

Augusto César Spadaccia Asciutti

"Papel da PS20/WFDC1 no desenvolvimento prostático e regulação da distribuição das células p63 positivas"

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

AUGUSTO CÉSAR SPADACCIA ASCIUTTI

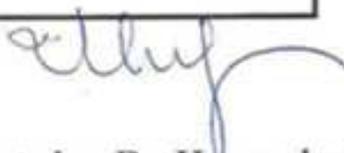
**“Papel da PS20/WFDC1 no desenvolvimento prostático e
regulação da distribuição das células p63 positivas”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pelo candidato

Augusto César Spadaccia Ascitti

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na
área de Biologia Celular.



Orientador: Dr. Hernandes Faustino De Carvalho

Campinas, 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

As24p Asciutti, Augusto César Spadaccia, 1988-
Papel da PS20/WFDC1 no desenvolvimento prostático e regulação da distribuição das células p63 positivas / Augusto César Spadaccia Asciutti. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata - Desenvolvimento. 2. Células-tronco. 3. Nicho de células-tronco. 4. Neoplasias da próstata. 5. Proteína WFDC1. I. Carvalho, Hernandes Faustino de, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of PS20/WFDC1 in the prostatic development and regulation of the distribution of p53-positive cells

Palavras-chave em inglês:

Prostate - Development

Stem cells

Stem cells niche

Prostatic neoplasms

WFDC1 protein

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Hernandes Faustino de Carvalho [Orientador]

Wagner José Fávaro

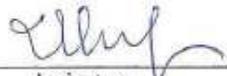
Leonardo Oliveira Reis

Data de defesa: 12-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

BANCA EXAMINADORA

Dr. Hernandes Faustino De Carvalho (Orientador)


Assinatura

Dr. Wagner Jose Favaro


Assinatura

Dr. Leonardo Oliveira Reis


Assinatura

Dr. Sérgio Luis Felisbino

Assinatura

Dra. Mariana Lazarini

Assinatura

Sumário

1. Agradecimentos.....	vii
2. Lista de abreviaturas e siglas.....	viii
3. Resumo.....	x
4. Abstract.....	xi
5. Introdução.....	1
5.1. Conceitos iniciais.....	1
5.2. Desenvolvimento prostático e fatores envolvidos.....	2
5.3. Células tronco prostáticas.....	5
5.4. Nicho das células tronco prostáticas.....	7
6. Justificativa.....	11
7. Objetivos.....	11
8. Materiais e métodos.....	12
8.1. Procedimentos com animais.....	12
8.2. Cultura de órgãos e silenciamento com siRNA.....	12
8.3. Fixação, emblocamento e secção.....	12
8.4. Coloração com Hematoxilina & Eosina.....	13
8.5. Imunohistoquímica.....	13
8.6. Real Time PCR.....	14
9. Resultados.....	15
9.1. Cultura de órgãos e silenciamento com siRNA.....	15
9.2. Análise histológica.....	15
9.3. Imunohistoquímica.....	16
9.4. Real Time PCR para MMP9.....	16
10. Discussão.....	17
11. Conclusões.....	24
12. Referências.....	25
13. Anexos.....	31

Agradecimentos

É com grande satisfação que concluo mais essa etapa da minha vida. Esse tempo que passei no Laboratório de Matriz Extracelular me ajudou a crescer muito, tanto como biólogo quanto como ser humano e com certeza levarei para sempre os bons momentos de convivência e aprendizado que tive com todos do laboratório.

Agradeço, primeiramente, ao Prof. Hernandes por ter me apoiado desde o primeiro minuto em que eu coloquei os pés no laboratório, por ter me instruído e me guiado em minhas decisões, desde o estágio, na iniciação científica e ao longo do mestrado. Obrigado por confiar em mim mesmo quando eu mesmo deixei um pouco de acreditar na minha capacidade. Obrigado por me ajudar a superar dificuldades, tanto da vida laboratorial e da pesquisa científica, quando da vida externa a universidade. Com o seu auxílio e sua orientação, saio daqui um biólogo melhor e uma pessoa melhor.

Agradeço a todos os companheiros de laboratório que, desde sempre, me receberam de braços abertos e sempre estiveram dispostos a me ensinar e me ajudar. Ao Danilo Damas e a Taize Machado, as primeiras pessoas que tive contato no laboratório e que ensinaram diversas técnicas laboratoriais, me ajudaram a desenvolver o pensamento científico e me ajudaram bastante durante para a prova de ingresso na pós-graduação. Ao Alexandre Bruni-Cardoso, que também me auxiliou muito em diversas técnicas, principalmente imunohistoquímica, sempre me guiando para obter os melhores resultados possíveis em um experimento. Ao Guilherme Barbosa que me ajudou em muito em praticamente todos os experimentos, e sempre esteve ao meu lado me ajudando a manter a calma e resolver os problemas que apareceram em meu caminho. Ao Rony Nunes e a Líliam Cardoso que promoveram meus primeiros contatos com a cultura de células e sempre me ajudaram, me deram dicas e me supervisionaram. A Rafaela Ribeiro e a Fabiana Kühne que me auxiliaram bastante com as técnicas mais voltadas para a biologia molecular, genética e bioinformática, assim como diversas outras questões nas quais precisei de ajuda. A Silvia Pimentel, que também me auxiliou bastante com a cultura de células, e a Juliete Silva que me ajudou a compreender a Citometria de Fluxo. Ao Umar Nishan que sempre me auxiliou nos procedimentos com animais, além de ajudar com o inglês, a Ana Milena que participou da minha banca de qualificação, a Mariana Baratti que me ensinou técnicas de microscopia confocal, a Daniela Crossara que me ensinou procedimentos interessantes com animais, e técnicas de cultura de células, ao Danilo Ferruci, Adauto Neto, Fiana Dornelas, Lucimara, Ana, Elisângela, Gustavo Magalhães, Renan Correia, Gabriella Anelli, Maria Cristina, e todos os outros que sempre me ajudaram com o que eu precisei.

Agradeço muito ao Programa de Pós Graduação do Instituto de Biologia, em especial a Liliam Panágio e a todos os professores que participaram do meu processo de formação, entre eles o Prof. Edson Pimentel, Profa. Cristina Vicente, Profa. Shirlei Recco-Pimentel, Profa. Luciana Bolsoni, Prof. Alexandre Oliveira, Profa. Ana Veiga e todos os outros que auxiliaram em meu aprendizado. A todos os funcionários do Instituto de Biologia, que dão duro todos os dias para manter o funcionamento do instituto, em especial a Elaine Gonçalves. Não posso deixar, também, de agradecer a todos os professores que tive durante minha graduação na Universidade Paulista, que em sua maioria me apoiaram e auxiliaram na construção do meu conhecimento.

Agradeço as agências de fomento que financiaram minha pesquisa, sendo a CAPES que, além disso, me concedeu a bolsa de mestrado, e a FAPESP que financiou equipamentos e materiais para o laboratório do professor Hernandes, os quais foram essenciais para o desenvolvimento de minha pesquisa. E para finalizar, agradeço muito aos meus pais, César Augusto Ascitti e Denise Tordin Spadaccia por sempre me apoiarem em minhas decisões e por me fornecerem um ambiente na qual eu posso me sentir tranquilo para me dedicar aos meus estudos e construir minha vida profissional. Também agradeço a minha irmã, Marina Spadaccia Ascitti, e a todos meus amigos e amigas que sempre me apoiaram e me desejaram o melhor.

Lista de abreviaturas e siglas

β-gal	Beta galactosidase
AR	Receptor de andrógeno
b2m	Beta-2 monoglobulina
BMP	Proteína Óssea Morfogenética
BrdU	5-bromo 2-desoxiuridina
BSA	Albumina de soro bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	Grupamento de Diferenciação
CK	Citoqueratina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DAPI	4'6-diamidino 2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Efna	Efrina
Eph	Receptor de Efrina
FAPESP	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
Fox	<i>Forkhead box</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
GusB	Beta-glucuronidase
GFP	Proteína Fluorescente Verde
HOX	<i>Homeobox</i>
HPRT	Hipoxantina Guanina Fosforibosil Transferase
Itg	Integrina
kDa	Quilodalton
Lmo	<i>LIM domainprotein</i>

MMP	Metaloproteinase de Matriz
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGK	Fosfoglicerato Cinase
PPiA	Peptidil Prolil Isomerase A
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSC	Células Tronco Prostáticas
Ptch	<i>Patched</i>
RNA	Ácido ribonucleico
Rreb	Proteína Ligante ao Elemento Responsivo a Ras
siGFP	Ácido Ribonucleico de Interferência Curto para GFP
siRNA	Ácido Ribonucleico de Interferência Curto
siWFDC1	Ácido Ribonucleico de Interferência Curto para WFDC1
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
TA	Amplificação transitória
TBP	Proteína de Ligação TATA
TGFβ	Fator de Transformação do Crescimento Beta
UGE	Epitélio do Seio Urogenital
UGM	Mesênquima do Seio Urogenital
UGS	Seio Urogenital
uPA	Urocinase Ativadora de Plasminogênio
uPAR	Receptor da Urocinase Ativadora de Plasminogênio
WAP	Proteína Acídica <i>Whey</i>
WFDC1	<i>WAP Four-dissulfide Core Domain 1</i>
Wnt	<i>Wingless-type</i>
Zeb	<i>Zinc-finger E-Box Binding Homeobox</i>

Resumo

Introdução: Durante o desenvolvimento e a vida adulta de um organismo, células tronco indiferenciadas, capazes de dar origem a um ou mais tipos celulares, proliferam e se diferenciam para, tanto produzir os tecidos de um organismo em desenvolvimento, quanto repor células perdidas pelo envelhecimento, doença ou injúria. Essas células residem em um nicho especializado contendo células diferenciadas e elementos responsáveis por manter o estado predominantemente quiescente. Acredita-se que as células tronco da próstata contribuam para o desenvolvimento de câncer através da desregulação dos elementos do nicho. ps20 é um elemento secretado por células musculares lisas da próstata, o qual demonstra capacidade de inibir o crescimento da linhagem de células prostáticas cancerígenas PC3 em cultura. Evidências sugerem uma possível relação entre ps20 com a adesão celular. No entanto, seu funcionamento é pouco conhecido. **Objetivos:** Analisar o efeito do silenciamento do gene WFDC1/ps20 sobre o comportamento das células p63⁺ e arquitetura tecidual durante o desenvolvimento prostático pós-natal. **Materiais e métodos:** Próstatas ventrais de ratos Wistar recém nascidos foram cultivadas sobre membranas flutuantes permeáveis, na presença de RNA de interferência para reduzir a expressão de ps20. Os órgãos foram cultivados por sete dias e em seguida analisados através da contagem da formação de estruturas epiteliais, colorações histológicas, imunohistoquímica e PCR em Tempo Real. **Resultados:** O silenciamento de WFDC1/ps20 levou a uma redução de 36% na quantidade de mRNA de WFDC1/ps20. Foi observada redução no número de pontas de ductos epiteliais entre o segundo e quarto dia cultura e entre o quarto e sétimo dia. A análise histológica revelou ductos com ramificação reduzida e com as pontas mais dilatadas, em resposta a redução de WFDC1/ps20. Foi observada polarização celular prejudicada e cavitação reduzida. A imunohistoquímica para p63 revelou que os níveis reduzidos de ps20 promoveram a concentração das células p63⁺ nas pontas dilatadas dos ductos epiteliais. Real Time PCR revelou que o silenciamento do gene WFDC1/ps20 promoveu um aumento de nove vezes na quantidade do mRNA de MMP9. **Discussão:** O silenciamento de WFDC1/ps20 afetou o desenvolvimento prostático com um efeito sem ambiguidade no comportamento das células basais p63⁺, como representado pelo seu acúmulo nas pontas dos ductos e diminuição ao longo dos ductos estendidos. O tratamento também prejudicou a polarização de células luminiais e comprometeu a cavitação. O conteúdo elevado de mRNA de MMP9 pode estar relacionado com o acúmulo da proteína e a degradação descontrolada da matriz extracelular ao redor das pontas dos ductos, levando ao fenótipo dilatado. Como a degradação correta da matriz em locais específicos é requerida para a formação do ponto de ramificação, é sugerido que a ps20 regula o balanço da atividade de MMP9 necessária durante o desenvolvimento prostático. Essa ideia coloca o sistema uPA/uPAR acima da regulação e ativação de MMP9. **Conclusões:** A redução de WFDC1/ps20 comprometeu a morfogênese em ramos, polarização das células epiteliais e cavitação. Esses aspectos estão associados com a desestabilização do comportamento das células p63⁺, como sugerido pelo seu acúmulo nas pontas dilatadas e diminuição do compartimento de células basais ao longo dos ductos estendidos.

Palavras-chave: próstata - desenvolvimento, células tronco, nicho de células tronco, neoplasias da próstata, proteína WFDC1.

Abstract

Introduction: During the development and adult life of an organism, undifferentiated stem cells, capable of giving rise to one or more cell types in an adult organism, proliferate and differentiate to both produce the tissues of an developing organism and replace cells lost by aging, disease or injury. These cells reside in a specialized niche containing differentiated cells and elements responsible for maintaining their predominantly quiescent state. Prostate stem cells are believed to contribute to cancer development via deregulation of niche elements. ps20 is a protein secreted by prostate smooth muscle cells which was shown to inhibit the growth of prostatic PC3 cancer cell line in culture. Evidences exist favoring a possible relationship between ps20 and cell adhesion. However its functioning is still poorly known. **Objectives:** Analyze the effect of the silencing of the WFDC1/ps20 gene in the behavior of p63-positive cells and tissue architecture during the post-natal prostatic development. **Materials and methods:** Ventral prostate of newborn Wistar rats were cultured on floating permeable membranes, in the presence of small interference RNA to reduce ps20 expression. The organs were cultured for seven days, and then analyzed by counting of epithelial structures formation, histological and immunohistochemical staining and Real Time PCR. **Results:** The silencing of WFDC1/ps20 led to a 36% reduction in WFDC1/ps20 mRNA amount. It was observed reduction in the number of epithelial duct tips between the second and fourth day of culture, and between the fourth and seventh day. Histological analysis revealed reduced branching and dilated tips in response to WFDC1/ps20 knocking down. It was observed hindered polarization and reduced cavitation. Immunohistochemistry for p63 revealed that reduced levels of ps20 promoted the concentration of p63⁺ cells at the enlarged ductal tips. Real Time PCR revealed that the knocking down the WFDC1/ps20 gene promoted a 9-fold increase in the amount of MMP9 mRNA. **Discussion:** The silencing of WFDC1/ps20 affected prostate development with an unambiguous effect on p63⁺ cells behavior, as represented by their accumulation at the ductal tips and depletion along the extended ducts. The treatment also hampered the differentiation of luminal cells and compromised cavitation. The increased MMP9 mRNA content might be correlated with the accumulation of the protein and uncontrolled degradation of the extracellular matrix around the duct tips, leading to the dilated phenotype. Since the correct degradation of the matrix in specific sites is required for the branch point formation we suggest that ps20 regulates the balance for MMP9 activity required during prostate development. This idea places the uPA/uPAR system upstream of MMP-9 regulation and activation. **Conclusions:** The reduction in the WFDC1/ps20 expression compromised branching morphogenesis, epithelial cell polarization and cavitation. These aspects are associated with a destabilization of p63⁺ cell behavior, as suggested by their accumulation at the dilated tips and depletion from the basal cell compartment along the extended ducts.

Key words: prostate - development, stem cells, stem cells niche, prostatic neoplasms, WFDC1 protein.

Introdução

Conceitos iniciais

O conceito de que tecidos possuem a capacidade de se regenerarem vem das ciências médicas e biológicas do século XIX. A existência de células tronco, vistas como a origem principal de renovação tecidual, foi publicada pela primeira vez por Regaud (Regaud. 1901), com seus estudos sobre espermatogênese. Posteriormente, os hematologistas Weidenreich, Dantschakoff e Maximow sustentados por Ferrata e Pappenhein propuseram que todas as células sanguíneas são derivadas de uma célula-tronco em comum (Baserga e Zavagli. 1981). Ambos os resultados seguem a ideia de que para a espermatogênese ocorrer, e para as células sanguíneas se renovarem ao longo da vida de um organismo, deve haver células ancestrais auto-replicantes. A descoberta posterior, de que certos progenitores podem reconstituir a população de células sanguíneas após irradiação letal, definiu de maneira mais clara o papel das células tronco e culminou no aumento das pesquisas com essas células (Robey. 2000).

Células tronco são muito importantes para um organismo. Nos embriões de 3-5 dias, denominados blastocistos, células tronco se dividem e diferenciam para formar células especializadas, que vão dar origem a diversos tecidos do organismo. Nos tecidos adultos, pequenas populações de células tronco controlam a reposição de células que são perdidas pelo envelhecimento, injúria ou doença (Ehnert et al. 2009). Células tronco não são especializadas, podem se auto-renovar indefinidamente e diferenciarem-se para formar um ou mais tipos celulares, o que levou a pesquisas sobre a possibilidade de utilizar essas células para o tratamento de doenças e lesões. Duas diferentes estratégias são buscadas para a utilização de células tronco na medicina regenerativa. Uma consiste na injeção de suspensões celulares na corrente sanguínea ou no tecido alvo, a denominada terapia celular. A segunda estratégia, denominada engenharia tecidual, é mais complexa e utiliza uma matriz, composta tanto de elementos orgânicos quanto de biomateriais, combinada a células tronco, para reconstruir um segmento tecidual ou órgão inteiro para substituição. Através dessas técnicas, acredita-se que seja possível desenvolver terapias eficientes contra diversos tipos de doenças e lesões, como; diversas doenças hepáticas, diabetes, distrofia muscular, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, artrite, degeneração retinal, lesões na medula espinal, esclerose múltipla e desordens monogênicas, como a hemofilia (Ehnert et al. 2009).

Células tronco residem em locais denominados “nichos” em um determinado órgão. Esses nichos consistem de um microambiente contendo células diferenciadas e elementos da matriz extracelular que nutrem as células tronco e as mantêm em seu estado quiescente. O conceito de nicho foi introduzido em 1978 (Schofield. 1978), no entanto, foi amplamente negado até que estudos com *Drosophila* estimulassem seu ressurgimento. Células do nicho fornecem um ambiente que impede que as células recebam estímulos para a diferenciação, apoptose e outros estímulos que podem desequilibrar a reserva de células tronco. O nicho também protege contra replicação excessiva de células que podem levar ao câncer. Células tronco são periodicamente ativadas para produzir progenitores ou células de amplificação transitória (TA) que estão comprometidas a produzir células diferenciadas. Assim, manter o balanço entre a quiescência e atividade das células tronco é a marca de um nicho funcional (Moore e Lemischka. 2006).

Estudos envolvendo células germinativas de *Drosophila* e *Caenorhabditiselegans* mostraram que os nichos são regulados por interações com a matriz extracelular e fatores de crescimento. Em ovário e testículos de *Drosophila*, células tronco crescem em contato com células vizinhas que as ancoram, mantendo a quiescência e permitindo a divisão assimétrica. A ancoragem das células garante que as células filhas movam-se para microambientes diferentes, assim sendo expostas a diferentes

sinais que regularão sua diferenciação (Langet al. 2009).

Nichos de células tronco compartilham diversas propriedades. Os nichos contêm elementos estromais de suporte que diferem de acordo com o nicho. Por exemplo, células endoteliais nutrem o nicho neuronal, enquanto osteoblastos N-caderina⁺ suportam o nicho das células tronco hematopoiéticas. O nicho fornece contato físico e ancoragem, os quais são necessários para a auto-renovação das células tronco. Moléculas de adesão como integrinas, E- e N-caderinas ancoram as células tronco à matriz extracelular. Fatores extrínsecos que controlam o número e o destino da população de células tronco são gerados juntamente ao nicho. Isso inclui diversas moléculas sinalizadoras, como Wnts, BMPs, FGFs, Notch e Shh, que controlam, positiva ou negativamente, a auto-renovação e determinação das células tronco (Guilak et al. 2009; Blum et al. 2010).

Assim, pode-se definir o nicho de células tronco como uma unidade estrutural interativa organizada para facilitar a determinação correta das células que o compõe de maneira espaço-temporal. Eventos de sinalização e *cross-talk* molecular são padronizados para ocorrerem no momento certo e na hora certa. É comum, entre diferentes nichos, a influência da organização anatômica na coordenação da função das células tronco. Sinais negativos e positivos estão integrados, como representado pelo eixo Wnt/Bmp e muitas dessas vias são comuns entre diferentes sistemas (Moore e Lemischka. 2006).

O estudo dos nichos de células tronco também é importante para o entendimento do câncer, sua origem e possíveis estratégias de tratamento. Células tronco nos órgãos possuem uma longa vida, isso faz com que adquiriam modificações epigenéticas e mutações genéticas através da exposição a insultos como o estresse oxidativo e dano ao DNA ao longo do processo de envelhecimento, resultando na desregulação de processos celulares normais (Bell e Van Zant. 2004; Feinberg et al. 2006). As características do tumor podem ser determinadas pelo estágio na qual essas alterações genéticas ocorrem. Mutações nas células tronco embrionárias dariam início aos cânceres da infância, como tumor de Wilms, teratocarcinoma e neuroblastoma. Mutações em progenitores precoces promovem o desenvolvimento de cânceres mal diferenciados, incluindo tumores de próstata, mama e cólon. Cânceres bem diferenciados surgiriam de progenitores tardios e tumores benignos de células um pouco antes da diferenciação terminal (Sell. 2004).

O ônus global do câncer continua a aumentar em grande parte devido ao envelhecimento e crescimento da população mundial e a uma crescente adoção de comportamentos causadores de câncer, especialmente o tabagismo, dentro de países em desenvolvimento econômico. Foi estimado que em 2008 ocorreram 12.7 milhões de novos casos de câncer seguidos de 7.6 milhões de mortes por câncer em todo o mundo (Jemal et al. 2011). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer, estimou que em 2010 houve 489.270 novos casos de câncer, sendo, 236.240 no sexo masculino e 253.030 no sexo feminino. Com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, o câncer de próstata teria a maior prevalência com 52.350 novos casos. O câncer de próstata é o segundo câncer mais frequentemente diagnosticado e a sexta maior causa de morte por câncer em homens, representando 14% (903.500) do total de casos novos de câncer e 6% (258.400) do total de mortes por câncer em homens em 2008. O câncer de próstata, mama, e colo-retal no sexo feminino, e as taxas de câncer de pulmão, são de 2 a 5 vezes maiores nos países desenvolvidos quando comparado aos países em desenvolvimento, como resultado de variações em um conjunto heterogêneo de fatores de risco e práticas de diagnóstico (Jemal et al. 2011).

Desenvolvimento prostático e fatores envolvidos

A glândula prostática desenvolve-se a partir do seio urogenital (UGS), que se origina da

endoderme. O processo de desenvolvimento, embora contínuo, pode ser classificado em cinco estágios distintos, que envolvem a determinação, início do brotamento, morfogênese em ramos, diferenciação e maturação pubertal. A determinação envolve a expressão de sinais moleculares que comprometem uma parte específica do seio urogenital com o desenvolvimento da próstata. O desenvolvimento fenotípico começa quando as células epiteliais do seio urogenital formam brotos que penetram o mesênquima circundante ao seio urogenital. Em humanos, o desenvolvimento prostático ocorre durante o segundo e terceiro trimestre de gestação e está completo no momento do nascimento. Em contraste, a próstata de roedores tem grande parte do seu desenvolvimento nos primeiros 15 dias após o nascimento. No nascimento, os lobos ventrais, dorsais e laterais da próstata de roedores, consistem de dutos alongados, sem ramificações, sendo que os subseqüentes crescimento e ramificação ocorrem após o nascimento. Durante essa fase, a proliferação de células epiteliais ocorre principalmente nas pontas dos brotos em crescimento, as extremidades distais (*típs*). O contato com o mesênquima prostático, também em desenvolvimento, promove o início e progresso da ramificação dos brotos. A morfogênese completa-se entre os dias 15 e 30 após o nascimento e o crescimento final e maturação ocorrem na puberdade, entre os dias 25 e 40 com o aumento dos níveis de andrógenos circulantes (Prins e Putz. 2008).

A diferenciação de células mesenquimais e epiteliais é coordenada com a morfogênese e ocorre no sentido proximal ao distal. A formação de lúmen ocorre juntamente com a diferenciação e formação das camadas basais e luminais e inicia-se nos dutos proximais por volta do dia 5 após o nascimento, estendendo-se a região distal por volta do dia 12. Entre os dias 10 e 15 a diferenciação funcional começa e ocorre a síntese de produtos de secreção pelas células luminais diferenciadas. Juntamente com a diferenciação epitelial, o mesênquima condensa-se entorno das pontas dos brotos e forma um padrão distinto ao longo da membrana basal. Células adjacentes aos dutos formam uma camada periductal de células musculares lisas enquanto células interductais se diferenciam em fibroblastos (Prins e Putz. 2008).

A determinação e iniciação do desenvolvimento prostático de humanos e roedores é inteiramente dependente de andrógenos produzidos pelos testículos fetais. Os andrógenos agem através de sua interação com receptores nucleares denominados receptores de andrógeno (AR), que são membros de uma superfamília de fatores de transcrição. AR é bastante expresso no mesênquima do UGS antes e durante a morfogênese prostática, enquanto a expressão de AR epitelial é induzida após o início do brotamento e ramificação. Foi demonstrado que o AR no mesênquima, não no epitélio, é responsável pela morfogênese prostática (Cunha e Chung. 1981; Cunha et al. 1987). Proliferação epitelial e diferenciação parecem ser amplamente governadas por fatores parácrinos sobre controle do AR mesenquimal, enquanto a diferenciação de células mesenquimais também requer sinais produzidos pelo epitélio (Prins e Putz. 2008). Esses eventos culminam na diferenciação de três linhagens de células prostáticas funcionalmente distintas; basal, luminal secretória e neuroendócrina. Células basais expressam citoqueratinas de alta massa molecular como CK5 e CK14. Elas não expressam receptor de andrógeno AR e sustentam as células luminais, que expressam citoqueratinas de baixa massa molecular, como CK8 e CK18. As células luminais expressam AR, produzem a secreção prostática e o antígeno específico prostático (PSA) em humanos, processos que são frequentemente regulados por andrógenos. Células neuroendócrinas produzem neuropeptídeos incluindo serotonina, bombesina, calcitonina e somatostatina (Kasper. 2008).

Fatores de transcrição nuclear, que incluem genes homeobox comuns e órgão-específicos e sinalizadores secretados como *Hedgehogs*, *Wnts*, *Fgfs* e *Bmps/Tgfb/activina* controlam o desenvolvimento prostático. Essas moléculas secretadas comunicam-se de maneira autócrina e parácrina entre células epiteliais e mesenquimais através de seus receptores (Prins e Putz. 2008).

Culturas de próstatas de ratos recém nascidos revelaram que genes Hox expressos durante o desenvolvimento prostático, incluindo Hoxa13, Hoxd13 e Hoxb13 são regulados positivamente por testosterona (Huang et al. 2007). Estudos mostraram papéis essenciais para Hoxa13 no crescimento prostático e Hoxd13 no crescimento prostático e ramificação (Warot et al. 1997). Ratos nocaute para Hoxb13 demonstram perda da produção de elementos de secreção e perda de polaridade celular, sugerindo seu papel na diferenciação (Economides e Capecchi. 2003). Isso é apoiado por estudos utilizando vetores lentivirais para promover a expressão de Hoxb13 em células prostáticas de ratos indiferenciadas, os quais demonstraram a ocorrência de induzida diferenciação para a linhagem epitelial(Huang et al. 2007).

O gene Nkx3.1 é expresso no trato reprodutivo masculino de maneira restrita ao epitélio da glândula prostática e bulbouretral (Bieberich et al. 1996). Sua expressão no epitélio do UGS em locais de início do brotamento, antes da formação dos brotos, sugere um papel na determinação prostática (Bieberich et al. 1996; Bhatia-Gaur et al. 1999). A expressão de Nkx3.1 epitelial é mantida ao longo da vida e acredita-se que tenha papel importante na homeostase tecidual. Camundongos mutantes nulos para Nkx3.1 exibem padrão de ramificação e diferenciação defeituosos, sugerindo sua importância na morfogênese ductal e diferenciação(Schneider et al. 2000).

Expressão de FoxA1 é detectada no epitélio da próstata em desenvolvimento, onde possui importante papel na morfogênese ductal e maturação das células epiteliais. Sua expressão é observada nos brotos epiteliais do UGS de ratos e camundongos, seus níveis aumentam durante o desenvolvimento prostático e são mantidos ao longo da vida adulta (Kopachik et al. 1998; Gao et al. 2005).

A via de sinalizaçãoNotch está ativa nos locais de início do brotamento, sugerindo um papel no processo inicial do desenvolvimento prostático. Enquanto Notch1 é inicialmente expresso por todas as células progenitoras, após a diferenciação sua expressão fica restrita às células epiteliais basais (Wang et al. 2004). Evidências demonstram que a sinalização Notch inibe a expansão de progenitores prostáticos, facilita a diferenciação epitelial durante o desenvolvimento ea continuidade da ativação dessa via tem papel na manutenção da homeostase (Wang et al. 2006).

Shh também possui papel na manutenção de células progenitoras da próstata para permitir o desenvolvimento correto do ducto (Berman et al. 2004), proliferação epitelial, diferenciação e ramificação. Excesso de Shh leva a regulação negativa de Fgf10 e positiva de Bmp4, o que resulta em um obstáculo para ao crescimento ductal e ramificação(Freestone et al. 2003; Pu et al. 2004).

A expressão de Fgf10 é detectada na próstata espacialmente restrita as regiões distais da glândula, onde é proposto que funcionem como quimioatratadores para os ductos em alongação e como indutor da ramificação dos ductos através da estimulação da proliferação de células epiteliais (Thomson e Cunha. 1999; Donjacour et al. 2003). A expressão de Fgf10 é ampla no mesênquima em desenvolvimento, durante os estágios iniciais do brotamento ductal e alongação e subsequente condensação ao redor dos ductos em crescimento, com forte expressão nas pontas distais durante a morfogênese ductal ativa (Huang et al. 2005). Receptores de Fgf10 e Fgf7 são expressos por células epiteliais prostáticas, estabelecendo assim importante comunicação parácrina epitélio-estroma durante o desenvolvimento. Estudos com camundongos nocaute para Fgf10 demonstraram um papel essencial na iniciação prostática e morfogênese, pois as próstatas desses animais eram rudimentares, com número limitado de brotos e crescimento bastante limitado. Foi demonstrado que a sinalização Fgf10 é

essencial para a estimulação por testosterona da expressão de Shh e Hoxb13 no epitélio da próstata ventral, estabelecendo assim que o Fgf10 funciona como um fator parácrino regulado por andrógeno que influencia a expressão de genes morforegulatórios em células epiteliais (Pu et al. 2007).

Experimentos sugerem que Bmp possui a função de inibidor do crescimento prostático, restringindo o crescimento dos brotos, e a compensação dessa função é necessária para o início do brotamento. Acredita-se que a expressão contínua de Bmp4 ao longo da extensão dos ductos possui um papel ativo na ramificação, por limitar a proliferação celular em locais restritos (Lamm et al. 2001; Pu et al. 2004; Huang et al. 2005; Prins et al. 2006). Bmp7 também possui potencial inibitório. Receptores de Bmp7 são encontrados tanto em células epiteliais como mesenquimais, nas regiões proximal e distal, sugerindo uma resposta diferenciada nesses locais distintos. Camundongos Bmp7 nocautes exibem um aumento de duas vezes na quantidade de ramificações, e adição de Bmp7 a cultura de órgãos inibe a morfogênese, indicando sua função inibitória semelhante a Bmp4 (Grishina et al. 2005).

Foi demonstrado que Tgf β 1 também possui papel inibitório do crescimento no desenvolvimento prostático. Seu papel inibitório no crescimento e morfogênese ductal pode ser atribuído em parte pela indução da expressão de p21^{cip/waf1} no epitélio, o qual leva a célula epitelial para um estado de diferenciação terminal, limitando sua proliferação (Chang et al. 1999). A ação de Tgf β 1 varia ao longo do eixo proximal-distal, levando a supressão da proliferação de células epiteliais e estromais nos ductos proximais e estimulando a proliferação de células epiteliais nas pontas distais menos diferenciadas (Tomlinson et al. 2004). A ação inibitória do crescimento pelo Tgf β 1 pode ser também mediada, em parte, pela redistribuição nuclear de AR para o citoplasma induzida por Tgf β 1 em células musculares lisas, suprimindo efetivamente a ação de andrógenos nessas células (Gerdes et al. 1998). Além disto, foi demonstrado que Tgf β 1 reprime a expressão prostática de Fgf10, o que pode também contribuir para seus efeitos inibitórios (Tomlinson et al. 2004).

A via de sinalização Wnt possui papel fundamental no desenvolvimento prostático. Em culturas de órgãos, a adição de Wnt5a inibe o crescimento de ductos e sua ramificação, devido a supressão da proliferação de células epiteliais nos ductos centrais e distais, mas não nos proximais. As células demonstraram sinais de maturação e diferenciação atrasada, além da falta de organização e polarização das células epiteliais (Huang et al. 2009).

Células tronco prostáticas

Células tronco prostáticas (PSC) nos ratos e camundongos adultos podem ser definidas por sua habilidade de sobreviverem a retirada aguda de andrógenos e proliferarem, diferenciarem e reconstruírem uma próstata mediante a reposição de andrógeno. Estudos de regressão/regeneração demonstram que, mesmo após mais de 30 ciclos, o tratamento com andrógenos pode restaurar a estrutura glandular (Tsujiura et al. 2002). Isaacs e Coffey (1989) propuseram que células tronco andrógeno-independentes dão origem a dois tipos celulares: células tronco e células de amplificação transitória (TA) andrógeno-independentes, as quais podem se dividir rapidamente, com capacidade proliferativa limitada e diferenciar-se em células luminais através de um fenótipo intermediário (Isaacs e Coffey. 1989).

Um sistema bastante útil para a análise do desenvolvimento prostático é a recombinação tecidual desenvolvida por Cunha e Lung (1978). Fragmentos de tecido dissecados do mesênquima do seio urogenital de ratos ou camundongos de meia gestação demonstram uma influência indutiva

quando combinados com fragmentos de epitélio prostático de origem embrionária ou pós-natal e enxertados sobre a cápsula renal de camundongos imunodeficientes. Com esse sistema é possível regenerar a arquitetura tubular ramificada da próstata (Cunha e Lung, 1978). Utilizando um sistema similar, foi proposto um modelo alternativo no qual células basais, luminais e neuroendócrinas representam linhagens de células epiteliais distintas. Kurita et al (2004) demonstrou que as células do seio urogenital de animais $p63^{-/-}$ dissociadas e enxertadas sobre a cápsula renal de camundongos machos, desenvolvem-se em um tecido prostático contendo células luminais e neuroendócrinas, porém sem células basais, suportando a hipótese de que esse tipo celular origina-se de uma linhagem epitelial separada (Kurita et al. 2004). Na próstata, uma população de células BrdU-positivas de ciclagem lenta foi encontrada na camada basal da região proximal. Essas células possuem alta capacidade proliferativa em cultura e são capazes de reconstituir estruturas glandulares ramificadas em culturas 3D em gel de colágeno (Tsujimura et al. 2002). Essas células sobrevivem à remoção androgênica e são capazes de regenerar completamente o tecido prostático após a reposição de andrógenos (Goto et al. 2006). Esses resultados sugerem que as células tronco prostáticas estão localizadas na região proximal.

Experimentos utilizando o cultivo de células em uma matriz semi-sólida contendo altos níveis de laminina e outros fatores demonstraram que a interação de receptores de superfície com as proteínas da matriz extracelular regula a polaridade e morfologia de células epiteliais mamárias, além de mediar sinais de sobrevivência, proliferação e diferenciação (Bissell et al. 2002). Células epiteliais prostáticas malignas e normais desenvolvem morfologia acinar em Matrigel, através de interações do receptor de superfície CD49f e a laminina do Matrigel (Bello-Deocampo et al. 2001). Células prostáticas crescem em estruturas esféricas quando cultivadas em Matrigel. Foi demonstrado que as células $p63^{+}$ possuem maior capacidade de formação de estruturas esféricas e essas células localizam-se preferencialmente na periferia das esferas, aonde estão em contato com os elementos da matriz. Essas observações sugerem que $p63$ deve regular a expressão de moléculas de adesão para modular vias de sinalização entre as células tronco e seu nicho que, subsequentemente, controla a capacidade proliferativa e diferenciação das células tronco prostáticas (Xin et al. 2007).

Estudos sugerem que células basais expressando $p63$ são requeridas para organogênese prostática. Camundongos $p63$ -deficientes apresentam defeitos severos no desenvolvimento de órgãos epiteliais que expressam $p63$, agênese do epitélio escamoso e glândulas mamária, salivar e lacrimal, demonstrando assim que $p63$ deve ser essencial para a manutenção da população de células tronco em vários tecidos epiteliais. Análises histológicas de toda a uretra de camundongos $p63^{-/-}$ revelaram ausência da próstata. Nenhum ducto ou brotamento epitelial pode ser identificado tanto na porção ventral quanto dorsolateral do mesênquima periuretral. (Signoretto et al. 2000).

Kurita et al (2004) realizaram estudos com camundongos $p63^{-/-}$ e $p63^{+/+}$ e demonstraram que $p63$ é essencial para o desenvolvimento das células prostáticas basais, mas que o desenvolvimento dos ductos prostáticos e a diferenciação de células luminais não necessitam de células $p63^{+}$. As células neuroendócrinas e células musculares lisas também não necessitam desse tipo celular para sua diferenciação (Kurita et al. 2004). Embora as células basais não sejam necessárias para a diferenciação de células luminais, elas parecem ser essenciais para a manutenção da diferenciação das células luminais. A perda das células basais, ou alterações em moléculas de adesão celular, afeta a expressão gênica e fenótipo das células luminais na próstata. As células basais $p63^{+}$ residem na membrana basal e devem mediar ou modular interações entre células estromais e luminais. Devido ao crescimento epitelial e diferenciação funcional serem reguladas por andrógenos através de fatores parácrinos estromais, é provável que a perda das células basais perturbe a interação entre as células epiteliais e estromais e atrapalhe esses eventos (Kurita et al. 2004).

Ousset et al (2012) realizaram experimentos de localização de linhagens celulares para investigar a hierarquia celular que contribui para o desenvolvimento prostático pós-natal sob condições fisiológicas. Foi mapeada a expressão de citoqueratinas basais (CK5, CK14) e luminais (CK8/18, CK19) durante o desenvolvimento prostático pós-natal e foi constatada a existência de progenitores basais multipotentes capazes de se diferenciarem em células basais, luminais e neuroendócrinas, além de progenitores luminais unipotentes, que seriam responsáveis pela grande expansão epitelial que ocorre durante o desenvolvimento prostático pós-natal. Para o desenvolvimento prostático foram propostos dois modelos, um na qual o compartimento de células basais contém progenitores basais unipotentes e bipotentes, enquanto no segundo modelo, um único progenitor basal bipotente pode se dividir simetricamente para dar origem a dois progenitores basais bipotentes, ou assimetricamente dando origem a um progenitor basal bipotente ou progenitor luminal unipotente. Durante a homeostase e regeneração prostática induzida por andrógenos, as linhagens luminais e basais são repostas por dois diferentes tipos de progenitores unipotentes basais e luminais (Ousset et al. 2012).

Acredita-se que as células tronco proliferem e se diferenciem mediante a estímulos similares aos detectados no desenvolvimento prostático. Wang et al (2006) demonstrou que a inativação de Notch em culturas de órgão resultou em formação luminal reduzida, segregação das camadas basal e luminal e separação entre as células basais adjacentes. A marcação de p63 não era homogênea, mas em grupos e em alguns lugares foi observado aumento da camada basal. As próstatas tratadas com os inibidores demonstraram um epitélio desorganizado, sem células luminais colunares justapostas a células basais alongadas. Foi observado aumento da população de células que expressaram marcadores de células luminais e basais, como CK8 e CK14, sugerindo um papel inibitório de Notch no crescimento e expansão de células epiteliais prostáticas, assim como na diferenciação (Wang et al. 2006). Grishina et al (2005) demonstrou que BMP7 inibe a ramificação prostática e limita a atividade de Notch1. Em ratos nulos para BMP7, o aumento da ramificação prostática coincidiu com o aumento da atividade de Notch1 no epitélio urogenital. Foi proposto que BMP7 inibe a sinalização de Notch1 no epitélio da próstata e limita o número de células com expressão de Notch1. Adicionalmente, foi demonstrado que FGF10 pode manter a atividade de Notch1 independentemente da atividade de BMP7. FGF10 compensa o efeito inibitório de BMP7 na sinalização por Notch1 (Grishina et al. 2005).

Outra importante via de sinalização é a via Wnt, envolvida no desenvolvimento prostático. Foi demonstrado que a ativação da sinalização canônica de Wnt mantém células progenitoras epiteliais em seu estado indiferenciado (Wang et al. 2008). Adição de Wnt5a a culturas de órgãos resultou em inibição do crescimento ductal e ramificação, as próstatas exibiram sinais de maturação e diferenciação celular atrasadas e as pontas dos ductos estavam preenchidas de células basais p63⁺. Em contraste, ratos nocaute para Wnt5a não demonstraram perda da capacidade de diferenciação das células epiteliais. Foi sugerido que Wnt5a não afeta permanentemente a diferenciação terminal, mas sim possui um papel em controlar a proliferação epitelial, organização e polarização. Wnt5a não é essencial para o início do brotamento prostático, mas é requerido para o desenvolvimento normal da próstata (Huang et al. 2009).

Nicho das células tronco prostáticas

Embora diferentes células tronco em diferentes tecidos variem em seu potencial de desenvolvimento, todas as células tronco devem se auto-renovar, porém seguindo um balanço adequado entre sua auto-renovação e diferenciação (Reya et al. 2001). Trabalhos em outros sistemas demonstraram que as células tronco devem residir em um nicho especializado que fornece um balanço essencial de células especializadas e fatores que permitem que a célula tronco se replique e diferencie

de acordo com as necessidades do sistema (Bjerknes e Cheng. 1999; Oshima et al. 2001; Spradling et al. 2001). O nicho das células tronco da próstata ainda não foi identificado devido a dificuldades para encontrar as células tronco prostáticas. Devido ao fato de células tronco ciclarem lentamente, a marcação por BrdU pode ser usada para identificar essas populações. Essas células que retêm por longos períodos a marcação por BrdU foram encontradas em outros órgãos, incluindo as córnea, folículo piloso, esôfago, coração, rim, pulmão e pâncreas. Evidências demonstram que células com retenção a longo prazo de BrdU são encontradas na camada basal da região proximal dos ductos prostáticos. Essas células possuem alto potencial proliferativo e foram capazes de reconstruir estruturas glandulares ductais em culturas 3D. Essas células sobrevivem a remoção de andrógenos e suportam a regeneração completa do tecido prostático após suplementação androgênica (Takaue Tsujimura. 2008).

Blum et al (2010) isolaram células do epitélio e mesênquima do seio urogenital (UGE e UGM, respectivamente), compararam a diferença de expressão gênica e buscaram, através de análises computacionais, decifrar fatores de transcrição e funções biológicas que caracterizam o nicho das células tronco prostáticas. Foram encontrados fatores ativos tanto no UGM quanto UGE, que possuem ligação com outros sistemas de células tronco, onde regulam funções como auto-renovação, migração e oncogênese. Foram observadas variações nos níveis de membros da família Ap2, que é responsável por promover a proliferação sobre a diferenciação, sendo um marcador de células tronco e pluripotência. Tcfap2a e Tcfap2c estão mais expressos no UGE em comparação com UGM, enquanto Tcfap2b está aumentando no UGM. Lmo2 está expresso onze vezes mais no UGM em comparação com o UGE. Na próstata normal atua como regulador da determinação celular e diferenciação e sua superexpressão está relacionada com o estágio avançado de tumores prostáticos. O enriquecimento de motivos Areb6/Zeb1 no UGE sugere que a migração celular deve ser um componente integral do nicho das células tronco da próstata. Esse fator é um regulador da transição epitélio-mesênquima no câncer prostático e estimula a migração e invasão das células prostáticas cancerígenas. Como foi demonstrado que a transição epitélio-mesênquima gera células com propriedades de células tronco, acredita-se que atividade de Areb6 no nicho das células tronco da próstata está relacionada a esse processo no nicho primitivo, assim como na invasão das células epiteliais no mesênquima circundante para formar os brotos prostáticos primitivos, de onde os ductos prostáticos se desenvolvem. Rreb1 também pode estar ligado com a migração de células no nicho das células tronco prostáticas. Rreb1 é essencial para diminuir as interações célula-célula de células epiteliais e permitir sua migração. Assim, a combinação de fatores expressos no nicho das células tronco da próstata deve ditar as mudanças dinâmicas na morfologia e migração de células juntamente ao nicho (Blum et al. 2010).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina está relacionado a auto-renovação de diversos tipos de células tronco e Wnt5a está expresso seis vezes mais no UGM em comparação com UGE. Para seu funcionamento, Wnt depende da palmitoilação, indicando que ambos o metabolismo lipídico e a via de sinalização Wnt são importantes reguladores no nicho das células tronco da próstata. A via Wnt/ β -catenina também regula a expressão de membros da família Eph de receptores e suas efrinas ligantes. Interações Eph-efrina são responsáveis pelo posicionamento de células no nicho e promover proliferação de células progenitoras. O ligante de Efn1 foi detectado com expressão três vezes maior no UGE e o receptor Efn3 onze vezes mais expresso no UGM em comparação com o UGE. Outra via de sinalização bastante relevante para a biologia de células tronco é a via Notch. Foi detectada expressão quatro vezes maior do receptor de Notch, Jag2, no UGE, enquanto o UGM expressa quatro vezes mais o ligante Notch4, em comparação com o UGE. Também foi detectado em abundância membros da família FGF, os quais estão ligados com as interações epitélio-mesênquima, auto-renovação, morfogênese prostática e manutenção do nicho. TGF- β e BMPs também participam de vias

bastante relevantes para a manutenção da auto-renovação de células tronco e muitas dessas moléculas estão superexpressas no UGE ou UGM. Também foram avaliados membros da via de sinalização Shh, que possui papel na proliferação e foi revelado um aumento de duas vezes na expressão do receptor de Shh, Ptch1, no UGM em comparação com o UGE (Blum et al. 2010).

Integrinas mediam a ligação de células tronco à matriz extracelular presente no nicho. Interações de integrinas com a matriz iniciam vias de sinalização e podem também ativar receptores de fatores de crescimento (Watt e Hogan. 2002). Foi encontrado aumento na expressão de Itga1, Itga4, Itga7, Itga8, Itga9 e Itgb3 no UGM em comparação com o UGE. Em contraste, outras integrinas são detectadas com expressão maior no UGE, como Itga3 e Itgb4, que funcionam como receptores de laminina, um componente da membrana basal. A expressão da subunidade integrina $\alpha 3$ é aumentada significativamente por p63. A expressão de Trp63 aparece 32 vezes maior no UGE em comparação com o UGM. Isso pode levar a expressão elevada da subunidade $\alpha 3$ integrina no UGE, o qual deve influenciar a adesão de células tronco a seu nicho. A expressão de integrina $\beta 6$ é cinco vezes maior no UGE e está envolvida com a ativação de TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 3$. A região proximal dos ductos prostáticos possui altos níveis de TGF- β e essa sinalização promove a quiescência de células tronco, sugerindo que esse é um regulador importante do nicho das células tronco da próstata (Blum et al. 2010).

A indução do crescimento e diferenciação de células epiteliais por células mesenquimais adjacentes é uma característica comum da organogênese de muitos tecidos. Essas interações foram particularmente bem estudadas na morfogênese do seio urogenital fetal em uma glândula prostática. Células epiteliais do seio urogenital progridem seguindo um padrão de morfogênese de ácinos apenas quando recombinadas com células mesenquimais do seio urogenital (Cunha. 1972). Interações epitélio-estroma possuem um importante papel, não apenas no desenvolvimento prostático, mas na progressão do câncer de próstata. Células estromais derivadas de hiperplasia prostática benigna possuem propriedades de células tronco com marcadores de células tronco mesenquimais (Lin et al. 2007). É importante entender a biologia das células estromais prostáticas não apenas no aspecto do nicho e seu papel em manter e determinar o destino das células tronco normais e cancerígenas, mas também como componente fundamental do tecido prostático com enorme potencial proliferativo e de diferenciação (Miki. 2010).

É sugerido que uma proteína designada ps20 também participa de processos relacionados a adesão celular. Rowley et al (1995) demonstraram que ps20 é capaz de inibir a proliferação de células PC3 em cultura e estimular a síntese protéica. Observações feitas em ensaio *in vitro* sugerem uma função na interação epitélio-estroma envolvida no crescimento tecidual e controle da diferenciação na glândula prostática. Foi demonstrado que, tanto a matriz extracelular produzida pelas células estromais, o contato direto célula-célula e a secreção de efetores parácrinos induzem e/ou facilitam a expressão gênica específica que levará a um fenótipo epitelial em uma ampla variedade de tecidos. Acredita-se que a combinação desses fatores parácrinos, moléculas da matriz e comunicação célula-célula contribuem para mecanismos de indução de fenótipo epitelial pelo estroma. As ações de ps20 devem ser um componente desse mecanismo. A proteína ps20 deve funcionar como um componente da matriz depositado pelo mesênquima ou como uma proteína de membrana envolvida na adesão célula-célula ou célula-matriz, assim afetando a proliferação/diferenciação (Rowley et al. 1995). A possível relação entre ps20 e as células tronco/progenitoras da próstata ainda precisa ser estudada.

Um processo bastante importante durante o desenvolvimento prostático é a clivagem proteolítica de componentes da matriz extracelular por MMPs (Xuet al. 2001). MMPs abrangem uma

família de enzimas que degradam uma grande variedade de componentes da matriz extracelular e possuem um papel importante em processos fisiológicos normais e estados patológicos, como a metástase tumoral e angiogênese. MMP-2 e MMP-9 são gelatinases que degradam preferencialmente colágeno tipo IV e laminina. A atividade de MMP-2 é maior durante o início do desenvolvimento prostático pós-natal, o que indica que sua expressão pode ser regulada por testosterona. MMP-9 localiza-se preferencialmente nas pontas dos ductos epiteliais em desenvolvimento e sua expressão é reduzida conforme o desenvolvimento se completa. Acredita-se que processos como a proliferação celular, ramificação ductal e a invasão epitelial no estroma estejam relacionadas com a atividade proteolítica localizada de MMP-2 e MMP-9 (Bruni-Cardoso et al. 2008). A relação entre MMP-9 e ps20 é desconhecida, assim como a relação de ambas essas moléculas com o fator de transcrição p63.

Justificativa

Compreender os elementos do nicho envolvidos no controle das células tronco prostáticas e de seus intermediários é essencial para a compreensão da dinâmica dos tipos celulares envolvidos no crescimento e fisiologia prostáticas. A desregulação desses elementos permite a proliferação celular excessiva, o que leva a carcinogênese e essa desregulação também auxilia nos processos de progressão tumoral.

Objetivos

Analisar o efeito do silenciamento do gene *WFDC1*/ps20 sobre o comportamento das células p63⁺, arquitetura tecidual durante o desenvolvimento prostático pós-natal e expressão de MMP9.

Materiais e Métodos

Procedimentos com animais

Os animais utilizados foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP). Foram utilizados ratos Wistar no dia do nascimento (dia 0). Os animais foram sacrificados por decapitação, a região do abdome inferior foi desinfetada com etanol 70% e as camadas de pele e músculo seccionadas de maneira a expor a cavidade peritoneal. Utilizando materiais cirúrgicos lavados e desinfetados com etanol 70%, o peritônio foi aberto e o sistema geniturinário exposto. Foram removidos os dois lobos da próstata ventral, localizados abaixo da bexiga urinária, os quais foram imediatamente colocados em placas de cultura. Os animais foram dissecados com o auxílio de uma lupa Leica M165C. Foram realizados três experimentos de cultura de órgãos, envolvendo quantidades diferentes de animais. No primeiro experimento, dois órgãos foram submetidos ao silenciamento de WFDC1/ps20 e três órgãos receberam o silenciamento de GFP. Esses órgãos foram utilizados para análise histológica e imunohistoquímica. No segundo experimento foram utilizados doze órgãos, sendo seis para o silenciamento de WFDC1/ps20 e seis para o silenciamento de GFP. Todos os doze órgãos foram congelados para extração de RNA. No último experimento foram utilizados novamente doze órgãos, sendo seis cultivados com siWFDC1 e seis com siGFP. Três animais de cada grupo foram utilizados para análise histológica e três para imunohistoquímica.

Cultura de órgãos e silenciamento com siRNA

Após a remoção das próstatas ventrais dos animais, os órgãos foram depositados sobre uma membrana de nitrocelulose semi-permeável LCR-PTFE Hidrofílica (Cat.: FHL01300, Millipore, Barueri, SP, BRA), previamente colocadas em placas de cultura de 24 wells, flutuando sobre meio de cultura DMEM (Cat.: 01.010.0500, Nutricell, Campinas, SP, BRA)/HAM-F12 (Cat.: 01981, Vitrocell, Campinas, SP, BRA) 1:1, suplementado com uma mistura de insulina, transferrina e selênio (Cat.: 41400-045, Gibco, Grand Island, NY, EUA) 1% e testosterona (Cat.: G03BA03, Novaquímica, Hortolândia, SP, BRA) 10 nM, juntamente com as soluções de siRNA contendo os duplex para inibição do mRNA do gene WFDC1 (Cat.: D-093220-04, ThermoScientificDharmacon, Pittsburgh, PA, USA). Como controle foi utilizado siRNA contendo duplex para inibição do mRNA da proteína GFP (Cat.: 27316638, IDT, Coral Ville, IA, EUA). Os siRNA foram utilizados na concentração de 20 μM transfectedos utilizando-se Lipofectamina 2000 (Cat.: 11668-019, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os meios de cultura contendo siRNA foram trocados a cada 48 horas e as culturas foram mantidas por sete dias em uma estufa úmida, contendo 5% de CO₂ a 37°C. O crescimento das culturas foi visualizado em microscópio Nikon TS100 e registrado com o auxílio de uma câmera Nikon DXM1200i. As imagens foram capturas utilizando objetiva com aumento de 10 vezes. A partir dessas imagens foi feita a contagem da ramificação dos ductos prostáticos. Todos os órgãos utilizados nos experimentos tiveram as pontas dos ductos prostáticos quantificadas visualmente e esses números foram submetidos a análises estatísticas.

Fixação, emblocamento e secção

Após o término dos sete dias de cultura, os órgãos foram retirados das membranas de nitrocelulose e imediatamente imersos em fixador. Para análises histológicas os órgãos foram fixados utilizando paraformaldeído (Cat.: 30525-89-4, Merck, Darmstadt, HE, ALE) 4% em solução salina tamponada com fosfato. Os órgãos ficaram imersos por 12-24 horas no fixador, lavados em água destilada, desidratados através de imersão em soluções de concentrações crescentes de etanol e imersos

em solução de historesina (Cat.: 702231731, Leica, Heidelberg, BW, ALE) por mais 12-24 horas. Todos esses procedimentos foram realizados em mesa agitadora orbital, em agitação moderada. Após a infiltração na solução de historesina, os órgãos foram emblocados em cápsulas de plástico para subsequente secção em micrótomo Leica RM2255. Foram realizadas secções de 2-4 µm que foram depositadas sobre lâminas histológicas de vidro. Para a imunohistoquímica, os órgãos foram imediatamente imersos em OCT (Cat.: 4583, Sakura, Torrance, CA, EUA) e congelados por imersão em nitrogênio líquido. Após completo congelamento, foram armazenados em biofreezer, a -80°C, para subsequente secção em criostato Microm HM505E. Foram realizadas secções de 5µm, que foram depositadas em lâminas histológicas de vidro.

Coloração com Hematoxilina & Eosina

Os cortes em historesina foram imersos em solução de Hematoxilina de Harris (Cat.: 2072, Dinâmica, Campinas, SP, BRA) por 20 minutos. Para oxidar a coloração as lâminas foram colocadas em suportes de vidro e deixadas sob água corrente por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de Eosina-fluxinapor 10 minutos, passadas em Xilol (Cat.: X09738RA, Êxodo Científica, Hortolândia, SP, BRA) por duas vezes de dois minutos cada e foram montadas sob lamínulas de vidro com Entellan (Cat.: 1.07961.0100, Merck, Darmstadt, HE, ALE). As lâminas foram analisadas em microscópio Leica DM2500 e registradas com o auxílio de câmera Leica DFM300 FX. Foram feitas imagens panorâmicas, em aumento de 10 vezes, das regiões proximal e distal, de maneira a permitir uma observação global do efeito do silenciamento. Foram capturadas imagens em aumento de 20 vezes de ambas as regiões para visualizar a formação de lúmen e a organização dos ductos prostáticos e imagens no aumento de 40 vezes para visualizar modificações a nível celular na organização ductal. A partir dessas imagens foi realizada a análise da formação de lúmen. Seis imagens do controle e seis imagens do siWFDC1 tiveram suas estruturas epiteliais quantificadas levando em conta quantas dessas estruturas epiteliais possuíam lúmen. Foi determinada a porcentagem de estruturas epiteliais com lúmen formado.

Imunohistoquímica

Os cortes obtidos por congelamento foram armazenados em freezer a -20°C. As lâminas foram retiradas do freezer e expostas a temperatura ambiente por 3-5 minutos. Para fixação foi utilizado paraformaldeído (Cat.: 30525-89-4, Merck) 4% em solução salina tamponada com fosfato por 10 minutos, seguido de permeabilização com Tween 20 (Cat.: T1.038, Synth, Diadema, SP, BRA) 0,2% em solução salina tamponada com fosfato e tratamento com peróxido de hidrogênio (Cat.: 00P1013.06.BJ, Synth, Diadema, SP, BRA) 6% em solução salina tamponada com fosfato para a remoção da autofluorescência do tecido. Para o bloqueio foi utilizado solução de BSA (Cat.: A7.906-5006, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 3%, soro de coelho (Cat.: R9133, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 10% diluídos em solução salina tamponada com fosfato, por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida foi aplicado anticorpo primário anti-p63 (Cat.: Sc-8431, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EUA) na diluição 1:100 em solução de BSA 1% com 10% de soro de coelho e deixado por 1 hora em forno seco a 37°C. O anticorpo secundário utilizado foi um anti-Ig de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Cat.: A-11059, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), diluído 1:2000, por uma hora a 37°C, sendo que a reação foi protegida da luz durante a reação com o anticorpo secundário. Para identificar os núcleos, foi utilizado DAPI (Cat.: D9542, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) diluído 2000 vezes a partir de uma solução com concentração de 1,5 mg/ml. As lâminas foram montadas com uma solução de glicerina (Cat.: 61.005.01.B3, Synth, Diadema, SP, BRA) 90% e solução salina tamponada com fosfato 10%, as reações visualizadas em microscópio de fluorescência Leica DM2500

e registradas com o auxílio de uma câmera Leica DFM300 FX acoplada. Foram capturadas imagens no aumento de 40 vezes para permitir a diferenciação precisa das células apresentando imunomarcação. Foram feitas imagens da região proximal e distal e o tratamento e o controle foram comparados visualmente.

Real Time PCR

O RNA total do material cultivado com siRNA foi extraído utilizando Kit Illustra RNAspin Mini (Cat.: 25-0500-71, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), eluído três vezes em 40µl de água DEPC e quantificado por espectrofotometria utilizando o NanoVue Plus (GE Healthcare). O cDNA foi produzido de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Cat.: 4368814, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e OligodT, a partir de 1µg de RNA. O RNA foi colocado em termociclador, no qual foi submetido a um ciclo de diferentes temperaturas, sendo 25° C por 10 minutos, 37° C por duas horas e 85° C por 5 minutos.

A quantificação relativa por PCR em tempo real foi realizada com o sistema TaqMan, no termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). O cDNA foi diluído 200 vezes a partir da transcrição, para 10µl de reação. O gene de MMP-9 foi quantificado com o ensaio inventoriado TaqMan Gene Expression Assays Rn00579162_m1 (Cat.: 4331182, Applied Biosystems). O gene WFDC1 foi quantificado com ensaio desenhado. Os primers (Sequence Detection Primer, Cat.: 4304970) e a sonda (TaqMan MGB Probe, Cat.: 4316034) foram encomendados à Applied Biosystems.

WFDC1_ratF 5' - CGC TGC CAG TCT GAC TCT GA - 3'

WFDC1_ratR 5' - CAT AGG CAC AGC CGT TGT AAC A - 3'

WFDC1_ratS 5' - 6FAM ACG ACA CAG ACG CTG MGBNFQ - 3'

Foram testados nove controles endógenos (Cat.: Cat.: 4331182, Applied Biosystems): β -actin (Rn_00667869), HPRT (Rn_01527840_m1), GusB (Rn_00566655_m1), GAPDH (Rn_99999916_m1), PPIA (Rn_00690933_m1), PGK1 (Rn_00821429_g1), b2m (Rn_00560865_m1), TRP7 (Rn_00821605_g1), TBP (Rn_01455648_m1) e o que demonstrou menos variação na expressão entre os tratamentos, utilizado para normalizar o Ct dos genes alvo, foi o TBP7.

Resultados

Cultura de órgãos e tratamento com siRNA

O silenciamento foi validado através de Real Time PCR, que demonstrou uma redução de 36% na quantidade do mRNA para WFDC1/ps20 presente no órgão que foi cultivado na presença de siRNA para WFDC1/ps20 em comparação com o controle (Figura 1).

Após dois dias de cultura, ambas as próstatas formaram novos ductos e brotos. No órgão controle é possível observar uma grande quantidade de pontos de ramificação na região distal dos ductos epiteliais, indicados pelas setas, enquanto os órgãos siWFDC1 aparentam redução na quantidade de pontos de ramificação. (Figura 2A e 2D). No 4º dia de cultura os efeitos observáveis no 2º dia tornam-se mais evidentes. É possível observar uma quantidade menor de pontos de ramificação nos órgãos siWFDC1. Foi possível observar longos ductos sem ramificação nas pontas distais, indicados pelos asteriscos (Figura 2B, 2E). Entre o 4º e o 7º dia número de ductos e brotos permanece praticamente igual, porém é possível observar novamente a presença de ductos mais alongados e sem ramificações nas pontas distais (asteriscos) que crescem sem formar ramificações do dia 4 para o dia 7, enquanto nos órgãos controle as ramificações continuam aparecendo (Figura 2C, 2F). Uma característica predominante do efeito da inibição da expressão do gene WFDC1 foi a presença de extremidades com aspecto dilatado, não encontradas na situação controle (Figura 2F). As extremidades distais dos ductos epiteliais foram quantificadas. Embora a simples contagem dessas estruturas não tenha revelado diferença estatística entre o tratamento e controle (Figura 3A), ouve uma tendência a diminuição dessas extremidades observável no dia 7. Quando essas estruturas são quantificadas levando em consideração o intervalo entre os tempos de observação da cultura, o que era sutil na contagem se torna evidente. É possível observar uma redução bastante significativa na quantidade de brotos distais no intervalo entre o 2º e o 4º dia de cultura, demonstrando maior quantidade de brotos epiteliais nos animais controle. Essa diferença também pôde ser quantificada com diferença estatística significativa no intervalo entre o 4º e o 7º dia de cultura (Figura 3B).

Análise histológica

A observação panorâmica dos cortes demonstra a presença de brotos maiores e menos ramificados nas extremidades distais em comparação com o controle, como indicado pelas setas. Na região proximal os ductos estão mal formados, com a organização do epitélio prejudicada e a formação de lúmen não é visualizada após inibição da expressão do gene WFDC1, mas é facilmente identificado nos órgãos controle, como indicado pelos asteriscos (Figura 4A, D).

Nos órgãos controle (siGFP), observam-se ductos bem formados, canalizados e com epitélio polarizado (Figura 4B), enquanto que nos órgãos que receberam o silenciamento de WFDC1/ps20, os ductos demonstram polarização de células epiteliais prejudicada, assim como a organização característica do ducto. Novamente não é observada a formação de lúmen (canalização) dos ductos (Figura 4E).

Observando em maior aumento, os órgãos controle demonstram gênese completa dos ductos, com a formação de lúmen e epitélio polarizado, com a presença de células luminais e basais distribuídas de maneira organizada (Figura 4C). Já os órgãos cultivados na presença de siWFDC1 demonstram gênese incompleta dos ductos, com diferente grau de organização epitelial, comprometimento da polarização celular e ausência de lúmen. Não é possível distinguir visualmente as

células basais e luminais e é nítido o dilatamento das extremidades distais (Figuras 4E, F). O epitélio demonstra certo grau de polarização e organização, porém não tão completa quanto observada no controle. Também é demonstrada formação do lúmen incipiente, porém sem a organização característica do epitélio observada nos órgãos controle. As Figuras 4E e 4F demonstram organização e polarização epiteliais prejudicadas e ausência de canalização.

Os órgãos cultivados na presença de siGFP mostram diversos níveis de ramificações na extremidades distais do ductos, com crescimento e formação de epitélio polarizado e lúmen após o ponto de ramificação. A Figura 4A demonstra um ducto que sofreu ramificação e continuou crescendo após o ponto de ramificação. É possível observar que após o ponto de ramificação o epitélio encontra-se polarizado e o lúmen começa a se formar. Nos órgãos que receberam o silenciamento de WFDC1/ps20, a ramificação nas extremidades distais está ausente (Figura 4D) ou incompleta (Figura 4E). É possível observar uma massa mais compacta de células na parte interna do epitélio, como indicado pelas setas (Figuras 4D, E e F).

A contagem das estruturas epiteliais individualizadas revelou uma maior porcentagem de estruturas epiteliais contendo lúmen nos animais controle. Nos órgãos siGFP, o lúmen estava presente em cerca de 35-95% das estruturas epiteliais analisadas, enquanto nos órgãos siWFDC1, de 0-40% das estruturas epiteliais apresentaram lúmen (Figura 5).

Imunohistoquímica

Os órgãos cultivados na presença de siGFP demonstram agrupamento de células p63⁺ após o último ponto de ramificação com leve concentração de células p63⁺ nas extremidades distais, como indicado pelas setas (Figura 6A). Nos órgãos cultivados na presença de siWFDC1, as pontas distais dos ductos epiteliais demonstram menos ramificações e as extremidades estão preenchidas por células p63⁺ que aparecem em maior quantidade que nos órgãos controle, além de a marcação aparece com maior intensidade, como indicado pelas setas (Figura 6B). A reação para p63 foi menor nos órgãos cultivados na presença de siWFDC1 em comparação com o controle (Figura 6C, D) e nos órgãos siWFDC1 é possível observar uma distribuição mais espaçada das células p63⁺ ao longo dos ductos epiteliais, como indicado pelas setas (Figura 6E).

Real time PCR para MMP9

A reação de PCR em tempo real para a quantificação da expressão de MMP9 demonstrou um aumento de 9 vezes na quantidade de MMP9 presente nos órgãos que receberam o tratamento com siRNA para WFDC1/ps20 (Figura 7).

Discussão

Os resultados das análises dos órgãos durante o crescimento em cultura, histológicas, imunohistoquímicas e Real Time PCR de próstatas ventrais de ratos Wistar cultivados na presença de siWFDC1 demonstram uma possível ligação da WFDC1/ps20 com a ramificação ductal, organização do epitélio, polarização, canalização e no comportamento das células basais p63⁺ (Figura 8). Estas alterações foram pronunciadas mesmo com uma inibição de apenas 36% na quantidade de mRNA.

As análises de secções dos tecidos corados com Hematoxilina e Eosina revelam um efeito bastante visível na formação dos ductos e tamanho das pontas. Na Figura 4 é possível visualizar ductos com pontas maiores, com aspecto dilatado e com menos pontos de ramificação nos órgãos que receberam o silenciamento de WFDC1/ps20 em comparação com os ductos do controle. Os ductos dos órgãos controle apresentam ramificação visível e ductos canalizados e com epitélio organizado, enquanto nos órgãos que receberam o silenciamento de WFDC1/ps20, a organização foi prejudicada e não é observada canalização, com a presença de células com formatos diferentes no interior das estruturas epiteliais. Apolarização do epitélio foi comprometida e são visualizadas células com formato mais arredondado (Figura 4).

O efeito do silenciamento de WFDC1/ps20 na ramificação das pontas dos ductos prostáticos em crescimento pode ser visualizado na Figura 4. No controle pode ser observada a formação de novos ductos com epitélio polarizado e canalização após os pontos de ramificação, enquanto nos órgãos que receberam o silenciamento de WFDC1/ps20, a ramificação é parcial ou ausente, as pontas dos ductos encontram-se maiores, com aspecto dilatado e preenchidas por células de formato arredondado e irregular, com grau de polarização reduzido e sem a possibilidade de definir visualmente células basais e luminais. Além disso, é possível visualizar uma população de células mais compactas na região interna do ducto. A quantificação das estruturas com lúmen evidente permitiu determinar que a inibição da expressão do WFDC1/ps20 promoveu uma redução na formação de lúmen nas estruturas epiteliais da próstata (Figura 5).

Diversos elementos são responsáveis pelo desenvolvimento prostático e manutenção do tecido prostático normal. Esses elementos agem em conjunto para coordenar eventos como a determinação prostática, brotamento, crescimento epitelial, diferenciação e todos os eventos necessários para o surgimento e manutenção da glândula prostática. Vários autores reportam efeitos da adição e remoção de fatores específicos e que levam a modificações na estrutura do tecido prostático, similares às que foram aqui observadas diante do silenciamento de WFDC1/ps20.

O silenciamento de WFDC1/ps20 levou à redução da quantidade de ramificações, comprometimento de polarização das células luminais, desestabilização das células basais p63⁺ e redução na formação de lúmen. Esses resultados sugerem uma conexão entre a proteína ps20 e os outros fatores envolvidos no desenvolvimento prostático. Camundongos nocautes para Hoxb13 demonstram perda da polaridade celular, sugerindo seu papel na diferenciação (Economides e Capecchi, 2003), assim como camundongos mutantes Nkx3.1^{-/-} exibem padrão de ramificação e diferenciação defeituosos, sugerindo sua importância na morfogênese ductal e diferenciação (Schneider et al. 2000). Evidências demonstram que a sinalização Notch inibe a expansão de progenitores prostáticos e facilita a diferenciação epitelial durante o desenvolvimento, que a continuidade da ativação dessa via, possui um papel na manutenção da homeostase (Wang et al. 2006), e que Shh participa da manutenção de células progenitoras na próstata para permitir o desenvolvimento correto do ducto, proliferação epitelial, diferenciação e ramificação (Berman et al. 2004). Excesso de Shh leva à

regulação negativa de Fgf10 e positiva de Bmp4, o que resulta em um obstáculo para o crescimento ductal e ramificação (Freestone et al. 2003; Pu et al. 2004). Adição de Bmp7 à cultura de órgãos inibe a morfogênese, indicando sua função inibitória semelhante a Bmp4. Nestes camundongos, a sinalização de Notch1 foi reduzida, levando à hipótese de que Bmp7 deve restringir a ramificação ductal por limitar a atividade de Notch1 (Grishina et al. 2005). Bmp4 e Bmp7 são modulados por um inibidor secretado noggin. Noggin se liga aos ligantes Bmp em regiões extracelulares, bloqueando sua interação com receptores transmembrana. Camundongos nocaute para noggin demonstram falta de estruturas precursoras mesenquimais (*mesenchymal pads*) ventrais e perda do brotamento da próstata ventral, com brotamento restrito nas regiões dorsolaterais. Estudos em cultura de órgãos revelaram que Bmp4 inibiu a proliferação de células epiteliais p63⁺ nas pontas distais, enquanto a adição de Noggin bloqueou essa ação. Foi proposto que o mesênquima expressando Noggin interaja com Bmp4/7 secretados para criar um gradiente de Bmp o longo do eixo do ducto que restringe e estimula o crescimento em regiões específicas (Cook et al. 2007). A via de sinalização Wnt possui papel fundamental no desenvolvimento prostático. Durante a morfogênese, o mRNA de Wnt5a é localizado no mesênquima distal no estágio de brotamento e nas células musculares peri-ductais em um gradiente crescente no sentido proximal-distal durante a ramificação. A proteína Wnt5a é secretada e encontrada no estroma periductal, matriz extracelular e células epiteliais nos ductos distais. Em culturas de órgãos, a adição de Wnt5a inibe o crescimento de ductos e sua ramificação, devido a supressão da proliferação de células epiteliais nos ductos centrais e distais, mas não nos proximais. As células demonstraram sinais de maturação e diferenciação atrasada, além da falta de organização e polarização das células epiteliais (Huang et al. 2009). Os órgãos cultivados na presença de siWFDC1 demonstram comprometimento da polarização das células luminiais, o que sugere que pode haver alguma relação entre ps20, Hoxb13, Nkx3.1, Notch ou Shh. Também é observada a redução na ramificação, o que pode sugerir relação entre ps20 e o eixo Bmp4/Bmp7/Noggin. Noggin está relacionado com o desenvolvimento do mesênquima prostático, no qual estão presentes as células musculares lisas que secretam ps20, e que está diretamente ligado ao desenvolvimento do epitélio da glândula. Efeitos similares aos observados mediante o silenciamento de WFDC1/ps20 também são observados em órgãos cultivados na presença de Wnt5a. Não há evidências conclusivas que conectem diretamente ps20 e outros elementos envolvidos no desenvolvimento prostático, porém, devido ao fato do silenciamento dessa molécula provocar efeitos similares aos observados mediante silenciamento ou adição de outros fatores, seria interessante investigar não somente a relação entre o sistema de serina proteinases, centradas no ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), mas também a relação direta de ps20 com esses fatores.

A imunohistoquímica para p63 revelou distribuição mais espaçada de células p63⁺ nos órgãos que receberam siWFDC1, em comparação com os órgãos controle (Figura 6E). Quando observada a região das extremidades distais, ficou demonstrada uma concentração incomum de células p63⁺. Nos órgãos controle, é observada uma leve concentração dessas células e é possível observar ramificações mais próximas à região distal. Nos órgãos cultivados na presença de siWFDC1, a presença de ramificações é menos observada, a concentração de células p63⁺ nas pontas dos ductos é mais acentuada e as células apresentam marcação mais intensa (Figura 6). Embora seja demonstrada, pela análise histológica, a ausência frequente de lúmen nos ductos prostáticos, a imunohistoquímica revela alguns ductos bem formados e com lúmen. Os experimentos que resultaram nos órgãos processados para histologia e para imunohistoquímica foram experimentos paralelos e é possível que o efeito do silenciamento seja mais visível em um experimento do que no outro. De qualquer maneira, efeitos similares como a falta de ramificação e a grande concentração de células nas pontas dos brotos são observados em ambos os experimentos, validando assim o silenciamento nos experimentos paralelos.

Foi proposto que células basais expressando p63 são requeridas para organogênese prostática.

p63 é um homólogo do gene supressor de tumor p53. O gene p63 codifica ao menos seis isoformas principais, três deles, TAp63 α , TAp63 β , TAp63 γ são capazes de transativar p53 e induzir a apoptose. As outras três isoformas Δ Np63 α , Δ Np63 β , Δ Np63 γ são capazes de suprimir p53 e as isoformas TAp63. p63 é expresso no compartimento basal de diversos tecidos epiteliais. Camundongos p63-deficientes apresentam defeitos severos no desenvolvimento de órgãos epiteliais que expressam p63, agênese do epitélio escamoso e das glândulas mamária, salivar e lacrimal, demonstrando assim que p63 deve ser essencial para a manutenção da população de células tronco em vários tecidos epiteliais. Análises comparativas entre células epiteliais basais e células estromais prostáticas revelaram que 80% das células basais expressam p63 no núcleo, enquanto as células estromais são negativas para essa proteína e que Δ Np63 α é a isoforma predominante entre as células epiteliais prostáticas. Análises histológicas de toda a uretra de camundongos p63^{-/-} revelaram ausência da próstata. Nenhum ducto ou brotamento epitelial pôde ser identificado tanto na porção ventral quanto dorsolateral do mesênquima periuretral. p63 pode ser essencial tanto para a manutenção das células tronco epiteliais prostáticas, como para sustentar uma população de células basais, o qual não representa um compartimento de células tronco, mas é essencial para o desenvolvimento prostático. É sugerido que o desligamento da função dominante negativa de Δ Np63 nas células basais deve ser necessário para a ativação da maquinaria de transcrição gênica dependente de p63 requerido para a diferenciação dessas células em células luminais secretórias (Signoretti et al. 2000).

p63 é essencial para o desenvolvimento das células prostáticas basais, mas o desenvolvimento dos ductos prostáticos e a diferenciação de células luminais não necessitam de células p63⁺. As células neuroendócrinas e células musculares lisas também não necessitam desse tipo celular para sua diferenciação (Kurita et al. 2004). Embora as células basais não sejam necessárias para a diferenciação de células luminais, elas parecem ser essenciais para a manutenção da diferenciação das células luminais. A perda das células basais, ou alterações em moléculas de adesão celular, afeta a expressão gênica e fenótipo das células luminais na próstata. Na próstata adulta, o crescimento epitelial e diferenciação funcional são regulados por andrógenos através de fatores parácrinos estromais. Na próstata normal, as células basais p63⁺ residem na membrana basal e devem mediar ou modular interações entre células estromais e luminais. Assim, é provável que a perda das células basais perturbe a interação entre as células epiteliais e estromais (Kurita et al. 2004). p63 é essencial para a diferenciação de células basais prostáticas e células basais são essenciais para manter a diferenciação normal das células luminais e integridade dos ductos prostáticos. No entanto, células basais não são necessárias para o desenvolvimento e regeneração prostática (Kurita et al. 2004). A análise conjunta destes resultados sugere também que existam relações mútuas entre as células basais, em particular as células p63⁺ e as células luminais, como já demonstrado para o epidídimo. Shumet al (2008) demonstrou que células basais do epidídimo emanam projeções estreitas que de fato atingem o lado luminal do epitélio. Esse fenômeno é também observado na traquéia e a glândula coagulante, a qual, em roedores, é análoga ao lobo mediano da próstata humana. No epidídimo essas células estabelecem junções de oclusão entre elas mesmas e células epiteliais adjacentes. Essas projeções enviadas em direção ao lúmen param ao atingir a junção de oclusão do epitélio e somente seguem para atingir o lúmen em regiões específicas, de maneira dinâmica e temporal, mais ainda não está claro quais são os sinais que desencadeiam esse processo. Também foi demonstrado que essas células servem como sensores hormonais luminais (Shumet al. 2008).

p63 é essencial para a diferenciação de células basais prostáticas e células basais são essenciais para manter a diferenciação normal das células luminais e integridade dos ductos prostáticos. No entanto, células basais não são requeridas para o desenvolvimento e regeneração prostática (Kurita et

al. 2004). Em adição, a injeção das células embrionárias p63^{+/+} em animais p63^{-/-} levou à recuperação de alguns defeitos no desenvolvimento causados pela ausência de p63. Camundongos p63^{-/-} foram desenvolvidos e complementados com células tronco embrionárias p63^{+/+} ROSA26 (β -gal⁺) para estudar o papel das células p63⁺ nos órgãos genitourinários. A injeção das células embrionárias p63^{+/+} levou a recuperação de alguns defeitos no desenvolvimento causados pela ausência de p63. Nesses animais, análises revelaram que a epiderme continha exclusivamente células β -gal⁺ (p63^{+/+}). Células do UGS de camundongos p63^{-/-} foram enxertados sob a cápsula renal de camundongos e foi observado o desenvolvimento de uma estrutura glandular formada em parte por células produtoras de muco e um epitélio prostático luminal. Isso demonstra que p63 é necessário para a diferenciação das células basais prostáticas, mas não luminais secretórias (Signoretti et al. 2005). Embora p63 não seja necessário para a diferenciação de células prostáticas secretoras, sua expressão é requerida na endoderme multipotente do seio urogenital para restringir o desenvolvimento a linhagem celular prostática. Durante a organogênese normal, os brotos prostáticos formam-se unicamente a partir de progenitores p63⁺, os quais estão comprometidos a linhagem celular prostática e dão origem exclusivamente ao epitélio prostático (Signoretti et al. 2005). Estudos em cultura de órgãos revelaram que Bmp4 inibiu a proliferação de células epiteliais p63⁺ nas pontas distais, enquanto a adição de Noggin bloqueou essa ação. Foi proposto que o mesênquima expressando Noggin interage com Bmp4/7 secretados para criar um gradiente de Bmp ao longo do eixo do ducto que restringe e estimula o crescimento em regiões específicas (Cook et al. 2007). É possível especular que o acúmulo de células p63⁺ nas extremidades distais dos ductos demonstre uma conexão entre p63 e Bmp4/7 ou Noggin.

p63 está relacionada com o desenvolvimento de epitélios estratificados e estruturas derivadas como a pele, mama, próstata, folículos pilosos entre outros, acreditando-se que possui algum papel na adesão celular, tanto célula-célula como célula-matriz. A regulação negativa da isoforma Δ Np63 em linhagens de células mamárias MCF10A levou ao desprendimento dessas células e subsequente apoptose, porém esse efeito foi reduzido no caso da isoforma TAp63. O aumento da função de ambas as isoformas preveniu a morte celular por desprendimento da matriz, sugerindo assim que a isoforma Δ Np63 está relacionada com a adesão a matriz extracelular (Carroll et al. 2007). Células epiteliais prostáticas normais e malignas, quando cultivadas em Matrigel, desenvolvem-se em estruturas esféricas com morfologia acinar, ancorando-se através de interações do receptor de superfície CD49f com a laminina (Bello-Deocampo et al. 2001). Foi demonstrado que as células p63⁺ possuem maior capacidade de formação de estruturas esféricas, e essas células localizam-se preferencialmente na periferia das esferas, aonde estão em contato com os elementos da matriz. Essas observações sugerem que p63 deve regular a expressão de moléculas de adesão para modular vias de sinalização entre as células tronco e seu nicho que, subsequentemente, controlam a capacidade proliferativa e diferenciação das células tronco prostáticas (Xin et al. 2007). A adesão celular à matriz não é importante somente para a organização estrutural dos tecidos, mas também para a proliferação de células epiteliais, migração, diferenciação e sobrevivência. O desprendimento físico da matriz extracelular resulta em apoptose em diversos tipos de células epiteliais e acredita-se que a morte relacionada à perda de p63, seja causada diretamente pela perda das moléculas de adesão reguladas por p63. Diversos genes relacionados a adesão celular são regulados positivamente mediante aumento da expressão da isoforma Δ Np63 ou de ambas isoformas juntas, incluindo integrinas, lamininas, diversos colágenos, fibronectina e caderinas entre outros. É interessante que mediante o desprendimento celular forçado, os níveis de p63 decaem, sugerindo um relacionamento recíproco entre adesão e p63. Essa habilidade de p63 de regular componentes de adesão celular pode ser fundamental para a manutenção da integridade e homeostase dos tecidos epiteliais (Carroll et al. 2007).

p63 é encontrado na camada basal, aparentemente onde estão presentes as células progenitoras. O comprometimento de progenitores ou células tronco necessita de complexos sinais e interações com a lamina basal e células diferenciadas que compõe o microambiente do nicho. Acredita-se que integrinas, através de interações com a matriz extracelular, possuam um papel importante no funcionamento de células tronco nesse microambiente (Watt e Hogan. 2000; Fuchset al. 2004). O nicho fornece um ambiente único, no qual a expressão localizada de componentes da matriz extracelular ajudam a reter as células tronco e progenitoras em um microambiente especializado. Perda ou alterações na expressão de integrinas, modulação da composição da membrana basal e mudanças na concentração de fatores secretados localmente permitem que essas células deixem o nicho e diferenciem-se ou entrem em apoptose (Watt e Hogan. 2000). Como p63 regula muitos dos genes relacionados a adesão e envolvidos na manutenção do nicho das células tronco, é possível especular que p63 possui um papel essencial no funcionamento das células tronco, através de sua habilidade de regular a adesão celular dentro do microambiente do nicho (Carroll et al. 2007). Na pele, a isoforma $\Delta Np63$ pode reprimir os inibidores do ciclo celular p21 e 14-3-3 σ , o que deve ser central para a manutenção das células basais no estado proliferativo. Conforme os níveis de p63 decaem durante a diferenciação, esses genes devem ser ativados para causar a parada no ciclo celular crítico para permitir a diferenciação terminal (Westfallet al. 2003). As vias de sinalização Notch e Wnt, que participam na determinação do destino celular, aparentam se relacionar de maneira recíproca com p63 no controle da diferenciação e auto renovação de células epidérmicas (Nguyen et al. 2006). Outro aspecto importante a ser considerado sobre p63 é sugerido por alguns estudos. Foi proposto que as células tronco não expressem p63 e que as células p63⁺ representam uma população de células de amplificação transitória na próstata (Kasper et al. 2008; Miki et al. 2010). Tendo em vista a relação de p63 com a adesão celular, é possível especular que a expressão de p63 leve a regulação negativa de moléculas de adesão, permitindo que essa célula deixe o ambiente do nicho e entre em amplificação transitória. Em contraste, mediante o desprendimento celular forçado, os níveis de p63 decaem, sugerindo que p63 regule positivamente moléculas de adesão (Carroll et al. 2007). Seria interessante investigar o papel separado das diferentes isoformas de p63 nesse processo de adesão das células tronco no microambiente do nicho, buscando compreender o que levaria essas células a entrarem em amplificação transitória.

A proteína ps20, secretada por células mesenquimais do seio urogenital, é capaz de inibir o crescimento de células epiteliais prostáticas tumorais PC3 em cultura. Essa proteína foi purificada a partir do meio condicionado pelas células da linhagem U4F em cultura. Sua adição a culturas de células PC3 produziu um efeito significativo na inibição do crescimento dessas células. Foi observado uma inibição de 15 a 30% na incorporação de [3H]timidina sobre o controle, variando de acordo com o método de renaturação da proteína extraída. Foram realizados ensaios de dose-resposta para determinar a concentração biologicamente ativa de ps20, e células PC3 foram incubadas com ps20 por cinco dias e contadas a cada 24 horas. Foi observada inibição de 52-60% na proliferação em comparação ao controle e o tempo de duplicação de culturas subconfluentes de células PC3 aumentou de uma média de 19.8 horas no controle, para 25.8 horas em culturas tratadas com ps20. A inibição da proliferação celular foi associada ao estímulo da síntese protéica. Em culturas tratadas com ps20, foi observado um aumento de 210.4% da síntese de proteínas de secreção em comparação com o controle e as células tratadas assumiram uma forma mais espalhada, com aumento de pseudópodes e filopódios em comparação com o controle (Rowley et al. 1995). Watson et al (2004) demonstrou que WFDC1/ps20 é regulado negativamente em cânceres de próstata, porém não foram encontradas mutações. Foi proposto que WFDC1/ps20 não é um supressor de tumor chave, mas pode participar na organização da matriz extracelular no tecido prostático normal (Watson et al. 2004). Em adição, foi demonstrado que ps20 é capaz de promover a expressão de CD54 em células T CD4⁺ (Alvarez et al. 2008), reforçando a ideia de

que a ps20 regula a adesão celular. Pouco é compreendido sobre os elementos que ativam ou reprimem a atividade de ps20, assim como aqueles que são ativados ou reprimidos por sua atividade. Além do seu efeito inibitório do crescimento de linhagens de células prostáticas cancerígenas e controle da expressão de CD54, foi demonstrado que a ps20 regula a expressão de fatores quimiotáticos neutrófilo-específicos, modulando a migração de neutrófilos e sua susceptibilidade a infecção por vírus da hepatite murina (Rogers et al. 2012). No útero de ratos, ps20 é localizada tanto das células musculares lisas quanto epiteliais luminais e sua expressão é regulada negativamente por estrógenos e tamoxifeno e foi proposto que ela desempenhe uma função de mediadora do crescimento local (Hung. 2005). Em adição, foi demonstrado que, em modelos xenográficos de câncer prostático, a ps20 pode ser um regulador da angiogênese induzido por TGF β 1 que funciona tanto promovendo a migração celular ou contribuindo para a estabilização de estruturas vasculares recém formadas (McAlhany et al. 2003).

Os efeitos observados mediante o silenciamento de WFDC1/ps20 em culturas de próstatas ventrais sugerem que ps20 pode estar relacionada com a adesão de células basais p63⁺. A desregulação dos mecanismos de adesão dessas células impede sua estabilização ao longo da estrutura do ducto prostático e leva a uma concentração dessas células nas pontas dos ductos em crescimento. A ausência de células basais leva a desorganização das células luminais, que não adquirem corretamente a polaridade, prejudicando, assim, a formação do lúmen no interior do ducto prostático.

Foi proposto que o gene da ativadora de plasminogênio uroquinase é reprimido por andrógenos, o qual é ativado após a castração e participa na atrofia da glândula prostática. No entanto, uroquinase é secretada no lobo ventral da próstata de ratos e isso deveria ser regulado positivamente por andrógenos. Wilson et al (1996) revelou que a castração de ratos pós-púberes resulta em um aumento substancial na atividade de ativadores de plasminogênio até o 4º dia após a castração, mas por volta do 7º dia as atividades retornam a níveis normais. Essa redução na atividade pode ocorrer devido ao aumento do inibidor de ativadores de plasminogênio tipo-1 (PAI-1) (Wilson et al. 1996). A expressão do receptor de membrana ativador de uroquinase (uPAR) é detectada em próstatas ventrais de ratos recém-nascidos e aumentam a ativação de pro-uPA. A forma ativa de uPA promove a degradação aumentada da matriz extracelular através da ativação de plasminogênio. uPAR liga-se a moléculas da matriz, como integrinas, as quais podem afetar a adesão celular, transdução de sinais e regulação gênica. Próstatas ventrais cultivadas na presença de peptídeos de uPA demonstram uma perturbação dose-dependente na ramificação dos ductos e diferenciação do tecido epitelial e mesenquimal. Esses resultados demonstram que a desregulação da ligação de uPA a uPAR resultam no retardo do desenvolvimento da próstata ventral de ratos recém-nascidos (Elfman et al. 2001). Também foi demonstrado que uPA promove a degradação de um domínio extracelular da integrina α 6, molécula importante para processos de adesão celular e migração, e essa degradação resulta na migração de células cancerígenas e invasão quando cultivadas sobre laminina (Pawar et al. 2007).

Em outros sistemas foi demonstrado que alterações no funcionamento normal de uPA alteram o funcionamento de MMP9 (Shin et al. 2010 e Lund et al. 2011) e o silenciamento de ps20 promoveu um aumento de 9 vezes na expressão de MMP9. MMPs são proteínas que participam na degradação da matriz extracelular e são importantes tanto em processos fisiológicos normais quanto em processos patológicos, como a metástase tumoral e angiogênese. MMP9 está preferencialmente localizada nas extremidades dos ductos prostáticos em crescimento e sua atividade cai após o nascimento, sendo indetectável no animal adulto (Bruni-Cardoso et al. 2008). A remodelação local e regulada da matriz extracelular é necessária durante a morfogênese, pois mudanças na proliferação celular, motilidade e a formação de contatos celulares necessários para esse processo, requerem a interação precisa entre as células e os componentes da matriz (Vu e Werb. 2000). Embora MMP9 tenha sido detectada em baixos

níveis, sua contribuição é reforçada devido à sua concentração na extremidade das estruturas epiteliais, sugerindo que sua atividade é importante durante o crescimento ductal na próstata. A marcação de laminina na ponta dos ductos é menos intensa e, como MMP9 degrada a laminina, é possível que essa enzima auxilie na regulação da quantidade de laminina nesses locais (Bruni-Cardoso et al. 2008). Em adição, foi demonstrado que a proteína WAP controla a proliferação de células epiteliais mamárias por prevenir a degradação de laminina (Nukumiet al. 2007) e, como ps20 possui um domínio WAP, é possível que haja um balanço entre a atividade de ps20 e MMP9 coordenando a degradação de laminina necessária para o crescimento do ducto. É possível especular que o silenciamento de ps20 tenha desbalanceado o sistema uPA/uPAR, levando ao aumento na atividade de MMP9, resultando no aspecto dilatado das extremidades dos ductos prostáticos observados mediante silenciamento de ps20. A degradação exagerada de laminina impediu que houvesse um balanço do crescimento da ponta do ducto, impedindo que a degradação da matriz extracelular ocorresse em pontos específicos, o que é necessário para permitir a ramificação. A atividade aumentada de MMP9 e a falta do balanço de sua atividade pela uPA, desregulada pelo silenciamento de ps20, levaram a degradação da matriz ao redor da ponta do ducto como um todo, fazendo com que esse crescesse de maneira homogênea e não localizada como seria necessário para a formação de um ponto ramificação que daria origem a dois novos ductos (Figura 9). Por outro lado, os presentes resultados evidenciaram que a atividade da ps20 é fundamental para fixar as células p63⁺ ao longo do ducto, sugerindo um mecanismo no qual estas células precisam decidir em fixar-se ou manterem-se agrupadas na extremidade distal do ducto em crescimento. Como a uPA pode promover a degradação de integrina $\alpha 6$, também é interessante sugerir que sua desregulação tenha resultado na ausência do sinal de fixação para as células basais p63⁺, resultando no acúmulo dessas células na extremidade distal. Há uma co-localização entre a expressão de MMP9 demonstrada anteriormente pelo laboratório (Bruni-Cardoso et al. 2008) e as células p63⁺ nas extremidades epiteliais em crescimento. Há também boa correlação entre a expressão de p63 e MMP9 pelas células da linhagem RWPE-1 (Augusto TM e Barbosa GB, observação não publicada). Parece-nos lógico que o acúmulo de células p63⁺ esteja também associado com o aumento de MMP9 neste região, o que representaria um mecanismo responsável pelo comprometimento da ramificação ductal observada no presente trabalho.

Conclusões

Após as análises dos resultados obtidos com a cultura de órgãos e silenciamento de WFDC1/ps20, é possível concluir que o *knockdown* de WFDC1/ps20 levou a redução da ramificação nas pontas dos ductos epiteliais prostáticos. A baixa atividade de WFDC1/ps20 também levou a desestabilização das células basais p63⁺, prejudicando a organização do epitélio prostático, o qual demonstrou células luminais com a polarização prejudicada e redução na formação do lúmen. Em adição, o silenciamento de WFDC1/ps20 promoveu um aumento de 9 vezes na quantidade de mRNA de MMP9. Os presentes resultados sugerem pela primeira vez uma conexão entre WFDC1/ps20, p63 e MMP9.

Referências

- Alvarez R, Reading J, King D F L, Hayes M, Easterbrook P, Farzaneh F, Ressler S, Yang F, Rowley D, Vyakarnam A (2008) WFDC1/ps20 Is a Novel Innate Immunomodulatory Signature Protein of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Permissive CD4⁺ CD45RO⁺ Memory T Cells That Promotes Infection by Upregulating CD54 Integrin Expression and Is Elevated in HIV Type 1 Infection. *J Virol* 82:471-476, 2008
- Baserga A e Zavagli G (1981) Ferrata's stem cells: an historical review on hemocytoblasts and hemohistioblasts. *Blood Cells* 7:537-545, 1981
- Bell D R e Van Zant G (2004) Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes. *Oncogene* 23:7290-7296, 2004
- Bello-DeOcampo D, Kleinman H K, Deocampo N D, Webber M K (2001) Laminin-1 and alpha6beta1 integrin regulate acinar morphogenesis of normal and malignant human prostate epithelial cells. *Prostate* 46:142-153, 2001
- Berman D M, Desai N, Wang X, Karhadkar S S, Reynon M, Abate-Shen C, Beachy P A, Shen MM (2004) Roles for Hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. *Dev Biol* 267:387-398, 2004
- Bhatia-Gaur R, Donjacour A A, Sciavolino P J, Kim M, Desai N, Young P, Norton C R, Gridley T, Cardiff R D, Cunha G R, Abate-Shen C, Shen M M (1999) Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 13:966-977, 1999
- Bieberich, C J, Fujita K, He W W, Jay G (1996) Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J Biol Chem* 271:31779-31782, 1996
- Bissell M J, Radisky D C, Rizki A, Weaver V M, Peterson O W (2002) The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 70:537-546, 2002
- Blum R, Gupta R, Burger P E, Ontiveros C S, Salm S N, Xiong X, Kamb A, Wesche H, Marshall L, Cutler G, Wang X, Zavadil J, Moscatelli D, Wilson E L (2010) Molecular signatures of the primitive prostate stem cell niche reveal novel mesenchymal-epithelial signaling pathways. *PLoS One* 5:e13024, 2010
- Bruni-Cardoso A, Vilamaior P S L, Taboga S R, Carvalho H F (2008) Localized matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the rat ventral prostate during the first week of postnatal development. *Histochem Cell Biol* 129:805-815, 2008
- Carroll D K, Brugge J S, Attardi L D (2007) p63, Cell Adhesion and Survival. *Cell Cycle* 6:225-261, 2007
- Chang W Y, Birch L, Woodham C, Gold L I, Prins G S (1999) Neonatal estrogen exposure alters the transforming growth factor-beta signaling system in the developing rat prostate and blocks the transient p21(cip1/waf1) expression associated with epithelial differentiation. *Endocrinology* 140:2801-2813, 1999

- Collins A T, Berry P A, Hyde C, Stower M J, Maitland M J (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*65:10946-10951, 2005
- Cook C, Vezina C M, Hicks S M, Shaw A, Yu M, Peterson R E, Bushman W (2007)Noggin is required for normal lobe patterning and ductal budding in the mouse prostate. *Dev Biol*312:217-230, 2007
- Cunha G R (1972) Epithelio-mesenchymal interactions in primordial gland structures which become responsive to androgenic stimulation. *Anat Rec*172:179-195, 1972
- Cunha G R, Chung L W (1981)Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem*14:1317-1324, 1981
- Cunha G R, Donjacour A A, Cooke P S, Mee S, Bigsby R M, Higgins S J, Sugimura Y (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev*8:338-362, 1987
- Cunha G R,Lung B (1978) The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice. *J Exp Zool*205:181-193, 1978
- Donjacour AA, Thomson AA, Cunha GR (2003)FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol*261:39-54, 2003
- Economides K D, Capecchi M R(2003) Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development*130:2061-2069, 2003
- Ehnert S, Glanemann M, Schmitt A, Vogt S, Shanny N, Nussler NC, Stöckle U, Nussler A (2009) The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbecks Arch Surg*394:985-997, 2009
- Elfman F, Bok R, Conn M, Shuman M, Cunha G (2001)Urokinase plasminogen activator amino-terminal peptides inhibit development of the rat ventral prostate.*Differentiation*69:108-120, 2001
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*7:21-33, 2006
- Freestone SH, Marker P, Grace OC, Tomlinson DC, Cunha GR, Harnden P, Thomson AA (2003) Sonic hedgehog regulates prostatic growth and epithelial differentiation. *Dev Biol*264:352-362, 2003
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769-778, 2004
- Gao N, Ishii K, Mirosevich J, Kuwajima S, Oppenheimer SR, Roberts RL, Jiang M, Yu X, Shappell SB, Caprioli RM, Stoffel M, Hayward SW, Matusik RJ (2005)Forkhead box A1 regulates prostate ductal morphogenesis and promotes epithelial cell maturation. *Development*132:3431-3443, 2005
- Gerdes MJ, Dang TD, Larsen M, Rowley DR (1998) Transforming growth factor-beta1 induces nuclear to cytoplasmic distribution of androgen receptor and inhibits androgen response in prostate smooth muscle cells. *Endocrinology*139:3569-3577, 1998

- Goto K, Salm SN, Coetzee S, Xiong X, Burger PE, Shapiro E, Lepor H, Moscatelli D, Wilson EL (2006) Proximal prostatic stem cells are programmed to regenerate a proximal-distal ductal axis. *Stem Cells* 24:1859-1868, 2006
- Grishina IB, Kim SY, Ferrara C, Makarenkova HP, Walden PD (2005) BMP7 inhibits branching morphogenesis in the prostate gland and interferes with Notch signaling. *Dev Biol* 288:334-347, 2005
- Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS (2009) Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 5:17-26, 2009
- Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS (2005) The role of Fgf10 signaling in branching morphogenesis and gene expression of the rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens. *Dev Biol* 278:396-414, 2005
- Huang L, Pu Y, Hepps D, Danielpour D, Prins GS (2007) Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* 148:1235-1245, 2007
- Huang L, Pu Y, Hu WY, Birch L, Luccio-Camelo D, Yamaguchi T, Prins GS (2009) The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol* 328:188-199, 2009
- Hung H (2005) Suppression of ps20 expression in the rat uterus by tamoxifen and estrogens. *Endocrinology* 146:2388-2396, 2005
- Isaacs J T, Coffey D S (1989) Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 2:33-50, 1989
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90, 2011
- Kasper S (2008) Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev* 4:193-201, 2008
- Kopachik W, Hayward SW, Cunha GR (1998) Expression of hepatocyte nuclear factor-3alpha in rat prostate, seminal vesicle, and bladder. *Dev Dyn* 211:131-140, 1998
- Kurita T, Medina RT, Mills AA, Cunha GR (2004) Role of p63 and basal cells in the prostate. *Development* 131:4955-4964, 2004
- Lamm ML, Podlasek CA, Barnett DH, Lee J, Clemens JQ, Hebnar CM, Bushman W (2001) Mesenchymal factor bone morphogenetic protein 4 restricts ductal budding and branching morphogenesis in the developing prostate. *Dev Biol* 232:301-314, 2001
- Lang SH, Frame FM, Collins AT (2009) Prostate cancer stem cells. *J Pathol* 217:299-306, 2009
- Lin VK, Wang SY, Vazquez DV, Xu C, Zhang S, Tang L (2007) Prostatic stromal cells derived from benign prostatic hyperplasia specimens possess stem cell like property. *Prostate* 67:1265-1276, 2007

- Lund IK, Nielsen BS, Almholt K, Rønø B, Hald A, Illemann M, Green KA, Christensen IJ, Rømer J, Lund LR (2011) Concomitant lack of MMP9 and uPA disturbs physiological tissue remodeling. *Dev Biol* 358:56-67, 2011
- McAlhany S J, Ressler S J, Larsen M, Tuxhorn J A, Yang F, Dang T D, Rowley D R (2003) Promoting of angiogenesis by ps20 in the differential reactive stroma prostate cancer xenograph model. *Cancer Res* 15:5859-5865, 2003
- Miki J (2010) Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. *Int J Urol* 17:139-147, 2010
- Moore K A, Lemischka I R (2006) Stem cells and their niches. *Science* 311:1880-1885, 2006
- Nguyen BC, Lefort K, Mandinova A, Antonini D, Deygan V, Della Gatta G, Koster MI, Zhang Z, Wang J, Tommasi di Vignano A, Kitajewski J, Chiorino G, Roop DR, Missero C, Dotto GP (2006) Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev* 15:1028-1042, 2006
- Nukumi N, Iwamori T, Kano K, Naito K, Tojo H (2007) Whey acidic protein (WAP) regulates the proliferation of mammary epithelial cells by preventing serine protease from degrading laminin. *J Cell Physiol* 123:793-800, 2007
- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104:233-245, 2001
- Ousset M, Van Keymeulen A, Bouvencourt G, Sharma N, Achouri Y, Simons BD, Blanpain C (2012) Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *Nat Cell Biol* 14:1131-1138, 2012
- Pawar SC, Demetriou MC, Nagle RB, Bowden GT, Cress AE (2007) Integrin alpha6 cleavage: a novel modification to modulate cell migration. *Exp Cell Res* 313:1080-1089, 2007
- Prins GS, Huang L, Birch L, Pu Y (2006) The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. *Ann N Y Acad Sci* 1089:1-13, 2006
- Prins G S, Putz O (2008) Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 76:641-659, 2008
- Pu Y, Huang L, Birch L, Prins GS (2007) Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: Fgf10-dependent and -independent pathways. *Endocrinology* 148:1697-1706, 2007
- Pu Y, Huang L, Prins GS (2004) Sonic hedgehog-patched Gli signaling in the developing rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens reduces ductal growth and branching. *Dev Biol* 273:257-275, 2004
- Regaud C (1901) Etudes sur la structure des tubes seminiferes et sur la spermatogenese chez les mammiferes. *Archives d'Anatomie microscopiques et de Morphologie experimentale* Parte 1-4:101-156, Parte 2-4:231-280, 1901

- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*414:105-111, 2001
- Robey PG (2000) Stem cells near the century mark. *J Clin Invest*105:1489-1491, 2000
- Rogers E, Wang B X, Cui Z, Rowley D R, Ressler S J, Vyakarnam A, Fish E N (2012) WFDC1/ps20: a host factor that influences the neutrophil response to murine hepatitis virus (MHV) 1 infection. *Antiviral Res* 96:158-168, 2012
- Rowley DR, Dang TD, Larsen M, Gerdes MJ, McBride L, Lu B (1995) Purification of a novel protein (ps20) from urogenital sinus mesenchymal cells with growth inhibitory properties in vitro. *J Biol Chem* 270:22058-22065, 1995
- Schneider A, Brand T, Zweigerdt R, Arnold H (2000) Targeted disruption of the Nkx3.1 gene in mice results in morphogenetic defects of minor salivary glands: parallels to glandular duct morphogenesis in prostate. *Mech Dev* 95:163-174, 2000
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*4:7-25, 1978
- Sell S (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51:1-28, 2004
- Shin S M, Cho K S, Choi M S, Lee S H, Han S H, Kang Y S, Kim H J, Cheong J H, Shin C Y, Ko K H (2010) Urokinase-type plasminogen activator induces BV-2 microglial cell migration through activation of matrix metalloproteinase-9. *Neurochem Res* 35:976-985, 2010
- Shum W W, Da Silva N, McKee M, Smith P J, Brown D, Breton S (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*135:1108-1117, 2008
- Signoretti S, Pires MM, Lindauer M, Horner JW, Grisanzio C, Dhar S, Majumder P, McKeon F, Kantoff PW, Sellers WR, Loda M (2005) p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*102:11355-11360, 2005
- Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M (2000) p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol*157:1769-1775, 2000
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature*414:98-104, 2001
- Takao T, Tsujimura A (2008) Prostate stem cells: the niche and cell markers. *Int J Urol*15:289-294, 2008
- Thomson A A, Cunha G R (1999) Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development*126:3693-3701, 1999

- Tomlinson DC, Freestone SH, Grace OC, Thomson AA (2004) Differential effects of transforming growth factor-beta1 on cellular proliferation in the developing prostate. *Endocrinology* 145:4292-4300, 2004
- Tsujimura A, Koikawa Y, Salm S, Takao T, Coetzee S, Moscatelli D, Shapiro E, Lepor H, Sun TT, Wilson EL (2002) Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *J Cell Biol* 157:1257-1265, 2002
- Vu T H, Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14:2123-2133, 2000
- Wang XD, Leow CC, Zha J, Tang Z, Modrusan Z, Radtke F, Aguet M, de Sauvage FJ, Gao WQ (2006) Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* 290:66-80, 2006
- Wang XD, Shou J, Wong P, French DM, Gao WQ (2004) Notch1-expressing cells are indispensable for prostatic branching morphogenesis during development and re-growth following castration and androgen replacement. *J Biol Chem* 279:24733-24744, 2004
- Wang B E, Wang X D, Ernst J A, Polakis P, Gao W Q (2008) Regulation of epithelial branching morphogenesis and cancer cell growth of the prostate by Wnt signaling. *PLoS One* 14:e2186, 2008
- Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, Chambon P, Dollé P (1997) Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development* 124:4781-4791, 1997
- Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 25:1427-1430, 2000
- Watson JE, Kamkar S, James K, Kowbel D, Andaya A, Paris PL, Simko J, Carroll P, McAlhany S, Rowley D, Collins C (2004) Molecular analysis of WFDC1/ps20 gene in prostate cancer. *Prostate* 1:192-199, 2004
- Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA (2003) The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol* 23:2264-2276, 2003
- Wilson MJ, Ludowese C, Sinha AA, Estensen RD (1996) Effects of castration on plasminogen activator activities and plasminogen activator inhibitor type 1 in the rat ventral prostate. *Prostate* 28:239-250, 1996
- Xin L, Lukacs RU, Lawson DA, Cheng D, Witte ON (2007) Self-renewal and multilineage differentiation in vitro from murine prostate stem cells. *Stem Cells* 25:2760-2769, 2007
- Xu J, Rodriguez D, Periclerc E, Kim J J, Hangai M, Yuen S M, Davis G E, Brooks P C (2001) Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol* 154:1069-1079, 2001

Anexos

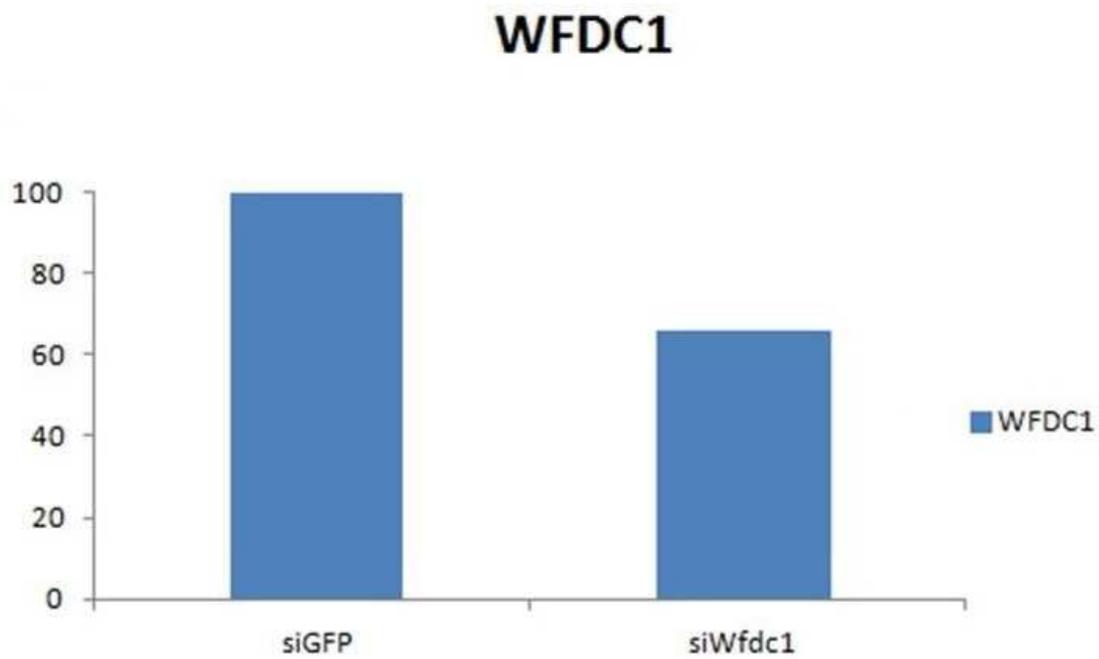


Figura 1: Real Time PCR para WFDC1/ps20. Foi observada redução de 36% na expressão de WFDC1 mediante o tratamento com siRNA.

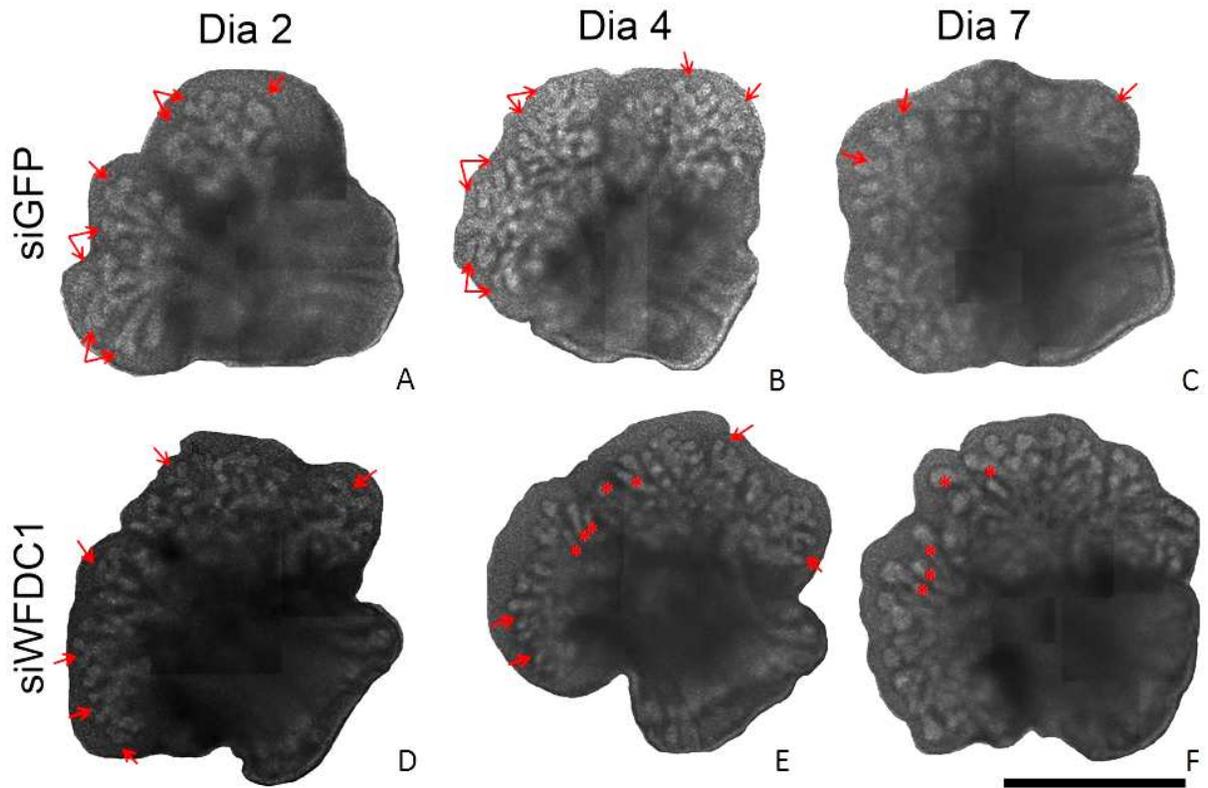


Figura 2: Cultura de próstatas ventrais de ratos Wistar recém-nascidos, na presença de siRNA. **A, B e C:** siGFP foi utilizado como controle e o crescimento foi registrado nos 2º, 4º e 7º dias de cultura. As setas indicam os pontos de ramificação. **D, E e F:** órgãos cultivados na presença de siWFDC1 e registrados nos mesmo tempos que o controle. As setas indicam os pontos de ramificação e os asteriscos indicam os ductos epiteliais que demonstraram crescimento com ausência de ramificações. (Barra de escala: 1 mm)

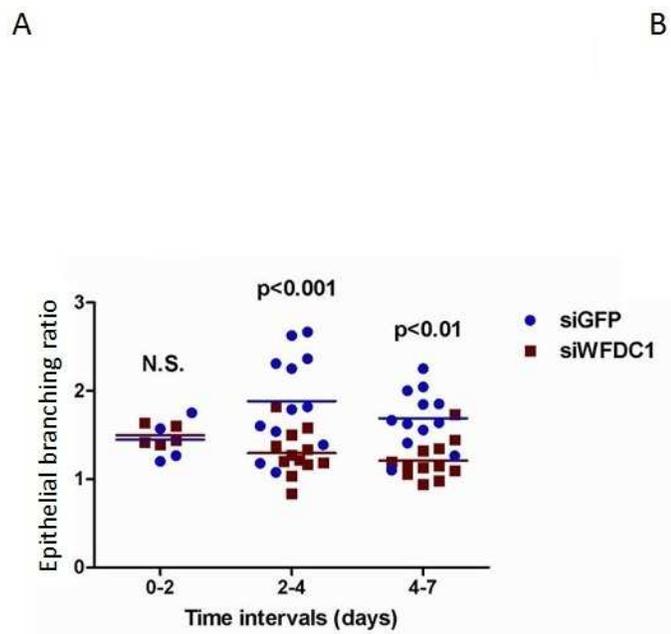
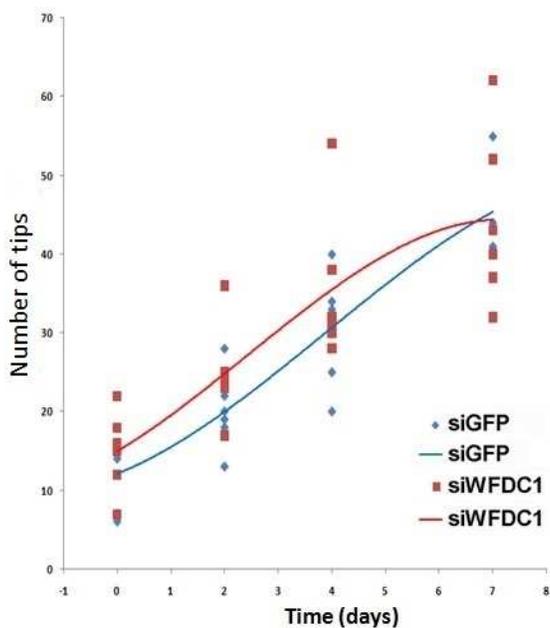


Figura 3: Gráfico da contagem das pontas dos brotos epiteliais nos órgãos cultivados na presença de siRNA: A contagem direta das pontas dos brotos demonstrou uma tendência a diminuição dessas pontas ao longo do tempo de cultura na presença de siWFDC1, em comparação com o controle. (n=6) B: Quando foi analisada a diferença na quantidade de pontas levando em consideração o intervalo de tempo, foi observado uma redução mais acentuada na quantidade de pontas nos órgãos tratados com siWFDC1 no período entre os dias 2 e 4 de cultura ($p < 0.001$) e uma leve redução no período entre os dias 4 e 7 de cultura ($p < 0.01$) em comparação com o controle. (n=4 ou 12)

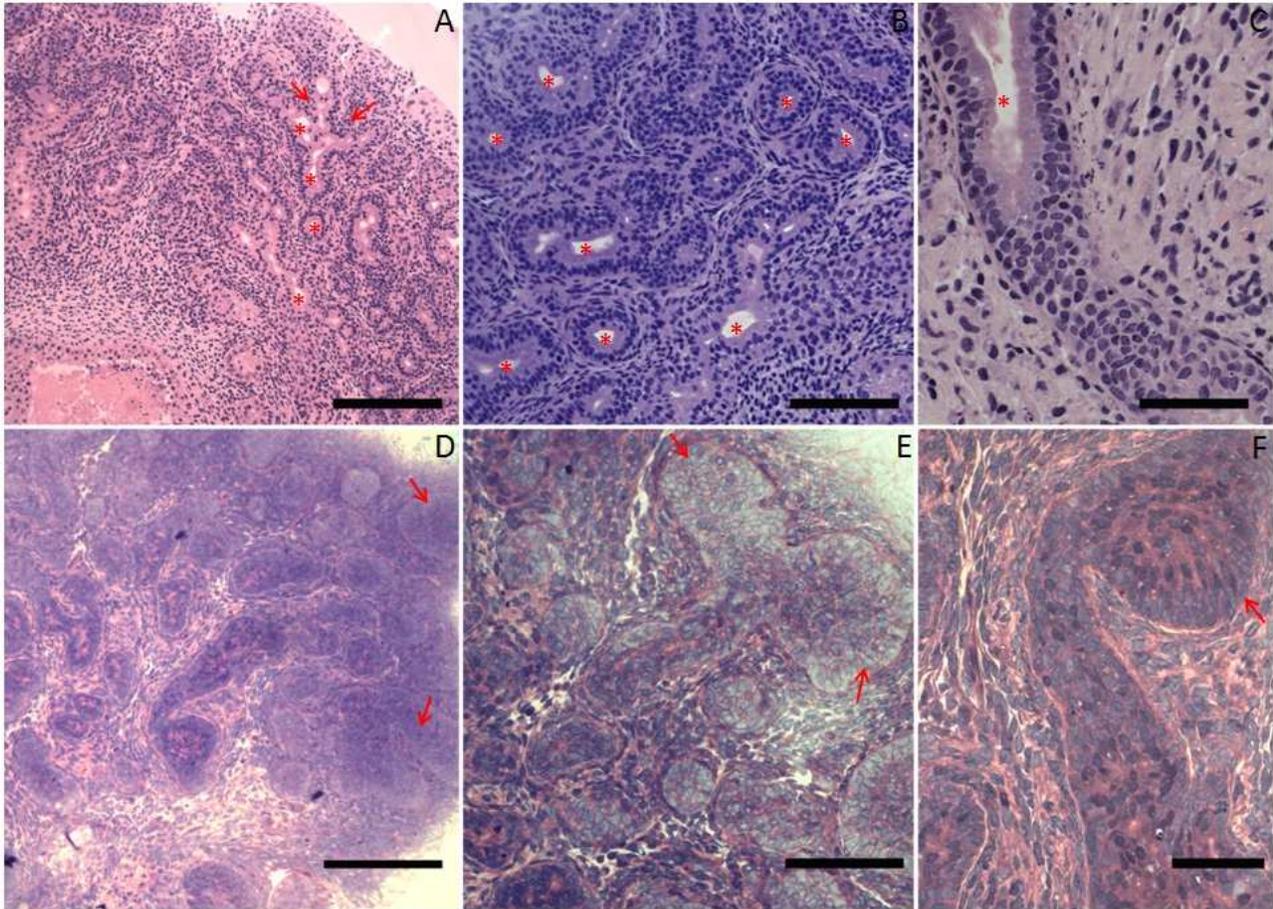


Figura 4: Próstatas ventrais cultivadas por 7 dias na presença de siRNA foram emblocadas em historesina, seccionadas e coradas com Hematoxilina e Eosina. **A, B e C:** Próstata cultivada na presença de siGFP. As setas indicam pontos de ramificação do ducto epitelial. Os asteriscos mostram o lúmen formado no interior das estruturas epiteliais. **D, E e F:** Próstata submetida ao silenciamento de WFDC1/ps20. As setas indicam as pontas dos brotos sem ramificações finais e com aspecto dilatado. (Barra de escala: **A e D:** 200 μ m - **B e E:** 100 μ m - **C e F:** 50 μ m)

Individualized epithelial structures with lumen

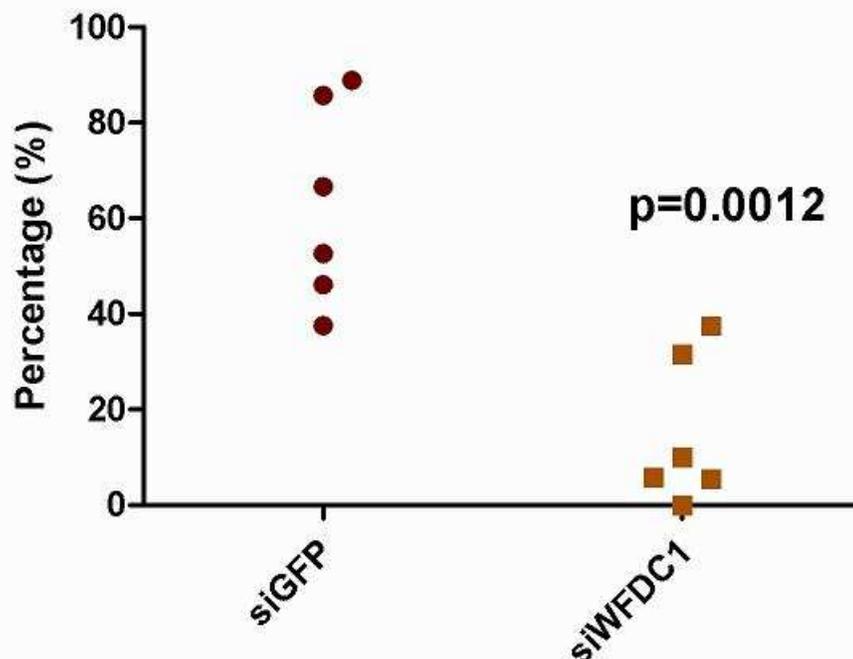


Figura 5: Gráfico da contagem da formação de lúmen em estruturas epiteliais. Foi contada a quantidade total de estruturas epiteliais observadas e a porcentagem delas que apresenta lúmen. Nos órgãos controle a porcentagem de estruturas epiteliais com lúmen ficou entre 35 e 95%, enquanto que nos órgãos que receberam o silenciamento de WFDC1, essa porcentagem fica entre 0 e 40%. (n=6)

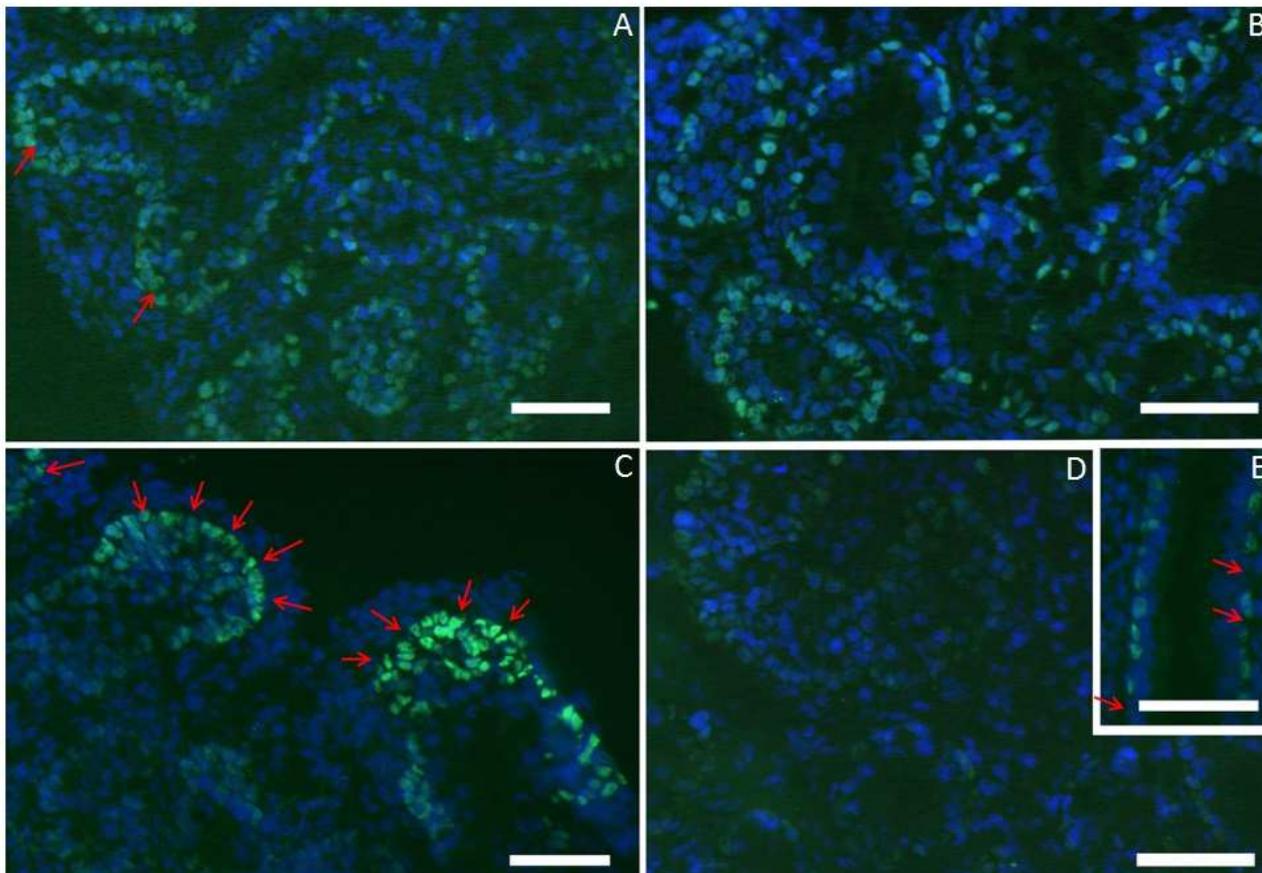


Figura 6: Imunohistoquímica para p63 em próstatas cultivadas na presença de siRNA. **A e B:**Próstatas controle demonstram leve concentração de células p63⁺ nas pontas dos ductos epiteliais (setas), assim como distribuição regular nesses ductos. (Barras de escala: 50µm) **C e D:** Nas próstatas cultivadas na presença de siWFDC1 foi observada concentração elevada de células p63⁺ nas pontas do ductos, e esses não apresentam ramificações (setas). A marcação aparece com menos intensidade nas regiões mais proximais dos ductos prostáticos. (Barras de escala: 50µm). **E:** No destaque é possível observar regiões dos ductos epiteliais aonde as células p63⁺ apresentam um grande espaçamento entre elas. (Barra de escala: 50µm)

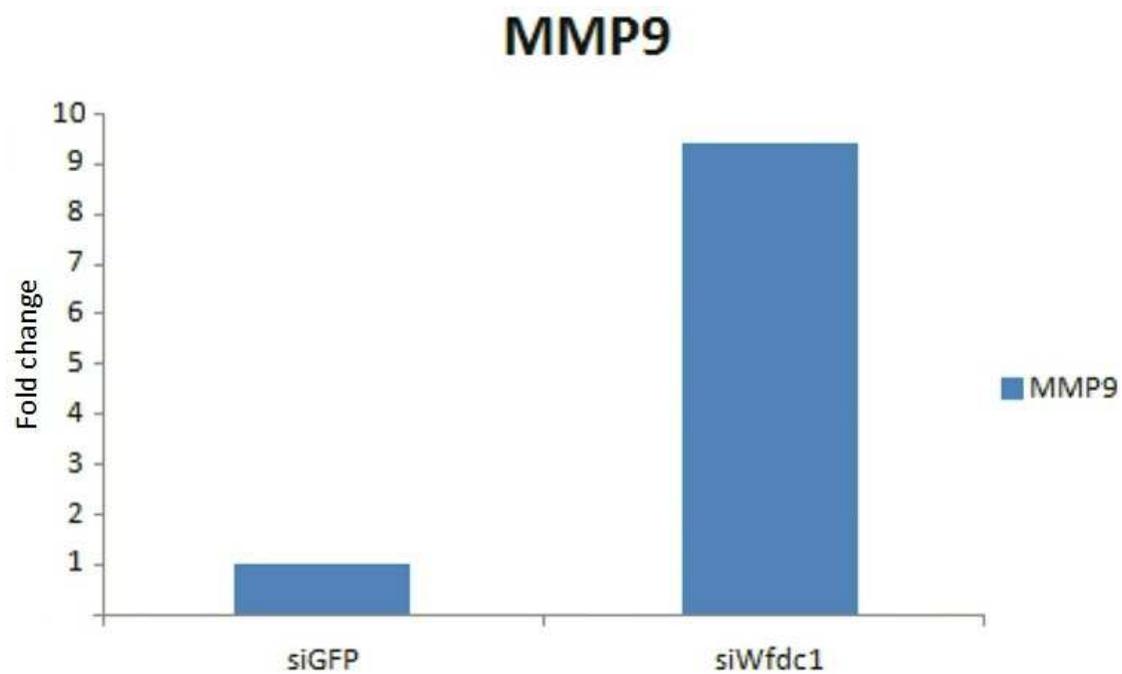


Figura 7: Gráfico da análise por Real Time PCR da expressão de MMP9. Nos órgãos que receberam o silenciamento de WFDC1/ps20 foi detectado aumento de 9 vezes na expressão de MMP9.

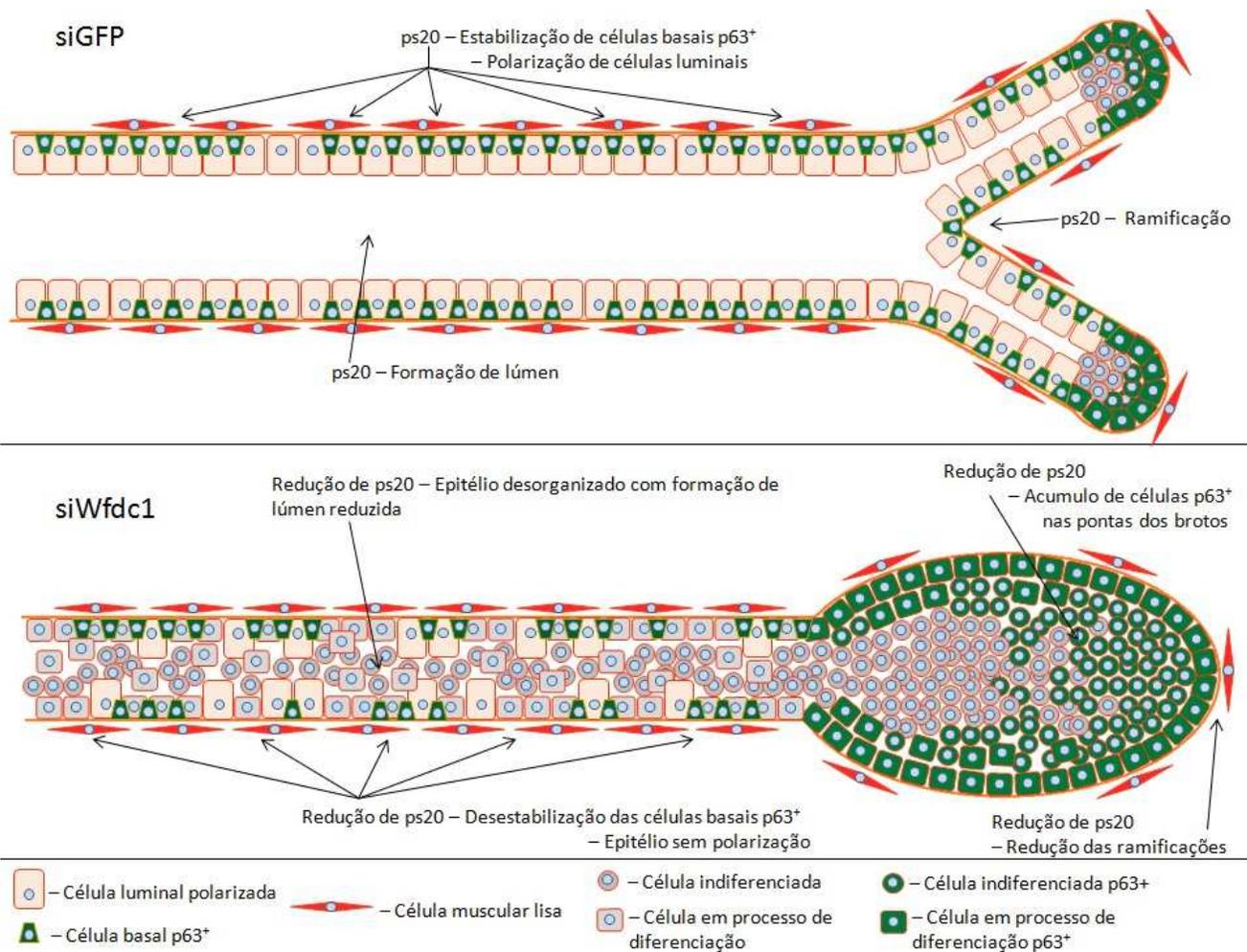


Figura 8: Esquema representando os efeitos do silenciamento de WFDC1 nos ductos epiteliais prostáticos. No órgão controle, é sugerido que a presença normal da proteína ps20 contribua para a estabilização das células basais p63⁺, que auxiliam na organização das células epiteliais luminais. Essas células polarizam-se e organizam-se corretamente, dando origem ao lúmen do ducto epitelial. Também é proposto que a proteína ps20 tenha um papel na ramificação do ducto prostático. É proposto que na ausência de ps20 ocorre uma desregulação nas células p63⁺ positivas, que acabam se concentrando na ponta do broto em crescimento. A ausência dessas células basais atrapalha a organização do epitélio prostático e a formação de lúmen é reduzida. Também é observada redução das ramificações.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "**Papel da PS20/WFDC1 no desenvolvimento prostático e regulação da distribuição das células p63 positivas**":

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

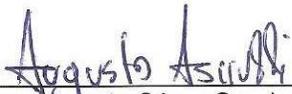
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

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

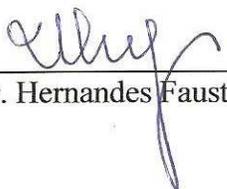
(x) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2242-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia (IB – UNICAMP)

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição:

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



Aluno: Augusto César Spadaccia Ascitti



Orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
 Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura