

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LESLIE CRISTINA PINTO

**“PERFIS DAS DISTROGLICANAS E
MORFO-FISIOLOGIA DO LOBO VENTRAL DA
PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
LESLIE CRISTINA PINTO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra.  Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Campinas, 2009

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

P658p

Pinto, Leslie Cristina

Perfis das distroglicanas e morfo-fisiologia do lobo ventral da próstata de camundongos distróficos / Leslie Cristina Pinto. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Próstata ventral. 2. Distroglicanas. 3. Camundongo mdx. I. Cagnon, Valéria Helena Alves, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Dystroglycans and laminin α 3 features on the prostate of mdx mice.

Palavras-chave em inglês: Ventral prostate; Dystroglycans; Mdx mice.

Área de concentração: Biologia Celular e Estrutural.

Titulação: Mestre em Anatomia.

Banca examinadora: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, Wagner Eduardo Matheus, Marcelo Martinez.

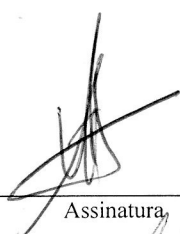
Data da defesa: 03/04/2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia.

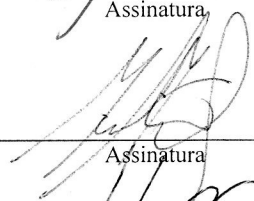
Campinas, 03 de Abril de 2009

BANCA EXAMINADORA

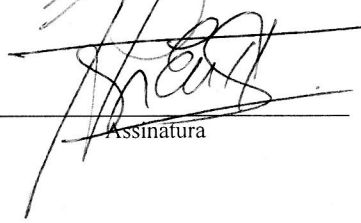
Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Martinez


Assinatura

Prof. Dr. Wagner Eduardo Matheus


Assinatura

Prof. Dr. Humberto Santo Neto


Assinatura

Profa. Dra. Elaine Minatel


Assinatura

DEDICATÓRIA

À DEUS,

“Tu és o maior responsável por esta vitória. Nessa caminhada, a Tua presença foi maior que todas as dificuldades e foi Tua força que me conduziu até aqui.

AOS MEUS MAIORES INCENTIVADORES,

MEUS PAIS, MÁRCIA E RENATO,

A vocês fonte divina da vida, que abdicaram dos seus sonhos para fazer com que os meus pudessem se tornar realidade chegou a hora de colher comigo os frutos que plantamos. Sei que hoje é o início de tudo; estou apenas começando, mas obrigada por me ajudarem a realizar esse grande sonho e partilharem dele comigo.

AOS MEUS IRMÃOS, EVELYN E VITOR,

Pelo grande amor, incentivo e exemplo.

À PROFESSORA VALÉRIA,

Agradeço àquela que me conheceu totalmente leiga e abriu-me essa grande porta, ampliando minhas perspectivas e horizontes. Ser mestre não é apenas lecionar, é ser exemplo de dedicação, dignidade e doação e, saiba professora, que esse grande legado foi deixado por você.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra Valéria Helena Alves Cagnon Quitete**, por ter me recebido em sua sala, quando eu era apenas uma desconhecida e ter permitido que eu desse os passos iniciais rumo a essa realização. Obrigada por me ter guiado até aqui, sempre com paciência, compreensão e perseverança.

Ao amigo **Wagner José Fávaro**, por sua disposição em me ajudar desde o início, demonstrando não só a mim, mas também aos nossos colegas de laboratório, o verdadeiro espírito de união e abnegação.

Aos professores do Departamento de Anatomia, **Profa. Dra. Maria Júlia Marques**, **Prof. Dr. José Ângelo Camilli**, **Profa. Dra. Elaine Minatel**, pelo incentivo e pela ajuda nas disciplinas.

Ao **Prof. Dr. Wagner Eduardo Matheus**, à **Profa. Dra. Cristina Pontes** e o **Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira** por sua participação no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto**, ao **Prof. Dr. Wagner Eduardo Matheus** e à **Profa. Dra. Maíra Aparecida Stefanini** pela contribuição para a lapidação deste trabalho durante a pré-banca examinadora.

À **Sra. Ana Floriano Rodrigues** pela atenção dispensada durante minha permanência no departamento de Anatomia.

Em especial, à **Sra. Lilian Alves Senne Panagio** por toda sua ajuda e apoio em todas as etapas do curso de pós-graduação.

Aos **Srs. Norivaldo Celestino** e **Marco Aurélio Ribeiro de Paula** por sua grande contribuição na realização da parte experimental deste trabalho.

À **Sra Marlene Lima Francisco** pelos cuidados com os animais deste trabalho.

À todos do **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural**.

À **FAPESP** pelos auxílios, tornando possível a realização deste trabalho.

“Mestre não é aquele que ensina, mas aquele que de repente aprende.”
(Afonso Romano de Sant’Anna)

Lista de abreviaturas

BC: basal epithelial cell

CEMIB: centro de bioterismo da Unicamp

COL: collagen

DAB: diaminobenzidina

DG: distroglicana

DGs: distroglicanas

DHT: dihidrotestosterona

EP: epithelium

EF: elastic fibers

FB: fibroblast

FGF: fator de crescimento fibroblástico

HPB: hiperplasia prostática benigna

IGF: fator de crescimento homólogo à insulina

IGFBPs: proteínas ligantes de IGF-1

KGF: fator de crescimento queratinoso

L: lúmen

M: mitochondria

MDX: x-chromosome linked muscular dystrophy

MV: microvilli

N: nuclei

NU: nucleoli

PIN: prostatic epithelial neoplasia

RER: rough endoplasmatic reticulum cisternae

RF: reticular fibers

SMC: smooth muscle cell

ST: stroma

TGF: fatores de crescimento transformadores

VEGF: fatores de crescimento do endotélio vascular

VS: secretory vesicles

ΔP : variação de peso

ÍNDICE

1-RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
2-INTRODUÇÃO.....	1
2.1-Próstata.....	1
2.2-Distrofia Muscular de Duchenne e camundongos mdx.....	6
2.3-Distroglicanas.....	7
3-JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	9
4-MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1-Macroscopia.....	11
4.2-Microscopia de luz.....	11
4.3-Morfometria em microscopia de luz.....	11
4.4-Microscopia eletrônica de transmissão.....	12
4.5- Dosagens de hormônios esteróides no soro sanguíneo.....	12
4.6-Detecção da apoptose e determinação do índice apoptótico.....	13
4.7-Imunomarcacão das distroglicanas (α e β), Ki-67 e IGF-1R α	13
4.8-Extração de proteínas e Western Blotting.....	14
4.9-Contagem das células Ki-67 positivas.....	16
5.0-Análises estatísticas.....	16
5-ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
6- CONCLUSÕES	56
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8-APÊNDICE.....	69

1-RESUMO

A distroglicana (DG) é uma importante proteína estrutural a qual está envolvida no desenvolvimento celular epitelial, formação de membrana basal e manutenção da integridade de diferentes tecidos. Estudos indicaram que a alteração na expressão da DG é um evento freqüente nas malignecências humanas e sugerem que esta molécula tem um papel importante no desenvolvimento de tumor. No câncer de próstata, verificou-se expressiva redução das distroglicanas, especialmente da α -DG, acarretando em progressão tumoral e ocorrência de metástases. Desta maneira, alterações na expressão das distroglicanas podem ser relevantes na patogênese das doenças prostáticas. Além disto, estas moléculas fazem parte de um complexo glicoproteico e estão relacionadas a uma série de proteínas tais como, agrinas, lamininas e a distrofina. Devido à deficiência de distrofina, este complexo está desestruturado na distrofia muscular de Duchenne e, no camundongo mdx. Este trabalho teve como objetivos caracterizar a estrutura epitelial e estromal do lobo ventral da próstata do camundongo mdx, identificar a ocorrência de receptores para distroglicanas α e β , IGF-1, laminina α -3, estabelecer correlações entre os processos de proliferação e morte celular e analisar a viabilidade do camundongo mdx como modelo experimental no estudo de patologias prostáticas. Um total de 30 animais (15 C57BL10 e 15 mdx) foi dividido em 2 grupos experimentais: controle e mdx. Amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas para análises macroscópicas, imunohistoquímicas, microscopias de luz e eletrônica de transmissão e análises morfométricas. Dosagens sorológicas de estradiol e testosterona foram realizadas. Os resultados mostraram que os níveis séricos de testosterona foram significativamente diminuídos nos camundongos mdx em relação aos controles. Em contraste, os níveis séricos de estradiol do grupo mdx mostraram-se significativamente aumentados em relação ao controle. Acentuada atrofia celular, ocorrência de neoplasia intraepitelial prostática, hipertrofia estromal, presença de células inflamatórias e hipertrofia estromal foram evidenciadas nos animais mdx. A intensidade da reação de imunolocalização da distroglicana foi de fraca expressão em relação ao controle, assim como a da laminina. Já a imunolocalização do IGF foi intensa em relação ao controle. Conclui-se que os animais mdx apresentaram alterações significativas

na integridade estrutural e molecular prostática, com sinais de aumento do processo proliferativo, comprometendo a homeostase glandular e o processo reprodutivo destes animais.

ABSTRACT

The prostate is a fundamental accessory sex gland for the male reproductive process and the stroma-epithelium interaction has an important role in prostate structural maintenance and function. The basal membrane is an interaction link, offering mechanical and physiological support. Nowadays, different studies suggest that dystroglycan (DG), which is an adhesion protein, plays a role in different types of cancer development and progression, including that of the prostate. Thus, the aims of this work were to characterize structural, ultrastructural and proliferative features of the prostatic stroma and epithelium of *mdx* mice; to verify the immunolocalization of the α and β dystroglycan, IGF-I and laminin $\alpha 3$ receptors; and to relate those structural and molecular events to prostate pathogenesis as well as to verify the viability of this experimental model in prostate disease studies. Thirty male mice (*mdx* and C57BL10/Uni) were divided into two groups: control and *mdx*. Samples from the ventral prostate were collected for immunological, Western Blotting, transmission electron and light microscopies and morphometrical analyses. Estradiol and testosterone measurements were verified. The results showed diminished testosterone and increased estradiol levels in the *mdx* group. Atrophied cells, stromal hypertrophy and prostatic intraepithelial were verified in the *mdx* mice. Weak α and β dystroglycan and laminin $\alpha 3$ immunolocalization was verified in the *mdx* group. However, intense IGF-I receptor localization was identified in the *mdx* animals. Thus, it was concluded that *mdx* animals presented changes in the molecular and structural integrity and proliferation signals, leading to glandular pathogenesis, compromising prostate homeostasis and the reproductive process. Apart from this, the destructuring of the dystroglycan-dystrophin complex can be considered a trigger factor for prostate pathogenesis. It can also point towards that the steroid-hormone and IGF relationship can be an alternative towards new therapies to treat prostatic diseases.

2- INTRODUÇÃO

2.1-Próstata

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino, sendo considerada a glândula mais volumosa e de grande importância funcional deste sistema (Cunha et al., 2002; Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005).

A próstata dos roedores é composta por um sistema complexo de ductos ramificados que terminam proximalmente na uretra (Ílio et al., 2000). Divide-se em três pares de lobos: ventral, lateral e dorsal, de acordo com a localização ao redor da uretra prostática e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior localizadas na face côncava das vesículas seminais (Jesik et al., 1982; Sugimura et al., 1986; Aumuller & Seitz, 1990). A borda epitelial dos ductos pode ser dividida em três regiões morfológicamente distintas. A região distal é circundada por células colunares altas, muitas das quais mostram sinais de divisão celular. A região intermediária é circundada por células mitóticas quiescentes capazes de secretar proteínas prostáticas. As células epiteliais ao redor da região proximal são cubóides baixas. A heterogeneidade de tipos celulares epiteliais indica diferentes respostas do epitélio ao mesmo nível de andrógeno circulante (Lee et al., 1990, Lee et al., 1994; Ilio et al., 2000).

Na espécie humana, a próstata encontra-se localizada ao redor da uretra, inferiormente à bexiga urinária, e são descritas 3 regiões glandulares distintas, no que se refere à organização histológica e incidência patológica: zona periférica, central e zona de transição, envoltas por uma fina camada fibromuscular (McNeal, 1988; Setchell & Brooks, 1988).

Em linhas gerais, a próstata se desenvolve a partir do seio urogenital do embrião na presença de andrógenos, como resultado de interações entre o seio urogenital epitelial e o seio urogenital mesenquimal. Durante o desenvolvimento prostático, o seio urogenital mesenquimal induz a formação de brotos epiteliais e o crescimento destes, bem como

regula a ramificação ductal, além de promover a diferenciação do epitélio secretor e especificar os tipos de proteínas secretoras expressadas (Cunha et al., 2004).

A secreção prostática é formada por diferentes constituintes como o ácido cítrico, ácido siálico, espermina e prostaglandinas, enzimas como a amilase, fibrinogenase, aminopeptidase, transglutaminase, fosfatases ácida e alcalina, uma cascata de fibrinolisinases e zinco (Blandy & Lytton, 1986; Lin & Bissel, 1993; Bull et al., 2001), os quais apresentam propriedades importantes para a fertilização, aumento da motilidade e sobrevivência dos espermatozoides (Lin & Bissel, 1993; Bull et al., 2001).

Nos roedores, em geral, os lobos prostáticos são compostos por um conjunto de estruturas túbulo-alveolares, onde o epitélio secretor simples encontra-se envolvido pelo estroma (Aumüller & Ader, 1979). A membrana basal está localizada entre o epitélio e estroma, tendo como seus principais componentes colágeno tipo IV e laminina (Knox et al., 1994).

O lobo ventral da próstata é constituído por ácinos revestidos por epitélio simples. Cada um destes consiste de células colunares assentadas em nítida membrana basal (Cavazos, 1975). O estroma prostático é formado por células estromais e matriz extracelular associada a fatores de crescimento, moléculas reguladoras e enzimas de remodelação, as quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências mecânicas sobre as células epiteliais (Tuxhorn et al., 2001; Cunha & Matrisian, 2002). Também, vasos sanguíneos, terminações nervosas e células imunes constituem partes integrais do estroma (Tuxhorn et al., 2001). Os fibroblastos e as células musculares lisas são importantes tipos celulares do estroma prostático. A principal função destas é sintetizar componentes estruturais e reguladores da matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (Lin & Bissel, 1993; Kreis & Vale, 1999; Tuxhorn et al., 2001), sendo um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (Taipale & Keski-Oja, 1997; Tuxhorn, et al., 2001). Componentes estruturais como colágeno e fibras elásticas

proporcionam rigidez mecânica e flexibilidade ao tecido prostático (Taipale & Keski-Oja, 1997; Tuxhorn, et al., 2001). Assim, em associação, células estromais e matriz extracelular criam um microambiente que regula o crescimento e diferenciação funcional das células adjacentes, desempenhando cada um desses, importante papel na manutenção da forma e função tecidual (Labat-Robert et al., 1990; Tuxhorn et al., 2001; Cornell et al., 2003).

O desenvolvimento, crescimento e funcionamento da próstata são dependentes de interações recíprocas entre epitélio e estroma, sendo reguladas por hormônios esteróides (Cunha et al., 2004). A membrana basal é o ponto de união desta interação oferecendo suporte mecânico e fisiológico ao epitélio secretor e, é formada, principalmente, por colágeno tipo IV, heparan sulfato e laminina (Knox et al., 1994; Carvalho & Line, 1996 Hayward & Cunha, 2000).

Estudos têm apontado a expressão das lamininas na membrana basal de vários tecidos epiteliais. Elas têm mostrado ter papel significativo na adesão, forma e migração celular, além de estarem envolvidas também na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. A identificação de várias subcadeias tem demonstrado a existência de uma variedade de isoformas de laminina. Entre estas encontramos a lamina α -3, altamente expressada na glândula prostática normal adulta, porém com uma expressão muito reduzida em patologias da próstata, entre elas, o câncer (Hao et al, 1996; Brar et al., 2003).

A morfogênese, a manutenção da atividade funcional e da morfologia, a proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos (Leav et al., 2001; Cunha et al., 2002). A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os principais andrógenos a induzir a diferenciação prostática (Toorians et al., 2003; Hsing, 2001). Os andrógenos expressam seus efeitos biológicos através da interação com receptores intracelulares específicos sendo que, o complexo receptor-hormônio associado à cromatina nuclear, regula a expressão do gene específico (Prins et al., 1991). A DHT é resultante da conversão

da testosterona através da enzima 5 α -redutase (Prins et al., 1991; Hsing, 2001; Marker et al., 2003; Toorians et al., 2003).

Apesar de a próstata ser primariamente regulada por andrógenos, o seu desenvolvimento, tanto em humanos como em roedores, é sensível a outros hormônios, destacando-se os estrógenos, que atuam sinergicamente à testosterona, influenciando tanto as funções normais do órgão quanto às alterações patológicas (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). Os estrógenos possuem efeitos anti-androgênicos e regulam negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, com conseqüente redução na produção de andrógenos pelas células de Leydig e decorrente involução do epitélio prostático e crescimento estromal em animais adultos (Weihua et al., 2002).

Os processos biológicos na glândula prostática, tais como regulação da proliferação e diferenciação celular, atividade mitogênica, processos secretores e crescimentos tumorais são regulados e/ ou influenciados por diferentes polipeptídeos como os fatores de crescimento homólogos a insulina (IGF), fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e pelos fatores de crescimento transformadores (TGF) (Kerr et al., 1995; Djavan et al., 2001; Marszalek et al., 2005). Os IGFs na próstata são produzidos pelas células estromais e atuam como fatores de crescimento parácrinos no epitélio prostático normal. Existem dois tipos de receptores de IGF transmembrânicos, o IGF-1 que é expressado em células prostáticas epiteliais e estromais e o IGF-2 que não foi encontrado em nenhum dos dois compartimentos prostáticos (Djavan, 2001). Os efeitos mitogênicos e proliferativos são modulados pelas proteínas ligantes de IGF-1 (IGFBPs) no epitélio prostático (Konno-Takahashi et al., 2003). Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que a elevação dos níveis séricos de IGF-I constitui potente fator de risco para o início da hiperplasia benigna e da carcinogênese prostática (Djavan et al., 2001; Takahashi et al., 2003; Pandini et al., 2005).

A morfologia e fisiologia da próstata têm sido examinadas em função das condições patológicas que podem acometer esse órgão. Dentre essas destacam-se a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o carcinoma prostático (Marcelli & Cunningham, 1999; Leav et al., 2001). McNeal (1978) propôs que a HPB, em homens, é resultado de uma reativação dos fatores de crescimento embriológicos no estroma prostático. Esta concepção foi suportada pelas observações morfológicas de Rohr & Bartsch (1980), os quais classificaram a HPB como uma doença estromal. Na HPB tem sido sugerido que os andrógenos e estrógenos estimulam os fibroblastos a produzirem fator de crescimento queratinoso (KGF) e fator de crescimento transformador (TGF β), os quais, através de estímulos parácrinos promovem crescimento e proliferação das células estromais e epiteliais, respectivamente (Droller, 1997).

Em oposição, o câncer de próstata é considerado uma doença do epitélio e, freqüentemente estende-se além dos limites normais do órgão (Droller, 1997). A carcinogênese desse órgão ocorre, em parte, como resultado da perturbação das interações entre estroma e epitélio, sendo iniciada por um dano genético do epitélio prostático. O epitélio começa a apresentar falhas na sinalização apropriada às células musculares adjacentes, e estas começam a se tornar indiferenciadas. Assim, a sinalização das células musculares para o epitélio se torna anormal, resultando em progressiva perda da proliferação e diferenciação epitelial, além disso, ocorrem migração, angiogênese, apoptose e metástases tumorais (Wong & Tam, 2002; Cunha et al., 2004).

Também, deve-se destacar que o câncer de próstata é a segunda maior causa *mortis* na população ocidental masculina, embora sua etiologia não esteja totalmente estabelecida (Jemal et al., 2003). Sabe-se que, o desenvolvimento do carcinoma prostático é de natureza endócrina (Morton et al., 1996) e que a ocorrência aumenta com a idade (Davies & Eaton, 1991).

Sabe-se que a alteração na expressão das distroglicanas influencia o desenvolvimento e a progressão de câncer prostático. No câncer de próstata de alto grau verificou-se acentuada redução na expressão das DGs, levando à anormal interação da célula prostática com a matriz extracelular, o que certamente acarreta em progressão de metástases. Assim sendo, estes estudos indicam que as anormalidades na expressão das DGs podem ser fatores cruciais na patogênese prostática (Henry et al., 2001; Sgambato et al., 2006).

2.2-Distrofia Muscular de Duchenne e camundongos MDX

A distrofia muscular de Duchenne destaca-se, dentre as distrofias musculares, por ser a mais comum e devastadora. Afeta 01 em cada 1500 crianças do sexo masculino nascidas vivas, sendo uma doença recessiva ligada ao cromossomo X. Além disso, caracteriza-se pela falta da distrofina, com conseqüente desestruturação do complexo distrofina-glicoproteínas (Hoffman et al., 1987; Bonilla et al., 1988; Petrof, 1998; Engel & Armstrong., 1994; Bogdanovich et al., 2004).

Clinicamente, a distrofia muscular de Duchenne se manifesta entre dois e cinco anos de idade, quando se evidencia atrasos no desenvolvimento motor e fraqueza muscular. A fraqueza muscular é progressiva resultando em perda da deambulação aos 12 anos de idade, contraturas articulares e cifo-escoliose (Engel & Armstrong, 1994). O processo de evolução do quadro clínico pode levar o paciente a óbito por volta dos 20 anos de idade (Bogdanovich et al., 2004).

Além disso, recentemente, Ito et al (2006), demonstraram que a deficiência de distrofina em músculo liso contribuiu para o fenótipo alterado vascular, além do próprio fenótipo distrófico geral em pacientes com distrofia de Duchenne. Anteriormente, Mancinelli et al (1999), estudaram as propriedades mecânicas do músculo liso no sistema vascular de camundongos deficientes de distrofina (mdx), verificando ruptura da atividade motora de músculos lisos da veia porta.

A linhagem de camundongos *mdx* (*X-chromosome linked muscular dystrophy*) apresenta, similarmente aos humanos doentes, ausência da distrofina. Entretanto, os animais jovens desta linhagem apresentam ciclos de regeneração muscular (Torres & Duchon, 1987), fato que não ocorre nos músculos de pacientes humanos. Os animais da linhagem *mdx* apresentam o gene da distrofina localizado na região Hq Bpa do cromossomo X e são afetados pela doença os animais machos e as fêmeas homozigóticas (Bulfield et al., 1984; Engel & Armstrong, 1994;).

O camundongo *mdx* foi identificado em 1984 na colônia C57BL10/ScSn apresentando níveis elevados das enzimas creatino-quinase e piruvatoquinase, bem como a degeneração muscular característica de distrofia muscular (Bulfield et al., 1984).

2.3-Distroglicanas

A distroglicana (DG) foi identificada como parte do complexo distrofina-glicoproteínas ligando a matriz extracelular ao citoesqueleto do músculo esquelético, onde tem o papel central na estabilização do sarcolema durante a contração (Batchelor & Winder, 2006). Em adição a esse papel no músculo, é expressada em outros tecidos, onde possui diversas funções, tais como, conectar as células epiteliais à lâmina basal, organização do citoesqueleto, polaridade celular e transdução de sinais extracelulares (Winder, 2001). Essa é uma proteína integral de membrana e interage com outras proteínas, tais como, distrofina, laminina, perlecan e agrinas (Sugita et al., 2001).

A distroglicana é formada por duas subunidades α -DG e β -DG, que são codificadas por um único gene. A α -DG é extracelular sendo ligada às proteínas da matriz extracelular e proteoglicanas. Já a β -DG é transmembrânica, ancorando a α -DG à membrana e é ligada ao citoesqueleto de actina via distrofina (Sgambato et al; 2003; Brennan et al., 2004; Cross et al , 2008).

Defeitos genéticos da DG não têm sido reportados como causa primária de doenças hereditárias humanas, provavelmente, devido ao fato de que uma mutação completa da distroglicana cause morte prematura do embrião (Williamson et al., 1997; Durbeej et al., 1998). Entretanto, anormalidades secundárias da DG têm sido descritas num grande número de doenças neuromusculares (Yamada et al., 2001; Sgambato et al., 2006).

Contudo, apesar de terem sido descobertas em músculos esqueléticos, elas são expressadas diretamente adjacentes à membrana basal, em nervo periférico e em epitélio de revestimento (Durbeej et al., 1998). A DG tem se mostrado essencial para o desenvolvimento epitelial *in vivo* e para morfogênese epitelial *in vitro*. No sistema nervoso é um importante mediador na resposta celular a estímulos moleculares originados na membrana basal e, sua inativação causa uma alteração na migração de neurônios no cérebro (Calogero et al., 2006). Também, tem sido relacionada a diversas funções celulares, tais como: controle do crescimento, diferenciação, mudança da forma e movimento, todas elas relevantes no processo de desenvolvimento de diferentes tipos de tumores, bem como nas metástases tumorais (Jing et al., 2004).

Segundo Raz (2004), a redução na expressão das distroglicanas acarreta a perda da função de adesão, causando uma interação anormal entre a célula e a matriz extracelular, resultando em um aumento da motilidade e das propriedades invasivas.

Estudos demonstraram baixa ou ausência da expressão da α -DG nos cânceres de próstata, mama e cólon (Sgambato et al., 2003; Sgambato et al., 2007), bem como baixa expressão da β -DG em diversos tipos de tumores (Cross et al., 2008). Outros estudos têm correlacionado a alteração das distroglicanas com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres, como; câncer da glia (Calogero et al., 2006), câncer de vulva (Sgambato et al., 2006), câncer de boca (Jing et al., 2004), tumores sólidos pediátricos, entre esses: rhabdomyosarcoma, neuroblastoma e meduloblastoma (Martin et al., 2007).

3- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A literatura especializada demonstrou a importância da glândula prostática no processo reprodutivo masculino e evidenciou a ocorrência de diferentes patologias nessa glândula, a qual possui grande complexidade quanto à morfofisiologia. Também, destacou-se o papel fundamental da interação epitélio-estroma na manutenção da integridade glandular, evidenciando-se a contribuição da membrana basal. Ainda, verificou-se o papel decisivo de diferentes polipeptídeos, fatores de crescimento, além de enzimas e proteínas que atuam de forma parácrina no funcionamento glandular.

Também, sabe-se que anormalidades na expressão das distroglicanas promoveram desequilíbrio do complexo distroglicanas-glicoproteínas, com conseqüente interferência nas interações entre matriz extracelular e citoesqueleto. O desequilíbrio destas interações favoreceu o aparecimento de carcinomas, dentre eles, o prostático. Entretanto o papel das distroglicanas no desenvolvimento de tumores, bem como na patogênese prostática é pouco conhecido. Assim, a evidenciação de diferentes aspectos estruturais da ocorrência da distroglicanas poderá fornecer sinais decisivos na prevenção da progressão e tratamento de patologias prostáticas.

O camundongo *mdx* é o animal mais utilizado no estudo das alterações do complexo distrofina-glicoproteínas, uma vez que esses animais apresentam deficiência da distrofina, com conseqüentes alterações nas musculaturas lisa e esquelética.

Assim, considerando-se a complexidade e importância da distrofia muscular de Duchenne e, seus efeitos sobre diferentes órgãos e tecidos corpóreos; também, a falta de informações sobre os perfis das distroglicanas na glândula prostática masculina, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

a) Caracterizar a estrutura epitelial e estromal do lobo ventral da próstata de camundongos da linhagem *mdx*, destacando aspectos morfológicos que possam comprometer o processo reprodutivo.

- b) Identificar a ocorrência dos receptores para as duas subunidades das distroglicanas, laminina α -3 e do IGF-1 no lobo ventral da próstata de camundongos mdx.
- c) Estabelecer correlações entre os processos de proliferação e morte celular no epitélio secretor celular a possíveis processos de patogênese glandular, associando-se a imunolocalização das distroglicanas.
- d) Analisar a viabilidade deste modelo experimental no estudo das patologias prostáticas.

4.0-MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho 30 camundongos machos, sendo 15 da linhagem MDX e 15 da linhagem C57BL10, com 3 meses de idade, foram divididos em 2 grupos experimentais. Todos os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) e mantidos no biotério do Departamento de Anatomia/IB/UNICAMP.

Os animais, dos dois grupos experimentais, receberam água e dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Mensurações semanais das ingestões de água e do consumo de dieta em grãos foram realizadas. Os animais foram mantidos dois a dois em gaiolas plásticas com revestimento de maravalha.

Após 90 dias, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica Marte AS 5500, anestesiados com Francotar/Virbaxyl (1:1) na dosagem 0,25 ml a cada 100g de peso corpóreo. Amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas para análises macroscópicas e de microscopia de luz e imunohistoquímica. Os testículos, vesículas seminais e glândulas de coagulação foram retirados e pesados na balança supracitada. Em seguida, os animais foram sacrificados por pneumotórax.

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa/UNICAMP) protocolo 1427-1.

4.1- Macroscopia

O complexo urogenital foi exposto sendo realizada incisão na parede abdomino-pélvica. Parte desse complexo que inclui; próstata, glândula de coagulação, vesícula seminal, uretra, bexiga urinária, testículos, ureteres e ductos deferentes foi dissecado com auxílio do microscópio cirúrgico DF Vasconcelos.

4.2-Microscopia de luz

Amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas de 5 animais de cada grupo experimental e fixadas em solução Bouin e paraformaldeído a 4%. Os tecidos fixados em paraformaldeído foram lavados em água corrente *overnight*, depois em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em série crescente de álcoois. Já os tecidos fixados em Bouin foram lavados diretamente em álcool etílico a 70% e, em seguida, desidratados em série crescente de álcoois também. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por duas horas e incluídos em paraplástico (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, USA). A secção do material foi realizada em micrótomo (Biocut-modelo 1130) com espessura de 5 micrômetros, corado com hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson (Junqueira et al., 1979), prata amoniacal (Behmer et al., 1976) e Resorcina Reticulina de Weigert (Carvalho et al., 1997), fotografado no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) e, submetidos à análises morfométricas.

4.3-Morfometria em nível de microscopia de luz

Para o estudo morfométrico foram utilizadas amostras da próstata ventral, coradas com hematoxilina e eosina, de cinco animais de cada grupo experimental, os mesmos utilizados para a microscopia de luz. As imagens celulares obtidas no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400) foram submetidas às mensurações das áreas nucleares, citoplasmáticas e luminais, altura do epitélio secretor, diâmetros maiores e menores dos núcleos e a porcentagem da

área relativa do epitélio X estroma glandular por meio do programa NIS-Elements: *Advanced Research* (USA).

Para quantificação das áreas nucleares e citoplasmáticas foram utilizadas células epiteliais contidas em dez campos aleatoriamente definidos, fixando-se as observações com objetiva de 100X.

Para a determinação, em porcentagem, da área relativa (estroma X epitélio) foi utilizada objetiva de 20X.

4.4-Microscopia eletrônica de transmissão

Um total de cinco animais de cada grupo experimental foi perfundido com solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), através do ventrículo esquerdo do coração (Sprando, 1990). A seguir, as próstatas ventrais foram coletadas e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas. Os fragmentos foram inclusos em resina plástica (Araldite Polyscience, Niles, IL, USA) e seccionados com 0,5 µm de no ultramicrotomo LKB 8800 ultratome III e corados com azul de metileno e azul II. Posteriormente, os blocos foram trimados e seccionados no ultramicrotomo Ultracult UCT 020 Leica. Os cortes obtidos foram montados em telas de cobre 200 Mesh e contrastados pelo acetato de uranila (Watson, 1958) e pelo citrato de chumbo (Reynolds, 1963), examinados e fotografados no microscópio de transmissão LEO 906 no laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp.

4.5- Dosagens de hormônios esteróides no soro sanguíneo

Amostras de sangue foram obtidas de cinco animais de cada grupo experimental, os mesmos destinados à microscopia de luz, através de punção cardíaca no ventrículo esquerdo. O soro foi separado por centrifugação e armazenado a – 20° C. As concentrações de testosterona e estradiol foram mensuradas por quimioluminescência em um laboratório

de análises clínicas de referência. Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos.

4.6-Detecção da apoptose e determinação do índice apoptótico

Amostras do lobo ventral de cinco animais, os mesmos destinados à microscopia de luz, foram seccionadas e submetidas às reações de detecção da fragmentação do DNA e Feulgen. A fragmentação do DNA foi detectada utilizando o sistema de detecção fluorescente para apoptose (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os núcleos apoptóticos foram identificados e fotografados através do microscópio Nikon TS-100, equipado com fluorescência (DXM 1200F, Nikon).

Para a reação de Feulgen, os cortes foram submetidos à hidrólise com 4 N HCl por 75 minutos e tratados com o reagente de Schiff por 40 minutos. Depois de extensa lavagem, os cortes foram desidratados e montados em lâminas histológicas. A seguir, seis campos de cada animal foram analisados com objetiva de 100X e o índice apoptótico foi determinado dividindo-se o número de núcleos apoptóticos pelo número total de núcleos encontrados nos campos microscópicos. Os núcleos apoptóticos foram identificados por características como picnose e/ ou fragmentação nucleolar, de acordo com Kerr & Searle (1973). Somente as células epiteliais foram consideradas para contagem.

4.7-Imunomarcação das Distroglicanas (α e β), Ki-67, IGF-IR α e laminina

Amostras do lobo ventral da próstata foram coletadas de cinco animais de cada grupo experimental. A seguir, foram obtidos cortes com cinco micrômetros de espessura no micrótomo (Biocut – Modelo 1130), coletados em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em uma série decrescente de álcoois e lavados em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C por 15 minutos em microondas (potência de 750 W) ou tratamento

com proteinase K, a depender das características de cada um dos anticorpos avaliados. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H_2O_2 (0,3% em metanol) por 15 minutos. Para diminuir as ligações inespecíficas proteína-proteína, os cortes foram incubados em solução bloqueadora com albumina soro bovino (3%), em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos alfa e beta distroglicanas, Ki-67, IGF-IR e laminina $\alpha 3$ foram localizados através dos anticorpos primários policlonais *rabbit* H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchenollogy) para alfa distroglicana (α -DG), *mouse* (NCL-b-DG) (Novocastra) para beta distroglicana (β -DG), *rabbit* N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotchenollogy) para IGF-Ir α e policlonal *rabbit* H-187 (Sc-20143) (Santa Cruz Biotchenollogy) para laminina α -3, diluídos (1:50) e armazenados *overnight* a 4 °C. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários HRP conjugados *goat anti-rabbit* (sc-3837) (Santa Cruz Biotchenollogy) e *goat anti-mouse* (sc-3697) (Santa Cruz Biotchenollogy) por 2 horas e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB). Para a contra-coloração destes foram utilizados hematoxilina de Harris e verde metil. As lâminas foram desidratadas, montadas e avaliadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse E-400.

A intensidade de coloração foi graduada como forte (+++), moderada (++) e fraca (+) de acordo com a concentração e distribuição dos receptores nos tecidos (Markopoulos et al., 2000).

4.8-Extração de proteínas e Western Blotting

Amostras do lobo ventral foram coletadas de todos os animais de cada grupo experimental e pesadas, homogenizadas através do homogenizador Polytron (Kinematica) por 1 min em 50 μ l/mg de tampão de extração contendo 100mM Tris 7.5, 10mM EDTA, 10% (v/v) Triton x-100 e 10 μ l/ml de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., USA). Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a

1400 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para a determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA). As amostras foram misturadas (1:1) com tampão de amostra 3X (100mM Tris- HCL ph 6.8, 10%β- mercaptoetanol, 4% SDS e 20% glicerol), incubadas em banho seco a 95°C por 5 minutos, rapidamente congeladas e armazenadas a -70°C até o momento do uso. O correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado no gel SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose (Amersham) a 70 V por 3 horas. A qualidade da transferência assim como da quantificação de proteínas foi analisada pela coloração das membranas com Ponceau S. As membranas foram então bloqueadas com 3% BSA diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os anticorpos primários policlonais *rabbit* H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchenollogy) para alfa distroglicana (α-DG), *mouse* (NCL-b-DG) (Novocastra) para beta distroglicana (β-DG), *rabbit* N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotchenollogy) para IGF-Ira e policlonal *rabbit* H-187 (Sc-20143) (Santa Cruz Biotchenollogy) para laminina α-3, diluídos em BSA 1% nas diluições 1:500. Após a lavagem com o tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários HRP conjugados *goat anti-rabbit* (sc-3837) (Santa Cruz Biotchenollogy) e *goat anti-mouse* (sc-3697) (Santa Cruz Biotchenollogy) na diluição de 1% em BSA. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade da peroxidase foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Anticorpo para β-actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens NIS-Elements: *Advanced Research (USA)*.

4.9-Contagem de células Ki-67 positivas

Os índices proliferativos foram obtidos por contagem das células Ki-67 positivas (coradas com verde metil). Amostras do lobo ventral de quatro animais de cada grupo experimental foram utilizadas, sendo as mesmas destinadas a imunomarcação para Ki-67. A seguir, dez campos de cada animal foram analisados com objetiva de 100X e o número total de células Ki-67 positivas foi expresso em porcentagem do total de células dos diferentes tipos celulares (células luminais, basais e estromais).

5.0- Análises Estatísticas

A comparação entre grupos foi realizada através das variáveis: variação de peso (ΔP) = peso final – peso inicial (g); consumo líquido diário (mL); consumo sólido diário (g); peso dos testículos (g); pesos das vesículas seminais, glândula de coagulação (g) e complexo prostático; áreas do núcleo (μm^2), do citoplasma (μm^2) e luminal (μm) e altura do epitélio (μm). Também os níveis de testosterona e estradiol totais no soro sanguíneo. Para a análise estatística foram empregados o Test-T (Norman & Streiner, 1994) e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre as médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

5-ARTIGO CIENTÍFICO

“Dystroglycans and Laminin $\alpha 3$ Features on the *Mdx* Mice Prostate”.

Submetido em Fevereiro de 2009: *International Journal of Experimental Pathology*.

“Dystroglycans and Laminin $\alpha 3$ Features on the Prostate of *Mdx* Mice”

Pinto LC¹, Fávaro WJ¹, Cagnon VHA¹

1 - Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, SP, Brazil

Short title: Dystroglycans and laminin on the prostate

Key words: Ventral Prostate; α -dystroglycan; β -dystroglycan; *mdx* mice;
Immunohistochemistry

This work was supported by FAPESP (numbers: 07/54689-9, 07/52053-0)

* Correspondence to: Valéria H. A. Cagnon PhD, Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brazil. Telephone: +(55) 19-3521-6102. Fax: +(55) 19-3289-3124. E-mail: quitete@unicamp.br

ABSTRACT

The prostate is a fundamental accessory sex gland for the male reproductive process and the stroma-epithelium interaction has an important role in prostate structural maintenance and function. The basal membrane is an interaction link, offering mechanical and physiological support. Nowadays, different studies suggest that dystroglycan (DG), which is an adhesion protein, plays a role in different types of cancer development and progression, including that of the prostate. Thus, the aims of this work were to characterize structural, ultrastructural and proliferative features of the prostatic stroma and epithelium of *mdx* mice; to verify the immunolocalization of the α and β dystroglycan, IGF-I and laminin $\alpha 3$ receptors; and to relate those structural and molecular events to prostate pathogenesis as well as to verify the viability of this experimental model in prostate disease studies. Thirty male mice (*mdx* and C57BL10/Uni) were divided into two groups: control and *mdx*. Samples from the ventral prostate were collected for immunological, Western Blotting, transmission electron and light microscopies and morphometrical analyses. Estradiol and testosterone measurements were verified. The results showed diminished testosterone and increased estradiol levels in the *mdx* group. Atrophied cells, stromal hypertrophy and prostatic intraepithelial were verified in the *mdx* mice. Weak α and β dystroglycan and laminin $\alpha 3$ immunolocalization was verified in the *mdx* group. However, intense IGF-I receptor localization was identified in the *mdx* animals. Thus, it was concluded that *mdx* animals presented changes in the molecular and structural integrity and proliferation signals, leading to glandular pathogenesis, compromising prostate homeostasis and the reproductive process. Apart from this, the destructuring of the dystroglycan-dystrophin complex can be considered a trigger factor for prostate pathogenesis. It can also point towards that the steroid-hormone and IGF relationship can be an alternative towards new therapies to treat prostatic diseases.

INTRODUCTION

The prostate is one of the most important accessory sex glands, with its secretion being fundamental for the male reproductive process (Setchell & Brooks, 1988; Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005). Morphogenesis, functional activity and morphology maintenance are regulated by androgens (Cunha et al., 2002; Imamov et al., 2005). Despite the prostate being primarily regulated by androgens, its development in both humans and rodents is sensitive to other hormones such as estrogens in both humans and rodents which act in association with the latter, influencing not only normal prostatic function but also pathological processes (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002).

The rodent prostate is divided into three pairs of lobes: ventral, dorsal and lateral according to their anatomic positions in relation to the urethra (Jesik et al., 1982; Aumuller & Seitz, 1990). These lobes show different characteristics in relation to morphology, secretion and hormone dependence (Colombel & Buttyan, 1995; Costello and Franklin, 1994). In general, the prostate lobes show a simple epithelium surrounded by stroma (Aumüller & Adler, 1979). The epithelial basal lamina is found at the interface between the epithelial cells and the stroma and it is primarily made up of proteoglycans, type IV collagen and noncollagenous glycoproteins such as laminin (Knox et al., 1994).

The prostate epithelium shows columnar cells intermingled with basal cells (McNeal et al., 1988; Abate-Shen & Shen, 2000; Garraway et al., 2003). The prostate stroma is made up of a complex net of stromal cells and extracellular matrix associated to growth factors; regulatory molecules; and enzyme restructuring, which provide biological signals and have mechanical influence on the epithelial cells (Tuxhorn et al., 2001; Cunha & Matrisian, 2002). Polypeptides such as insulin-like growth factors (IGFs), fibroblastic growth factors (FGF), vascular endothelium growth factors (VEGFs) and transforming growth factors (TGFs) are important mitogenic factors to maintain prostate function (Kerr et al., 1995; Djavan et al., 2001; Konno-Takahashi et al., 2003;

Zhao et al., 2004; Marszalek et al., 2005). IGFs are produced by the stromal cells in the prostate, acting as paracrine growth factors in the glandular epithelium (Djavan et al., 2001). There are two types of IGF transmembrane receptors; IGF-1 which is expressed in the stromal and epithelial prostatic cells and IGF-2 which was not found in both prostate compartments (Djavan et al., 2001). The proliferative and mitogenic effects are modulated to bind IGF-1 protein in the prostate epithelium (IGFBPs) (Konno-Takahashi et al., 2003).

Nowadays, different studies suggest that dystroglycan (DG), which is an adhesion protein, plays a role in epithelial cell development; formation of basal membrane; cell polarity; transduction of extracellular signals; and maintenance of tissue integrity (Henry & Campbell, 1998; Winder, 2001). Dystroglycan is linked to extracellular matrix proteins such as laminin; perlecan; and agrin; proteoglycans, in addition to cytosolic proteins (Losasso et al., 2000; Sugita et al., 2001). DG is formed by two protein subunits, β and α , interacting to form a non-covalent complex which is identified by the same gene (Brennan et al., 2004). α -DG links extracellular molecules, whereas the transmembrane β -DG anchors α -DG to the cell membrane (Sgambato et al., 2003). DG was initially studied in skeletal muscles and its role has been limited to muscle physiopathology for a long time (Brennan et al., 2004). The role of different adhesion molecules, such as DG and its ligands have not been completely elucidated. Nevertheless, nowadays the adhesion protein role, such as that of carried out by DG, has shown multiple functions which are involved in connecting cells to the basal lamina and in the exchange of information with the extracellular environment (Hood & Cheresch, 2002; Lyons & Jones, 2007). In addition, it is well known that the accurate contact between epithelial cells and their underlying basement membrane is fundamental to the maintenance of tissue architecture and function (Weir et al., 2006). Therefore, the adhesion molecules are extremely important to promote tissue growth, differentiation and maintenance of cyto-architecture of different organs, including the prostate (Brennan et al., 2004).

The stroma-epithelium interaction has an important role in prostatic structural maintenance and function (Ekman, 2000). The basal membrane is an interaction link, offering mechanical and

physiological support which is specially made up of collagen type IV and laminin (Knox et al., 1994). The laminins have been shown to play significant roles in cellular adhesion, cell shape and migration, proliferation, differentiation, and cell survival (Colognato & Yurchenco, 2000; Brar et al., 2003). The imbalance of the stroma-epithelium interaction leads to different prostatic diseases including prostate cancer (Wong et al., 2000; Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2003; Cornell et al., 2003). Stromal cells associated with carcinomas affect different processes that include tumor initiation, growth, migration, angiogenesis, apoptosis, invasion and metastasis (Wong et al., 2000; Cunha et al., 2001; Cunha et al., 2003; Cornell et al., 2003).

Abnormalities in the expression of the dystroglycans promote an imbalance of the glycoprotein-dystroglycan complex, which in turn causes an interference in the interaction between the extracellular and cytoskeletal matrix. The imbalance of these interactions promotes the onset of carcinomas, among which, prostatic carcinoma. Literature has shown that the role of the dystroglycans in the development of tumors, as well as in the different prostatic pathogenesis, is little known. Thus, evidence of the structural aspects of the dystroglycans will provide means for the impediment of progression and towards the treatment of prostatic pathologies.

The *mdx* mouse (dystrophin-deficient) is the most commonly used animal in the study of changes in the glycoprotein-dystroglycan complex, as they show dystrophin deficiency, and consequently alterations in the smooth and skeletal muscles.

Thus, considering the lack of information on dystroglycan profiles in the male prostatic gland, as well as the characterization of the prostate of *mdx* mice, the aim of the present study was to characterize the structural, ultrastructural and proliferative features of the prostatic stroma and epithelium compartments of the ventral lobe of *mdx* mice; identify the occurrence of α and β dystroglycan and IGF-I receptors; correlate the molecular and structural occurrences in the prostate of *mdx* mice with prostatic pathogenesis; and indicate a possible viability of this line of mouse in the study of the prostate.

ANIMALS AND TISSUE PREPARATION

A total of 15 male mice (*mdx*) and 15 control mice (C57BL10/Uni), 90 days old, from the Bioterism Center/Unicamp were used. The mice were divided into two groups: the control and the *mdx* groups. After 90 days, all animals were anesthetized with a 0.25 mL/100 g body weight dose of Francotar/Virbaxyl (1:1, Vibra® Roseira, São Paulo, Brazil), and samples of the intermediate and distal regions from the ventral lobe of the prostate were collected under a DF Vasconcellos Steromicroscopy (DF Vasconcellos, São Paulo, Brazil) which allows the withdrawal of prostate samples from these specific regions to be processed for morphometrical, structural, immunological and Western Blotting analyses. Hormonal dosages were also carried out on the blood samples.

Animal experimentation was carried out as per the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Research Institutional Committee - protocol number 1427-1 (University of Campinas - UNICAMP).

Samples of the ventral prostate were collected from five animals in each group for histological analysis and then fixed by immersion in either Bouin's solution or 4% paraformaldehyde from each one of the animals; embedded in paraplast (Paraplast Plus, Brazil); cut into 5- μ m thick sections; and submitted to the following staining procedures: hematoxylin-eosin (Behmer et al., 1976); Masson trichrome (Junqueira et al., 1979); amoniactal silver impregnation for reticular fibers (Behmer et al., 1976); and Weigert Resorcin-Fucsin for elastic fibers. The slides were photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Five animals from each experimental group were anesthetized and perfused with Karnovsky's solution for ultrastructural analysis. Next, samples of the ventral prostate were immersed in the same fixative for 2 h, followed by 1 h in a cacodylate buffer and 1% osmium tetroxide. After that, all the material was embedded in resin (Polysciences, Niles, IL, USA), cut with an ultramicrotome (Ultracult UCT 020 Leica, Wetzlar, Germany), mounted on copper grids

(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), and counterstained with uranyl acetate and lead citrate. The specimens were then examined and photographed under a LEO 906 transmission electron microscope.

Morphometrical Procedures

Samples of the ventral prostate were collected from five animals in each group for morphometrical analyses. Four 5- μ m thick cuts from each animal in the different experimental groups were obtained and stained with hematoxylin-eosin.

Cellular, cytoplasm, nuclear, epithelial, luminal and stromal areas and epithelial height were measured and the groups were randomly chosen using $\times 200$ magnification.

Cellular, cytoplasm and nuclear areas and epithelial height in the ventral lobe of the prostate were measured (10 fields per animal were randomly taken), using $\times 100$ magnification.

To determine epithelial, luminal and stromal areas, ten fields per animal were randomly taken, using $\times 20$ magnification. The different parameters were measured using the NIS-Elements: *Advanced Research* (Nikon, Tokyo, Japan) computerized image analysis system.

Determination of the apoptotic index

Samples of the ventral prostate were collected from five animals in each group, fixed by immersion in 4% paraformaldehyde and processed for DNA fragmentation by means of a fluorescein apoptosis detection system (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer instructions. The apoptotic nuclei were identified using a Nikon TS-100 microscope equipped for fluorescence (DXM 1200F, Nikon, Tokyo, Japan), in addition to Feulgen's reaction (Garcia-Florez, 2005).

The sections were subjected to hydrolysis with 4N HCl for 75 min and then treated with Schiff's reagent for 40 min., for Feulgen's reaction. After washing, the sections were dehydrated and mounted on slides. Ten microscopic fields were taken at random and analyzed per animal, resulting in 40 fields per group, using a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope with a $\times 100$ objective. The number of nuclei counted varied from 1290 to 2657 in the different experimental groups. The apoptotic index was determined by dividing the number of apoptotic nuclei by the total number of nuclei found in the microscope field. Apoptotic nuclei were identified by the characteristic pyknosis and/or nuclear fragmentation, as reported by Kerr & Searle (1973).

Immunolabelled alpha dystroglycan (α -DG), beta dystroglycan (β -DG), laminin $\alpha 3$, Ki-67 and IGF-IR α

Samples of the prostate ventral lobe were removed from all animals in each group then fixed by immersion in Bouin's solution, embedded in paraplast (Paraplast Plus, Brazil) and cut into 6 μ m thick sections. The sections were deparaffinized in xylene, hydrated using graded alcohols and rinsed under tap water. Different protocols were used for antigen retrieval. After that, the sections were incubated in 0.3% H₂O₂ for 15 min to block endogenous peroxidase. Nonspecific binding was blocked by incubating the sections in a blocking solution for 1h at room temperature. Primary rabbit H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchnollogy, California, USA) for α -DG, mouse (NCL-b-DG) (Novocastra, Houston, USA) for β -DG, rabbit H-187 (sc-20143) (Santa Cruz Biotchnollogy, California, USA) for laminin $\alpha 3$, rabbit H-300 (sc-15402) (Santa Cruz Biotchnollogy, California, USA) for Ki-67 and rabbit N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotechnology) for IGF-IR α were diluted in 1% BSA (1:50) and applied to the sections overnight at 4°C. The Envision HRP Kit (Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA) was used to visualize the bound antibody according to manufacturer's instructions. The sections were washed for 15 min. with TBS-T and a secondary labeled polymer from the Envision HRP Kit (Dako) was applied for 40 min. at

room temperature. After washing in TBS-T, peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen kit from Envision HRP Kit (Dako) for 10 min. Sections were lightly counterstained with methyl green and Harris' hematoxylin dehydrated in an increasing ethanol series and xylene, mounted in entellan (Merck, Darmstadt, Germany) and photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan). Sections from the ventral lobe of the prostate, which were not stained with primary antibody for α -DG, β -DG, laminin α 3, Ki-67 and IGF-IR α , were used as negative controls. Staining intensity was graded as strong (+++), moderate (++) , and weak (+) according to concentration and distribution of the receptor in the sectioned tissue (altered Markopoulos et al., 2000).

Protein extraction and Western Blotting

The samples of the prostate ventral lobe were removed from all animals in each group, weighed and homogenized in a Polytron homogenizer (Kinematica) for 1 min in a 50 μ l/mg lysis buffer. The tissue homogenates and cell extracts were clarified by centrifugation at 14,000 $\times$ for 20 min. at 4°C. A sample of each extract was used to determine the protein concentration using the Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.,USA). The clarified supernatants were mixed (1:1) with 3 $\times$ sample buffer, transferred to a dry bath at 95°C for 5 min., rapidly frozen on ice, and stored at -70°C until use. Protein (50 μ g) was set to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL., USA) at 70V for 3h. The membranes were blocked with TBS-T containing 1% BSA for 60 min, rinsed in TBS-T and incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies: rabbit H-300 (sc-28534) (Santa Cruz Biotchnology, California, USA) for α -DG, mouse (NCL-b-DG) (Novocastra, Houston, USA) for β -DG, rabbit H-187 (sc-20143) (Santa Cruz Biotchnology,

California, USA) for laminin $\alpha 3$ and rabbit N-20 (sc-720) (Santa Cruz Biotechnology) for IGF-IR α diluted in 1% BSA (1:1,000) and applied to the membranes. The membranes were then incubated for 2h with rabbit and mouse secondary conjugated HRP antibodies (Santa Cruz Biotchenollogy) diluted 1:2,000 in 1% BSA. After washing in TBS-T, peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) for 10 min. β -Actin was used as the endogenous control. Blots were quantified by NIS-Elements: *Advanced Research* (Nikon, Tokyo, Japan) computerized image analysis system.

Counting of Immunolabeled Ki-67

The Ki-67 immunolocalization was measured in five animals in each experimental group. Ten fields were taken at random and measured per animal, resulting in 50 fields per group with a $\times 100$ objective lens and the total number of Ki-67 staining positive cells was expressed as the percentage of these total cells, including luminal, basal epithelial and stromal cells. The number of nuclei counted ranged from 1290 to 2657 for the different experimental groups.

Hormone Concentrations in Serum

At the end of the 90-day treatment, blood samples were collected from all the mice in each group and the serum concentrations of testosterone and estradiol were determined by radioimmunoassay using Coat-a-Count total testosterone/estradiol kits (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). The serum hormone concentrations were expressed in ng/dL and pg/mL .

Statistical Analysis

Average data for cellular, cytoplasm, nuclear, epithelial, luminal and stromal areas, epithelial height, serum levels, apoptotic index and immunolabeled Ki-67 were compared between

groups and analyzed statistically by analysis of variance and Tukey multiple range test, with the level of significance set at 5% (Montgomery, 1991).

RESULTS

Light and Transmission Electron Microscopies and Morphometrical Analyses

The Control Group

The ventral lobe of the prostate showed folded acinus mucosa (Figures. 1a and 1c). The secretory epithelium presented tall columnar cells with basal nuclei (Figures 1a, 1b, 1c, 2a and Table 1). Flattened rough endoplasmic reticulum cisternae and developed Golgi complex in the supranuclear and perinuclear (Figures 2c and 2d) were observed in the cellular cytoplasm. Secretory vesicles with granules, showing different electron density in the apical cytoplasm were also shown (Figures 2a, 2b and 2c). The microvilli were short and sparse (Figures 2a and 2b).

The prostate stroma showed thin collagen fibers underlying the secretory epithelium and intermingled with smooth muscle cells, as well as reticular and elastic fibers, especially underlying the epithelium (Figures 1b, 1c, 1d, 1e, 2d and Table 1). The muscular layer presented smooth muscle cells underlying the epithelium (Figure 2d).

The stromal area was $1.1\times$ greater than that found in the epithelial area (Table 1)

The Mdx Group

The prostatic acini presented less folded mucosa than that observed in the control group (Figures 1f and 1h). Atrophied secretory epithelium with cuboidal cells was verified (Figures 1f, 1g, 1h and 2e), showing decreased nuclear and cytoplasmic areas and epithelial height with nuclei occupying a large cytoplasmic portion (Figures 1f, 1g, 1h, 2e and Table 1). Occasional prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) was identified, characterized by increased and altered nuclei (Figures 1g, 1h and 2i). Dilated Golgi complex cisternae were observed in the cellular cytoplasm

(Figure 2g). Occasional vesicles containing secretion of low electrodensity material was verified in the apical region cell (Figures 2e, 2f and 2g). Rupture of mitochondrial crista was verified (Figures 2g and 2h). Moreover, vacuolization of the cytoplasm (Figure 3a) and digestory vacuoles (Figure 2h) were characterized. Short and scarce microvilli covered the cellular surface (Figure 2f).

Thick collagen fibers, not only underlying the epithelium but also in all the stromal area (Figures 1f, 1h and 2h), were verified in the prostate stroma, demonstrating the hypertrophied stroma. The stromal area was 1.9× greater than the epithelial area (Table 1). The smooth muscle cells showed folded sarcolemma with spinous features and small secretory vesicles (Figure 2h). A great amount of reticular and elastic fibers was observed in all the cytoplasmatic area (Figures 1i and 1j). Inflammatory cells were seen in the prostate stroma (Figure 1f).

Determination of the apoptotic index

The apoptotic index revealed different kinetics for cell death for each group (Figures 3b, 3d and 3e). This index was significantly higher in the *mdx* animals in relation to the control group (Figure 3e).

Counting of Immunolabeled Ki-67

The proliferative activity was significantly increased in the animals from the *mdx* group when compared to the control group (Figures 3a, 3c and 3e).

Immunolabelled alpha dystroglycan (α -DG), beta dystroglycan (β -DG), laminin α 3, Ki-67 and IGF-IR α and Western Blotting analysis

The animals from the *mdx* group presented weak α -DG and β -DG immunoreactivities, in relation to the control group, representing 17.6% and 62.1% protein levels, respectively (Figures 4a,

4b, 4e, 4f, 5 and Table 2). The laminin $\alpha 3$ immunoreactivity was weak in the *mdx* group, representing 19.5% of protein level in relation to the control group, in which the laminin $\alpha 3$ immunolocalization was intense (Figures. 4c, 4g, 5 and Table 2).

Intense IGF-IR α immunoreactivity was verified in the stromal cells of the *mdx* animals, representing 64.1% of protein level, which was higher than that found in the control group (Figures 4d, 4h, 5 and Table 2).

Hormone Concentrations in Serum

The average serum testosterone levels were higher in the control group than that found in the *mdx* group. However, reduced estradiol levels were verified in the control group in comparison to the *mdx* group (Table 3).

DISCUSSION

The results showed decreased testosterone serum level and increased estrogen serum level in the animals from the *mdx* group in relation to the control group. The *mdx* animals showed morphological disorganization in both glandular secretory epithelium and stroma such as epithelial atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, disorganization of the secretory organelles and stromal hypertrophy and inflammatory cells. In addition, the *mdx* group showed reduced α -DG, β -DG and laminin $\alpha 3$ immunoreactivities and increased IGF-I immunolocalization.

The different accessory sexual glands from animals showing different pathological conditions or methods for androgenic ablation such as castration; the continuous use of alcohol; and experimental diabetes demonstrated morphological and physiological characteristics similar to those described in the present study for *mdx* mice (Vilamaior et al., 2000; Heinlein & Chang, 2004; Fávaro & Cagnon, 2006; Cândido et al., 2007; Fávaro et al., 2008; Cagnon & Fávaro, 2008).

Castration is one of the most commonly used methods to study the mechanisms involving testosterone in the maintenance and working of the prostate. Based on these studies, it was verified that androgenic deficiency causes degeneration of the prostate, activation of the apoptosis and intense remodeling of the extracellular matrix of the organ, including the increase of the collagen fibers (Carvalho & Line, 1996; Kiess & Gallaher, 1998; Banerjee et al., 2000; Vilamaior et al., 2000; Heinlein & Chang, 2004; Augusto et al., 2008). Also, Antonioli et al. (2004) verified that the prostatic muscle cells are affected by the absence of androgens demonstrating shortened smooth muscle cells with a spinous appearance. In addition to this, there are studies which correlated the reduction of the hormone levels to alterations of IGF levels (Ohlson, 2007). In hormone dependent tumors, as the case of prostate cancer, the induction of cellular death caused by androgenic depletion has been associated to the regression of the tumor (Staack et al., 2003). Also, Ohlson et al. (2007) observed the prostatic tissue of patients with different degrees of tumor development and they detected that castration did not cause a reduction of IGF levels in most of the tumors. However, in some cases, there was a significant decrease of these levels, accompanied by an increase in the apoptosis rates. These results were agreement with those of another study carried out on castrated mice, where there was glandular degeneration in addition to a reduction in the IGF rates (Ohlson et al., 2005).

Fávaro & Cagnon (2006) and Cândido et al. (2007) also detected a significant reduction in the testosterone levels and increase of the estradiol levels in rodents with chronic alcoholism, damaging the epithelium and stroma of different accessory sex glands, highlighting epithelial atrophy, PIN, increase of collagen fibers and presence of inflammatory cells in the glandular stroma.

Also, similar morphological and physiological results in experimental diabetes to those in castration and in alcoholism were verified. Several clinical and experimental studies demonstrated that diabetes caused low testosterone and gonadotrophic hormone levels attributing these effects to the negative feedback of the hypothalamic-hypophyseal-gonadal (Tesone et al., 1980; Saito et al., 1996; Ho, 1991; Ballester et al., 2004; Kasper et al., 2008; Suthagar et al., 2008). Fávaro et al. (2008) and Cagnon & Fávaro (2008) observed atrophy of the secretory epithelium cells, stromal hypertrophy,

PIN, dilation of the organelles involved in the secretory glandular process, apart from a decrease in the occurrence of the two subtypes of dystroglycan receptors in the ventral prostate of spontaneously diabetic mice. Thus, the different alterations of the prostate characterized by androgenic privation, justified these cellular events.

Despite the prostate being primarily androgen regulated, there are other hormones such as estrogens which act with androgen, influencing the development and maintenance of the prostate activities, as well as the occurrence and progression of diseases in this organ (Weihua et al., 2001; Cunha et al., 2002). Several clinical and experimental studies have shown the crucial role of androgen and estrogen in the development of different prostatic pathologies (Marcelli & Cunningham, 1999; Cunha et al., 2002; Tuxhorn et al., 2002; Risbridger et al., 2003; Mcpherson et al., 2007). Naslund et al. (1988) observed that hormonal imbalance is one of the main etiological factors involved in the development of prostatitis in rats. Estrogens have anti-androgen effects and negatively regulate the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis, with a reduction of androgen production by Leydig cells, resulting in atrophied prostatic epithelium and stromal growth in adult animals (Weihua et al., 2002). Bianco et al. (2002) and Risbridger et al. (2003) demonstrated that both estrogens and androgens could lead to morphological and functional prostate alterations, however, each one of them *per se* is not able to cause the carcinogenesis of this gland.

The stroma-epithelium interaction has an important role in prostatic structural maintenance and function (Ekman, 2000). In addition, based on morphological, functional and embryological aspects, this interaction could be considered a single functional unit (Aumüller & Seitz, 1990; Hayward & Cunha, 2000). The basal membrane is an interaction link, offering mechanical and physiological support (Knox et al., 1994; Hayward & Cunha, 2000). Brar et al. (2003), verifying the expression of the different laminin chains in the human prostate of pre-pubescent individuals and adults, with cancer and prostate hyperplasia, identified that the laminin $\alpha 3$ is expressed in healthy pre-pubescent and adult prostates. However, this study verified that in hyperplasia and in prostate cancer, the laminin $\alpha 3$ expression was absent, thus damaging adhesion, differentiation, migration,

proliferation and cellular survival. The imbalance of the stroma-epithelium interaction benefits the development of prostatic cancer (Cunha et al., 2002). The stromal microenvironment changes, which are caused by different cells and extracellular matrix elements, could point to the beginning of the development and progression of cancer in the prostate (Cunha et al., 2003). The increased extracellular matrix element, specially, collagen fibers, growth factors and stromal restructuring is called reactive stroma, leading to a positive microenvironment for tumoral growth (Grossfeld et al., 1998; Rowley, 1998; Hayward et al., 2001; Tuxhorn et al., 2002). Also, other studies showed the phenotype changes of smooth muscle cells as a result of different lesions, such as prostatic cancer. Those changes characterized these cells as miofibroblast, which are secretory cells with intermediate features between fibroblast and smooth muscle cells (Vilamaior et al., 2000; Wong et al., 2000; Tuxhorn et al., 2001; Fávaro & Cagnon, 2006). The present results pointed towards the active role of the muscle cells in the extracellular matrix remodeling of the animals from the mdx group, probably, due to the hormone imbalance. Apart from this, it can be concluded that mdx mice presented tissue destructuring, damaging the organ functional activity as well as its reproductive process.

Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) is pointed out as being a lesion tissue which comes prior to invasive adenocarcinoma, tending to become malignant (Davidson et al., 1995; Häggman et al., 1997; Xie et al., 2000; Alberts & Blute, 2001). According to Billis (2000), the inflammatory process is a result of the prostatic secretion flow in the stroma, after blocking up its ducts. Also, other studies demonstrated the relation to inflammatory infiltrate and tumor progression (Wilson & Balkwill, 2002; Lin & Pollard, 2004).

Apoptosis is an intrinsic active cellular mechanism, which destroys cells during tissue restructuring and development processes (Kerr et al., 1972; Kerr & Searle, 1973). This event is characterized by morphological changes, including loss of plasmatic membrane and condensation of cytoplasm and nucleus (Quarrie et al., 1995; Strange et al., 1995; Sohn et al., 2001). This

physiological mechanism guarantees tissue organization during cellular development and balance in the mature organ, which is very often related to tissue involution process (Rauch et al., 1997). Then, the control mechanism of tissue homeostasis is a balance between proliferation and cellular death (Quarrie et al., 1995; Strange et al., 1995; Sohn et al., 2001). Thus, in the present study the presence of inflammatory cells together with the occurrence of PIN and stromal hypertrophy, as well as the compromising of the balance between the cell death processes and cellular proliferation indicated that the prostate of mdx mice is susceptible to the development of malignant pathologies.

Several studies verified that different types of cancers such as breast, colon and prostate demonstrated heterogeneity of the β -DG expression and a low or absent α -DG expression when compared to normal epithelial tissue (Losasso et al., 2000; Henry et al., 2001; Sgambato et al., 2003; Brennan et al., 2004). Moreover, reduced α -DG was associated with tumor progression (Henry et al., 2001). Sgambato et al. (2007) showed that DG overexpression inhibits the growth and tumorigenesis of the prostatic cells. According to Cross et al. (2008) there is a loss or a marked reduction of β -DG expression in the vast majority of human cancers. Raz (2004) showed that reduced DG expression caused loss of function leading to aberrant cell-extracellular matrix interaction, resulting in an increase of invasion properties. This author suggested that the DG is a positive element towards tumorigenesis in the epithelial cells. Also, other results suggested that the lack of DG could have early effects on carcinogenesis events, much more than neoplasia transformation (Sgambato et al., 2003; Sgambato & Brancaccio, 2005).

Thus, the results demonstrated an inverse relationship between the distribution of the dystroglycan receptors (α and β) and laminin in relation to the IGF-I and the antigen Ki-67 receptors, pointing towards an increase of the proliferative process, which certainly interrupted glandular dynamics, weakening the cell-cell and extracellular cell-matrix interaction, which is a harmful factor to the organizational stability of the ventral lobe of the prostate, pointing to the pathogenesis of the organ. In addition to this, it was concluded that the structural and molecular

changes verified in the mdx mice positively signaled the relevance of this rodent in prostate morfophysiological studies. Finally, it can be pointed out that the relationship between steroid hormones and IGF-I can be an alternative for new therapies for prostate diseases and that new studies are necessary.

REFERENCES

- Abate-Shem, C., Shem, M.M. (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Dev*, **14**, 2410-2434.
- Alberts, S.R., Blute, M.L. (2001) Chemoprevention for prostatic carcinoma: The role of flutamide in patients with Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Urology*, **57**, 188-190.
- Antonioli, E., Della-Colleta, H.H., Carvalho, HF. (2004) Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl*, **25**, 50-56.
- Augusto, T.M., Carvalho, H.F. Felisbino, S.L. (2008) Remodeling of rat ventral prostate after castration involves heparanase-1. *Cell Tissue Res*, **332**, 307-315.
- Aumüller, G., Ader, G. (1979) Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell Tissue Res*, **198**, 145-158.
- Aumüller, G., Seitz, J. (1990) Protein secretion and secretory processes in male accessory sex gland. *International Rev Citol*, **121**, 127-231.
- Ballester, J., Munoz, M.C., Dominguez, J., Rigau, T., Guinovart, J.J., Rodriguez-Gil, J.E. (2004) Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl*, **25**, 706-719.
- Banerjee, S., Banerjee, P.P., Brown, T.R. (2000) Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology*, **141**, 821-822.

- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas-Neto, A.G. (1976) Manual Para Histologia Normal e Patológica. pp.225. Edart-Edusp, São Paulo.
- Bianco, J.J., Handelsman, D.J., Pedersen, J.S., Risbridger, G.P. (2002) Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*, **143**, 4922-4933.
- Billis, A. (2000) Sistema Genital Masculino. In: Bogliolo, L. (ed) Patologia, 6 ed. pp.514-537. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Brar, P.K., Dalkin, B.L., Weyer, C., Sallam, K., Virtanem, I., Nagle, R.B. (2003) Laminin Alpha-1, Alpha-3, and Alpha-5 Chain Expression in Human Prepubertal Benign Prostate Glands and Adult Benign and Malignant Prostate Glands. *Prostate*, **55**, 65-70.
- Brennan, P., Jing, J., Ethunandan, M., Gorecki, D. (2004) Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol*, **30**, 589-592.
- Cagnon, V.H.A., Fávoro, W.J. (2008) Dystroglycan patterns on the prostate of non-obese diabetic mice submitted to glycaemic control. *Int J Exp Pathol*, doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00624.x (Epub ahead of print).
- Cândido, E.M., Carvalho, C.A., Martinez, F.E., Cagnon, V.H. (2007) Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. *Cell Biol Int*, **31**, 459-472.
- Carvalho, H.F., Line, S.R. (1996) Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biol Int*, **20**, 809-819.
- Colognato, F., Yurchenco, P.D. (2000) Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, **218**, 213-234.

- Colombel, M.C., Buttyan, R. (1995) Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland prostate as a model system. *Methods Cell Biol*, **46**, 369-385.
- Cornell, R.J., Rowley, D., Wheller, T., Ali, N., Ayala, G. (2003) Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. *Urology*, **61**, 870-875.
- Costello, C.L., Franklin, B.R. (1994) Effects of prolactin on the prostate. *Prostate*, **24**, 162-166.
- Cross, S.S., Lippitt, J., Mitchell, A., Hollingsbury, F., Balasubramanian, S.P., Reed, M.W., Eaton, C., Catto, J.W., Hamdy, F., Winder, S.J. (2008) Expression of beta-dystroglycan is reduced or absent in many human carcinomas. *Histopathology*, **53**, 561-566.
- Cunha, G.R., Risbridger, G., Wang, H., Young, P. (2001) Evidence that epithelial mesenchymal estrogen receptor- α mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Develop. Biol*, **229**, 432-442.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z. (2002) Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation*, **70**, 473-485.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., Ricke, W.A. (2003) Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer*, **107**, 1-10.
- Cunha, G.R., Matrisian, L.M. (2002) It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*, **70**, 469-472.
- Davidson, D., Bostwick, D.G., Qian, J., Wollan, P.C., Oesterling, J.E., Rudders, R.A., Siroky, M., Stilmant, M. (1995) Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: predictive accuracy in needle biopsies. *J Urol*, **154**, 1295-1299.

Djavan, B., Waldert, M., Seitz, C., Marberger, M. (2001) Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol*, **19**, 225-233.

Ekman, P. (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *Prostate*, **10**, 14-18.

Fávaro, W.J., Cagnon, V.H. (2006) Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue Cell*, **38**, 311-323.

Fávaro, W.J., Padovani, C.R., Cagnon, V.H.A. (2008) Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. *Tissue & Cell*, doi: 10.1016/j.tice.2008.09.001 (Epub ahead of print).

Garcia-Florez, M., Oliveira, C.A., Carvalho, H.F. (2005) Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz J Med Biol Res*, **38**, 487-497.

Garraway, L.A., Lin, D., Signoretti, S., Waltregny, D., Bhattacharya, N., Loda, M. (2003) Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate*, **55**, 206-218.

Grossfeld, G., Hayward, S.W., Tlsty, T., Cunha, G.R., 1998. The role of stroma in prostatic carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*, **5**, 253-270.

Häggman, M.J., Macoska, J.A., Wojno, K.J., Oesterling, J.E. (1997) The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *J Urol*, **158**, 12-22.

Hayward, S., Cunha, G.R. (2000) The prostate development and physiology. *Radiol. Clin. North Am*, **38**, 1-14.

- Hayward, S., Wang, Y., Cao, M., Hom, Y., Zhang, B., Grossfeld, G., Sudilovsky, D., Cunha, G.R. (2001) Malignant transformation in a non-tumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res*, **61**, 8135-8142.
- Heinlein, C.A., Chang, C. (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*, **25**, 276-308.
- Henry, M.D., Campbell, K.P. (1998) A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell*, **95**, 859-870.
- Henry, M.D., Cohen, M.B., Campbell, K.P. (2001) Reduced expression of dystroglycan in breast and prostate cancer. *Hum. Pathol*, **32**, 791-795.
- Ho, S.M. (1991) Prostatic androgen receptor and plasma testosterone levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Steroid Biochem Molec Biol*, **38**, 67-72.
- Hood, J.D., Cheresch, D.A. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, **2**, 91-100.
- Imamov, O., Shim, G.J., Warner, M., Gustafsson, J.A. (2005) Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol Reprod*, **73**, 866-871.
- Jesik, C.J., Holland, J.M., Lee, C. (1982) An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate*, **3**, 81-97.
- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., Brentani, R. (1979) Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. *J Histochem*, **11**, 447-455.
- Kasper, J.S., Liu, Y., Pollak, M.N., Rifai, N., Giovannucci, E. (2008) Hormonal profile of diabetic men and the potential link to prostate cancer. *Cancer Causes Control*. (Epub ahead of print).

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Kerr, J.F., Searle, J. (1973) Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch B Cell Pathol*, **13**, 87-102.
- Kerr, M., Lee, A., Wang, P.L., Purushotham, K.R., Chegini, N., Yamamoto, H., Humphreys-Beher, M.G. (1995) Detection of insulin and Insulin-Like Growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. *Biochem Pharmacol*, **49**, 1521-1523.
- Kiess, W., Gallaher, B. (1998) Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*, **138**, 482-491.
- Knox, J.D., Cress, A.E., Clark, V., Manriquez, L., Affinito, K.S., Dalkin, B.L., Nagle R.B. (1994) Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am. J. Pathol*, **145**, 167-174.
- Konno-Takahashi, N., Takeuchi, T., Shimizu, T., Nishimatsu, H., Fukuhara, H., Kamijo, T., Moriyama, N., Tejima, S., Kitamura, T. (2003) Engineered IGF-1 expression induces glandular enlargement in the murine prostate. *J. Endocrinol*, **177**, 389-398.
- Lin, E.Y., Pollard, J.W. (2004) Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer*, **90**, 2053-2058.
- Losasso, C., Di Tommaso, F., Sgambato, A., Ardito, R., Cittadini, A., Giardina, B., Petrucci, T.C., Brancaccio, A. (2000) Anomalous dystroglycan in carcinoma cell lines. *FEBS Letters*, **484**, 194-198.

Lyons, A.J., Jones, J. (2007) Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **36**, 671-679.

Marcelli, M., Cunningham, G. (1999) Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 3463-3468.

Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R., Cunha, G.R. (2003) Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. *Develop Biol*, **253**, 165-174.

Markopoulos, A.K., Pouloupoulos, A.K., Kavavis, I., Papanayotou, P. (2000) Immunohistochemical detection on insulin-like growth factor I in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Oral Dis*, **6**, 31-34.

Marszalek, M., Wachter, J., Ponholzer, A., Leitha, T., Rauchenwald, M., Madersbacher, S. (2005) Insulin-like growth factor 1, chromogranin A and prostate specific antigen serum levels in prostate cancer patients and controls. *Eur Urol*, **48**, 34-39.

Mcneal, J.E., Stamey, T.A., Hodge, K.K. (1988) The prostate gland: Morphology, pathology, ultrasound anatomy. *Monogr Urol*, **9**, 36-54.

Mcpherson, S.J., Ellen, S.J., Simpson, E.R., Patchev, V., Fritzemeier, K.H., Risbridger, G.P. (2007) Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*, **148**, 566-574.

Montgomery, D.C. (1991) Design and analysis of experiments. p. 649, John Wiley: New York.

- Naslund, M.J., Strandberg, J.D., Coffey, D.S. (1988) The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis. *J Urol*, **140**, 1049-1053.
- Ohlson, N., Bergh, A., Persson, M.L., Wikstrom, P. (2005) Castration rapidly decreases local insulin-like growth factor-1 levels and inhibits its effects in ventral prostate in mice. *Prostate*, **66**, 1687.
- Ohlson, N., Bergh, A., Stattin, P., Wikström, P. (2007) Castration-induced epithelial cell death in human prostate tissue is related to locally reduced IGF-1 levels. *Prostate*, **67**, 32-40.
- Quarrie, L.H., Addey, C.V., Wilde, C.J. (1995) Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labelling. *Cell Tissue Res*, **281**, 413-419.
- Raz, A. (2004) Dystroglycan: To adhere or not adhere during cancer progression. *Cancer Biol. Ther*, **3**, 976–976.
- Rauch, F., Polzar, B., Stephan, H., Zanotti, S., Paddenber, G.R., Mannherz, H.G. (1997) Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J Cell Biol*, **137**, 909-923.
- Risbridger, G.P., Bianco, J.J., Ellem, S.J., Mcpherson, S.J. (2003) Oestrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 187-191.
- Rowley, D.R. (1998) What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev*, **76**, 69-125.
- Saito, M., Nishi, K., Foster-Junior, H.E., Weiss, R.M., Latifpour, J. (1996) Effect of experimental diabetes on rat prostate endothelin receptors. *Eur J Pharm*, **310**, 197-200.

Sgambato, A., Migaldi, M., Montanari, M., Camerini, A., Brancaccio, A., Rossi, G., Cangiano, R., Losasso, C., Capelli, G., Trentin, G.P., Cittadini, A. (2003) Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. *Am. J. Pathol*, **162**, 849–860.

Sgambato, A., Brancaccio, A. (2005) The dystroglycan complex: From biology to cancer. *J. Cell Physiol*, **205**, 163–169.

Sgambato, A., Camerini, A., Amoroso, D., Genovese, G., De Luca, F., Cecchi, M., Migaldi, M., Rettino, A., Valsuani, C., Tartarelli, G., Donati, S., Siclari, O., Rossi, G., Cittadini, A. (2007) Expression of Dystroglycan Correlates with Tumor Grade and Predicts Survival in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Biol. Ther*, **6**, 1840-1846.

Setchell, B.P., Brooks, P.E. (1988) Anatomy, vasculature, Innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil, E., Neil, J. The Physiology of Reproduction. pp.753-836. Raven Press, New York.

Sohn, B.H., Moon, H.B., Kim, T.Y., Kang, H.S., Bae, Y.S., Lee, K.K., Kim, S.J. (2001) Interleukin-10 up-regulates tumour-necrosis-factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene expression in mammary epithelial cells at the involution stage. *Biochem J*, **360**, 31-38.

Staack, A., Kassis, A.P., Olshen, A., Wang, Y., Wu, D., Carroll, P.R., Grossfeld, G.D., Cunha, G.R., Hayward, S.W. (2003) Quantitation of apoptotic activity following castration in human prostatic tissue in vivo. *Prostate*, **54**, 212-219.

Strange, R., Friis, R.R., Bemis, L.T., Geske, F.J. (1995) Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol*, **46**, 355-368.

Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., Südhof, T.C. (2001) A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*, **23**, 435-445.

- Suthagar, E., Soudamani, S., Yuvaraj, S., Ismail Khan, A., Aruldas, M.M., Balasubramanian, K. (2008) Effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. *Biomed Pharmacother* (Epub ahead of print).
- Tesone, M., Oliveira-Filho, R.M., Valle, L.B., Calvo, J.C., Baranao, J.L., Foglia, V.G., Charreau, E.H. (1980) Androgen receptors in the diabetic rat. *Diabetologia*, **18**, 385-390.
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Rowley, D.R. (2001) Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*, **166**, 2472-2483.
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Smith, M.J., Smith, V.C., Dang, T.D., Rowley, D.R. (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res*, **8**, 2912-2923.
- Untergasser, G., Madersbacher, S., Berger, P. (2005) Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol*, **40**, 121-128.
- Vilamaior, P.S., Felisbino, S.L., Taboga, S.R., Carvalho, H.F. (2000) Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate*, **45**, 253-258.
- Xie, W., Wong, I.C., Tsao, S.W. (2000) Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *Prostate*, **44**, 31-39.
- Weihua, Z., Makela, S., Andersson, L.C., Salmi, S., Saji, S., Webster, J.I., Jensen, E.V., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (2001) A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 6330-6335.

- Weihua, Z., Warner, M., Gustafsson, J.A. (2002) Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol*, **193**, 1-5.
- Weir, M.L., Oppizzi, M.L., Henry, M.D., Onishi, A., Campbell, K.P., Bissell, M.J., Muschler J.L. (2006) Dystroglycan loss disrupts polarity and beta-casein induction in mammary epithelial cells by perturbing laminin anchoring. *J Cell Sci*, **119**, 4047-4058.
- Wilson, J., Blackwill, F. (2002) The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol*, **12**, 113-120.
- Winder, S.J. (2001) The complexities of dystroglycan. *TIBS*, **26**, 118–124.
- Wong, Y.C., Xie, W., Tsao, S.W. (2000) Structural changes and alteration in expression of TGF-beta1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. *Prostate*, **45**, 289-298.
- Zhao, W.Q., Chen, H., Quon, M.J., Alkon, D.L. (2004) Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*, **490**, 71-81.

FIGURE LEGENDS

Figures 1a, 1b, 1c, 1d and 1e: Photomicrographs of the secretory epithelium of the ventral lobe of the prostate from the control group.

1a: Folded prostatic acini. Secretory epithelium (**EP**) with columnar and basal cells. Lumen (**L**). Stroma (**St**) with thin and short collagen fibers. Hematoxylin-eosin.

1b: Secretory cells with nucleoli (**Nu**) and basal cells (**arrow**). Lumen (**L**). Stroma (**St**). Hematoxylin-eosin.

1c: Secretory epithelium (**EP**) with columnar and basal cells. Lumen (**L**). Collagen fibers (**col**) in the prostatic stroma, placed underlying the epithelium, very often. Masson's trichrome.

1d: Reticular fibers (**rf**) underlying the epithelium (**EP**). Lumen (**L**). Stroma (**St**). Ammoniacal silver.

1e: Elastic fibers (**ef**) underlying the epithelium (**EP**). Lumen (**L**). Stroma (**St**). Weigert's Resorcin-Fuchsin.

Figures 1f, 1g, 1h, 1i and 1j: Photomicrographs of the secretory epithelium of the ventral lobe of the prostate from the *mdx* group.

1f: Acini showing poorly folded mucosa and intra-luminal secretion (**L**). Secretory epithelium (**EP**) with atrophied cells. Hypertrophied stroma (**St**). Inflammatory cells (**arrow**) in the prostatic stroma. Hematoxylin-eosin.

1g: Nuclei of the epithelial cells occupying a large area in the cellular cytoplasm with one or two nucleoli (**Nu**). Prostatic intraepithelial neoplasia (**PIN**) with increased nuclei. Lumen (**L**). Stroma (**St**). Hematoxylin-eosin.

1h: Prostatic epithelium (**EP**) with cuboidal cells intermingled with basal cells. Prostatic intraepithelial neoplasia (**arrow**). Lumen (**L**). Stroma compounded by large amount of collagen fibers (**col**). Masson's trichrome.

1i: Increased reticular fibers (**rf**), distributed in all the stromal area (**St**). Epithelium (**EP**). Lumen (**L**). Ammoniactal silver.

1j: Increased elastic fibers (**ef**), distributed in all the stromal area. Epithelium (**EP**). Lumen (**L**). Weigert's Resorcin-Fuchsin.

Figures 2a, 2b, 2c and 2d: Electronmicrographs of the ventral lobe of the prostate from the control group.

2a: Simple epithelium with tall columnar cells. Basal nuclei (**N**) with nitid nucleoli (**Nu**). Secretory vesicles (**Vs**). Microvilli (**Mv**) cover the cellular surface. Lumen (**L**). Stroma (**St**).

2b: Apical region. Secretory vesicles (**Vs**). Lumen (**L**). Short and scattered microvilli (**Mv**).

2c: Supranuclear region. Rough endoplasmic reticulum cisternae (**RER**) and paralell and flattened Golgi complex cisternae (**arrows**) with secretory vesicles (**Vs**). Cellular nuclei (**N**).

2d: Secretory epithelium with basal nuclei (**N**). Basal epithelial cell (**Bc**). Rough endoplasmic reticulum (**RER**). Mitochondria (**M**). Basal lamina (**arrow**). Stroma (**St**) with collagen fibers (**col**) underlying and smooth muscle cells (**smc**).

Figures 2e, 2f, 2g, 2h and 2i: Electronmicrographs of the ventral lobe of the prostate from the *mdx* group.

2e: Atrophied epithelium with cuboidal cells intermingled with basal cells (**Bc**). Irregular nuclei (**N**) with nucleoli (**Nu**). Secretory vesicles (**Vs**). Vacuolization of the cytoplasm (**asterisks**). Lumen (**L**). Stroma (**St**). **Inset:** Occurrence of apoptotic nuclei (**arrows**) in the secretory epithelium.

2f: Apical region. Discontinuity of microvilli. Rare secretory vesicles (**Vs**) with flocculent and low electrodensity secretion. Nuclei of the epithelial cell (**N**). Lumen (**L**).

2g: Supranuclear region. Nuclei (**N**). Dilated Golgi cisternae (**arrows**). Secretory vesicles (**Vs**). Mitochondria (**M**) with ruptured cristae. Lumen (**L**).

2h: Nuclei (**N**) of the secretory cell. Digestory vacuoles (**asterisks**) in the cytoplasm. Mitochondria (**M**). Hypertrophied stroma with collagen fibers (**col**) distributed in both underlying the epithelium and intermingled with smooth muscle cells (**smc**) and fibroblast (**fb**). Smooth muscle cells (**smc**), showing spinous aspect (**arrow**) and secretory vesicles (**v**).

2i: Prostatic intraepithelial neoplasia (**PIN**). Prostatic stroma (**St**).

Figure 3a: Ventral lobe of the prostate. Ki-67 Immunolocalization from the control group: Weak Ki-67 immunoreactivity (**arrows**) in the secretory epithelial cells (**EP**) and stromal cells (**St**). Lumen (**L**).

Figure 3b: Ventral lobe of the prostate. Detection of apoptotic cell from the control group: Weak DNA fragmentation (**arrows**) in the secretory epithelial cells (**EP**). Stroma (**St**). Lumen (**L**).

Figure 3c: Ventral lobe of the prostate. Ki-67 Immunolocalization from the *mdx* group: Strong Ki-67 immunoreactivity (**arrows**) in the secretory epithelial cells (**EP**) and stromal cells (**St**). Lumen (**L**).

Figure 3d: Ventral lobe of the prostate. Detection of apoptotic cell from the *mdx* group: Strong DNA fragmentation (**arrows**) in the secretory epithelial cells (**EP**). Stroma (**St**). Lumen (**L**).

Figure 3e: Percentage of immunolabeled Ki-67 and apoptotic index of the ventral lobe of the prostate. Inset: Secretory epithelial cell (**EP**) with apoptotic nuclei (**arrow**). Stroma (**St**). Lumen (**L**). X1000.

Figure 4a: Ventral lobe of the prostate. α -DG immunolocalization from the control group: Strong α -DG immunoreactivity (**arrows**) in the secretory epithelium (**EP**) and smooth muscle cells. Stroma (**St**). Lumen (**L**).

Figure 4b: Ventral lobe of the prostate. β -DG immunolocalization from the control group: Intense β -DG immunoreactivity (**arrows**) in the periacinal prostatic stroma. Epithelium (**Ep**). Stroma (**St**). Lumen (**L**).

Figure 4c: Ventral lobe of the prostate. Laminin $\alpha 3$ immunolocalization from the control group: Intense laminin $\alpha 3$ (**arrows**) in the basement membrane of the prostatic epithelium (**EP**). Stroma (**St**). Lumen (**L**).

Figure 4d: Ventral lobe of the prostate. IGF-IR α immunolocalization from the control group: Weak IGF-IR α (**arrows**) immunoreactivity in the prostatic stroma (**St**) Secretory epithelium (**EP**). Lumen (**L**).

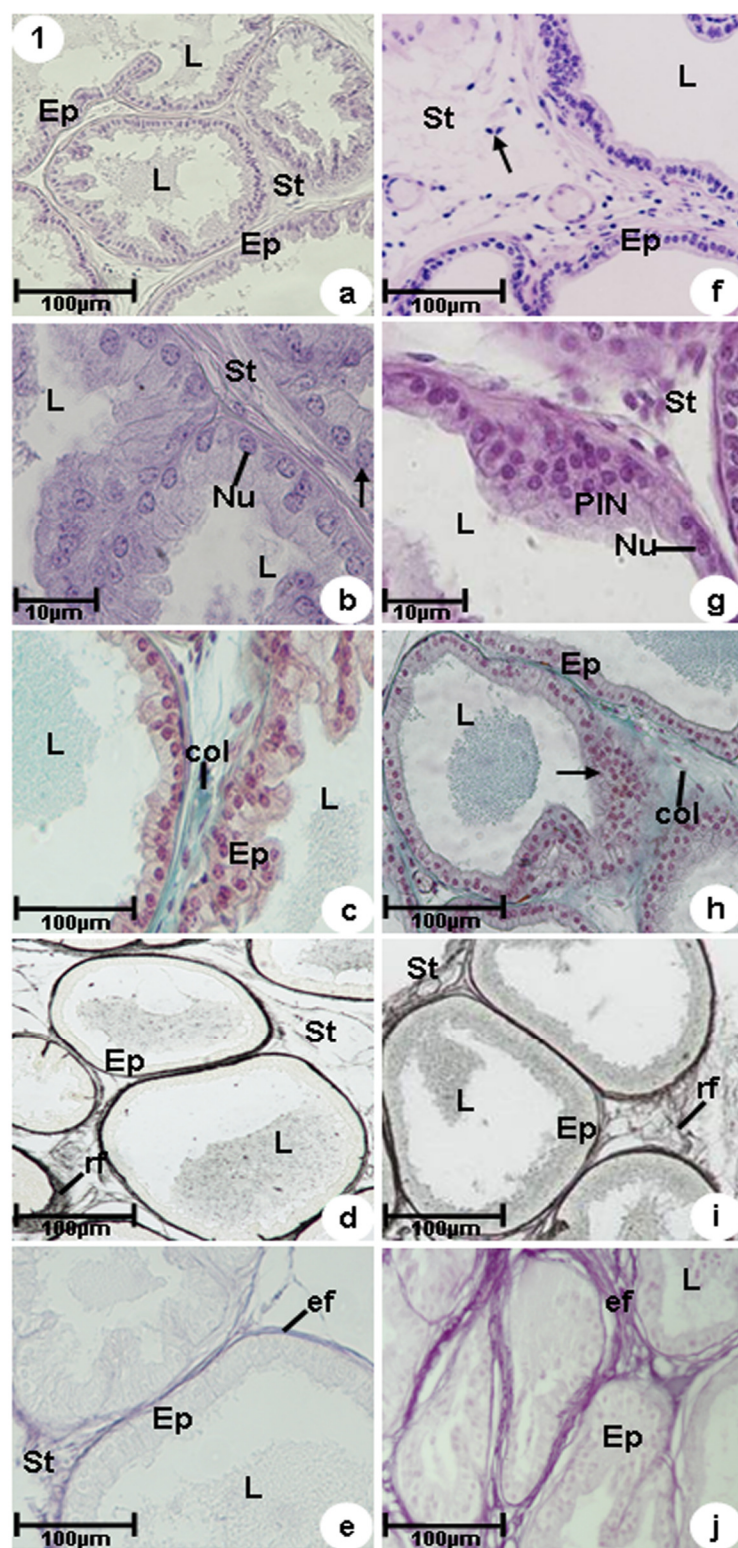
Figure 4e: Ventral lobe of the prostate. α -DG immunolocalization from the *mdx* group: Weak α -DG immunoreactivity (**arrows**) in the secretory epithelium (**EP**) and smooth muscle cells. Stroma (**St**). Lumen (**L**).

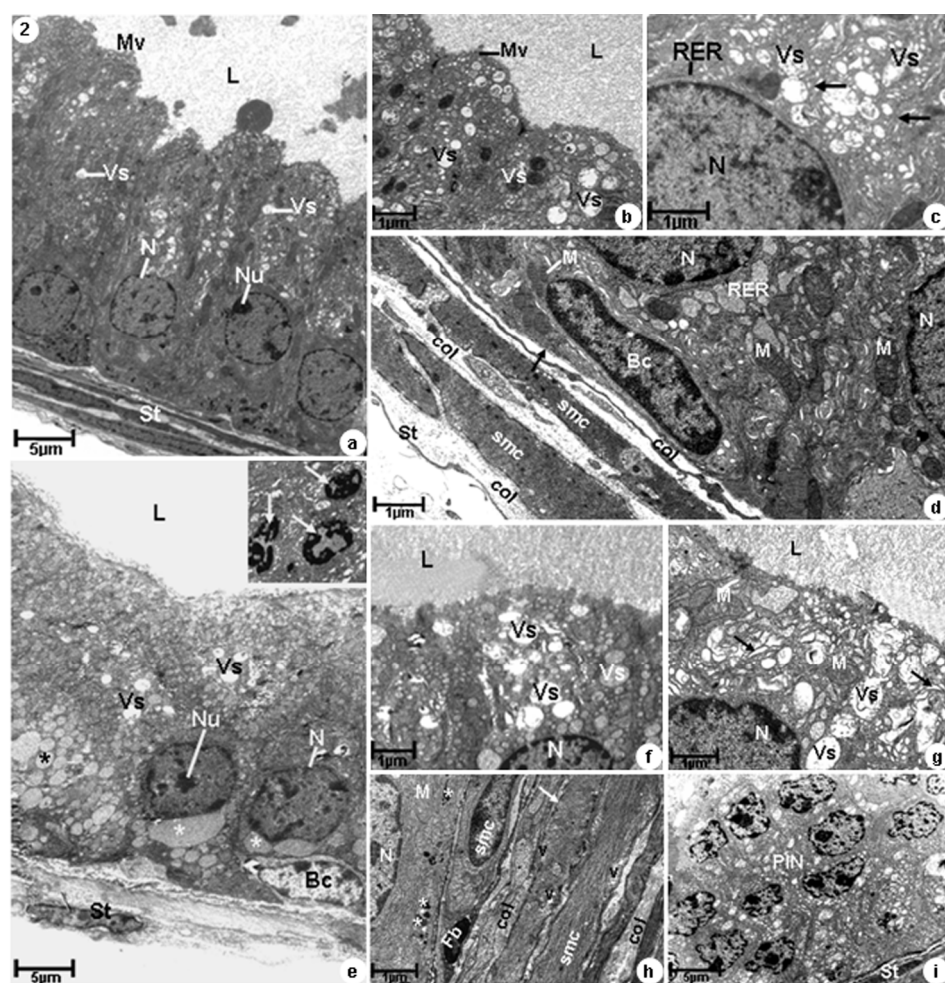
Figure 4f: Ventral lobe of the prostate. β -DG immunolocalization from the *mdx* group: Weak β -DG immunoreactivity (**arrows**) in the periacinal prostatic stroma. Epithelium (**Ep**). Stroma (**St**). Lumen (**L**).

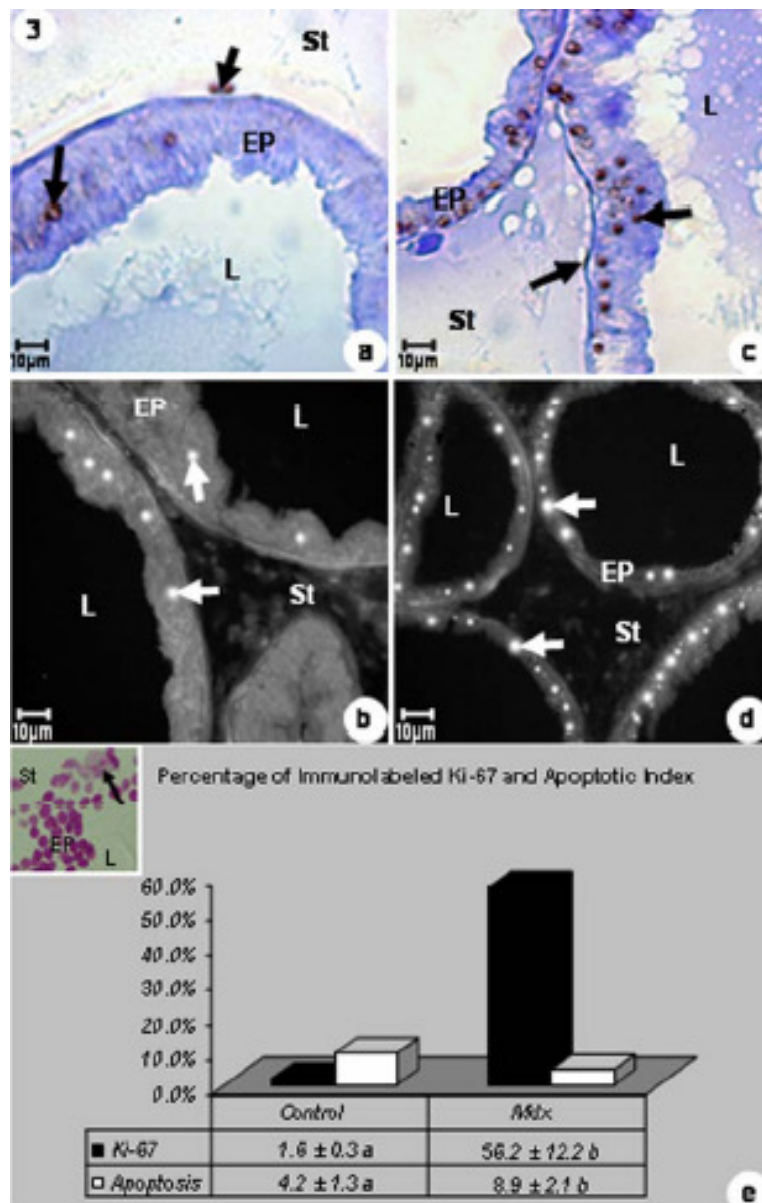
Figure 4g: Ventral lobe of the prostate. Laminin $\alpha 3$ immunolocalization from the *mdx* group: Weak laminin $\alpha 3$ (**arrows**) in the basement membrane of the prostatic epithelium (**EP**). Stroma (**St**). Lumen (**L**).

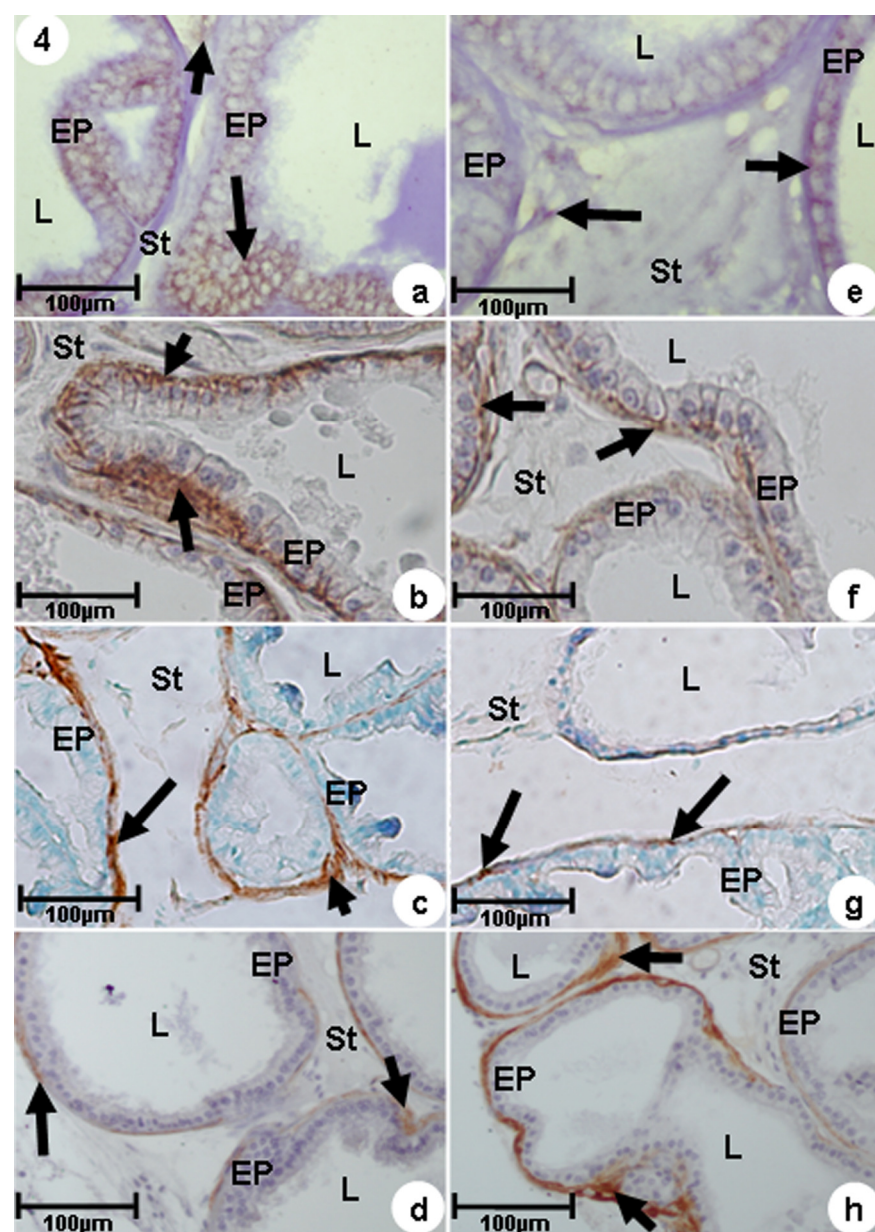
Figure 4h: Ventral lobe of the prostate. IGF-IR α immunolocalization from the *mdx* group: Intense IGF-IR α (**arrows**) immunoreactivity in the prostatic stroma (**St**) Secretory epithelium (**EP**). Lumen (**L**).

Figure 5: Representative Western Blotting and semiquantitative determination of prostate ventral lobe extracts in the two experimental groups. The α -DG, β -DG, laminin α -3 and IGF-IR α protein were indentified in the blots. B-Actin was used as the endogenous control.









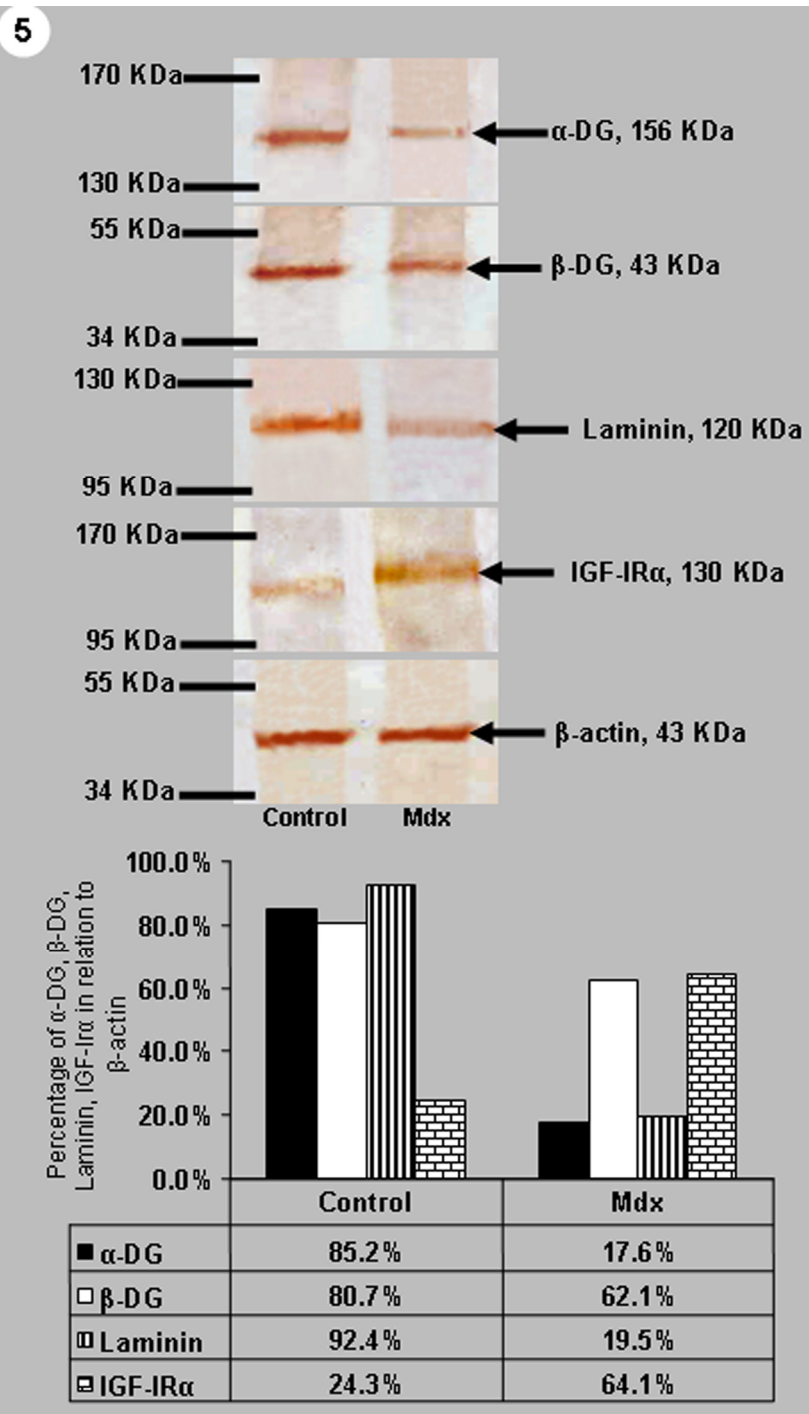


Table 1: Mean and standard deviation of the nuclear, cytoplasmatic, epithelial, luminal and stromal areas (μm^2) and epithelial height (μm) of the ventral lobe of mice from two experimental groups.

Variants	Groups	
	Control	<i>Mdx</i>
Nuclear Area	27.7 ± 1.4 a	17.0 ± 2.5 b
Cytoplasmatic Area	127.7 ± 12.0 a	44.7 ± 8.3 b
Epithelial Height	23.6 ± 0.1 a	9.3 ± 1.8 b
Epithelial Area	134.1 ± 17.7 a	99.8 ± 5.6 b
Stromal Area	156.9 ± 17.7 a	191.1 ± 5.7 b
Luminal Area	152.7 ± 9.2 a	63.2 ± 14.5 b

Two averages, followed by the same small letter are not different from each other ($P > 0.05$) Tukey's test.

Table 2: Immunolabeled antigen intensity of the two different experimental groups in the prostate

Antigens	Groups	
	Control	<i>Mdx</i>
IGFR-1	+	+++
α -DG	+++	+
β -DG	+++	+
Laminin $\alpha 3$	+++	+

Intense (+++), Moderate (++), Weak (+)

Table 3: Serum total testosterone (ng/mL) and estradiol (pg/mL) concentrations of mice in the two experimental groups.

Variants	Groups	
	Control	<i>Mdx</i>
Testosterone	9.6 ± 0.6 a	3.8 ± 2.2 b
Estradiol	25.7 ± 1.1 a	44.3 ± 12.6 b

Two averages, followed by the same small letter are not different from each other ($P > 0.05$) Tukey's test.

5-CONCLUSÕES

- 1-) O camundongo mdx apresentou desequilíbrio dos hormônios esteróides, o que certamente foi fator deflagrador das alterações na próstata.
- 2-) O camundongo mdx apresentou alterações estruturais tanto no epitélio como no estroma da próstata, comprometendo a homeostase glandular e, provavelmente o processo reprodutivo do animal.
- 3-) A ocorrência simultânea de células inflamatórias, neoplasia intraepitelial prostática bem como hipertrofia estromal, além do desequilíbrio entre os processos de apoptose e proliferação celular, indicaram a próstata do camundongo mdx como sendo susceptível ao desenvolvimento de patologias malignas.
- 4-) A diminuição de moléculas estruturais como a α -DG, β -DG e laminina α -3 indicaram enfraquecimento da interação célula-matriz extracelular, o que certamente é fator prejudicial à estabilidade organizacional do lobo ventral da próstata colocando esse órgão como susceptível ao desenvolvimento de patologias malignas.
- 5) O desequilíbrio dos hormônios esteróides e o aumento do IGF-IR podem ser alternativas para novas terapias de doenças prostáticas.

6.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUMÜLLER, G. & ADER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. **Cell Tissue Res**, v.198, p.145-158, 1979.

AUMÜLLER, G. & SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex gland. **International Rev. Citol.**, v.121, p.127-231, 1990.

BATCHELOR, C.; WINDER, S.J. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. **Trends Cell Biol**, v.16, p.198-205, 2006.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS, A.G. **Manual para histologia normal e patológica**, São Paulo: Edart-Edusp, p.225, 1976.

BLANDY, J.P. & LYTTON, B. What is the prostate and what is it for? In: **Comparative Anatomy**, p.1-11, 1986.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **J. Mol. Med**, v.82, n.2, p.102-15, 2004.

BONILLA, E.; SAMITT, C.E.; MIRANDA, A.F.; HAYS, A.P.; SALVIATI, G.; DIMAURO, S.; KUNKEL, L.M.; HOFFMAN, E. P.; ROLAND, L.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. **Cell**, n.54, p.447-452, 1988.

BRAR, P.K.; DALKIN, B.L.; WEYER, C.; SALLAM, K.; VIRTANEN, I.; NAGLE, R.B.

Laminin alpha-1, alpha-3, and alpha-5 chain expression in human prepubertal benign prostate glands and adult benign and malignant prostate glands. **The prostate**, v.55, p.65-70, 2003.

BRENNAN, P.A.; JING, J.; ETHUNANDAN, M.; GÓRECKI, D. Dystroglycan complex in cancer. **EJSO**, v. 30, p.598-592, 2004.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.; MOORE, K.J.X. Chromosome linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, n.4, p.1189-92, 1984.

BULL, H.; MURRAY, P.G.; THOMAS, D.; FRASER, A.M.; NELNOS, D.N. Demyetified Acid phosphatases. **J Clin Pathol.**, v.55, p.65-72, 2001.

CALOGERO, A.; PAVONI, E.; GRAMAGLIA, T.; D'AMATI, G.; RAGONA, G.; BRANCACCIO, A.; PETRUCCI, T.C. Altered expression of α -DG subunit in human gliomas. **Cancer biology & Therapy**, v.5, n.4, p.441-448, 2006.

CARVALHO, H.F.; LINE, S.R. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. **Cell Biol Int**, v.20, n.12, p.809-19, 1996.

CAVAZOS, F. Fine structure and functional correlates of male accessory sex glands of rodents. In Washington Roy O. Greep, Edwin B. Astwood Handbook of Physiology. **American Physiological Society**, p. 353-381, 1975.

CORNELL, R.J.; ROWLEY, D.; WHELLER, T.; ALI, N.; AYALA, G. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. **Urology**, v.61, p.870-875, 2003.

CROSS, S.S.; LIPPIT, J.; MITCHELL, A.; HOLLINGSBURY, F.; BALASUBRAMANIAN, S.P.; REED, M.W.R.; EATON, C.; HAMDY, F.; WINDER, S.J. Expression of β -dystroglycan is reduced or absent in many human carcinomas. **Histopathology**, v.53, p.561-566, 2008.

CUNHA, G.R. & MATRISIAN, L.M. It's not my fault, blame it on my microenvironment. **Differentiation**, v.70, p.469-472, 2002.

CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, v.70, p.473-485, 2002.

CUNHA, R.C.; PAUL, S.C.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Arch Histol Cytol**, v.67, n.5, p.417-434, 2004.

DAVIES, P. & EATON, L C. Regulation of prostate growth (Review). **J Endocrinol**, v.131, p.5-17, 1991.

DJAVAN, B.; WALDERT, M.; SEITZ, C.; MARBERGER, M. Insulin-like growth factor and prostate cancer. **Word J Urol**, n.19, v.4, p.225-33, 2001.

DROLLER, M.J. Medical approaches in the management of prostatic disease. **Br J Urol**, v.79, p.42-52, 1997.

DURBEEJ, M.; HENRY, M.D.; FERLETTA, M.; CAMPBELL K.P.; EKBLOM, P. Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. **J. Histoche. Cytochem.**, n.46, p.449-457, 1998.

ENGEL, A.G. & ARMSTRONG, C.F. **Miology Basic and Clinical.Mcgraw-Hill**, second edition, p.1134-1187, 1994.

HAO, J.; YANG, Y.; McDANIEL, K.M.; DALKIN, B.L.; CRESS, A.E.; NAGLE, R.B. Diferential expression of laminin 5 by human malignant and normal prostate. **American Journal of Pathology**, v.149, n.4, p.1341-1349, 1996.

HAYWARD, S.W.; CUNHA, G.R. The prostate: development and physiology. **Radiol. Clin. North Am.**, v.38, n.1, p.1-14, 2000.

HENRY, M.D.; COHEN, M.B.; CAMPBELL, K.P. Reduced expression of dystroglycan in breast an prostate cancer. **Hum Pathol**, v.32, p.791-795, 2001.

HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H.; KUNKELI, L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, n.51, p.919-928, 1987.

HSING, A.W. Hormones and prostate cancer: What's next? **Epidemiol. Rev.**, v.23, n.1, p.42-58, 2001.

ILIO, K.Y.; NEMETH, J.A.; SENSIBAR, S.; LANG, S. Prostatic ductal system in rats: Changes in regional distribution of extracellular matrix proteins during castration-induced regression. **The prostate**, v.43, p.3-10, 2000.

ITO, K.; KIMURA, S.; OZADA, S.; MATSUKURA, M.; IKEZAWA, M.; YOSHIOKA, K.; UENO, H.; SUEKI, M.; ARAKI, K.; YAMAMURA, K.; MIWA, T.; DICKSON, G.; TOMAS, G.D.; MIIKE, T. Smooth muscle-specific dystrophin expression improves aberrant vasoregulation in mdx mice. **Hum. Mol. Genet**, v.15, n.14, p.2266-75, 2006.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUEL, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M.J. Cancer Statistics. **CA cancer J. Clin**, v.53, n.1, p.5-26, 2003.

JESIK, C.J.; HOLLAND, J.M & LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. **Prostate**, n.3, p.81-97, 1982.

JING, J.; LIEN, C.F.; SHARMAS, S.; RICE, J.; BRENNAN, P.A.; GÓRECKI, D.C. Aberrant expression, processing and degradation of dystroglycan in squamous cell carcinomas. **Eur. J. Cancer**, v.40, p.2143-2151, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrossirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue section. **J. Histochem.**, v.11, p.447-455, 1979.

KARNOVSKY, J.M. A formadehide-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell Biology**, v.27, p.137,138, 1965.

KERR, J.F.; SEARLE, J. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. **Virchows Arch. B. Cell Pathol.**, v.13, n.2, p.87-102, 1973.

KERR, M; LEE, A; WANG, P.L; PURUSHOTHAN, K.R; CHEGINI, N; YAMAMOTO, H; HUMPHREYS, M.G. Detection of insulin and insulin-like growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1521-1531, 1995.

KNOX, J.D. ; CRESS, A.E; CLARRK, V; MANRIQUEZ, L; AFFINITO, K.S; DALKIN, B.L; NAGLE, R.B. Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha-6-integrins in the normal and neoplastic prostate. **Am. J. Pathol.**, v.145, n.1, p.167-174, 1994.

KONNO, T.N; TAKEUCHI, T; SHIMIZU, T; NISHIMATSU, H; FUKUHARA, H; KAMIJO, T; MORIYAMA, N; TEJIMA, S; KITAMURA, T. Engineered IGF-1 expression induces glandular enlargement in the murine prostate. **J. Endocrinol**, v. 177, p.389-398, 2003.

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

LABAT-ROBERT, J.; BIHARA-VARGA, M.; ROBERT, L. Extracellular Matrix. **FEBS Lett.**, v.268, n.2, p.386-393, 1990.

LEAV, I.; LAU, K. M.; ADAMS, J. Y.; MCNEAL, J. E.; TAPLIN, M. E.; WANG, J.; SINGH, H.; HO, S. M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. **Am. J. Pathol.**, v.159, p.79-92, 2001

LEE, C.; SENSIBAR, J.A.; DUDEK, S.M.; HIIPAKKA, R.A.; LIAO, S. Prostatic ductal system in rats :regional variation in morphological and functional activities. **Biol. Reprod.**, v.43,p.1079-1086,1990.

LEE, C.; GOOLSBY, C.L.; SENSIBAR, J.A. Cell cycle kinetics in rat prostatic epithelia: nuclear migration during g2 phase. **J.Urol.**, v.152, p. 2294-2299, 1994.

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

MANCINELLI, R.; TONALI, P.; ROMANI, R.; TRINGALI, A.; VARGIU, R.; AZZENA, G.B. Mechanical properties of smooth muscle portal vein in normal and dystrophin-deficiente (mdx) mice. **Exp.physiol.**, v.84, n.5, p.929-40, 1999.

MARCELLI, M. & CUNNINGHAM, G. Hormonal Signaling in Prostatic Hyperplasia and Neoplasia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.84, p.3463-3468, 1999.

MARKOPOULOS, A.K.; POULOPOULOS, A.K.; KAYAVIS, I.; PAPANAYOTOU, P. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. **Oral. Dis**; v.6, n.1, p.31-4, 2000.

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. **Develop. Biol.**, v.253, p.165-174, 2003.

MARSZALEK, M.; WACHTER, J.; PONHOHER, A.; LEITHA, T.; RAUCHENWALD, M.; MADERSBACHER, S. Insulin like growth factor-1, cromogranin A and prostate specific antigen serum levels in prostate cancer patients and controls. **Eur.Urol**, v.48, n.1, p.34-9, 2005.

MARTIN, L.T.; GLASS, M.; DOSUNMU, E.; MARTIN, P.T. Altered expression of natively glycosylated dystroglycan in pediatric solid tumors. **Human pathology**, v.38, p.1657-68, 2007.

McNEAL, J.E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. **Invest Urol.**, v.15, p.340-5, 1978.

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

MORTON, M.S.; GRIFFITS, K.; BLACKLOCK, N. The preventive role of the diet in prostatic disease. **Br. J. Urol.**, v.77, n.4, p.481-493, 1996.

NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. Biostatistics- The base essentials, Mosby, St. Louis, 1994. 260p.

PANDINI, G. et al.. IGF-II binding to insulin receptor isoform A induces a partially different gene expression profile from insulin binding. **Ann NY Acad Sci**, n.1028, p. 459-6, 2005.

PETROF, B.J.The Molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Molecular and Celular Biochemistry**, n. 179, p.11-123, 1998.

PRINS, G.S.; BIRSCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. **Endocrinology**, v.129, p.3187-3199, 1991.

RAZ, A. Dystroglycan: adhere or not adhere during cancer progression.Cancer **Biology &Theraphy**, v.3, n.10, p.976-976, 2004.

REYNOLDS, E.S.The use of lad citrate at high ph as electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol**, v.71, p.208-212, 1963.

ROHR, H.P.; BARTSCH.G. Humam benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. **Urology**, v.16, n.6, p.625-33,1980.

SETCHELL, B.P., BROOKS, P.E. Anatomy, vasculature, innervations and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E., NEILL, J. (Eds.). **The Physiology of Reproduction Raven Press**, New York, p. 753-836, 1988.

SGAMBATO, A.; MIGALDI, M.; MONTANARI, M.; CAMERINI, A.; BRANCACCIO, A.; ROSSI, G.; CANGIANO, R.; LOLASSO, C.; CAPELLI, G.; TRENTINI, G.P.; ITTADINI. A dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. **Am J Pathology**, v.163, n.3, p.849-60, 2003.

SGAMBATO, A.; TARQUINI, E.; RESCI, F.; BARBARA, P.; BETARICE, F.; CAMERINI, A.; RETTINO, A.; MIGALDI, M.; CITTADINI, A.; ZANNONI, F.G. Aberrant expression of α -dystroglycan in cervical and vulvar cancer. **Gynecologic oncologic**, v.103, n.397-404, 2006.

SGAMBATO, A.; CAMERINI, A.; AMOROSO D.; GENOVESE, G.; DE LUCA F.; CECCHI, M.; MIGALDI, M.; RETTINO, A.; VALSUANI, C. Expression of dystroglycan correlates with tumor grade and predicts survival in renal cell carcinoma. **Cancer Biol Ther**, v.6, n.12, p.1840-6, 2007.

SPRANDO, R.L. Perfusion rat testis through the heart using heparin. In: Russel, L.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River Press, p.277-280, 1990.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A. Morphological and histological study of castration-induced degeneration and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. **Biol Reprod.**, v.34, p.973-983, 1986.

SUGITA, S.; SAITO, F.; TANG, J.; SATE, J.; CAMPBELL, K.; SÜDHOF, T.C. Astoichiomttric complex of neurexins and dystroglycan in brain. **J cell Biol**, v.154, n.2, p.435-45, 2001.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. **FASEB J.**, v.11, n.1, p.51-59, 1997.

TAKAHASHI, S.; SUZUKI, S.; INAGUMA, S.; IKEDA, Y.; CHAO, Y.M. Down-regulated expression of prostaticin in high-grade or hormone-refractory human prostate cancers. **Prostate**, v.54, n.3, p.187-93, 2003.

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

TORRES, L.F.; DUCHEN, L.W. The mutant mdx inherited myopathy in the mouse: morphological studies of nerves and muscles. **Brain**, p.269-99, 1987.

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

UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Experimental Gerontology**, v.40, p.121-128, 2005.

WATSON, M.L. Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. **L. Biophys. Biochem. Citol.**, v.4, p.727-730, 1958.

WEIHUA, Z.; MAKELA, S.; ANDERSSON, L.C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J.I.; JENSEN, E.V.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 6330-6335, 2001.

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

WILLIAMSON, R.A.; HENRY, M.D.; DANIELS, K.J.; HRSTTKA, R.F.; LEE, J.C.; SUNUDA, Y.; IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O.; CAMPBELL, K.P. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag 1-null mice. **Hum. Mol. Genet.**, v.6, p.831-841, 1997.

WINDER, S.J. The complexities of dystroglycan. **Trends Biochem Sci**, v.26, p.118-124, 2001.

WONG, Y.C.; TAM, N.N. Differentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. **Differentiation**, v.70, p.633-645, 2002.

YAMADA, H.; SAITO, F.; FUKUTA, H.O. Processing of β -DG by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. **Hum. Mol. Genet.**, v.10, p.1563-69, 2001.

8-APÊNDICE

Tabela 1- Média e desvio padrão da variação de peso corpóreo (Pf-Pi) (g), do consumo de ração (g) e de líquido (ml) nos dois grupos experimentais

Variável	Controle	Mdx
Variação peso (g)	6,5±1,7 a	7,2±1,4 a
Peso ração (g)	9,7±1,1 a	10,1±1,2 a
Água (ml)	11,1±1,1 a	11,9±1,9 a

A tabela 1 mostrou que os animais do grupo controle e os do grupo mdx ingeriram quantidades médias diárias de ração variando de 9,7 a 10,1 g, sendo esses valores estatisticamente iguais. Também, ambos os grupos ingeriram quantidades médias diárias de água variando de 11,1 a 11,9 ml, não sendo essa diferença estatisticamente significativa.

A variação média do peso corpóreo entre os grupos controle e mdx foi de 6,5 a 7,2 sendo que esta não representou diferença estatisticamente significativa (tabela 1).

Tabela 2- Média e desvio padrão do peso dos órgãos corpóreos nos dois grupos experimentais

Variável	Controle	Mdx
Peso testículo (g)	0,20±0,009 a	0,15±0,005 b
Vesícula seminal (g)	0,30±0,04 a	0,19±0,04 b
Glândula coaguladora (g)	0,05±0,007 a	0,02±0,003 b
Complexo prostático (g)	0,52±0,084 a	0,5±0,071 a
Volume prostático (cm ³)	0,1 a	0,1 a

A tabela 2 mostrou que os pesos dos testículos, vesículas seminais e glândulas coaguladoras apresentaram-se estatisticamente maiores no grupo controles em relação àqueles verificados nos

animais do grupo mdx. Contudo, o complexo prostático, embora tenha sido numericamente maior no grupo controle, não representou diferença estatisticamente significativa.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada “Perfis das distroglicanas e morfofisiologia do lobo ventral da próstata de camundongos distróficos”

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

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

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1427-1). *ap. 19/12/2007*

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

Aluno(a): Leslie Cristina Pinto *Leslie C. Pinto*

Orientador(a): Valéria Helena Alves Cagnon Quitete *[Assinatura]*

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome: Profa. Dra. Anamaria A. Guarnaldo
Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARNALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP