prostate was isolated from the prostatic complex, weighed and fixed in Karnovsky's solution followed by embedding in Paraplast and Historesin. Histological sections were stained by haematoxylin and eosin, picrosirius-haematoxylin, Gomori's reticulin or Weigert's resorcin-fuchsin. Analyses were carried out with a Zeiss-Jenamed light microscope (Jena, Germany), coupled with a semi-automatic image analysis system (Image-Pro Plus Media Cybernetics version 4.5 for Windows software, Md., USA).

Other fragments were fixed in 3% glutaraldehyde/0.25% tannic acid in Millonig's buffer pH 7.3 for 2 hr, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and finally embedded in Araldite (Polisciences, Eppelheim, Germany) according to Cotta-Pereira et al. (1976). Thin sections were stained in uranyl acetate and lead citrate and analysed in a LEO 902 transmission electron microscope (Zeiss, Germany).

Immunohistochemical detection of fibronectin

Some fragments were fixed in 4% formaldeyde for immunohistochemistry analysis. Antigen retrievel was performed at 92°C with citrate buffer, pH 5.0, for 20 min. Briefly, sections were treated with 3% H₂O₂ in methanol, for 20 min, to quench endogenous peroxidase activity and incubated in 1% horse serum in phosphate-buffered saline for 1 hr to block non-specific binding. As the primary antibody, mouse anti-human fibronectin (IQ011, FKBiotek, Brazil) was incubated (1:100) on the sections in a humidified chamber overnight, at 4°C. The sections were subsequently incubated for 45 min with a biotinylated secondary antibody, followed by the peroxidase-labelled avidin/biotin solution reaction (NovoStain Super ABC Kit, Novocastra, UK) for 45 min. Finally, they were exposed to the peroxidase substrate diaminobenzidine for 3 min, stained in methyl green and mounted.

Morphometric and stereological analysis

Epithelial height was measured in five different histological sections per group. In each section, five different microscopic fields were captured at a magnification of $\times 1,000$. Measurements were taken at 10 different points of each field resulting in 250 measurements per group.

For the determination of the relative volume of the prostatic compartments (epithelium, lumen and stroma), histological sections were submitted to the Weibel system of point counting (Weibel et al. 1963). In general, 20 microscopic fields were selected on two different histological sections per animal. The relative frequency (%) was calculated by counting the points that precisely touched the analysed components.

The maximum diameter of smooth muscle cells was measured in the central region of the middle nucleus by using electron micrographs of longitudinal sections of these cells (n=30 per group).

Table 1 Mean values of blood glucose, serum insulin, body weight (BW) and prostatic weight (PW) of the control and dexamethasone-treated (DEXA) groups

Group	Insulin (ng/ml)	Glucose (mg/dl)	BW (g)	PW (mg)
Control	3.3	98	428.36	0.462
DEXA	17.3*	127.5*	352.13*	0.442

*Significantly different, P<0.05 (analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Unpaired Student's t-test

Statistical analysis

Data were expressed as means and evaluated by Student's t-test. Values of P < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Table 1 presents the mean values of blood glucose and serum insulin levels in fasted rats. As expected, DEXA rats showed a significant increase in serum insulin levels. Even with high circulating insulin, blood glucose content was only mildly increased in the DEXA group but this increase was statistically significant compared with the control group. The body weight and wet weight of the ventral prostate were reduced in DEXA rats but the latter value was not statistically significant (Table 1).

Light microscopy

The ventral prostate of control animals demonstrated large acini containing a substantial amount of secretion in the lumen and surrounded by a dense stroma (Fig. 1a). The secretory epithelium had a typical folded mucosa with tall prismatic cells and exhibited a high frequency of nuclei in the apical cytoplasm, some of which were in mitosis (Fig. 1b). In the DEXA group, epithelial atrophy was observed in the prostate, which showed acini with an unfolded epithelium and large luminal diameter (Fig. 1d). Epithelial cells were cubic with lower proliferative activity, dividing cells not being found frequently in the epithelium (Fig. 1e). Atrophy in some prostatic acini showing flat epithelial cells and the evident loss of cytoplasmic volume were observed in DEXA rats (Fig. 1g). Furthermore, some acini had lost their structural organization showing atypical cells with no epithelial orientation (Fig. 1h).

The stroma of the control group had typical long smooth muscle cells with flat elongated nuclei (Fig. 1c), whereas treated animals showed some stromal changes, mainly in the muscle layer, which consisted of more stained and retracted cells with small twisted nuclei (Fig. 1f). With respect to connective tissue elements, collagen fibres presented intense staining and a diffuse stromal distribution, despite their higher concentration in the sub-epithelial region, in control animals (Fig. 2a). The other fibrous elements such as reticular fibres (Fig. 2b), elastic fibres (Fig. 2c) and glycoprotein fibronectin (Fig. 2d) were concentrated next to the basement membrane. The distribution of extracellular matrix elements was not drastically altered in DEXA animals. However, collagen fibres were thinner and easily distinguishable (Fig. 2e), whereas

Fig. 1 Histological sections of the ventral prostate of control (a-c) and DEXA-treated (d-h) rats. Haematoxylin and eosin staining. a Large acini (a) lie in a dense stroma (S) between glandular portions (I lumen). b Secretory epithelium showing many folds (e), tall cells and intense proliferative activity (arrows), with underlying stroma (s). Inset: Cell in mitosis next to the lumen. c Fibromuscular layer: large smooth muscle cells with elongated and prominent nuclei (smc) lying under the epithelium (e). d Ventral prostate of DEXA-treated animals showing glandular portions (a) with enlarged luminal space (I) and underlying stromal area (S). e Atrophied secretory epithelium (e) showing small cells but with maintained secretory activity since luminal secretion (se) and Golgi area (arrows) were present (\$ stroma). f Smooth muscle cells (smc) had an altered phenotype with contracted cytoplasm and long, irregular, intensely stained nuclei (e epithelium). Inset: Smooth muscle cells (smc) showing the same nuclear phenotype. g Region of the gland showing the highest epithelial atrophy with extremely flat cells (arrow) and enlarged lumen (I) with underlying stroma (\$). h Cells lost their spatial organization in the epithelium (star in inset) and exhibited an atypical morphology (thin arrows). The adjacent stroma (S) contained atrophied and irregular cells with higher cytoplasmic density (large arrow). Bars 100 m (a, d, inset in h), 50 m (b, e, g), 20 m (c, f, h, insets in b, f)



reticular fibres became smooth and stretched (Fig. 2f) and elastic fibres were decreased (Fig. 2g). DEXA group prostate also demonstrated a decrease in fibronectin immunoreaction, which was more diffuse throughout the stroma and less intense in the basement membrane in comparison with that of control animals (Fig. 2h). Morphometry and stereology

Morphometric-stereological analysis (Table 2) revealed a decrease of 50% in the relative volume of the epithelium in the DEXA group, confirming the aforementioned atrophy. On the other hand, an enlargement of 55% was observed

Fig. 2 Histological sections of the ventral prostate of control (a-d) and DEXA-treated (e-h) rats. a Dense bundles of collagen (CO) aggregated in fibres distributed throughout the interacinar space (\$) with a predominant location in the peritubular region (e epithelium). Picrosirius-haematoxylin staining. b Reticular fibres located in the basement membrane region (arrows) follow the contours and epithelial folds (e). Gomori's reticulin staining. c Localization of elastic fibres (ef) in the basement membrane and some stromal ramification (e epithelium). Weigert's resorcinfuchsin staining. d Fibronectin expression in the prostate stroma (arrowheads). Note the stronger distribution below the epithelium (e). e In the prostate of DEXA animals, thin collagen fibers (arrow) had low stromal distribution. Picrosiriushaematoxylin staining. f Reticular fibres (arrows) were thinner and smoother than in controls (e epithelium). Gomori's reticulin staining. g Elastic system (ef) showing thin bundles with sparce stromal distribution (e epithelium). Weigert's resorcin-fuchsin staining. h Decreased fibronectin staining showing fine glycoproteic structures and diffuse localization (arrowheads). Bars 100 m (d, h), 50 m (a, e), 20 m (b, c, f, g)



in the luminal compartment. The relative stromal volume showed no significant change in DEXA animals.

Transmission electron microscopy

Control prostates showed an epithelium with electron-dense cells and a continuous basal lamina (Fig. 3a,f). In the stromal area, fibroblasts exhibited their typical morphology

with large nuclei and some secretory organelles (Fig. 3b). Ultrastructural analysis of the prostate in DEXA animals demonstrated a different morphology with regard to the basal lamina and fibroblasts. The basal lamina was frequently discontinuous at the lamina densa and, at this point, collagen fibrils were inserted in the region equivalent to the lamina lucida (Fig. 3e). When compared with controls in the same sectional orientation, the fibroblasts

Table 2 Mean values of relative frequency (RF) of prostatic components (epithelium, lumen, stroma) and morphometry of epithelial height of the control and DEXA groups

Parameter measured	Control	DEXA	
RF epithelium (%)	42.73	21.94*	
RF lumen (%)	37.80	59.40*	
RF stroma (%)	19.50	18.65	
Epithelial height (m)	24.11	15.62*	

*Significantly different, P<0.05 (analysis of variance followed by Turkey's post hoc test. Unpaired Student's t-test

displayed a decreased volume but their typical fusiform morphology was maintained in the DEXA group (Fig. 3c). However, in comparison with the controls, they had a larger number of secretory organelles, mainly endoplasmic reticulum, which frequently exhibited large cisternae and secretory vesicles (Fig. 3d).

The smooth muscle cells of control animals were elongated with long irregular nuclei and large amounts of collagen in the space between the cells (Fig. 4a–c). In the prostate of DEXA-treated animals, these cells presented a different phenotype with contracted nuclei and cytoplasm, large numbers of caveolae and interruptions in the adjacent basal lamina (Fig. 5a). The smooth muscle cells showed a reduction of 50% in their maximum diameter (from $5.4\pm$ $1.4 \ \mu m$ in controls to $2.8\pm0.7 \ \mu m$ in the DEXA group). Moreover, mitochondria from smooth muscle cells exhibited a distinct morphological pattern in DEXA animals; they had a larger size, denser matrix and a peripheral distribution as if they were detaching from the cell (Fig. 5b,c).

The ultrastructural study did not indicate any important changes in the morphology and arrangement of the collagenous and elastic fibrilar systems of the rat prostate in the DEXA group.

Discussion

The administration of high GC doses is an apt experimental protocol for the induction of peripheral insulin resistance (Ruzzin et al. 2005). GC levels are well known to be elevated during obesity and cachexia, pregnancy and



the ventral prostate of control (a, b, f) and DEXA-treated (c-e) rats, a Epithelium showing a basal cell (bc) and nuclei (n) and rough endoplasmic reticulum (rer) of a luminal cell. Note the intact basal lamina (arrows) delimiting the stroma with an adjacent fibroblast (f). b Smooth muscle cell (smc) and fibroblast (f) at higher magnification. Note the typical flat structure, long nuclei and distinct secretory organelles of the fibroblast. c Stromal region of the prostate of DEXA-treated animal demonstrating a fibroblast (f) in transverse section indicating its fusiform pattern but decreased cellular fraction. Some elastic fibres (ef) lie in close association with this cell. d Drastic reduction of smooth muscle cell diameter (smc). Fibroblasts (f) are also atrophied but maintain the integrity of their secretory organelles, such as the endoplasmic reticulum (arrow) and secretory vesicles (VS). e Changes in the epithelial basal lamina showing evident interruptions (arrow). (f) High magnification of epithelialstromal interface displaying basal lamina. Bars 2.01 m (a, c), 0.93 m (b), 0.72 m (d), 0.43 m (e, f)

Fig. 3 Electron micrographs of

27



Fig. 4 Electron micrographs of smooth muscle cells in the ventral prostate of control rats. a-c Smooth muscle cells (Smc) with morphological integrity. Note their elongated structure, typical nuclei (n), many dense bodies (arrows) and caveolae (ca) at the cell periphery. The space between stromal cells is filled by collagen (co). Mitochondria (m) are also abundant. Bars 1.2 μ m (a), 0.56 m (b, c)

metabolic syndrome, all of which are dysfunctions associated with peripheral insulin resistance (Houstis et al. 2006). GCs may disturb glucose homeostasis by the impairment of insulin action. Moreover, GCs increase gluconeogenesis and decrease glucose uptake in peripheral tissues such as muscles and fat (Castro and Elias 2003). These effects are similar to those of type 2 diabetes in which islet function is preserved and insulin release occurs but peripheral tissues are unable to use it, which in turn, may induce hyperglycaemia and compensatory hyperinsulinaemia. These conditions characterize insulin resistance (Ling et al. 1998). In the present study, peripheral insulin resistance has been confirmed by the high levels of glucose and fast serum insulin measured in DEXA-treated rats, in agreement with previous studies of insulin resistance induced by DEXA administrations (Saad et al. 1993; Rafacho et al. 2007). Some basic biometric parameters have been correlated to the development of insulin resistance induced by GC, such as decreased body weight (Barbera et al. 2001; Caldefie-



Fig. 5 Electron micrographs of the stromal cells in the prostate of DEXA rats. a Smooth muscle cells (SmC) showing a contracted pattern, highly irregular nuclei (n) and decreased cytoplasmic fraction. Basal lamina interruptions (arrows) and many caveolae (Ca) with a decreased size were also detected. b Mitochondria (m) in the smooth muscle cells were located in the periphery of the cell and showed a larger volume and electron density than those of the controls. c Morphological pattern of mitochondria at higher magnifiaction. Note the large size and disorganization of the internal membranes (star) of a mitochondrion and its possible detachment from the cell (arrow). Bars 0.72 m (a), 0.56 m (b, c) 28

Chazet 2001). Previous studies have attributed the body weight reduction to decreased food intake, as insulin is well known to exert anorexigenic effects on the hypothalamus (Wood et al. 1979; Santos et al. 2007). Thus, the increased serum insulin level observed in the DEXA-treated rats is probably the major factor responsible for the body weight loss by acting on the hypothalamus and favouring the suppression of food intake.

The prostate is an androgen-dependent gland and changes in androgen serum levels are related to gland development, secretory activity and the occurrence of various pathologies (Cunha et al. 2003). However, other hormones also have an important function in prostatic physiology, including oestrogen, insulin and GCs (Lostroh 1971; Scarano et al. 2004). DEXA treatment induces epithelial atrophy and alters prostatic stromal environment mainly in the cellular elements, such as fibroblasts and smooth muscle cells. As stated above, GC plays an important role in the metabolism and functioning of the peripheral tissues and our data reveal that this also applies to the prostate.

Three main mechanisms acting jointly or in isolation might explain the prostate alterations observed in the present study after DEXA treatment: (1) the direct action of GCs, since receptors for GC have been described in the prostate (Cleutiens 1997); (2) the high concentration of glucose in the tissue and (3) the role of insulin. As hyperglycaemia in other situations does not lead to a response similar to that reported here, principally with regard to smooth muscle cells (Cagnon et al. 2000), we infer that glucose levels do not have important role in these changes. The atrophy of prostate secretory epithelium is a frequent response to testosterone withdrawal and antiandrogen therapy (Vilamaior et al. 2000; Goes et al. 2007) but, to our knowledge, this has not been described for GC therapy. In the normal prostate, GC receptors are highly expressed in the stroma, whereas epithelial cells exhibit a higher expression of androgen receptors than of receptors for GC (Cleutjens 1997). Insulin resistance causes a decrease in the production of sex-hormone-binding globulins leading to low total testosterone and normal free androgenic levels (Kapoor et al. 2005). Therefore, the atrophic alterations observed in the prostate epithelium after DEXA treatment are probably attributable to insulin disorder.

Our ultrastructural evaluations have indicated that the stromal cell types respond differently to the DEXA administration. The fibroblasts present large amounts of endoplasmic reticulum profiles with enlarged cisternae. The increase in the secretory organelles suggests a stimulatory role of GC in its synthetic activity, as is well known in wound healing. In spite of this, the apparent amount and distribution of some extracellular matrix elements such as reticular and elastic fibres are unchanged and collagen fibres and fibronectin decrease after GC treatment. Thus, together with the increased synthesis of some extracellular macromolecules, higher levels of degradation might be induced.

Concerning the consequence of DEXA treatment on smooth muscle cell, the striking effects are the apparent cell atrophy and mitochondrial alterations. The former effect might be explained by the degradation of cytoskeletal proteins as reported in skeletal muscle cells submitted to GCs (Manoli et al. 2005). Recent studies have indicated that GC is involved in mitochondrial morphology and physiology. Cellular energy and apoptosis, two important processes related to mitochondria, are affected by steroidal hormones such as GC. Moreover, the existence of steroid receptors and the presence of regions responsive to steroids in the mitochondrial genome constitute evidence of their influence on mitochondrial activity (Psarra et al. 2006). Duclos and colleagues (2004) have reported that high concentrations of GC cause an increase in the mitochondrial volume and decrease the number of mitochondria, thus modifying oxidative phosphorylation in the muscles. Other studies have shown that chronic administration of GC promotes morphological damage to the mitochondria of skeletal muscle, decreased enzymatic activity and increased production of free radicals, thus inducing apoptosis in these cells (Manoli et al. 2005; Mitsui et al. 2002). In the smooth muscle cells of GC-treated rats, mitochondria are larger, exhibiting higher matrix electron density and a peripheral distribution. Although the functional activity of mitochondria has not been assayed by specific biochemical methods in the present investigation, the comparison of morphological features with those described in the above-mentioned studies suggests that these cells are functionally compromised. Furthermore, these changes in mitochondrial morphology are accompanied by cell atrophy. Thus, GC might exert a negative effect on the smooth muscle cells of rat prostate. On the basis of the important role attributed to the smooth muscle cells, which have been actively implicated in stromal microenvironment homeostasis and the regulation of epithelial function (Cunha et al. 2003), these changes might influence the behaviour of stromal and epithelial components and consequently prostate physiology.

Taken together, our data indicate that, unlike the epithelial response mainly directed by insulin disturbance, stromal responses are influenced by direct GC action. Furthermore, these alterations in connective tissue components are distinct from those caused by androgen suppression (Vilamior et al. 2000). Recent evidence has indicated the negative effect of insulin resistance on cellular activity. Insulin resistance is well known to enhance the production of insulin-like growth factor-1; this growth factor, together with high insulin levels, acts on cellular physiology by stimulating differentiation and proliferation (Barnard et al. 2002). Thus, we consider it reasonable to propose that both processes, viz. the direct action of GC and the insulin resistance state, can lead to important histological alterations and cellular injury, principally to the prostatic stroma.

In summary, our histological, quantitative and ultrastructural analyses indicate that GC-induced insulin resistance causes, in the rat ventral prostate, epithelial and smooth muscle cell atrophy and alterations in fibroblasts, which show a more synthetic phenotype. In addition to atrophy, mitochondrial changes have also been detected in the smooth muscle cells, thus confirming the role of insulin in the reduction of prostate volume and indicating possible deleterious effects of GC mainly in smooth muscle cells. Future studies exploring insulin signalling "in vivo" and GC effects "in vitro" in prostatic cells will be indispensable for the further elucidation of these alterations.

Acknowledgments The authors express their gratitute to Mr. Luis Roberto Faleiros Jr. for his technical support.

References

- Albrecht M (2002) Effects of dexamethasone on proliferation and fibronectin synthesis by human primary prostatic stromal cells in vitro. Andrologia 34:11–21
- Andrews RC, Walker BR (1999) Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. Clin Sci 96:513–523
- Barbera M, Fierabracci V, Novelli M, Bombara M, Masiello P, Bergamini E, De Tata V (2001) Dexamethasone-induced insulin resistance and pancreatic adaptative response in ageing rats are not modified by oral vanadyl sulfate treatment. Eur J Endocrinol 145:799–806
- Barnard RJ, Aronson WJ, Tymchuk CN, Ngo TH (2002) Prostate cancer: another aspect of the insulin resistance syndrome? Obesity Rev 3:303–308
- Bodker A, Bruuen J, Balslev A, Iversen HG, Meyhoff HH, Anderson KE (1999) Estrogen receptor in the human prostatic urethra and prostate in prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia. Scand J Urol Nphrol 33:237–242
- Cagnon VHA, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani CR, Padovani CR, Martinez FE (2000) Ultrastructure study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). Tissue Cell 32:275–283
- Caldefie-Chazet F (2001) Dexamethasone treatment induces longlasting hyperleptinemia and anorexia in old rats. Metabolism 50:1054–1058
- Carvalho CAF, Camargo AM, Cagnon VHA, Padovani CR (2003) Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of C57BL/6j and NOD mice. Anat Rec 270A:129–136
- Castro M, Elias LLK (2003) Simpósio: urgências e emergências endócrinas, metabólicas e nutricionais. Capítulo II 36:375–379
- Cleutjens CBJM (1997) Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression,

but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. Endocrinology 138:5293–5300

- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF (1976) The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic-related fibers. Stain Technol 51:7–11
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA (2003) Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. Int J Cancer 107:1–10
- Duclos M, Gouarne C, Martin C, Rocher C, Pierre M, Letellier T (2004) Effects of corticosterone on muscle mitochondria identifying different sensitivity to glucocorticoids in Lewis and Fischer rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 286:159–167
- Durant S, Duval D, Homo-Delarche F (1986) Factors involved in the control of fibroblast proliferation by glucocorticoids: a review. Endocr Rev 7:254–269
- Goes RM, Zanetoni C, Tomisso TC, Ribeiro DL, Taboga SR (2007) Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. Micron 38:231–236
- Hayward SW, Cunha GR (2000) The prostate: development and physiology. Radiol Clin N Am 38:1-14
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. Nature 440:944–948
- Jeong IK, Oh SH, Kim BJ, Chung JH, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim KW (2001) The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. Diabetes Res Clin Pract 51:163–171
- Kapoor D, Malkin CJ, Channer KS, Jones TH (2005) Androgens, insulin resistance and vascular disease in men. Clin Endocrinol 63:239–250
- Ling ZC, Khan A, Delauny F, Davani B, Ostenson CG, Gustafsson JA, Okret S, Landau BR, Efendic S (1998) Increased glucocorticoid sensitivity in islet beta-cells: effects on glucose 6-phosphatase, glucose cycling and insulin release. Diabetologia 41:634–639
- Lostroh AJ (1971) Effects of testosterone and insulin in vitro on maitenance and repair of the secretory epithelium of the mouse prostate. Endocrinology 88:500–503
- Manoli I, Lee H, Alesci S, Mcfann KK, Su YA, Kino T, Chrousos GP, Blackman MR (2005) Monoamine oxidase A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. FASEB J express article 10, published online DOI 10.1096/fj.04–3660fje
- Mitsui T, Azuma H, Nagasawa M, Iuchi T, Akaike M, Odomi M, Matsumoto T (2002) Chronic corticosteroid administration causes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. J Neurol 249:1004–1009
- Porte D Jr (1999) Mechanisms for hyperglycemia in the metabolic syndrome. The key role of β cell disfunction. Ann N Y Acad Sci 892:73–83
- Psarra AMG, Solakidi S, Sekeris CE (2006) The mitochondria as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. Mol Cell Endocrinol 246:21–33
- Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR (2007) Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. Can J Physiol Pharmacol 85:536–545
- Reiter E, Hennuy B, Bruynix M, Cornet A, Klug M, McNamara M, Closset J, Hennen G (1999) Effects of pituitary hormones on the prostate. Prostate 38:159–165
- Ribeiro DL, Caldeira EJ, Candido EM, Manzato AJ, Taboga SR, Cagnon VA (2006) Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. Eur J Histochem 50:51–60
- Ross RW, Kantoff PW (2007) Predicting outcomes in prostate cancer: how many more nomograms do we need? J Clin Oncol 25:3563–3564

- Ruzzin J, Wagman AS, Jensen J (2005) Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal mucles: defects in insulin signaling and the effects of a selective glycogen sythase kinase-3 inhibitor. Diabetologia 48:2119–2130
- Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR (1993) Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. J Clin Invest 92:2065–2072
- Saika T, Kusaka N, Tsushima T, Yamato T, Ohashi T, Suyama B, Arata B, Nasu Y, Kumun H (2001) Treatment of androgenindependent prostate cancer with dexamethasone: a prospective study in stage D2 patients. Int J Urol 8:290–294
- Santos CL, Rafacho A, Bosqueiro JR (2007) Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre a glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. Biosci J 23:101–110

- Scarano WR, Cordeiro RS, Goes RM, Carvalho HF, Taboga SR (2004) Tissue remodeling in guinea pig lateral prostate at different ages after estradiol treatment. Cell Biol Int 29: 778–784
- Scott AM, Atwater I, Rojas E (1981) A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. Diabetologia 21:470–475
- Vilamaior PSL, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for the smooth muscle cells. Prostate 45:253–258
- Weibel ER (1963) Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Lab Invest 12:131–155
- Wood SC, Lotter EC, McKay LD (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. Nature 282:503–505

5.2- Artigo 2

Ribeiro DL, Alberti S, Marques SFG, Spadella CT, Manzato AJ, Taboga SR, Dizeyi N, Abrahamsson PA, Góes RM. 2008. Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Experimental Pathology*. Aceito para publicação.

Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats

Running title: Diabetes and prostatic lesions development

Daniele Lisboa Ribeiro ^a, Silvio Fernando Guideti Marques ^b, Sandra Alberti ^b, César Tadeu Spadella ^b, Antônio José Manzato ^c, Sebastião Roberto Taboga ^d, Nishtman Dizeyi ^e, Per-Anders Abrahamsson ^e, Rejane Maira Góes ^d

^a Department of Cell Biology - State University of Campinas - Unicamp- Campinas- Brazil

^b Department of Surgery and Orthopedy- São Paulo State University- FMB/Unesp- Botucatu-Brazil

^c Department of Computer Science and Statistic and ^d Departament of Biology - São Paulo State University –IBILCE/Unesp- São José do Rio Preto- Brazil

^e Department of Urology, Lund University Hospital- Lund- Sweden

Correspondence: Rejane Maira Góes. Departamento de Biologia, IBILCE, UNESP. Rua Cristóvão Colombo, 2265. Jardim Nazareth. São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. 15054-000. Tel. +55 17 32212391; Fax: +55 17 32212390. Email adress: remagoes@ibilce.unesp.br

Abstract

Objectives To evaluate the changes caused by chronic diabetes in the rat ventral prostate and to establish a correlation between diabetes and the development of prostatic lesions. *Methods* Male rats received alloxan (42mg/kg b.w.) to induce diabetes. Ninety days after diabetes diagnosis, animals were sacrificed and the ventral prostate was removed and prepared for general and imunohistochemical analyses. The total area showing different types of lesions was estimated. *Results* Diabetes led to a decrease in the body and prostatic weights, as well as in testosterone levels. The prostate morphology and stereology showed high variation in the diabetic group. Some animals had light changes; the great majority had an intense epithelial atrophy; and other rats showed pre-malignant and malignant lesions in the prostate. Such epithelial atrophy was, in some samples, combined with chronic inflammation similar to PIA. Diabetic group also presented high incidence of prostatitis, adenocarcinoma and PIN. Samples with adenocarcinoma had poorly differentiated acini with high levels of cellular proliferation and nuclear atypia. These lesions exhibited an invasive feature showing Bcl-2-positive cells and interruptions in the basement membrane. An association among PIA, PIN and adenocarcinoma was detected in one sample. Conclusion Reduced androgen levels have a synergic effect to insulin dysfunction promoting negative effects in the rat prostate. Diabetic individuals had high incidence of prostatitis and this inflammation could stimulate the incidence of prostatic lesions.

Keywords: alloxan, diabetes, inflammation, intraepithelial neoplasia, prostate atrophy

Introduction

Diabetes Mellitus is a chronic disease which affects the metabolism of proteins, carbohydrates and lipids. The major characteristic is hyperglycemia as a consequence of abnormal secretion of insulin in the pancreas (type I) or inefficient action of insulin in the target tissues (type II) (Robbins,1989). It is estimated that there are 150 million diabetic people in the world and the projection of the World Health Organization is 366 million until the year of 2030 (Barros *et al.*, 2006). This disorder promotes adverse effects in all organic systems. Diabetes exerts a negative action on the neuroendocrine axis and those effects can enhance the action of diabetes on other organs that are dependent on the axis, like male gonads and acessory glands. It is well established that low testosterone levels are related to diabetes and they can influence the morphology of reproductive accessory glands (Soudamani *et al.*, 2005).

The impact of diabetes on the prostate is still a controversial issue. Morphological and quantitative studies in rodents (Cagnon *et al*, 2000) indicated that changes caused in the ventral prostate by experimental and spontaneous diabetes are similar to those described for castration (Oliveira *et al.*, 2007; Góes *et al.*, 2007). Furthermore, it has been shown that besides the aforementioned drastic structural alterations, diabetes is also related to the incidence of prostatic intraepithelial neoplasia (Ribeiro *et al.*, 2006). However, the relashionship between diabetes and prostate cancer is not clear (Ilic *et al.*, 1996; Weiderpass *et al.*, 2002).

Prostate cancer is still a considerable source of mortality among men around the world (Palapatu *et al.*, 2004). The factors which determine the risk for prostate cancer are still poorly understood but it has been recently described that a chronic process such as inflammation could

be responsible for the development of cancer in this gland. Furthermore, chronic inflammation is frequently associated with focal atrophy and post-atrophic hyperplasia of the prostate (Tomas *et al.*, 2007). The term PIA- proliferative inflammatory atrophy was proposed by De Marzo *et al* (2003) to unify the atrophic processes that are highly proliferative and occur in the prostatic epithelium. Histological studies suggest that PIA could be a precursor or a risk factor for prostate cancer (De Marzo *et al* 2007). Besides morphological and immunophenotypical observations there is also genetic evidence for the potential role of PIA as a precursor of malignant tumour (Faith *et al.*, 2005).

It is interesting to note that diabetes causes hormonal changes and plays an important role in prostate physiology and it can also promote damage to the immunological system, thus facilitating the development of chronic inflammation. Thus, it is necessary to study the effects of diabetes on prostate morphophysiology focusing on the lesions that can occur in this gland. Regarding the controversial correlation between diabetes and prostate cancer and the lack of studies focusing on prostatic biology in diabetic individuals, the purpose of the present work was to evaluate the changes caused by chronic diabetes induced in the rat ventral prostate through histological, stereological and immunohistochemical methods.

Material and Methods

Experimental diabetes induction

Seventy Wistar rats three- month- old male, weighting 200-300g were used in this experiment. Diabetes was induced by a single injection of 42 mg/kg alloxan diluted in physiological solution after 12 h of fasting, according to Lerco *et al.* (2003). Animals received 100µl of the drug
solution in the tail vein (Experimental group, n=55) or just the vehicle solution (Control group animals, n=15). Blood glucose was measured between 1-15 days after injection using the glucose oxidase method (Accu-Chek Active, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Animals with glucose levels up to 200 mg/dl were considered diabetic. Three months after diabetes onset all the animals were anesthetized by CO_2 inhalation and immediately killed by decapitatation and their prostate removed. Body weight was monitored throughout the experiment. Animal handling and experiments were performed according to the ethical guidelines of the São Paulo State University (UNESP, publication No. 17/07-CEEA), following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH).

Serum Hormonal levels

Blood was collected by cardiac puncture immediately before death. Plasma was separated by centrifugation and stored at -20° C for subsequent assays. Serum quantification of testoterone was done using the Modular Analyzer for Immunoassay of Chemiluminescence ECI (Johnson and Johnson, USA) (Weeks, 1984). Five animals were used for each group and the test was performed in triplicate. The intra- and inter-assay variations were 4.6% and 4.3%, respectively.

Light Microscopy

The prostates were weighed and fixed by immersion in Karnovsky fixative (5% parformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) for 24 h. After fixation, the tissues dehydrated in ethanol series, embedded in glycol methacrylate resin (Leica historesin embedding kit, Leica, Nussloch, Germany) or paraplast and sectioned at 3 µm on a Leica automatic rotatory

microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany). Sections were stained with hematoxylin-eosin and Gömöri Reticulin for general studies. The analyses were made in a Zeiss-Jenamed light microscope (Jena, Germany), coupled with a semi-automatic image analysis system (Image-Pro Plus ©Media Cybernetics version 4.5 for Windows software, Maryland, USA).

Immunohistochemical detection of tenascin and Bcl-2

Some fragments were fixed in formaldeyde 4% for immunohistochemistry analysis. The antigen retrievel was performed at 92°C with citrate buffer pH 5.0 for 20 min. Briefly, slides were treated with H₂O₂ 3% in methanol, for 20 min, to quench the endogenous peroxidase activity and incubated in horse serum 1% in PBS for 1 h, to block non-specific binding. Primary antibodies: mouse anti-human tenascin (IQ012, FKBiotek, Brazil) and rabbit anti-human Bcl-2 (SC-783, Santa Cruz, USA) were incubated (1:200) in a humidified chamber overnight, at 4°C. Then, sections were incubated for 45 min with a biotinylated secondary antibody, followed by peroxidase-labelled avidin/biotin solution reaction (NovoStain Super ABC Kit, Novocastra, UK) for 45 min. Finally, they were exposed to the peroxidase substrate DAB for 3 min, stained in Methyl Green or hematoxilyn and mounted.

Stereological and Statistic analysis

Paraffin sections were used to estimate the volume of components of the prostate: epithelium, lumen, smooth muscle cells and stroma. For each animal at least 2 different fragments were used and from those fragments, 20 different and consecutive fields were observed at the objective of 20X. The percentage of each component was calculated using the Weibel method of counting

points (Weibel, 1963), performed according to Ribeiro *et al.* (2006). The quantitative data was analysed by non-parametric Student's T test, linear correlation of Pearson and the significance level between groups was evaluated by non-parametric tests: Mann-Whitney and Kruskal-Wallis using Minitab programme.

Multiplicity of prostatic lesions

Histopathological lesions detected in the rat ventral prostate of diabetic animals were classified according to the classification system proposed by Shappel *et al* (2004): simple atrophy, PIA, PIN, adenocarcinoma and inflammation. The digitised images of histological sections from three different fragments per animal were acquired as described above and employed to quantify the multiplicity of lesions (% of the tissue). The image analysis the Image Analysis software Image J 1.34 (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Heath, Bethesda, Maryland, USA) was used to line up the area corresponding to lesions and the total area of the histological section. The remaining areas without these parameters were considered normal and the sum of all parameters was always 100%.

Results

Due to the very high glucose levels, about 25% of alloxan-treated animals survived after 3 months of diabetes. Alloxan-induced diabetes caused a significant decrease in body and prostatic weight as well as a significant increase in the glucose levels (Table 1). The relative weight of the ventral prostate and testosterone serum levels also decreased after three months of diabetes

(Table 1). Statistical analyses showed a strong inverse correlation between body weight and glucose levels (-0.73) and a weak inverse correlation between prostate weight and glucose levels (-0.55) in diabetic animals.

Light microscopy and Stereology

In control animals, the intermediary portion of the ventral prostate showed a typical tubuloalveolar organization, with well-developed acini and different degrees of epithelial folds (Fig 1A). The presence of a wide acinar lumen and the evidence of conspicuous Golgi complex in the apical portion of the epithelium point to a high level of secretory activity in the prostate of these animals (Fig.1B). The sub-epithelial stroma exhibited a diffuse and discontinuous layer of smooth muscle cells associated with fibroblasts and other components of connective tissue (Fig. 1B).

The light microscopy analysis evidenced three patterns of histological response to the diabetes. Mild histological alterations were detected in a small percentage (22%) of animals which had glandular features very similar to the control ones. Besides some points of atrophy, most of acini had epithelial folding (Fig 1C), high columnar cells, normal secretion activity and stroma with high degree of similarity to the control animals (Fig 1D). Most diabetic animals (64%) showed intense atrophy in the prostate. Acini had dilated lumen interspersed with loose stroma (Fig 1E, 4A). The epithelial cells exhibited a high degree of atrophy that showed greater width than height and decreased volume of cytoplasm, but still indicated secretory activity (Fig 1F). Among diabetic animals, 35% showed drastic alterations in prostate histology caused by

premalignant and malignant lesions, exhibiting PIA, PIN, adenocarcinoma and granulomatous inflammation (Fig 4).

When the stereological data of diabetic animals were plotted on an integrated graphic representation of epithelium, lumen and muscle stroma, the control group forms a cluster represented by high epithelial and mild luminal volume (Fig 2). On the other hand, the diabetic group was clustered in two subgroups located at opposite extremes of the graph, reflecting very distinct patterns of histological changes (Fig 2). One subgroup had a considerable decrease in the epithelial volume and large luminal amplitude which reveals an atrophic response caused by diabetes induction. The other subgroup was located on the opposite side because of decreased frequency of epithelium and an almost complete lack of luminal space, representing a drastic difference between control and diabetic animals with prostatic atrophy (Fig 2).

Multiplicity of lesions

About 64% of all diabetic animals had simple atrophy and PIN, 7% showed PIA and 35% had adenocarcinoma. In most cases, areas with normal glands were located together with simple atrophy which occupied about 20% of the total gland (Fig 3 and 4A). PIA occurred in concomitant area with 13% of PIN and 81% of adenocarcinoma. PIN lesions occupied an average of 4% and adenocarcinoma represented 23% of the gland (Fig 3). There was a frequent association of PIN with atrophic epithelium and some adenocarcinoma areas.

Morphological features of predominant lesions

The atrophy was predominant in all diabetic samples and exhibited large acini, drastic reduction in the epithelial height with flat cells and evident loss of cytoplasm (Fig 4A). Inflammation occurred in 29% of diabetic animals and all of them were represented by infiltrate of lymphocytes and eosinophiles, except the animal with PIA where the atrophy was related to drastic inflammation characterized by high numbers of macrophages (Fig 4B). PIA lesions were classified as proliferative epithelium which exhibited morphological features of simple atrophy associated with dense inflammatory areas (Fig 4C). PIN lesions were frequent and had the pappilary and/or pseudocribiform pattern (Fig 4D). Adenocarcinoma exhibited poorly differentiated gland in some cases (Fig 4E) and invasion in the surrounding adipose tissue (Fig 4F). These tumours showed atypical cells, nuclear and nucleolar morphological variation (Fig 4G) and interruptions in the basement membrane (Fig 4H), which demonstrate the invasiveness of these lesions.

Immunohistochemistry

The control group prostate did not present positive reaction to Bcl-2 in contrast to all diabetic groups with simple gland atrophy (Fig 5A and B). Accordingly, all suspect lesions including PIA and adenocarcinoma were positive for Bcl-2 (Fig 5C and D). The immunohistochemistry for tenascin in the prostate of control group demonstred light reaction below the epithelium and in some blood vases (Fig 5E). In other hand, an intense staining for tenascin througout the area surrounding tumours especially in the sub-epithelial region was detected in diabetic animals

presenting prostatic lesions (Fig 5F). Immunostaining for laminin showed evident interruptions in the basement membrane of malignant acini when compared to control ones (Fig 5G and H).

Discussion

Prostatic weight, as well as testosterone serum levels decreased significantly in the diabetic group. Androgens are crucial for cell proliferation, differentiation and normal functioning of the prostate. Beside androgens, other hormones like insulin, glucocorticoid and estrogens also have an impact on this gland since it has receptors for these hormones (Cleutjens, 1997). A recent study has shown that diabetes negatively influences the differentiation and maturation of the pubertal rat prostate and decreases its weight and epithelial volume. Moreover, it has been demonstrated that diabetes can reduce the number of androgen receptors in the prostate (Barros *et al.*, 2006). Thus, the lost of prostatic weight shown in the present work is in line with the literature (Cagnon *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2006) and confirms the negative role of diabetes in this reproductive gland.

This study showed a high variation in the prostatic morphology of diabetic rats. Considering the histological and stereological data, some diabetic animals had light changes; the great majority had an intense epithelial atrophy; and other rats showed pre-malignant and malignant lesions in the prostate. This data confirmed the high degree of atrophy in the ventral prostate caused by experimentally induced diabetes. It is interesting to note that prostatic atrophy observed in chronic diabetes herein, especially the epithelial type, is an event that resembles other androgen deficiency situations such as castration (Góes *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

43

However, while the epithelial atrophy resultant from androgenic supression is similar to the involution process that shows morphology similar to undifferentiated prostate and decreased secretion, the atrophic pattern observed in most of the chronic diabetic animals, is very distinct with extremely flat epithelial cells that maintained secretory activity. Previous reports about testosterone supplementation in diabetic animals revealed that the androgen does not completely establish changes in the reproductive system, while insulin replacement can reverse prostatic involution and serum levels of testosterone (Yono *et al.*, 2002). Our morphological data reinforce this idea because they show clear evidence that the effects of diabetes do not result only from androgen decrease but are also related to insulin. It is possible that the negative effects of androgen deficiency could be intensified by absence of insulin since it presents a stimulatory effect on the normal prostatic morphophysiology.

Prostatic lesions occurred in 35% of diabetic animals. These lesions were classified as PIA, PIN and adenocarcinoma. The immunohistochemistry for Bcl-2, the presence of intense proliferation and points of basement membrane interruption together with the poor differentiation of some acini indicate that these lesions have malignant features. The Bcl-2 is a proto-oncogene family that plays a central role in the regulation of apoptosis. The protein product encoded by bcl-2 promotes cell survival by effectively suppressing apoptosis in diverse cellular settings (Wang *et al.*, 2004;Yoshino *et al.*, 2006). The potential predictive value of Bcl-2 for determining the malignancy has been demonstrated in other human tumours, including breast cancer and head and neck cancer (Mackey *et al.*, 1998). Overexpression of Bcl-2 was observed in numerous neoplastic prostate tissues and was found to protect prostate cancer cells against apoptosis *in vitro* and to confering resistance to androgen depletion *in vivo* (Huang *et al.*, 2003). This findings

prove that an abnormal balance between antiapoptotic and proapoptotic molecules may affect tumor development and/or progression showing the importance of Bcl-2 as a malignant marker. In spite of this malignant features described herein for diabetic animals, data have shown no positive relation between diabetes and prostate cancer development (Weiderpass *et al.*, 2002). Furthermore, insulin acts as a growth factor for cell proliferation and stimulates IGF release which also has a stimulant effect on tumours. Thus, the absence of insulin in diabetic animals should be a protective factor against tumour (Calton *et al.*, 2007). In contrast, other reports suggest a possible positive correlation between diabetes and benign hyperplasia, urinary symptoms and prostate cancer (Will *et al.*, 1999; Michel *et al.*, 2000). Therefore, the correlation of diabetes and prostate cancer is still controversial and warrants further elucidation.

The area presenting prostatitis was larger in diabetic animals compared to control ones and occupied most of the gland. A recent work showed that alloxan-induced diabetes promoted a high incidence of stomach infections and this infection would act as a precursor for carcinogenesis in this organ (Kodama *et al.*, 2006). It is well known that high levels of glucose caused by diabetes can block the correct functioning of immunological cells and for this reason diabetic patients have recurrent infections (Calvet and Yoshikawa, 2001). Furthermore, the immune system is damaged in diabetic individuals and it could explain the high incidence of prostatitis in diabetic rats. The inflammation process may induce carcinogenesis through morphological and genetic damage in the cells, and it also can create a microenvironment rich in cytokines and growth factors increasing cell proliferation (Palapatu *et al.*, 2004). According to recent models of prostatic carcinogenesis, epithelial proliferative cells from PIA express high levels of glutathione S-transferase (GSTP1), an enzyme which inactivates carcinogenes in the cells (Nelson *et al.*,

2006). The high expression of GSTP1 acts as a defence against oxidative damage in the genome. Areas with inflammation surrounding PIA can induce mutations in GSTP1 genes in atrophic epithelial cells rendering them vulnerable to oxidants, thus damaging DNA and promoting neoplasic transformation to develop PIN lesions. In a next step, cell mutation in PIN performs a malignant progression (Karainov *et al.*, 2007). All these studies show that PIA is more frequent in cases of adenocarcinoma suggesting an active role in tumour promotion. But this progression from PIA to PIN and subsequent tumour development is still debated (Tomas *etal.*, 2007).

Our results demonstrated the incidence of malignant lesions in the prostate gland of diabetic animals. However, a possible toxic role of alloxan in tissues other than the pancreas cannot be excluded. Previous studies showed that alloxan promotes toxic effects in the cell membrane of hepatocytes (Bilic, 1975) while others have suggested that alloxan is not toxic in hepatocytes since the high levels of glucose can protect these cells from membrane damage (Harmam and Fischer, 1982). Thus, the toxic role of alloxan in other tissues remains unproven.

The high morphological variation observed in the diabetic group indicates that the immunological function and the deficiency of insulin and testosterone presents action that varies among individuals. Thus, it is possible to assume that those with high incidence of inflammation caused by diabetes could develop subsequent premalignant and malignant lesions in the prostate, while the remained diabetic individuals without prostatitis may develop only simple atrophy resultant from androgenic decrease.

Acknowledgements: This work was supported by Coordinating Body for Training-Capesscholarship (PDEE-BEX0146/07-2) and Foundation for Scientific Research of Sao Paulo StateFAPESP. The authors would like to thank to Mr Luiz Roberto Faleiros Jr for the technical support.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest associated with this

manuscript.

References

Barros RPA, Machado UF & Gustafsson JA (2006) Estrogens receptors: new players in diabetes mellitus. Trends in Molecular Medicin 12, 425-431.

Bilic N (1975) The mechanism of alloxan toxicity: na indication for alloxan complexes in tissues and alloxan inhibition of 4-Acetamido-4'-Isothioeyanato-Stilbene-2,2'-Disulphonic Acid (SITS) Binding for the Liver Call Membrane. Diabetologia 11, 39-43.

Cagnon VHA, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani CR, Padovani CR & Martinez FE (2000) Ultraestructure study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). Tissue and Cell 32, 275-283.

Calton BA, Chang SC, Wright ME, Kipnis V, Lawson K, Thompson FE, Subar AF, Mouw T,

Campbell DS, Hurwitz P, Hollenbeck A, Schatzkin A & Leitzmann MF (2007) History of diabetes mellitus and subsequent prostate cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. Cancer Causes Control 18, 493–503.

Calvet HM & Yoshikawa TT (2001) Infections in diabetes. Infect Dis Clin North Am 15, 407-21.

Cleutjens CBJM (1997) Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specifc antigen expression, but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. Endocrinology 138, 5293-5300.

De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, Isaacs WB & Nelson WG (2003) Human prostate cancer precursors and pathobiology. Urology 62, 55-60.

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB & Nelson WG (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. Nature 7, 256-269.

Faith D, Han S, Lee DK, Friedl A, Hicks JL, De Marzo AM & Jarrard AF (2005) p16 upregulated proliferative inflammatory atrophy of the prostate. The Prostate 65, 73-82.

Goes RM, Zanetoni C, Tomisso TC, Ribeiro DL & Taboga SR (2007) Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of mongolian gerbil. Micron 38, 231-236.

Harmam AW & Fischer LJ (1982) Alloxan toxicity in isolated rat hepatocytes and protection by sugars. Biochem Pharmacol 31, 3731-6.

Huang J, Lin T, Chang D, Lin S & Ying S (2003) Truncated Bcl-2, a potential pre-metastatic marker in prostate cancer. Biochem and Biophys Res Com 306, 912–917 Ilic M, Vlajinac H & Marinkovic J (1996) Case control study of risk factors for prostate cancer. Br J Cancer 74, 1682-6.

Karainov M, Todonova K, Kuzmanov A & Hayrabedyan S (2007) Quantitative immunohistochemical detection of the molecular expression patterns in proliferative inflammatory atrophy. J Mol Hist 38, 1-11.

Kodama Y, Ozaki K, Sano T, Matsuura T, Akagi H & Narama I (2006) Induction of squamous cell carcinoma of forestomach in diabetic rats by single alloxan treatment. Cancer Sci 97, 1023-30.

Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini AS & Padovani CR (2003) Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. Acta Cirúrgica Brasileira 18,132-142.

Mackey Tj, Borkowski A, Amin P, Jacobs Sc & Kyprianou N (1998) Bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. Urology 52, 1085:1090.

Michel MC, Mehlburger L, Schumacher H, Bressel HU & Goepel M (2000) Effect of diabetes on lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 163,1725-9.

Nelson WG, de Marzo AM & Isaacs WB (2003) Prostate cancer. N Engl J Med 349, 366-381.

Oliveira SM, Vilamaior PSL, Corradi, LS, Góes RM & Taboga SR (2007) Cellular and extracellular behavior in the gerbil (Meriones unguiculatus) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement Cell Biology International 31, 235-24.

Palapattu GS, Suteliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB & Nelson WG (2004) Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. Carcinogenesis 26, 1170-1181. Ribeiro DL, Caldeira EJ, Candido EM, Manzato AJ, Taboga, SR & Cagnon VA (2006) Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. Eur J Histochem 50, 51-60.

Robbins SL (1989) Doenças Sistêmicas. In: Robbins SL, editor. Diabetes Mellitus. Patologia Estrutural e Funcional. Canadá: W.B. Sounders Company pp.238-250.

Shappel SB, Thomas GV& Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM & Cardiff RD (2004) Prostate Pathology of genetically engineered mice: Definitions and classification. The consensus report from the bar harbor meeting of the mouse models of human cancer consortium prostate pathology commitee. Cancer Research 61, 2270-2305.

Soudamani S, Yuvaraj S, Malini T & Balasubramanian K (2005) Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation os ventral prostate during sexual maturation of rats. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 287, 1281-9.

Tomas D, Kruslin B, Rogatsch H, Schäfer G, Belicza M & Mikuz G (2007) Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. European Urology 51, 98-104.

Wang W, Bergh A & Damber JE (2004) Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal up-regulation of COX-2, Bcl-2 and cell proliferation in the glandular epithelium. The Prostate 61, 60-72.

Weeks I & Woodhead JS (1984) Chemiluminescence immunoassays, J Clin Immunoassays 7, 82-89.

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

Weiderpass E, Ye W, Vainio H, Kaaks R & Adami H-O (2002) Reduced risk of prostate cancer among patients with diabetes mellitus. Int J Cancer 102, 258-261.

Will JC, Vinicor F & Calle EE (1999) Is diabetes mellitus associated with prostate cancer incidence and survive? Epidemiology 10, 313-8.

Yono M, Pouresmail M, Takahashi W, Flanagan JF, Weiss RM & Latifpour J. (2005) Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 372, 251-255.

Yoshino T, Shiina H, Urakami S, Kikuno N, Yoneda T, Shigeno K & Igawa M (2006) Bcl-2 Expression as a PredictiveMarker of Hormone-Refractory Prostate Cancer Treated with Taxane-Based Chemotherapy. Clin Cancer Res 12, 6116-6124.

Table 1- Mean values of glucose (mg/dL) and serum testosterone levels (ng/dL), body weight (BW) (g), relative ventral prostate weight (RPW) from control and diabetic group.

	Control	Diabetic	p Value
Glucose levels	89.29	412*	0.0000+
Testosterone levels	82.2	26.4*	0.0327
BW	200	-36*	0,0000+
RPW	0.0014	0.0008^{*}	0.0002

significant difference between groups. p < 0.05

Figure legends

Figure 1- Photomicrographs of the ventral prostate from control (A and B) and diabetic rats (C-F). H&E. **A-** Large acini with folded epithelium. **B-** Typical prismatic epithelium (e) constituted by high columnar cells with evident Golgi complex (*). The smooth muscle layer is thin with long and flat nuclei (s). **C-** Ventral prostate of diabetic rat showing characteristics similar to the control with epithelial folds in addition to some points of gland atrophy (arrows). **D-** Detail of the prismatic epithelium (e) showing cells smaller than controls. Golgi complex area (*). Stroma (s) had clear decrease in muscle layer. **E-** Atrophied prostate. Acini had bigger luminal space (a), secretion accumulation and decreased epithelium. **F-** Detail of the epithelial atrophy consisting predominantly of flat cells with small nuclei and distinct loss of cytoplasm (arrows). Stromal space between acini was loose with reduced muscle layer (s) Scale Bars: A, C, E: 50 μm; B, D, F: 20 μm.

Figure 2- Variations in the relative frequency (%) of tissue compartiments of the ventral prostate in control (n = 5; •) and diabetic (n = 9; •) animals. Legend: Ep – acinar epithelium, L -lumen and SMC - smooth muscle cells. The points represent the mean of each individual. Note that diabetic group was separeted into two sub-groups according to its high morphological variation in the prostate. The parameters epithelium and lumen were statistically different between control and diabetic group (p = 0.018 and 0.003 repectively. Kruskal-Wallis test).

Figure 3- Graph for multiplicity of the lesions (atrophy, PIA, PIN, adenocarcinoma and inflammation) compared with normal areas in the ventral prostate of control and diabetic rats.

Figure 4- Photomicrographs of prostatic lesions in diabetic rats. Staining: H&E (AG), Gomori's Reticulin (H). **A-** Simple atrophy. **B-** Prostatitis: Inflammation in the stroma consisting of lymphocyte cells (ii) and larger number of macrophages (arrow). Acini (a). **C-** PIA lesion is represented by atrophic acini associated with intense inflammation (ii). **D-** Prostatic Intraepithelial neoplasia (PIN) in a pseudocribriforme pattern. **E-** Adenocarcinoma showing poor differentiated acini (arrows) and intense cell proliferation related to inflammation areas. **F-** Malignant cells (arrow head) invading adipose tissue surrounding prostate (at). **G-** Poorly differentiated acini in detail showing disorganization of the epithelium and high morphological variation, cells with large nuclei, numerous and proeminent nucleoli (arrows). **H-** Reticular fibers

are not continuous and indicate interruption in the basement membrane (white arrow). Scale Bars: A, D, E- 100µm; B- 50µm; C- 200µm; F, G, H- 20µm.

Figure 5- Immunohistochemistry in paraffin sections of the ventral prostate of control (A, E, G) and diabetic rats (B, C, D, F, H). **A** - Control animals showed no positive reaction for Bcl-2 in the ventral prostate. **B**- Diabetic group with prostatic simple atrophy also did not exhibit Bcl-2 expression, except in some limphocytes. **C and D**- Positive staining for Bcl-2 in the lesions suspected for malignancy: PIA (C) and adenocarcinoma (D). **E**– Immunohistochemistry for tenascin in the control prostate showing light positivity. **F**- Intense immunoreaction for tenascin surrounding lesions indicates the presence of reactive stroma and possible interference in the epithelial-stromal interaction. **G and H**- Laminin immunostaining showed intact basement membrane in control (G) and its disarrangement in the malignant lesions of diabetic animals (H). The arrows indicate the point of the basement membrane disruption. Scale bars: A, B, E, F: 200μm; C, D, G, H: 50μm.











5.3- Artigo 3

Ribeiro DL, Spadella CT, Taboga SR, Góes RM. Diabetes induz remodelação estromal e aumento de proteoglicanos de condroitim sulfato na próstata ventral de ratos. *A ser submetido*.

O diabetes induz remodelação estromal e aumento de proteoglicanos de condroitim sulfato na próstata ventral de ratos

Daniele Lisboa Ribeiro¹, César Tadeu Spadella², Sebastião Roberto Taboga³, Rejane Maira Góes³*.

¹ Departamento de Biologia Celular – IB – Unicamp, Campinas- SP

² Departamento e Cirurgia e Ortopedia- FCM- Unesp, Botucatu- SP

³ Departamento de Biologia- IBILCE- Unesp, São José do Rio Preto- SP

Palavras chave: diabetes, próstata ventral, proteoglicano de condroitim sulfato, colágeno, matriz extracelular

* Autor correspondente: Rejane Maira Góes. Rua Cristóvão Colombo, 2265. Jardim Nazareth. Cep: 15054-000. São José do Rio Preto- SP. Brasil. Telefone: 17 32212391. Fax: 17 32212390. email: remagoes@ibilce.unesp.br

Abstract

Objectives: To evaluate the changes in the extracellular matrix (MEC) of rat prostate which shows drastic atrophy caused by diabetes. Material and Methods: Diabetes was induced into male adult Wistar rats using endovenous injection of alloxan (45 mg/kg bw) and animals were killed 90 days after diabetes onset. Prostate fragments were processed for light microscopy following immunoreaction for fibronectin (FN), chondroitin sulphate (CS) and Picrossirius staining for collagen fibers. Proteoglycans (PG) were identified at transmission electron microscope after fixation with Cuprolinic Blue. Results: Diabetes led to a thickening of 25% in the acinar basement membrane accompanied by increase and disorganization of its proteoglycans (P1). Three additional populations of stromal PGs were identified in the rat prostate according to their dimensions and distribution: collagen fibril linked PG (P2) and interstitial small (P3) and large (P4) PGs. Diabetes increased P3 and mainly P4. The latter appeared more dense and large and accumulated around the smooth muscle cells and blood vessels. Immunohistochemical reactions revealed a significative increase in CS (33%) and collagen (44%) in diabetic rats whereas FN did not change. Conclusions: The atrophic changes observed in rat ventral prostate after diabetes are accompanied by stromal remodelation related to increase in collagen and large chondroitim sulfate PGs. Thus, diabetes can promote a stromal microenvironment rich in elements that could favour cell migration, proliferation and pathological process.

Introdução

O *diabetes mellitus* é considerado um grave problema de saúde pública devido à crescente incidência e aos prejuízos para a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Inúmeros estudos clínicos ou com modelos experimentais evidenciam os efeitos deletérios dessa doença para o sistema genital, os quais se relacionam principalmente com a disfunção erétil e infertilidade (Oksanen, 1975; Jackson & Hutson, 1984; Scarano *et al.*, 2006). Por outro lado, a interferência do diabetes na histofisiologia das glândulas acessórias do aparelho genital tem sido pouco explorada (Cagnon *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2003). No caso da próstata, investigações com

roedores demonstram que algumas respostas, tais como a atrofia do órgão e do epitélio secretor, são comuns independentemente do tipo de abordagem utilizada, se o diabetes espontâneo ou induzido pelo tratamento com drogas diabetogênicas (Steger & Rabe, 1997; Ribeiro *et al.*, 2006).

A remodelação estromal parece ser outra resposta comum à próstata frente ao diabetes, envolvendo alterações morfológicas nas células musculares lisas e evidente aumento nas fibras colágenas (Carvalho *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2006). Pelo menos em parte, tais alterações são semelhantes às causadas pela castração (Vilamaior *et al.*, 2000) e podem ser interpretadas como o resultado da diminuição nos níveis séricos de testosterona (Soudamani *et al.*, 2006). Entretanto, o diabetes é uma desordem metabólica complexa na qual inúmeras outras variáveis estão envolvidas, entre as quais se destaca a hiperglicemia e falta da ação da insulina nos tecidos.

O estroma da próstata diferencia-se do encontrado para a maioria dos órgãos, pois apresenta uma grande quantidade de células musculares lisas e alta capacidade de resposta aos hormônios esteróides, em especial aos andrógenos. As células que o constitui, juntamente com os elementos da matriz extracelular (MEC) por elas secretados, influenciam a morfogênese, maturação e homeostase do órgão (Wong & Tam, 2002). Alterações nas fibras colágenas, reticulares e elásticas têm sido relacionadas com a remodelação tecidual que segue a queda de andrógenos e instalação de lesões malignas (Carvalho et al., 1997). Embora as variações nos proteoglicanos (PGs) e glicoproteínas adesivas da MEC sejam comparativamente menos conhecidas nessas situações, alguns relatos apontam para o envolvimento dos proteoglicanos de condroitim sulfato (CSPGs) e da tenascina com a progressão maligna dos tumores de próstata (Goulas et al., 2001; Tuxhorn et al., 2002). Além disso, o conteúdo de CSPGs na região peritumoral é um fator determinante no prognóstico tumoral (Ricciardeli et al., 1997). A relação entre diabetes e aumento da incidência de adenocarcinoma de próstata tem sido muito debatida, pois enquanto alguns autores apontam a influência negativa do diabetes nas patologias prostáticas (Will et al., 1999; Michel et al., 2000) outros discutem a ausência de correlação entre essas duas doenças (Bonovas et al. 2004).

Devido à dificuldade de sobrevivência dos animais diabéticos, os estudos com modelos experimentais existentes focalizam as alterações prostáticas no curto termo, sendo pouco conhecidos os efeitos para a próstata de períodos mais longos nessa situação. Em estudo recente

foram examinadas as alterações histopatológicas na próstata ventral de ratos após três meses de diabetes induzido pela aloxana (Ribeiro *et al.*, in press). Nessas condições os animais diabéticos apresentaram altas taxas de glicemia e uma resposta histológica da próstata bastante variável. Apesar dessa variação, três padrões de resposta tecidual foram encontrados: um com alterações discretas, um segundo com atrofia intensa e o último com severo comprometimento da glândula devido à incidência de adenocarcinomas. Surpreendentemente, nessas condições experimentais, a incidência de neoplasias malignas foi muito alta (35%). O foco da presente investigação é avaliar as alterações na matriz extracelular do estroma prostático de animais diabéticos, com nítidos sinais de atrofia glandular, e as implicações com o desenvolvimento de lesões malignas.

Material e Métodos

Indução do diabetes

Foram utilizados 70 ratos machos alogênicos (*Rattus novergicus*) adultos (3 meses de idade), pesando entre 200 e 300g, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP de Botucatu. O manuseio dos animais e os experimentos foram executados segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal (UNESP/Botucatu, protocolo no. 17/07-CEEA).Estes animais foram divididos em 2 grupos: **Controle**- injeções de solução fisiológica (n=15); **Diabético**-injeção endovenosa de aloxana (5,6 Dioxiuracil monohidrato, Sigma, St Louis, USA) (n=55). Após jejum alimentar de 12 horas, com fornecimento de *"água ad libitum*", cada rato recebeu aloxana pela veia caudal, diluída em solução aquosa 2% na dose única de 42 mg/kg de peso corporal. Decorridos 30 minutos do tratamento, os animais foram alimentados normalmente. A glicemia dos animais de ambos os grupos foi testada após 7 e 14 dias da indução. Foram utilizados no estudo apenas os animais com glicemia de jejum acima de 250mg/dl em todas as medições, perda de peso, aumento da ingestão hídrica e do débito urinário. O peso corpóreo e a ingestão de ração e água foram monitorados ao longo do experimento. Os ratos de ambos os grupos foram mortos após 90 dias de diagnóstico do diabetes, com o uso de inalação de CO₂ seguida de decapitação.

Imunohistoquímica

O lobo ventral da próstata foi fixado em paraformol 4% em tampão fosfato 0,1M e incluído em paraplast. Os cortes histológicos foram corados pelo Picrosirius-hematoxilina para análise das fibras colágenas. Para as reações de imunohistoquímica, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% em metanol durante 20 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. O bloqueio de interações inespecíficas de proteínas foi feito em BSA 3% em PBS acrescido de soro normal de cavalo 1% (NovoStain ABC Kit, Novocastra, UK), por 1 hora. Seguiu-se, então, a incubação dos cortes com os anticorpos primários monoclonais anticamundongo para: condroitim sulfato (CS-56/ Sigma, 1:500) e fibronectina (IQ011/ FK Biotec, 1:50), durante 1 hora, TA. A incubação com o anticorpo secundário biotinilado (1:250 NovoStain ABC Kit) foi realizada durante 45 minutos em temperatura ambiente, seguida de lavagem em PBS e nova incubação no complexo Avidina/Biotina/Peroxidase (NovoStain super ABC reagente), por 45 minutos. A revelação foi feita através da reação com diaminobenzidina – DAB e os cortes foram contra-corados com metilgreen ou hematoxilina.

Microscopia eletrônica de transmissão

Os fragmentos da próstata ventral foram fixados em glutaraldeído 3%/ ácido tânico 0,25% em tampão Millonig pH 7,3, por 2 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, durante 2 horas e incluídos em Araldite (Polisciences Europe, Eppelheim, Germany) (Cotta-Pereira *et al.* 1976). Os cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo, segundo Reynolds *et al.* (1963) e observados no microscópio de transmissão LEO 902 (Zeiss, Germany).

Citoquímica ultra-estrutural para detecção de proteoglicanos

Os PGs foram identificados com base no método citoquímico do azul cuprolínico com concentração crítica de eletrólitos de Scott (1965, 1980), que preserva os proteoglicanos na forma de filamentos ou prismas. Resumidamente, os fragmentos prostáticos foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão acetato de sódio 0,025M pH 5,6, contendo 0,3 M de cloreto de magnésio, durante 30 min a 4°C. A seguir, foram fixados "overnight", em temperatura ambiente, na mesma solução contendo 0,2% de azul cuprolínico (Electron Microscopy Sciences, Fort

Washington, PA). Após lavagem em tampão acetato, contendo as mesmas concentrações de cloreto de magnésio, os fragmentos foram imersos em ácido fosfotúngstico 1%, por 30 min e, então, desidratados e incluídos em Araldite (Polisciences, Europe, Eppelheim, Germany). Os PGs aqui observados para a próstata ventral de ratos foram classificados com base nos relatos de Chan & Wong (1989, 1992).

Estimativa da marcação dos componentes da matriz extracelular

As áreas contendo fibras colágenas, condroitim sulfato, e fibronectina foram estimadas utilizando sistema analisador de imagens (Image-Pro Plus ©Media Cybernetics version 4.5 for Windows software, Maryland, USA). Cinco animais por grupo e três fragmentos de próstata foram utilizados por animal. Vinte imagens foram digitalizadas de campos microscópicos contíguos, no aumento de 100x, por animal. As áreas de coloração ou de deposição de DAB foram estimadas através do método de contagem de pontos de Weibel *et al.* (1963) com aplicação de um retículo de 130 pontos, sendo expressas em freqüência relativa (%).

Análises morfométricas

Foram utilizados pelo menos 3 fragmentos prostáticos por animal e no mínimo 3 animais por grupo. As eletromicrografías em aumento de 30000x foram digitalizadas em resolução de 660dpi e analisadas com o analisador de imagens acima mencionado. As medidas da espessura da lâmina densa da MB do epitélio acinar (n = 60) foram efetuadas em eletromicrografías, escolhendo-se três 3 pontos distintos para cada região e pelo menos 20 regiões acinares diferentes por animal. As medidas do diâmetro das fibrilas de colágeno I e do comprimento dos PGs (n = 100) foram realizadas no material processado com o azul cuprolínico, utilizando-se a amostragem semelhante à descrita acima.

Análise estatística

Todas as médias dos resultados numéricos foram analisadas estatisticamente através de teste T- Student não paramétrico aliado a testes de comparação entre os grupos, utilizando-se o

programa Statistica 6.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 184-1996). Valores de p< 0,05 foram considerados significantes.

Resultados

Em estudo anterior (Ribeiro *et al.*, in press), constatou-se que a maior parte dos ratos (64%) acometidos há três meses pelo diabetes apresentou uma nítida atrofia da próstata ventral. O peso relativo da próstata reduziu aproximadamente a metade nos animais diabéticos (de $1,4 \pm 0,3$ para $0,8 \pm 0,3$ por 100g de peso corporal, p <0,05), os quais apresentaram elevados níveis glicêmicos (412 ± 65 mg/dl) e redução de testosterona (82 ± 35 e 26 ± 10 ng/dl, controle e diabético respectivamente). As alterações morfológicas observadas nesses animais, em comparação com os controles, são ilustradas na Figura 1. Tanto em microscopia de luz (1A, B, D e E) como em eletrônica (Fig 1C e F), notam-se, nos ratos diabéticos, células epiteliais secretoras cúbicas ou pavimentosas com pouca quantidade de retículo endoplasmático e algumas vesículas de secreção na região apical (Fig 1E e F), diferentemente dos controles que apresentam células altas e abundância de retículo endoplasmático rugoso (Fig 1B e C).

O compartimento estromal da próstata ventral de ratos contém uma região subepitelial (Figs 1A,B) com esparsas fibrilas colágenas e fibroblastos dispostos continuamente em uma ou duas camadas, seguida por uma região fibromuscular rica em células musculares lisas que também circunda as unidades secretoras (Figs. 2A). O padrão de organização histológica do estroma prostático não variou drasticamente após três meses de diabetes, contudo, verificou-se uma maior desorganização dos componentes da matriz extracelular (Figs: 1F; 5A, B). Assim, as análises ultra-estruturais (Fig. 1F, 2B) e dos cortes histológicos corados com Picrossirius (Fig. 5A, B) revelaram um aumento na densidade das fibras colágenas, confirmado com a estereologia (Tab. 1). Além disso, a espessura das fibrilas de colágeno tipo I aumentou 77% nos animais diabéticos (Tab. 1). Portanto, o diabetes acarreta desmoplasia na glândula.

A observação da membrana basal (MB) em microscopia eletrônica de transmissão indicou um aumento na espessura da lâmina densa (Fig. 2) estimado em cerca de 25% nos animais diabéticos (Tab.1).

Vários tipos de PGs foram identificados na próstata ventral de ratos, após fixação com o azul cuprolínico. Embora, com esse processamento, todos eles apareçam sob a forma de filamentos, quatro tipos diferentes foram identificados com base nas dimensões e localização (Tab. 2). Os PGs da MB - P1- ocorrem nas faces externa e interna da lâmina densa, formando uma dupla camada que conecta essa estrutura com o estroma e com a lâmina lúcida (Fig 2C). Nos animais diabéticos ocorreu um aparente aumento dos P1 que aparecem desorganizados nas duas camadas da lâmina densa (Fig 2D). Os P2 associam-se perpendicularmente à superfície das fibrilas de colágeno, formando pontes entre fibrilas adjacentes, numa periodicidade regular de 46 nm (Fig 3A). O diabetes não alterou a distribuição dessas moléculas (Fig 3B; tabela 2). Os PGs P3 apresentam comprimento muito variável (entre 28 a 65 nm) e uma distribuição mais ampla, sendo encontrados no estroma subepitelial, em associação com a superfície de fibroblastos e na matriz extracelular entre as células musculares lisas (Fig. 3C). Nos animais diabéticos, houve um aumento desses filamentos que parecem ter localização predominante onde o estroma tem pouco colágeno (Fig 3D). PGs de grandes dimensões, designados de P4, foram identificados sob a forma de espículas bastante eletrondensas geralmente ligadas à um material amorfo (Tab. 2). Esses geralmente associam-se entre si formando grandes aglomerados. Embora os P4 sejam mais freqüentes no estroma intersticial, eles também aparecem no estroma subepitelial do grupo controle (Fig 4A e B). No grupo diabético, os P4 com o aspecto semelhante aqueles encontrados nos animais controle foram menos freqüentes, pois a maioria apresentou maior eletrondensidade e dimensões (Fig. 4C-E). Houve um drástico aumento dessas moléculas por toda a região estromal, em especial ao redor dos vasos sanguíneos, na MB acinar e na superfície das células musculares lisas (Fig. 4 F-I). Além disso, os P4 são freqüentemente visualizados em arranjo paralelo ou conectados pelas extremidades, no grupo diabético (Fig. 4C-E).

A imunohistoquímica em microscopia de luz revelou a presença de condroitim (CS) sulfato próximo à MB do epitélio acinar, ao redor das células estromais e dos vasos sanguíneos na próstata dos animais controle (Fig. 5E). Um nítido aumento das áreas contendo CS (Tab. 1,

Fig. 5F) foi identificado após três meses de diabetes em especial nas regiões onde os P4 foram encontrados (Fig. 5G, H). Verificou-se uma co-distribuição da fibronectina com o CS no estroma prostático dos animais controle (Fig. 5C). A freqüência relativa das áreas contendo fibronectina não se altera após o diabetes (Tab. 1), mas uma reatividade maior para essa glicoproteína foi identificada ao redor dos vasos sanguíneos e em alguns pontos do estroma intersticial (Fig. 5D).

Discussão

O diabetes causa alterações na organização, secreção e "turnover" dos componentes da MEC com conseqüente comprometimento funcional de diferentes órgãos (Ayo *et al.*, 1991; Silbiger *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2007; McLennan *et al.*, 2007). Conforme mencionado anteriormente, experimento prévio de indução de diabetes pela aloxana revelou que a histologia da próstata é drasticamente afetada por essa doença, mostrando severa atrofia epitelial e uma alta incidência de neoplasias (Ribeiro *et al.*, in press). Com base nesses achados, nós procuramos avaliar até que ponto essas alterações atróficas são acompanhadas por modificações no ambiente estromal, em particular nos componentes da MEC, com vistas a contribuir para as possíveis relações com o desenvolvimento de neoplasias malignas.

Apesar dos cortes histológicos não revelarem alterações drásticas no estroma da próstata ventral do grupo diabético, uma análise mais detalhada com o uso de métodos ultra-estruturais, imunohistoquímicos e quantitativos apontou para importantes alterações no sistema colagênico e PGs. Assim, verificou-se o aumento e maior desorganização das fibras de colágeno tipo I, juntamente com o aumento da espessura fibrilar, o que indicam desmoplasia. Ao contrário do que ocorre na parótida e placenta, onde um aumento da marcação e expressão de fibronectina tem sido constatado em ratos diabéticos (Lamers *et al.*, 2007; Giachini *et al.*, 2008), para a próstata não houve aumento das áreas contendo essa glicoproteína, embora uma maior intensidade de deposição do DAB tenha sido observada ao redor dos vasos sanguíneos.

Conforme constatado pelo exame ultra-estrutural e morfométrico, o diabetes promoveu um espessamento da lâmina densa da MB acinar na próstata de ratos. Adicionalmente, o processamento com azul cuprolínico revelou que o aumento da espessura é acompanhado do uma maior densidade e desorganização dos PGs (P1). O espessamento da MB é uma degeneração comum do diabetes em diferentes órgãos (Daimon & Koni, 1998; Mason & Wahab, 2003). Segundo alguns autores, ele é decorrente do acúmulo de material depositado em várias camadas na MB, enquanto outros acreditam na diminuição da sua degradação e/ou superexpressão de seus componentes (Cadaval *et al.*, 2000). Contudo, estudos em outros sistemas mostram uma relação direta entre o aumento da MB e o conteúdo e grau de sulfatação dos PGs (Edge & Spiro, 2000; Conde-Knape, 2001). Sabe-se que os PGs são moléculas complexas que contribuem para as características biomecânicas da MEC e interferem indiretamente na proliferação, diferenciação e morte celular (Ruoslahti, 1989; Stepp *et al.*, 2002). Essas propriedades são devidas a sua capacidade de ligar diferentes fatores de crescimento, aumentando a sua concentração ou tornando-os mais facilmente disponíveis para as células adjacentes (Ruoslahti & Yamaguchi, 1991). Assim, é possível que as alterações na estrutura e organização molecular da membrana basal causadas pelo diabetes possam prejudicar as funções celulares tanto no epitélio como no estroma prostático.

No presente estudo, a análise das possíveis mudanças nos PGs frente ao diabetes necessitou da caracterização prévia dessas macromoléculas, o que foi alcançado com a fixação das mesmas pelo corante catiônico Azul cuprolínico, seguida de sua observação em nível ultraestrutural. Esse é um dos métodos mais confiáveis para esses fins, pois permite reconhecê-las com um maior grau de resolução e discriminar com maior clareza suas interações com os demais componentes da MEC (Tab. 2). Com exceção do P4, os outros três PGs encontrados na próstata ventral de ratos são muito semelhantes, quanto ao tamanho e localização, àqueles descritos por Chan & Wong (1985, 1992) para a vesícula seminal e próstata lateral de cobaia. Além do aspecto ultra-estrutural, a digestão prévia com glicosidases específicas possibilitou a esses autores a determinação dos tipos de GAGs que os constituem. Assim, os PGs associados à lâmina densa, aqui designados P1, contêm heparam sulfato; os associados às fibrilas colágenas, por nós designados P2, possuem cadeias de dermatam sulfato e aqueles encontrados em abundância no espaço intersticial, reconhecidos como P3, contém condroitim sulfato. No presente estudo não foi possível precisar o conteúdo de GAGs de cada PG identificado, mas o aspecto ultra-estrutural, dimensões e tipo de associação com os demais elementos da MEC, além da semelhança entre os órgãos, sugerem fortemente que se tratam das mesmas moléculas descritas por esses autores.

Nossas análises ainda demonstraram a existência de um quarto PG de grande tamanho, na próstata de ratos (P4), que aumenta drasticamente com o diabetes. Além disso, o material amorfo a eles associado aparece bastante eletrondenso, de maneira que eles se tornam muito espessas. Seu aspecto ultra-estrutural, distribuição e co-localização com o CS indicam que seja um componente da família dos grandes PGs de CS ligantes de ácido hialurônico, como o versicam. Este último tem sido identificado com técnicas imunohistoquímicas para a próstata humana e é sabidamente abundante em tecidos conjuntivos frouxos ricos em fibras musculares lisas e fibras elásticas (Bode-Lesniewska et al., 1996). Um estudo recente mostrou que a glicação, ligação de moléculas de açúcar no grupo amina das proteínas, é a maior causa de danos às proteínas da MEC (Ahmed & Thornalley, 2007). Considerando que a glicação é um dos eventos mais importantes do diabetes, gerando produtos de glicação avançada (AGEs) que danificam diversos tecidos (Price & Knight, 2007; Kanwar et al., 2008), é provável que a adição de açúcares no core protéico dos PGs possa ser o evento responsável pela maior eletrondensidade dos P4. Portanto, as condições de diabetes da presente investigação causam não apenas a expressão aberrante de P4, mas altera a sua distribuição e afeta provavelmente as suas interações com outras moléculas. Um aparente aumento na trama de P3 também é evidente nos animais diabéticos, mas não se compara em intensidade ao que ocorre para o P4.

Sabe-se que a MEC do estroma prostático sofre significativa remodelação em situações de ablação androgênica como a castração, havendo um aumento de fibras colágenas (Vilamaior *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2007), de heparam sulfato na MB (Carvalho & Line, 1996) e de CS (Kofoed *et al.*, 1971; Terry & Clark, 1996). Esses estudos mostram que a expressão de GAGs é dependente de andrógenos. Considerando-se que o diabetes acarretou uma diminuição dos níveis de testosterona, é razoável supor que o aumento de colágeno e CS tenha sido influenciado pela queda de andrógenos. Por outro lado, estudos mostram que a hiperglicemia aumenta a expressão de TGF beta que por sua vez, induz a síntese de CSPGs nas células musculares lisas arteriais (Schonherr *et al.*, 1991; Lammers *et al.*, 2007). Então, as drásticas alterações observadas em

especial para os PGs indicam o envolvimento de outros fatores diferentes dos andrógenos, como a hiperglicemia.

O CS, bem como a FN, apresentam funcões bastante diversificadas nos tecidos. O primeiro tem importância na proliferação e movimentação celular e o último na diferenciação, adesão e migração celular, bem como nos processos de inflamação e reparo tecidual (Zimmermann et al., 1994; Romberger, 1997). Essas moléculas, além do colágeno e da tenascina, também tem sido implicadas na invasão tumoral, visto que o desenvolvimento do câncer é acompanhado pela remodelação na MEC, marcada pela degradação de componentes préexistentes e síntese de novos elementos (Rowley 1999; Tuxhorn et al., 2002). Na hiperplasia benigna ou no câncer de próstata ocorre um aumento de até 4 vezes nos níveis de CS (Goulas et al, 2000). O aumento de PGs altamente carregados negativamente, como o CS, torna o tecido mais hidratado e expandido em volume, além de ligar mais fatores de crescimento. Esse tecido alterado propicia um microambiente similar ao do embrião que favorece o crescimento e migração das células tumorais e formação de vasos sanguíneos, promovendo o estabelecimento do tumor e metástase (Li et al., 2001). Esses resultados indicam que a atrofia prostática causada pelo diabetes é acompanhada de desmoplasia, aumento e reorganização dos proteoglicanos de CS. Pode se sugerir que essas mudanças no estroma prostático de animais diabéticos favorecem o desenvolvimento de patologias na glândula e apontam os proteoglicanos como os possíveis moduladores da progressão maligna nessa situação.

Referências Bibliográficas

Ahmed N & Thornalley PJ. 2007. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? Diabetes Obes Metab. 9: 233-45.

Ayo H, Radnik RA, Glass WF, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JI. 1991. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high glucose medium. Am J Physiol.269: F185-F191.

Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, Briner J, Heitz PU, Zimmermann DR. 1996. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. J Histochem Cytochem 44: 303-12

Cadaval RAM, Kohlman O, Michelacci YM. 2000. Urinary excretion of glycosaminoglycans and albumin in experimental diabetes mellitus. Glycobiol. 10: 185-192.

Cagnon VHA, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani CR, Padovani CR & Martinez FE. 2000. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). Tissue and Cell 32, 275-283.

Carvalho HF & Line SR. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. Cell Biol Int. 20: 809-19

Carvalho HF, Vilamaior PS, Taboga SR. 1997. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. Prostate. 32: 27-34

Carvalho CA, Camargo AM, Cagnon VH, Padovani CR. 2003. Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of C57BL/6J and NOD mice. Anat Rec A. 270: 129-36

Chan L & Wong YC. 1989. Cytochemical characterization of cuprolinic blue-stained proteoglycans in the epithelial-stromal interface of the guinea pig lateral prostate. Prostate. 14: 133-45

Chan L & Wong YC. 1992. Cytochemical localisation and characterisation of proteoglycans (glycosaminoglycans) in the epithelial-stromal interface of the seminal vesicle of the guinea pig. J Anat 180: 41-56

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

Conde-Knape K. 2001. Heparan sulfate proteoglycans in experimental models of diabetes: a role for perlecan in diabetes complications. Diabetes Metab Res Ver. 17: 412-21

Daimon S & Koni I. 1998. Glomerular enlargement in the progression of mesangial proliferative glomerulnophritis. Clin Neprhol. 49: 145-152.

Edge AS & Spiro RG. 2000. A specific structural alteration in the heparan sulphate of human glomerular basement membrane in diabetes. Diabetologia. 43: 1056-9

Giachini FR, Carriel V, Capelo LP, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB, Zorn TM, San Martin S. 2008. Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. J Anat. 212: 31-41

Goulas A, Hatzichristou DG, Karakiulakis G, Mirtsou-Fidani V, Kalinderis A, Papakonstantinou E. 2000. Benign Hyperplasia of the Human Prostate Is Associated With Tissue Enrichment in Chondroitin Sulphate of Wide Size Distribution. The Prostate 44:104–110.

Jackson FL & Hutson JC. 1984. Altered responses to androgens in diabetic male rats. Diabetes 33: 819-24.

Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, Danesh FR. 2008. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. Exp Biol Méd. 233: 4-11

Kofoed JA, Tumilasci OR, Curbelo HM, Lemos SMF, Arias NH, Houssay AB. 1971. Effects of castration and androgens upon prostatic proteoglycans in rats. Prostate 16:93-102. 22.

Lamers ML, Gimenes FA, Nogueira FN, Nicolau J, Gama P, Santos MF. 2007. Chronic hyperglycamia increases $TGF\beta$ signaling and the expression of extracellular matrix proteins in the rat parotid gland. Matrix Biology. 26: 572-582.

Li SC, Chen GF, Chan PSF, Choi HL, Ho SM, Chan FL. 2001. Altered Expression of ExtracellularMatrix and Proteinases in Noble Rat Prostate Gland After Long-Term Treatment With Sex Steroids. Prostate 49:58 -71

McLennan SV, Kelly DJ, Schache M, Waltham M, Dy V, Langham RG, Yue DK, Gilbert RE. 2007. Advanced glycation end products decrease mesangial cell MMP-7: a role in matrix accumulation in diabetic nephropathy? Kidney Int. 72: 481-8.

Mason RM & Wahab NA. 2003. Extracellular matrix metabolism in diabeticnephorpaty. J Am Soc Neprhol. 14:1358-1373.

Michel MC, Mehlburger L, Schumacher H, Bressel HU, Goepel M. 2000. Effect of diabetes on lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia. J Urol 163,1725-9.

Oksanen A. 1975. Testicular lesion of streptozotocin diabetic rats. Hormony Res 6:138-144.

Oliveira SM, Vilamaior PS, Corradi LS, Góes RM, Taboga SR. 2007. 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. 31: 235-45.

Price CL & Knight SC. 2007. Advanced glycation: a novel outlook on atherosclerosis. Curr Pharm. 13: 3681-7

Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque in electron microscopy. J cell Biol 17: 208-212.

Ribeiro DL, Caldeira EJ, Cândido EM, Manzato AJ, Taboga SR, Cagnon VH. 2006. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. Eur J Histochem. 50: 51-60.
Ribeiro DL, Marques SFG, Alberti A, Spadella CT, Manzato AJ, Taboga SR, Dizeyi N, Abrahamsson PA, Goes, RM. 2008. Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. Int J Exp Patol. In press

Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, Tilley WD, Skinner JM, Horsfall DJ. 1997. Elevated Stromal Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Predicts Progression in Early-Stage Prostate Cancer. Clinical Cancer Research 3: 983-992.

Romberger DJ. 1997. Fibronectin. Int J Biochem Cell Biol. 29: 939-43

Rowley DR. 1999. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? Cancer Metastasis Ver. 17: 411-9.

Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. J Biol Chem. 264: 13369-72

Ruoslathi E, Yamaguchi Y. 1991. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell 64:867–869.

Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. 2006. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. Int J Androl. 29: 482-8.

Schönherr E, Järveläinen HT, Sandell LJ, Wight TN. 1991. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factorb1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. J Biol Chem. 266: 1740–1746.

Scott JE & Dorling J. 1965. Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. Histochemie. 5: 221-33

Scott JE. 1980. The molecular biology of histochemical staining by cationic phthalocyanin dyes: the design of replacements for Alcian Blue. J Microsc. 119: 373-81

Silbiger S, Crowley S, Shan Z, Browlee M, Satriano J, Schlondorff D. 1993. Non enzymatic glycaton of mesangial matrix and prolongged exposure of mesangial matrix to elevated glucose reduces colagen synthesis and proteoglycan charges. Kidney Int. 43: 853-864.

Steger RW & Rabe MB. 1997. The effects of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. Proc Soc Exp Biol Med 214:1-11.

Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DD, Pajoohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Brown M, Aquino C, Schwartz AM, Goldberger O, Hinkes MT, Bernfield M. 2002. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. J Cell Sci 115: 4517-31

Soudamani S, Yuvaraj S, Malini T & Balasubramanian K. 2005. Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation os ventral prostate during sexual maturation of rats. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 287, 1281-9.

Terry DE & Clark AF. 1996. Glycosaminoglycans in the three lobes of the rat prostate following castration and testosterone treatment. Biochem Cell Biol . 74:653-658.

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. Clin Cancer Res. 8: 2912-23.

Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. 2000. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. Prostate. 45: 253-8.

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

Will JC, Vinicor F & Calle EE. 1999. Is diabetes mellitus associated with prostate cancer incidence and survive? Epidemiology 10, 313-8.

Wong YC & Tam NC. 2002. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. 70:633-645.

Wu D, Peng F, Zhang B, Ingram AJ, Gao B, Krepinsky JC. 2007. Collagen I induction by high glucose levels is mediated by epidermal growth factor receptor and phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling in mesangial cells. Diabetologia. 50: 2008-18.

Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M, Bruckner- Tuderman L. 1994. Versican is expressed in the proliferation zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. J Cell Biol. 124:817–825.

Tabela 1- Dados (média ± desvio padrão) morfométricos e estereológicos de diferentes componentes da matriz extracelular do estroma prostático de ratos controle e após 3 meses de diabetes. Os dados estereológicos representam a freqüência relativa de marcação para colágeno após Picrosírius-Hematoxilina, e fibronectina e Condroitim sulfato após reações imunohistoquímicas específicas.

Dados morfométricos (nm)	Controle	Diabético
Espessura da lâmina densa da membrana	52 ± 0,04	$67 \pm 0,06*$
basal epitelial		
Diâmetro das fibrilas de colágeno	22 ± 0.8	$39 \pm 0,98*$
Dados Estereológicos (%)		
Colágeno	$14,4 \pm 0,9$	20,7 ± 1,28*
Fibronectina	$9,0 \pm 0,71$	$9,3\pm0,38$
Condroitim Sulfato	$14,9 \pm 0,05$	20,1 ± 1,0*

* diferença significativa entre os grupos. p< 0,05. Teste T (N=5).

Tabela 2- Caracterização dos proteoglicanos no estroma da próstata ventral de ratos controles e diabéticos segundo a dimensão e localização.

Tipos	Dimensão (nm)		Localização
	Controle	Diabético	
P1	36 ± 0,68	$38 \pm 0,64$	Membrana basal do epitélio acinar e das células
			musculares lisas
P2	$46 \pm 0,84$	$40 \pm 0,\!60$	Associação com fibrilas de colágeno
P3	$39 \pm 0,81$	$44 \pm 1,01$	Estroma intersticial
			Superfície de fibroblastos e célula muscular lisa
P4	$83 \pm 2,11$	$145 \pm 4,\!48$	Membrana Basal do epitélio acinar
			Membrana basal capilar
			Superfície de célula muscular lisa
			Estroma intersticial
			Proximidade das fibrilas de colágeno

Legendas das figuras

Figura 1- Microscopia de Luz e Eletrônica da próstata ventral de ratos controles (A, B e C) e diabéticos (D, E e F). A e B- Visão geral dos ácinos na próstata ventral e detalhe do epitélio secretor (e) e região de estroma intersticial (s). C- O epitélio secretor dos animais controle apresentou células tipicamente colunares (e) de núcleo alongado (n) e área de retículo endoplasmático bastante proeminente (er). O estroma, localizado logo abaixo da MB (lb) apresentou uma típica organização com células musculares lisas (smc) e fibroblastos (f). D e E-Próstata de animais diabéticos, mostrando pequenas porções glandulares de epitélio atrofiado (e). Estroma (s). F- Epitélio cúbico (e) constituído de células achatadas e reduzidas organelas citoplasmáticas, onde a atividade sintética foi mantida no ápice celular (seta). No estroma (s) a desorganização fibrilar e celular é evidente, mostrando desarranjo da camada fibromuscular subepitelial. Células musculares lisas (smc) e prolongamentos de fibroblastos (cabeças de seta) Barras: A, D- 400 μm, B, E- 20 μm, C-2,01 μm; F-2,54 μm.

Figura 2- Ultra-estrutura e Citoquímica para proteoglicanos da MB da próstata ventral de ratos controles (A, C) e diabéticos (B, D). Os animais diabéticos apresentaram nítido espessamento da MB (lb) principalmente na região da lâmina densa (setas). O colágeno (co) associado a essa região também tiveram aumento de fibrilas quando comparado ao controle. Célula muscular lisa (smc), fibroblasto (f). C- Os P1, localizam-se em intervalos periódicos tanto na face interna como na externa da lâmina densa da MB epitelial (cabeças de seta). **D-** Na lâmina densa dos animais diabéticos, esses proteoglicanos aparecem maiores e desorganizados (cabeças de seta). Barras: A, B- 1,56 μm, C, D- 0,44 μm.

Figura 3- Citoquímica ultra-estrutural para análise de proteoglicanos P2 e P3 na próstata ventral de ratos controle (A e C) e diabéticos (B e D). A e B- Os P2 aparecem associados às fibrilas de colágeno em intervalos periódicos de 46 nm, geralmente nas bandas densas, tanto nos animais controle como nos diabéticos. O diabetes não modificou a distribuição desses proteoglicanos. C- Os P3 são encontrados próximos as células musculares lisas (smc) ou livres no

estroma intersticial. P2 (cabeças de seta). **D-** Nos animais diabéticos, a distribuição intersticial de tais proteoglicanos é mais difusa e abundante. Fibroblasto (f). Barras: A, B- 0,35 μ m; C, D- 0,28 μ m.

Figura 4- Citoquímica ultra-estrutural para análise dos grandes proteoglicanos P4 na próstata ventral de ratos controles (A, B) e diabéticos (C-I). Nos animais controle os grandes proteoglicanos aparecem como filamentos compridos (A, setas), normalmente associados uns aos outros e separados por um material amorfo (B). Na próstata do grupo diabéticos, tais proteoglicanos ocorrem sob a mesma característica morfológica e associação com um material amorfo (C). Entertanto, os filamentos são mais espessos e se associam uns aos outros por suas extremidades formando estruturas longas e bastante eletrondensas (D e E). Esses P4 ocorrem por toda a região estromal (setas), incluindo o estroma intersticial (F), mas formam camadas contínuas principalmente na região da MB epitelial (G) e entre as células musculares lisas (H e I). Célula muscular lisa (smc), epitélio (e) e lâmina basal (lb). Barras: A, F, G, I- 0,56 μm; B, C, E- 0,171 μm; D- 0,2 μm, H- 0,6 μm.

Figura 5- Avaliação da matriz extracelular da próstata ventral de ratos controles (A, C, E, G) e diabéticos (B, D, F, H) após as técnicas de Picrosírius-Hematoxilina (A e B) e imunohistoquímica para Fibronectina (C e D) e Condoritim sulfato (E-H). Os animais controles exibem grande quantidade de colágeno (A), fibronectina (C) e condroitim sulfato (E), todos com localização predominante na região subepitelial dos ácinos e vasos sanguíneos (v). Epitélio (e). O diabetes crônico promoveu um aumento nos elementos de matriz extracelular prostático. O colágeno (B) apresentou maior quantidade de densas fibras por toda o estroma indicando desmoplasia estromal. A fibronectina (D) não teve alterações significativas na sua marcação, mas mostrou pontos interrompidos de expressão abaixo dos ácinos (setas). O condroitim (F) demonstrou evidente aumento de imunomarcação e distribuição no estroma. Além disso, houve pontos de intensa positividade para CS (G e H), indicando uma maior concentração de moléculas ao redor dos vasos sanguíneos, células musculares lisas (setas) e em pontos da MB (cabeças de seta). Barras: A-F- 25 μm, G- 50 μm, H- 46 μm.











Capítulo 6

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Modelo experimental de resistência à insulina

• A resistência à insulina induzida por glicocorticóide (GC) causa, na próstata ventral de ratos, atrofia epitelial, atrofia das células musculares lisas, acompanhada de alterações mitocondriais, além de alterações nos fibroblastos que demonstraram fenótipo mais sintético. As alterações epiteliais foram, provavelmente, induzidas pela ausência da ação da insulina, pois são bastante semelhantes às descritas em curto termo para animais diabéticos. Por outro lado, as alterações nas células musculares lisas também são resultantes do efeito deletério do GC.

Modelo experimental de diabetes crônico não tratado

• Verificou-se uma grande variação morfológica individual na resposta histopatológica da próstata, frente ao diabetes. Foi possível diferenciar a resposta ao diabetes em três níveis, segundo a gravidade das alterações histopatológicas: 1) modificações leves; 2) intensa atrofia epitelial e 3) ocorrência de lesões pré-malignas e malignas.

• O diabetes, na condição experimental aqui utilizada, aumenta a incidência de inflamação e lesões pré-malignas (PIA, NIP) e malignas na próstata (adenocarcinoma). A variação morfológica observada na próstata dos indivíduos diabéticos pode ser interpretada como uma tendência à progressão maligna. Esses dados sugerem que a redução de testosterona promove a atrofia epitelial e as freqüentes inflamações favorecem o desenvolvimento subseqüente de lesões malignas na próstata.

• O diabetes induzido altera o ambiente estromal da próstata ventral ocasionando espessamento da membrana basal acinar e aumento de colágeno e de proteoglicanos de condroitim sulfato. Esses últimos se acumulam principalmente ao redor dos vasos sanguíneos e

células musculares lisas. Tais alterações estromais induzidas podem prejudicar as interações epitélio-estroma e produzir um ambiente rico em elementos que podem favorecer o desenvolvimento das lesões teciduais na glândula.

• A complexidade das alterações metabólicas envolvidas no diabetes dificulta o esclarecimento dos mecanismos relacionados com as alterações aqui descritas. Contudo, os efeitos prejudiciais dessa doença para a morfologia prostática indicam um potencial comprometimento tanto da sua função na reprodução como na incidência de patologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrecht M, Renneberg H, Wennemuth G, Möshler O, Janssen M, Aumüller G, Konrad L. 1999. Fibronectin in human prostatic cells in vivo and in vitro: expression, distribution and pathological significance. Histochem Cell Biol. 112: 51-61.

Anderson LC, Suleiman AH, Garret JR. 1994. Morphological effects of diabetes on the glandular ducts and acini of the rat submandibular gland. Mycroscopy Research and Technique 27:61-70.

Aumailley M & Gayraud B. 1998. Structure and biological activity of the extracellular matrix. J Mol Med 76: 253-265.

Aumüller G & Seitz J. 1990. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. Int. Rev. Citol 121:127-231.

Avedano GF, Agarwal RK, Bashey RI, Lyons MM, Soni BJ, JiothrmaYI GN, Regan TJ. 1999. Effects of glucose intolerancae on myocardial function and collgen-linked glycation. Diabetes 48:1443-1447

Bell GI & Polonsky KS. 2001. diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. Nature 414: 788-791.

Bollineni JS, Alluru I, Reddi AS. 1997. Heparan sulfate proteoglycan synthesis and its expression are decreased in the retina of diabetic rats. Curr Eye Res 16:127-30

Cadaval RAM, Kohlman O, Michelacci YM. 2000. Urinary excretion of glycosaminoglycans and allbumin iin experimental diabetes mellitus. Glycobiol. 10: 185-192.

Cagnon VHA, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani CR, Padovani CR, Martinez FE. 2000. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). Tissue & Cell 32:275-283.

Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. 1990. Steroid receptor family: structure and functions. Endocr Rev. 11: 201-220.

Carvalho HF, Taboga SR, Vilamaior PSL. 1997. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. Tissue & Cell. 29: 163-170.

Cleutjens CBJM. 1997. Both androgen receptor and glucocorticoid receptor are able to induce prostate-specific antigen expression, but differ in their growth-stimulating properties of LNCaP cells. Endocrinology 138(12): 5293-5300.

Cohen RJ, Glezerson G, Taylor LF, Grundle HA, Naudé JH. 1993. The neuroendocrine cell population of the human prostate galnd. J Urol 150: 365-368.

Conde-Knape K. 2001. Heparan sulfate proteoglycans in experimental models of diabetes: a role for perlecan in diabetes complications. Diabetes Metab Res Rev 17:412-21.

Costello CL & Franklin BR. 1994. Effects of prolatin on the prostate. Prostate 24:162-166.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. 2003. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. Int J Cancer. 107:1-10.

Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. 2004. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. Arch Histol Cytol. 67: 417-34.

Deklerk DP. 1983. The glycosaminoglycans of normal and hyperplastic prostate. Prostate 4:73-81.

Delellis RA & Dayal Y. 1992. Neuroendocrine System. In: Sternberg SS (Ed). Histology for Pathologists. Raven Press. New York. p 347-362.

Denmead SR. Isaacs JT. 2004. The role of prostate specific antigen in the clinical evaluation of prostatic disease. BJU Int. 93 supl 1: 10-15.

Di Sant'Agenese PA. 1991. Endocrine-paracrine (APUD, neuroendocrine) cells in the normal and pathlogic prostate. Bull Assoc anat (Nancy). 75: 63-67.

Di Sant'agnese, PA. 1992. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. *Cancer* supplement 70 (1): 254-268.

Dizeyi N, Konrad L, Bjartell A, Wu H, Gadaleanu V, Hansson J, Helboe L, Abrahamsson PA. 2002. Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. Urologic Oncology 7: 91–98

Duarte ACGO. 1996. Estudo experimental dos efeitos da estimulação ultrasônica de baixa intensidade na consolidação óssea em ratos submetidos ao diabetes aloxânico. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Dufau ML. 1988. Endocrine regulation and communicating functions of the leydig cell. Annu Rev Physiol. 50: 482-508.

Edge AS & Spiro RG. 2000. A specific structural alteration in the heparan sulphate of human glomerular basement membrane in diabetes. Diabetologia 43:1056-9

Fuchs FD & Wannmacher L. 1992. Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.

Gilman L, Goodman S. 1975. The phamacological basics of therapeutics. 5^a Ed. New York: McMillan Publishine. Diabetologia 28: 195-203.

Hay ED. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal trasnformation. Acta Anat 154: 8-20.

Hayward SW, Cunha GR. 2000. The prostate: development and physiology Radiol Clin North Am. 38: 1-14.

Herson PL, Ashford MLJ. 1997. Activation of a novelnon-selective cation channel by alloxan and H2O2 in the rat insulin secreting cell line CRI-G1. J Physiol 501:59-66.

Huang H. Tindall DJ. 2002. The role of the androgen receptor in prostate cancer. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 12: 193-207.

Ilic M, Vlajinac H & Marinkovic J. 1996. Case control study of risk factors for prostate cancer. Br J Cancer 74, 1682-6.

Inoue S, Leblond CP. 1989. Three-dimensional network of cords: the main component of basement membanes. Am J anat 181: 341-358.

Iozzo RV. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu* Rev Biochem 67:609-652.

Jesik CJ, Holland JM, Lee C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. Prostate 3: 81-97.

Kolodny RC, Kahn CB, Goldstein HH, Barnett DM. 1974. Sexual dysfunction in diabetic men. Diabetes 23:306-309.

Kovacs J, Zilahy M, Banyasz T, Gomba S. 1998. Evaluation of apoptosis and cell proliferation in experimentally induced renal cysts. Urological Research 26:411-416.

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. 2001. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. Front Neuroendocrinol. 22: 185-212.

Leblond CP, InoueS. 1988. Structure, composition, and assembly of basement membrane. Am J Anat 185: 367-380.

Lernmark A. 1985. Molecular biology of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia. 28(4):195-203.

Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. 1987. seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefation of human semen. J clin Invest. 80: 281-285.

Lin CQ, Bissel MJ. 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB 7:737-743.

Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, tindall DJ. 1994. Molecular mechanisms of androgen action. Vitam Horm. 49: 383-432.

Lostroh AJ. 1971. Effects of testosterone and insulin in vitro on maintenance and repair of the secretory ephitelium of the mouse prostate. Endocrinology 88:500-503.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. 2003. Hormonal cellular and molecular control of cprostatic development. Develop. Biol 253:165-174.

McNeal JE. 1888a. Normal histology of the prostate. Am J surg Pathol. 12: 619-633.

McNeal JE. 1988b. Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinma. Semin Ultrasound CT MR. 9: 329-334.

Migliorini RH & Kettelhut IC. O pâncreas endócrino. In: Aires MM. 1999. Fisiologia. 2ª ed. Guanabara Koogan. p.842-851.

Miki J & Rhim JS. 2007. Prostate cell cultures as in vitro models for the study of normal stem cells and cancer stem cells. Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 1–8.

Organização Mundial da Saúde. 2007. Acesso em: 12 dez 2007. Disponível em: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html>.

Özturk Y, Altan VM, Yildizoglu-Arin. 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. Pharmacological Reviews 48:69-104.

Park PW, Reizes O, Bernfield M. 2000. Cell surface heparan sulfate: selective regulators of ligant –receptor encounters. J Bio Chem 275: 29923-29926.

Price D. 1963. Comparative aspects of development and structure in the prostate. Nat Can Inst Monogr 12: 1-27.

Prins GS. 1992. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. Endocrinol. 130: 3703-14.

Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. 2007. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. Can J Physiol Pharmacol 85: 536-45

Ribeiro DL, Candido EM, Caldeira E, Manzato AJ, Taboga SR, Cagnon, VHA. Submetido. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. Eur J Histochemistry.

Ricke WA, Wang Y, Kurita T, Hayward SW, Cunha GR. 2005. Hormonal and stromal regulation of normal and neoplastic prostatic growth. Prog Mol Subcell Biol 40: 183-216.

Risbridger GP, Bianco JJ, Ellem SJ, McPpherson SJ. 2003. Oestrogens and prostate cancer. Endocrine-related cancer 10:187-191.

Romberger DJ. 1007. Fibronectin. Int J biochem Cell Biol. 29: 939-943.

Rosengren A. 2007. Pathophysiology and treatment of defective insulin secretion in diabetes. Dissertação (Doutorado). Lund university.Suécia.

Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. J Biol Chem 264: 13369-13372.

Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG . 2006. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. Int J Androl 29: 482-8.

Shellini SA. 1992. Retinopatia diabetica experimental. Estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados. Dissertação (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

Singh P, Uzgare A, Litvinov I, Denmeade SR and Isaacs JT. 2006. Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer Endocrine-Related Cancer 13: 653–666.

Sociedade Brasileira de Diabetes. 2007. Acesso em: 27 nov. 2007. Disponível em: http://www.diabetes.org.br/aprendendo/historia/historiaprimeiros.php

Stefan SF. 1996. Definition and classification of diabetes including maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Mellitus*, A fundamental and clinical text. 1 Ed. p251-290.

Steger RW & Rabe MB. 1997. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. Proc Soc Exp Biol Med 214:1-11.

Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DD, Pajoohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Brown M, Aquino C, Schawtz AM, Goldeberger O, Hinkes MT, Bernfied M. 2002. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. J Cell Sci 115: 4517-4531.

Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, Norman RW, Tryer DA, O'Brien SP, Rittmaster RS. 2005. Differential alterations in 5alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. Prostate. 63: 231-239.

Timpl R. 1996. Macromolecular organization of basement membranes. Curr Opin Cell Biol 8: 618-624.

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. Clin Cancer Res. 8: 2912-23.

Vogl-Willis CA, Edwards IJ. 2004. High-glucose-induced structural changes in the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, of cultured human aortic endothelial cells. Biochim Biophys Acta167:36-45

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. 1979. Purification of a human prostate specific antigen. Ivest Urol. 17: 159-163.

Weiderpass E, Ye W, Vainio H, Kaaks R & Adami H-O. 2002. Reduced risk of prostate cancer among patients with diabetes mellitus. Int J Cancer 102, 258-261.

Wilson JD. 2001. Androgens, androgen receptors and male gender role behavior. Horm Behav. 40: 358-366.

Wight TN, Heinegard DK, Hascall VC. 1991. Proteoglycans: Structure and Function. In: Hay. Cell Biology of Extracellular Matrix. New York, Plenum Press. p.45-78.

World Health Organization. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and complications. Report of WHO Consultation. Part I: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Disponível em: http://www.diabetes.com.au/pdf/who_report.pdf

Yokoyama H, Hoyer PE, Hansen PM, Van Den Born J, Jensen T, Berden JHM, Deckert T, Garbarsch C. 1997. Imunohistochemical quantification of heparan sulfate proteoglican and collagen IV in skeletal muscle capillare basement membranes of patients with diabetic nephropathy. Diabetes 46: 1875-1880.

Zimmet, KAP. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Diabetic Medicine. 15: 539-553.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2001. global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature. 414: 782-787.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "EFEITOS DA RESISTÊNCIA A INSULINA E DO DIABETES NA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS"

() não se enquadra no Artigo 1°, § 3° 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 nº 17/07-CEEA).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo n^2 ____).

Aluno(a): Daniele Lisboa Ribeiro

Orientador(a): Profa Dra Rejane Maira Góes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

zuard Função:

Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO Presidente Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/IB - UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Botucatu



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 17/07-CEEA, sobre "INTERAÇÕES EPITÉLIO-ESTROMA NA PRÓSTATA DIABÉTICOS", VENTRAL DE RATOS sob a responsabilidade de REJANE MAIRA GÓES, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e COMISSÃO ÉTICA NA pela foi aprovado DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA), em reunião de 27/04/2007.

3

Prof. Dr. MARCELO RAZERA BARUFFI Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM Secretária - CEEA

Botucatu, 27 de abril de 2007.

Instituto de Biociências - CEEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br