

HIPÁCIA WERNECK GOMES

**INVESTIGAÇÃO DA PLASTICIDADE MORFOLÓGICA E
FENOTÍPICA DE CÉLULAS BASAIS E DE MACRÓFAGOS NO
EPITÉLIO PROSTÁTICO DE RATOS EM DIFERENTES
MICROAMBIENTES HORMONAIS**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2020

HIPÁCIA WERNECK GOMES

**INVESTIGAÇÃO DA PLASTICIDADE MORFOLÓGICA E
FENOTÍPICA DE CÉLULAS BASAIS E DE MACRÓFAGOS NO
EPITÉLIO PROSTÁTICO DE RATOS EM DIFERENTES
MICROAMBIENTES HORMONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr. Cleida Aparecida de Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2020

043

Gomes, Hipácia Werneck.

Investigação da plasticidade morfológica e fenotípica de células basais e de macrófagos no epitélio prostático de ratos em diferentes microambientes hormonais [manuscrito] / Hipácia Werneck Gomes. – 2020.

115 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a): Dr. Cleida Aparecida de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Neoplasia. 2. Próstata. 3. Macrófagos. I. Oliveira, Cleida Aparecida de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
HIPÁCIA WERNECK GOMES**

327/2020
entrada
1º/2018
2018697484

Às **quatorze horas** do dia **20 de fevereiro de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**INVESTIGAÇÃO DA PLASTICIDADE MORFOLÓGICA E FENOTÍPICA DE CÉLULAS BASAIS E DE MACRÓFAGOS NO EPITÉLIO PROSTÁTICO DE RATOS EM DIFERENTES MICROAMBIENTES HORMONAIS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cleida Aparecida de Oliveira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cleida Aparecida de Oliveira	UFMG	Aprovada
Dra. Helen Lima Del Puerto	Departamento de Patologia - UFMG	Aprovada
Dr. José Carlos Nogueira	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020.**

Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira (Orientadora) Cleida
Dr^a. Helen Lima Del Puerto Helen
Dr. José Carlos Nogueira José Carlos Nogueira

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Vanessa Pinho da Silva

Prof. Vanessa Pinho da Silva
Sub-Coordenadora do Programa de
Pós Graduação em Biologia Celular - ICB/UFMG

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira, e contou com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*Aos meus pais, a base de tudo, a quem sou grata por todo amor
e dedicação em me fazer feliz.*

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil, mas tenho certeza que o caminho percorrido foi mais leve e prazeroso graças às maravilhosas pessoas que Deus colocou na minha vida.

Agradeço à minha querida orientadora, Cleida Oliveira, pelo constante incentivo. Sou grata por ter aberto as portas do laboratório com tanto carinho, e por ter guiado minha trajetória desde então. Você me ensinou a olhar o mundo microscopicamente, e eu me encantei por ele! Você me ensinou que um trabalho bem feito exige paciência, dedicação, e sobretudo muito amor. E essa semente do amor pela ciência, que você plantou em mim durante a nossa primeira conversa, e regou ao longo desses anos, floresceu, e originou esse trabalho lindo, feito por NÓS. Muito obrigada!

Agradeço ao Professor Germán A.B. Mahecha, pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso e por compartilhar sua sabedoria.

Agradeço aos queridos amigos do LABRE, pela convivência e paciência ao longo desses anos. Agradeço ao Gabriel, que não por acaso tem nome de anjo, por ter me apresentado ao laboratório e ter sido desde então minha dupla de experimentos e ideias. Sua disponibilidade e paciência foram fundamentais no meu aprendizado. Agradeço à Bruna, minha companheira de eventos (científicos ou não), pela companhia diária, por estar do meu lado tomando bons drinks para comemorar as conquistas ou chorar as frustrações e dúvidas. Agradeço à Clara, nossa “severina”, pelo apoio e pela doce ajuda, especialmente nesses últimos meses. Agradeço a todos que estão e já estiveram no laboratório, e que tive o prazer de conviver: Elisângela, Jonas, Wiviane, Felipe, Monalise. Esse trabalho tem um pedacinho de cada um de vocês!

Agradeço à Mônica, por ter me acolhido como filha científica durante seu doutorado. Meus primeiros passos profissionais foram inspirados em você! Obrigada por me ensinar a ser pesquisadora e por sempre estar disposta a responder às minhas dúvidas.

Agradeço ao querido professor José Carlos Nogueira, pela contagiante alegria em aprender e ensinar. Ver sua empolgação em trabalhar e colaborar com a pesquisa é motivador.

Agradeço ao Lucas, meu marido, por acreditar na minha capacidade acima de tudo. Agradeço todo o carinho e dedicação com que você vem cuidando de nós. Obrigada por ser meu suporte em todos os momentos em que duvidei de mim mesma, e por toda a ajuda direta e indireta na realização desse trabalho. E como se não bastasse as dificuldades e desafios enfrentados por dois mestrandos, você embarcou comigo na aventura de uma vida a dois, que vem sendo desafiadora e maravilhosa. Obrigada por tanto!

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional. O trabalho que desenvolvi é reflexo da dedicação que vocês empenharam na minha educação e formação. Vocês me ensinaram a não desistir diante das dificuldades, sempre me incentivando a ser o melhor que eu pudesse ser.

Agradeço à minha grande família, por sempre permanecer unida. Em especial, agradeço às minhas avós, por dividirem comigo a sabedoria adquirida ao longo dos anos, sempre com muito carinho. À minha prima Nathália, agradeço pela amizade que construímos desde a infância, e por estar presente em todos os momentos. À minha afilhada Alice, por me apresentar um amor que eu ainda não conhecia, o amor de madrinha, e por alegrar a minha vida com pequenos gestos. Amo vocês!

Agradeço aos amigos antigos e aqueles que conheci durante o Mestrado, pelas conversas e momentos de descontração que atenuaram as dificuldades. Em especial, à Maria Alice e à Karen, por terem me ajudado na elaboração dos vídeos que estão nesse trabalho. À Kiany, por me socorrer sempre que o Western Blotting não funcionava. À Flávia, pela parceria e colaboração.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular por terem contribuído com a minha formação

Agradeço à UFMG, que foi minha segunda casa durante esses anos e me proporcionou grandes experiências e aprendizados.

A todos, meu sincero OBRIGADA!

“Não devemos esquecer que, quando o rádio foi descoberto, ninguém sabia que seria útil em hospitais. Tratava-se de um trabalho de ciência pura. E isto é uma prova de que o trabalho não deve ser considerado do ponto de vista da sua utilidade direta. Deve ser feito por si mesmo, pela beleza da ciência. E sempre há a possibilidade de que uma descoberta científica se torne, tal como o rádio, um benefício para a humanidade.”

Trecho do discurso de Marie Curie no Vassar College em 14 de maio de 1921

RESUMO

O compartimento basal do epitélio prostático é composto por células basais que, além de estarem associadas à manutenção da homeostase tecidual, podem estar relacionadas à iniciação e progressão do câncer de próstata. As células basais prostáticas constituem uma população heterogênea, onde se encontram diversas subpopulações com diferentes contribuições estruturais e funcionais para a próstata. Porém, pouco se sabe sobre a regulação do número, da morfologia e da função das diferentes subpopulações de células basais, bem como a influência dessas células nas modificações que acontecem no epitélio durante o processo carcinogênico. Complicando ainda mais a compreensão sobre o compartimento basal do epitélio, esse pode abrigar macrófagos, que por muitos anos foram confundidos com as células basais. O que vem chamando atenção é a participação dos macrófagos no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata, porém os relatos em relação a presença dessas células imunes no epitélio no contexto tumoral são escassos e superficiais. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar possíveis alterações na morfologia e no fenótipo de células basais e de macrófagos no epitélio prostático de ratos Wistar em diferentes microambientes hormonais. Para isso, foram utilizados três modelos experimentais: (1) envelhecimento, (2) indução de lesões prostáticas através do tratamento prolongado com testosterona e estradiol e (3) castração. Ensaio de imuno-histoquímica e imunofluorescência mostraram que as células basais estão amplamente distribuídas na próstata, independentemente da idade dos animais, e apresentam morfologia variada. A população de células basais CK5-positivas aumentou no epitélio prostático ao longo do envelhecimento, enquanto as células basais p63-positivas reduziram. Macrófagos com fenótipo e morfologia variados foram observados no epitélio prostático após castração cirúrgica e em lesões pré-malignas e malignas, tanto observadas naturalmente ao longo do envelhecimento quanto após tratamento com testosterona e estradiol. Além disso, delgadas projeções citoplasmáticas das células basais foram observadas se estendendo ao redor dos macrófagos intraepiteliais nas lesões prostáticas, mostrando uma íntima interação entre essas células. Considerando o conjunto de resultados, conclui-se que os macrófagos e as células basais são células extremamente plásticas, capazes de adaptar a morfologia e o fenótipo dependendo do microambiente local, além de desempenharem um papel importante no desenvolvimento e progressão das lesões prostáticas.

Palavras-chave: Próstata. Células basais. Macrófagos. Câncer.

ABSTRACT

The basal compartment of the prostatic epithelium is composed of basal cells that, in addition to being associated with the maintenance of tissue homeostasis, may be related to the initiation and progression of prostate cancer. Basal cells of the prostate constitute a heterogeneous population, presenting several subpopulations with different structural and functional contributions to the prostate. However, little is known about the regulation of the number, morphology and function of basal cell subpopulations, as well as the influence of these cells on the changes that occur in the epithelium during the carcinogenic process. Complicating even more the understanding of the basal compartment of the prostatic epithelium, it may contain macrophages, which for many years have been confused with basal cells. The participation of macrophages in the development and progression of prostate cancer has been drawing attention, but reports regarding the presence of these immune cells in the epithelium in the tumoral context are scarce and superficial. Therefore, the aim of the present study was to investigate possible changes in the morphology and phenotype of basal cells and macrophages in the prostatic epithelium of Wistar rats in different hormonal microenvironments. For this, three experimental models were used: (1) aging, (2) induction of prostatic lesions through prolonged treatment with testosterone and estradiol and (3) castration. Immunohistochemistry and immunofluorescence assays have shown that basal cells are widely distributed in the prostate, regardless of the age of the animals, and they have varying morphology. The population of CK5-positive basal cells increased in the prostatic epithelium during aging, while the p63-positive basal cells decreased. Macrophages with varied phenotype and morphology were observed in the prostatic epithelium after surgical castration, as well as in pre-malignant and malignant lesions, either observed naturally during aging or after treatment with testosterone and estradiol. In addition, thin cytoplasmic projections of the basal cells have been observed to extend around the intraepithelial macrophages in prostatic lesions, highlighting an intimate interaction between these cells. Taken together, our results show that macrophages and basal cells are extremely plastic cells, capable of adapting their morphology and phenotype depending on the local microenvironment, playing an important role in the development and progression of prostatic lesions.

Keywords: Prostate. Basal cells. Macrophages. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Comparação entre a estrutura anatômica e histológica da próstata humana e de ratos	16
Figura 2.	Representação esquemática das células de origem do câncer de próstata	20
Figura 3.	Representação esquemática das etapas de síntese dos principais hormônios esteroides sexuais que ocorre nas adrenais, nos testículos e na próstata	22
Figura 4.	Esquema representando a progressão das lesões prostáticas.	28
Figura 5.	Representação esquemática exemplificando as diferenças entre macrófagos M1 e M2 em relação aos marcadores, produção de citocinas e metabolismo celular	30
Figura 6.	Representação das funções pró-tumorigênicas exercidas pelos macrófagos associados ao tumor (TAM)	32
Figura 7.	Representação da interação entre macrófagos e células de Leydig para realização da esteroidogênese	35
Figura 8.	Varição morfológica das células basais CK5-positivas encontradas ao longo do epitélio prostático de ratos Wistar	92
Figura 9.	Varição quantitativa das células basais CK5-positivas encontradas no epitélio prostático de ratos Wistar ao longo do envelhecimento	93
Figura 10.	Varição quantitativa das células basais CK5-positivas presentes no epitélio prostático de ratos Wistar após castração e reposição hormonal.	93
Figura 11.	Varição quantitativa das células basais p63-positivas encontradas no epitélio prostático de ratos Wistar ao longo do envelhecimento.	94
Figura 12.	Varição quantitativa das células basais intensamente coradas para aromatase presentes no epitélio prostático de ratos Wistar após castração e reposição hormonal.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADT	Terapia de privação androgênica
AP	Próstata anterior
AR	Receptor de andrógeno
CaP (ou PCa)	Câncer de próstata
CCL2	Proteína quimiotática de monócitos
CD163	Receptor <i>scavenger</i> da hemoglobina
CD206	Receptor de manose
CK	Citoqueratina
CKHMW	Citoqueratina de alto peso molecular
CYP	Citocromo P450
DHEA	Dehidroepiandrostrona
DHEA-S	Sulfato de dehidroepiandrosterona
DHT	Di-hidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Próstata dorsal
E ₂	Estradiol
EGF	Fator de crescimento epidermal
ER α (ou ESR1)	Receptor de estrógeno α
ER β (ou ESR2)	Receptor de estrógeno β
Fizz-1	Fator mitogênico induzido por hipóxia
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LC3	Proteína associada a microtúbulos 1A/1B – cadeia leve 3
LH	Hormônio luteinizante
LP	Próstata lateral
M1	Macrófagos tipo 1 classicamente ativados
M2	Macrófagos tipo 2 alternativamente ativados

M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCM7	Proteína de manutenção minicromossômica 7
MMP	Metaloproteinases da matriz
MNU	N-metil-N-nitrosourea
NO	Óxido nítrico
PCa	Câncer de próstata
Ph	Potencial hidrogeniônico
PIA	Atrofia inflamatória proliferativa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PSA	Antígeno prostático específico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptor de retinoide X
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TGF- β	Fator de crescimento transformante β
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VP	Próstata ventral

SUMÁRIO

I. REVISÃO DE LITERATURA	14
1. A PRÓSTATA	15
1.1. Características gerais da próstata	15
1.1.1. <u>Células basais prostáticas</u>	17
1.2. Regulação hormonal da próstata	21
1.2.1. <u>Andrógenos</u>	22
1.2.2. <u>Estrógenos</u>	24
2. INFLAMAÇÃO	26
2.1. Inflamação na próstata	26
2.1.1. <u>Associação entre inflamação e câncer</u>	27
2.2. Macrófagos	29
2.2.1. <u>Macrófagos associados ao tumor</u>	31
2.2.2. <u>Hormônios esteroides sexuais e macrófagos</u>	34
2.2.3. <u>Macrófagos na próstata</u>	36
II. JUSTIFICATIVA	38
III. OBJETIVOS	41
IV. RESULTADOS	43
CAPÍTULO I – Artigo publicado	45
CAPÍTULO II – Artigo submetido	64
CAPÍTULO III – Resultados adicionais não publicados	91
V. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

I. REVISÃO DE LITERATURA

I. REVISÃO DE LITERATURA

1. A PRÓSTATA

1.1. Características gerais da próstata

A próstata é uma glândula anexa do sistema genital masculino de mamíferos. A palavra próstata é derivada do grego “prostates”, que significa "alguém que está diante de algo ou alguém" (Marx e Karenberg 2009). Essa denominação refere-se ao fato da próstata localizar-se na cavidade pélvica, distal ao colo da bexiga, envolvendo a porção inicial da uretra.

A principal função da próstata é secretar o líquido prostático, que corresponde a aproximadamente 30% do plasma seminal em humanos, e é caracterizado por uma secreção homogênea, leitosa, de pH 7,3 (Fair e Cordonnier 1978; Verze *et al.* 2016). Essa secreção tem composição diversificada, incluindo cátions metálicos, como zinco, lipídeos, citrato e proteínas, como albumina, lactoferrina, defensina, fibrinolisina, coagulase, fosfatase ácida e antígeno prostático específico (PSA) (Kumar e Majumder 1995; Flint *et al.* 2015; Verze *et al.* 2016; Sfanos *et al.* 2018). Tais componentes, juntamente com as secreções produzidas pelas demais glândulas anexas, são responsáveis por proporcionar condições para a sobrevivência dos espermatozoides durante sua veiculação pelo sistema genital masculino e feminino, possibilitando assim a fertilização (Kumar e Majumder 1995; Verze *et al.* 2016). Nesse sentido, as enzimas fibrinolisina, coagulase e PSA estão envolvidas no processo de liquefação do sêmen e do muco cervical, facilitando o trânsito dos espermatozoides (Flint *et al.* 2015; Verze *et al.* 2016). O citrato, por sua vez, atua alcalinizando o pH vaginal, o que é fundamental para a sobrevivência dos espermatozoides nas vias genitais femininas (Fair e Cordonnier 1978; Flint *et al.* 2015).

A eliminação dos produtos secretados pela próstata ocorre através da uretra durante a ejaculação, momento em que o líquido prostático irá se misturar aos espermatozoides conduzidos pelos ductos deferentes e aos produtos da vesícula seminal, formando assim, o sêmen (Kumar e Majumder 1995).

A ejeção da secreção glandular prostática durante a ejaculação é favorecida pela contração da musculatura lisa presente no estroma prostático (Risbridger e Taylor 2006). O estroma é de natureza conjuntivo-muscular liso, sendo a proporção e distribuição de seus componentes variável entre as diferentes espécies. Enquanto na próstata humana a

musculatura lisa é abundante e encontra-se amplamente distribuída por todo o estroma, em ratos e camundongos o estroma é composto principalmente por tecido conjuntivo frouxo, e as fibras musculares lisas concentram-se em uma delgada camada de células que circundam os adenômeros glandulares (Hayward *et al.* 1996a). Em ambas as espécies, o estroma também contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, além de componentes do sistema imune como mastócitos, macrófagos e linfócitos (Hayward *et al.* 1996a). O estroma e o epitélio glandular prostático se influenciam de forma recíproca através de diferentes vias de sinalização, garantindo um microambiente adequado para a homeostase e o desenvolvimento normal da próstata (Hayward *et al.* 1996a; Risbridger e Taylor 2006).

Os adenômeros podem estar dispostos ao redor da uretra de maneira concêntrica, como ocorre em humanos, ou na forma de lobos, como observado em ratos e camundongos (**Figura 1**). Dessa forma, a próstata humana pode ser dividida em três zonas glandulares, denominadas zona central, zona de transição e zona periférica, e uma região aglandular constituída apenas por tecido fibromuscular, a zona anterior. Em ratos e camundongos o complexo prostático é composto por quatro pares de lobos de simetria bilateral, denominados de acordo com a posição em relação à uretra, sendo estes as próstatas anterior, dorsal, lateral e ventral (Risbridger e Taylor 2006; Lee *et al.* 2011).

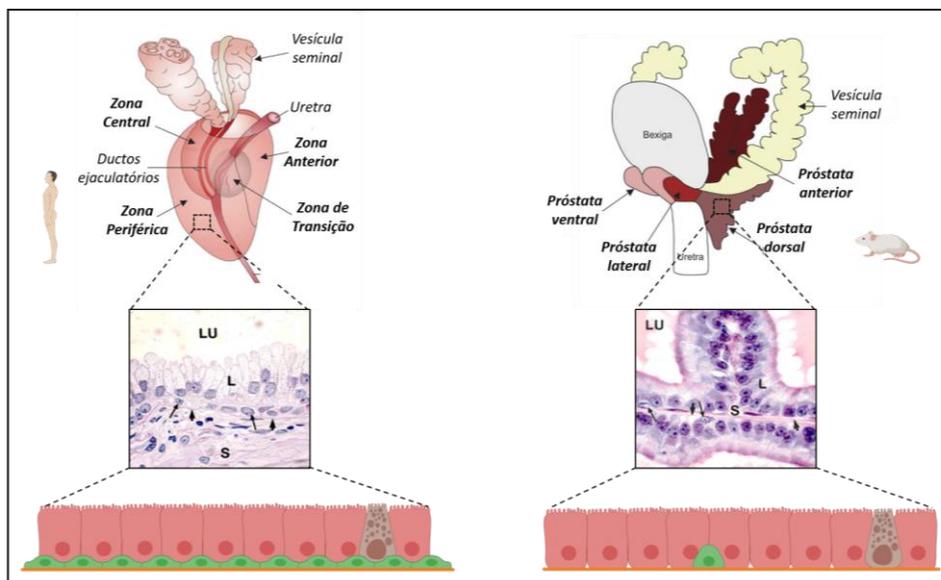


Figura 1. Comparação entre a estrutura anatômica e histológica da próstata humana e de ratos. Os adenômeros podem estar dispostos de maneira concêntrica ao redor da uretra prostática, como ocorre em humanos, ou na forma de lobos, como observado em roedores. Em ambas as espécies, os adenômeros são revestidos por epitélio composto por células luminiais (L, rosa), células neuroendócrinas (marrom) e células basais (seta; verde). Entretanto, enquanto em humanos as células basais formam uma camada contínua na base do epitélio, em roedores essas células são mais esporádicas e estão dispersas entre as células luminiais. Estroma (S); lúmen (Lu). Adaptado de Risbridger e Taylor (2006); El-Alfy *et al.* (2000).

A constituição histológica dos adenômeros da próstata humana e de outros animais, incluindo roedores, é muito semelhante (Hayward e Cunha 2000; Risbridger e Taylor 2006), sendo revestidos por epitélio geralmente prismático, composto por três tipos celulares morfológica e funcionalmente distintos, sendo eles: células luminais, células neuroendócrinas e células basais (**Figura 1**).

As células luminais, denominadas também células secretoras, são as mais abundantes no epitélio prostático. Apresentam-se colunares e com o núcleo arredondado situado no terço basal do citoplasma. Estas células altamente diferenciadas são responsáveis pela secreção dos principais componentes do líquido prostático. Para garantir a composição proteica da secreção, as células luminais apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos, além de numerosos grânulos de secreção apicais (El-Alfy *et al.* 2000; Risbridger e Taylor 2006).

As células neuroendócrinas são encontradas esporadicamente no epitélio glandular prostático. Elas participam da regulação intraepitelial, atuando no crescimento, diferenciação e processos secretórios da próstata de maneira parácrina, autócrina ou neuroendócrina (Rodriguez *et al.* 2003; Risbridger e Taylor 2006; Grigore *et al.* 2015). Existem dois tipos morfológicos de células neuroendócrinas descritos, que apresentam importância funcional distinta: as abertas, que alcançam o lúmen e conseqüentemente recebem estímulos luminais, tais como variação química ou de pH, e as fechadas, que não alcançam o lúmen e recebem estímulos basais, como fatores vindos do estroma (Grigore *et al.* 2015). Essas células secretam vários tipos de neuropeptídios, incluindo cromogranina, serotonina, sinaptofisina, somatostatina e calcitonina, além de fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que auxiliam na manutenção da homeostase das populações celulares vizinhas (Rodriguez *et al.* 2003; Grigore *et al.* 2015).

Por ser o foco do presente estudo, as características das células basais serão abordadas com mais detalhes no próximo tópico.

1.1.1. Células basais prostáticas

As células basais prostáticas são classicamente descritas como sendo pequenas, encontradas no compartimento basal do epitélio, com formato triangular ou achatado, núcleo pequeno e pouco citoplasma (El-Alfy *et al.* 2000; Taylor e Risbridger 2008). Em humanos essas células formam uma camada contínua na base do epitélio, em contato com a lâmina basal, e logo acima delas encontram-se as células luminais, em uma proporção de 1:1 entre

essas células. Já em roedores as células basais são mais esporádicas e estão dispersas entre as células luminais, em uma proporção de células basais:luminais de cerca de 1:10 em ratos e 1:4 em camundongos (**Figura 1**) (El-Alfy *et al.* 2000).

As células basais podem ser identificadas através da expressão de citoqueratina 5 (CK5), CK14 e p63 (Risbridger e Taylor 2006). A população de células basais é muito heterogênea, sendo identificados até o momento, na próstata de camundongos adultos, sete subpopulações que expressam diferentes combinações desses marcadores (Lee *et al.* 2014). Tais subpopulações são encontradas em diferentes proporções e estágios de diferenciação no epitélio prostático (Lee *et al.* 2014). Nesse sentido, algumas células basais apresentam-se mais indiferenciadas e são consideradas as células tronco que podem gerar os demais tipos de células epiteliais prostáticas e contribuir para a manutenção da homeostase tecidual (De Marzo *et al.* 1998; Lee *et al.* 2014; Huang *et al.* 2015). Outras apresentam fenótipo mais diferenciado, participando da regulação hormonal do epitélio prostático através da expressão de enzimas esteroidogênicas, tais como 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteroide desidrogenase), 5 α -redutase tipo 2 e aromatase (El-Alfy *et al.* 2000; Pelletier *et al.* 2001; Morais-Santos *et al.* 2018), estando ativamente envolvidas na produção local de andrógenos e estrógenos.

Os avanços das técnicas de imagem na última década resultaram em um progresso significativo sobre a compreensão da complexa rede de células basais encontrada nos epitélios pseudoestratificados, especialmente no epidídimo. Inicialmente, foi observado que as células basais não estavam restritas ao compartimento basal do epitélio, como se pensava anteriormente, mas que essas podem apresentar projeções citoplasmáticas estreitas, que se insinuam entre as demais células epiteliais, podendo alcançar o lúmen (Shum *et al.* 2008). Posteriormente, reiterando a quebra na concepção de que as células epiteliais são estáticas e restritas à base do epitélio, Roy e colaboradores (2016) elegantemente mostraram que as projeções das células basais se estendem e retraem periodicamente em direção ao lúmen, seguindo um padrão oscilatório. Dessa forma, foi então proposto que essa plasticidade de movimento das células basais representava um mecanismo único pelo qual essas células enviam sensores para monitorar o ambiente luminal, modular suas próprias funções e subsequentemente influenciar o comportamento das células vizinhas (Shum *et al.* 2008; Roy *et al.* 2016; Breton *et al.* 2019). Esses achados foram explorados no epitélio do epidídimo, enquanto na próstata a plasticidade estrutural das células basais permanece pouco caracterizada. O que se sabe é que as células basais prostáticas apresentam múltiplas projeções, que partem tanto da região basal quanto da região apical da célula, e se

interconectam, formando uma rede na base do epitélio (Soeffing *et al.* 1995; Hayward *et al.* 1996b).

No epidídimo, sabe-se que os prolongamentos das células basais criam junções comunicantes com as células epiteliais adjacentes, estabelecendo uma interação dinâmica e temporária, preservando a integridade epitelial (Roy *et al.* 2016). Na próstata, a presença de junções comunicantes entre as células basais e as secretoras também já foi reportada, indicando importante papel na comunicação célula-célula (El-Alfy *et al.* 2000; Habermann *et al.* 2001). Assim, as células basais conseguem detectar tanto os estímulos apicais quanto os basolaterais, evidenciando sua função sensorial e regulatória (El-Alfy *et al.* 2000; Shum *et al.* 2008; Roy *et al.* 2016).

Durante o desenvolvimento prostático, as células basais comportam-se como células-tronco, multipotentes e auto renováveis, podendo se diferenciar e originar todas as demais linhagens celulares epiteliais: basais, luminais e neuroendócrinas (Ousset *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014; Huang *et al.* 2015). Na próstata adulta, o tipo celular a qual as células-tronco epiteliais pertencem é controverso. Embora estudos apontam a existência de células-tronco dentre as subpopulações de células basais (Verhagen *et al.* 1992; De Marzo *et al.* 1998; Lee *et al.* 2014), sabe-se que essa propriedade não está restrita ao compartimento basal, uma vez que as células basais e luminais podem ser mantidas por progenitores celulares independentes (Kurita *et al.* 2004; Wang *et al.* 2009; Choi *et al.* 2012; Liu e Goldstein 2014; Huang *et al.* 2015; Crowell *et al.* 2019). A contribuição de cada progenitor celular na fisiologia e/ou na patogenia da próstata ainda não está muito bem elucidada, mas sabe-se que as células basais são necessárias para a regeneração tecidual que ocorre após privação androgênica (McPherson *et al.* 2010; Hussaim *et al.* 2012; Lu *et al.* 2013), podendo gerar novas células luminais para manter a homeostase tecidual (Van Leenders *et al.* 2000; Lee *et al.* 2014; Toivanen *et al.* 2016).

Células basais são também alvo de grande interesse no processo de carcinogênese prostática, desde que esse envolve a perturbação da estrutura do epitélio glandular, evidenciada pela perda de células com fenótipo basal, o que gera um tumor com fenótipo luminal (Choi *et al.* 2012; Wang Z *et al.* 2014). Apesar dessa característica, não há um consenso quanto ao tipo celular de origem do câncer de próstata (CaP), mas sabe-se que tanto as células luminais quanto as células basais podem originar o tumor, influenciando assim nas suas propriedades biológicas (Goldstein *et al.* 2010; Choi *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2012; Goldstein e Witte 2013; Lu *et al.* 2013; Wang Z *et al.* 2014). Devido ao fato de as células basais sofrerem divisões celulares assimétricas, originando uma célula-filha basal e outra

luminal, as células basais que sofrem transformação maligna produzem tumores com características luminais (**Figura 2**) (Lu *et al.* 2013; Wang J *et al.* 2014). Essa diferenciação de células basais em luminais é um processo natural (Wang *et al.* 2009; Choi *et al.* 2012), que pode ser potencializado em condições inflamatórias, como ocorre no CaP (Kwon *et al.* 2014). Dessa forma, o acúmulo de células inflamatórias aumenta as chances de as células basais serem as iniciadoras do câncer (Goldstein e Witte 2013). Os tumores de origem basal apresentam crescimento mais lento, possivelmente devido ao número inicial de células em transformação e/ou ao atraso intrínseco na proliferação devido à diferenciação (Wang *et al.* 2013; Wang J *et al.* 2014).

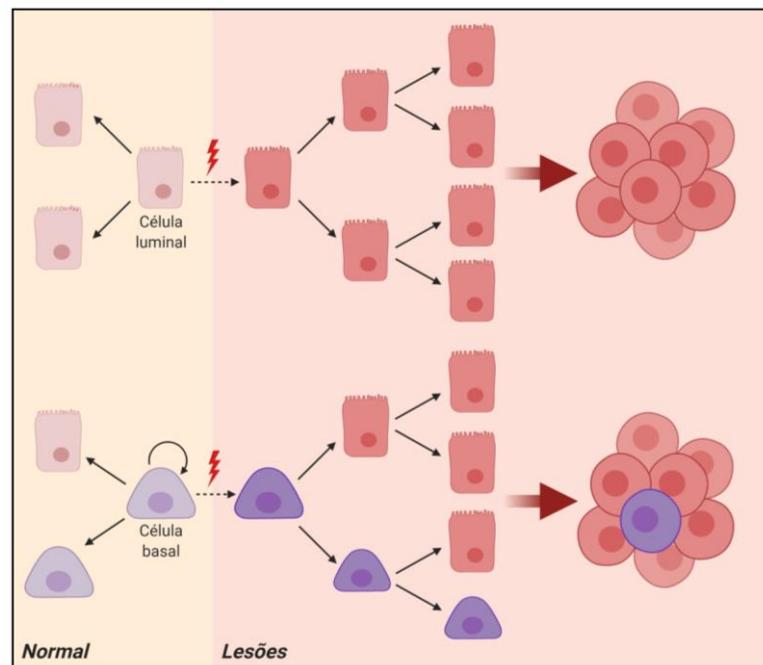


Figura 2. Representação esquemática das células de origem do câncer de próstata. Em condições naturais, células basais tem a capacidade de originar células basais e luminais, através de divisões assimétricas, ao contrário das células luminais, que expandem sua população através de divisões simétricas. Após sofrerem mutação, as células basais darão origem a células luminais transformadas, as quais passarão por vários ciclos de divisões simétricas. Dessa forma, o tumor prostático será composto principalmente de células luminais, contendo uma pequena população de células basais. Por outro lado, a transformação maligna de células luminais e a posterior proliferação dessas células ocorre independentemente das células basais, gerando um tumor composto exclusivamente por células luminais. *Adaptado de Wang J et al. (2014).*

Pelo exposto, fica evidente que as células basais do epitélio prostático constituem uma população heterogênea, onde se encontram diversas subpopulações com diferentes contribuições estruturais e funcionais para a próstata, tanto no contexto fisiológico quanto patológico (De Marzo *et al.* 1998, Goldstein *et al.* 2010; Taylor *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014).

1.2. Regulação hormonal da próstata

Em 1941, Huggins e Hodges fizeram uma observação histórica de que a retirada dos testículos, conhecida como castração cirúrgica, causava regressão do CaP, e demonstraram pela primeira vez a dependência dos andrógenos circulantes para a sobrevivência e progressão do câncer (Huggins e Hodges 1941). Por suas descobertas em relação ao tratamento hormonal do CaP, Charles Huggins foi laureado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1966. Atualmente, mais de 75 anos após essas descobertas, a privação androgênica permanece sendo o tratamento de escolha para CaP avançados, porém a maioria dos casos progride para um estágio resistente à castração, que invariavelmente é fatal (Risbridger e Taylor 2013). Dessa forma, as contribuições das possíveis rotas de síntese e fontes de andrógenos permanecem em debate.

Os hormônios esteroides são derivados do colesterol, e a etapa inicial de sua síntese, que consiste na clivagem de colesterol em pregnenolona, ocorre em quantidades relevantes apenas no córtex da adrenal e nas células de Leydig dos testículos em homens, sendo esses os órgãos-chave no controle hormonal reprodutivo masculino (Sharifi e Auchus 2012). Entretanto, a próstata dispõe de maquinaria enzimática própria para produção dos esteroides sexuais, permitindo assim uma regulação autônoma, ajustando o metabolismo dos hormônios sexuais de acordo com as suas necessidades locais (El-Alfy *et al.* 1999; Labrie *et al.* 2000). Sendo assim, a próstata é influenciada por hormônios esteroides provenientes da circulação sanguínea e/ou produzidos localmente, utilizando precursores originados dos testículos e do córtex da glândula adrenal (**Figura 3**) (Labrie *et al.* 2000; Pelletier 2008).

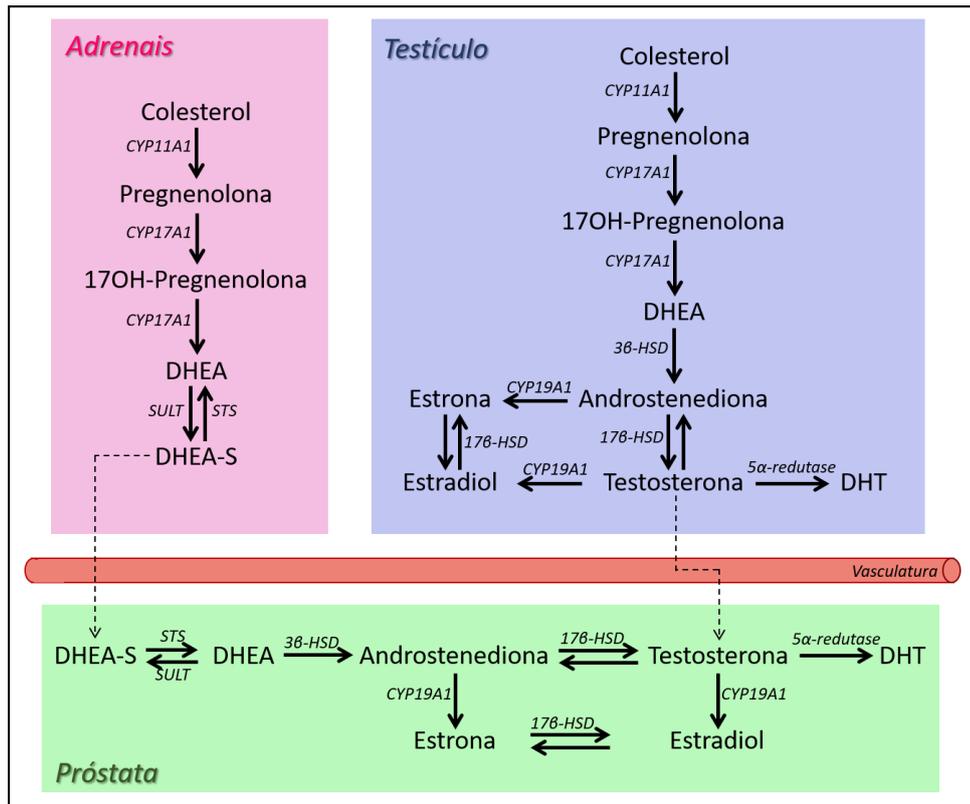


Figura 3. Representação esquemática das etapas de síntese dos principais hormônios esteroides sexuais que ocorre nas adrenais, nos testículos e na próstata. Os hormônios esteroides são derivados do colesterol, e a etapa inicial de sua síntese ocorre em quantidades relevantes apenas nas adrenais e nos testículos em homens. A próstata dispõe de maquinaria enzimática própria para produção dos esteroides sexuais, utilizando para isso precursores e/ou hormônios originados dos testículos e das glândulas adrenais. CYP19A1: aromatase; DHEA: dehidroepiandrosterona; DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona; DHT: diidrotestosterona. *Adaptado de Zang et al. (2017).*

1.2.1. Andrógenos

O principal andrógeno que atua no sistema genital masculino é a testosterona, produzida principalmente nas células de Leydig dos testículos, mediante estímulo do hormônio luteinizante (LH), secretado pelas células gonadotróficas da adenohipófise (Grossman *et al.* 2001). Ao contrário dos testículos, que produzem diretamente a testosterona, as adrenais produzem precursores para a formação desse andrógeno em tecidos periféricos, como na próstata (**Figura 3**) (Zang *et al.* 2017). Em relação aos testículos, o córtex da adrenal secreta de 100 a 500 vezes maiores quantidades de dehidroepiandrosterona (DHEA), um precursor de testosterona (Rahman *et al.* 2016). Diferentemente dos testículos, na adrenal essa produção hormonal é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pelas células corticotróficas da adenohipófise (Rahman *et al.* 2016).

Em diversos órgãos a testosterona pode ser convertida, pela enzima 5 α -redutase, em di-hidrotestosterona (DHT). Tanto testosterona quanto DHT exercem seus efeitos através da ligação e ativação de proteínas específicas, conhecidas como receptores de andrógenos (AR). DHT se liga com mais afinidade aos receptores de andrógenos e tem uma taxa de dissociação menor em relação à testosterona, induzindo assim uma atividade transcricional mais expressiva. Por essa razão DHT é considerado o andrógeno mais potente (Grossmann *et al.* 2001; Tan *et al.* 2015). DHT é fundamental para promover o desenvolvimento da próstata durante o período embrionário (Cunha *et al.* 1992) e proporcionar a manutenção da estrutura e da atividade secretora da glândula em animais adultos (Oliveira *et al.* 2007).

Os andrógenos desempenham função importante no crescimento prostático, estimulando a proliferação e inibindo a apoptose das células epiteliais (Banerjee *et al.* 2000; Kurita *et al.* 2001). Em condições fisiológicas, as células do estroma prostático produzem continuamente fatores de sobrevivência, como o fator de crescimento epidermal (EGF), que estimulam a homeostase epitelial. Com a queda dos níveis de andrógenos, como ocorre após castração cirúrgica, as células do estroma reduzem a produção de fatores de sobrevivência e aumentam a produção de sinais de morte celular, induzindo apoptose das células epiteliais prostáticas (Kurita *et al.* 2001).

Pelo fato de a próstata ser dependente de um suprimento contínuo de andrógenos para manter o conteúdo celular adequado e a atividade funcional, a terapia de privação androgênica (ADT – do inglês *androgen deprivation therapy*) é o tratamento mais utilizado no CaP, seja por castração cirúrgica ou química. Porém, apesar de ser inicialmente efetivo por causar a regressão da massa tumoral via apoptose, o tratamento geralmente falha, resultando na progressão para um tumor mais agressivo, metastático, refratário a andrógeno e não tratável pelas estratégias existentes (Risbridger e Taylor 2013).

Ainda não se sabe o mecanismo exato com que a resistência à ADT ocorre, porém, uma das explicações recai sobre a concentração residual de andrógenos. A ADT é considerada efetiva quando os níveis séricos de testosterona estão abaixo de 50 ng/dL. Porém, sabe-se que os níveis séricos de testosterona não se correlacionam com os níveis androgênicos intratumorais, uma vez que mesmo seis meses após ADT, os níveis de DHT na próstata permanecem cerca de 25% dos níveis iniciais (Wadosky e Koochekpour 2016). A principal fonte de andrógeno residual é o sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), a forma primária circulante da DHEA, uma precursora de testosterona. Mesmo após ADT, a concentração de DHEA-S é mantida a níveis suficientes para a conversão em andrógenos potentes na próstata. Assim, apesar dos níveis androgênicos permanecerem baixos, a

quantidade que persiste é adequada para ativar maquinarias moleculares que direcionam o crescimento do câncer (Zang *et al.* 2017; Mostaghel *et al.* 2019). Nas últimas décadas, as opções de tratamento para o CaP metastático e resistente a castração vem aumentando com a introdução terapêutica da abiraterona (inibidor de CYP17A) por exemplo. Apesar dos avanços, o aumento da sobrevida é de apenas alguns meses, e eventualmente a maioria dos pacientes vão a óbito (Becker *et al.* 2019).

Além da explicação relacionada aos hormônios, a recorrência do CaP pode ocorrer devido à existência de algumas subpopulações de células basais prostáticas que são resistentes ou se adaptam à privação androgênica (English *et al.* 1987; Risbridger e Taylor 2013), e que podem reiniciar o câncer (Taylor *et al.* 2012; Goldstein e Witte 2013; Lu *et al.* 2013).

1.2.2. Estrógenos

Além da metabolização em DHT, a testosterona também pode ser convertida de forma irreversível em estrógenos pela enzima CYP19A1, conhecida como aromatase (**Figura 3**). A expressão de aromatase e a consequente síntese de estrógenos ocorre em locais específicos nos homens, como tecido adiposo, ossos, músculo liso, cérebro, testículo, ductos eferentes e próstata (Simpson *et al.* 2002; Carreau *et al.* 2007; Morais-Santos *et al.* 2018).

Os estrógenos desempenham papel importante na fisiologia masculina. A ausência desse hormônio, ocasionada pela deficiência de aromatase, por exemplo, pode gerar maturação esquelética tardia, redução da massa óssea, fechamento epifisário defeituoso, comprometimento do metabolismo de lipídeos, hiperinsulinemia e infertilidade (Ellem e Risbridger 2009; De Ronde e De Jong 2011). Apesar dos efeitos benéficos dos estrógenos em vários tecidos, seu papel na próstata é ambíguo, sendo sua resposta dependente do tipo de receptor que será ativado (Ellem e Risbridger 2009).

Embora os níveis de estrógenos durante a vida adulta sejam considerados baixos, os homens são expostos a altos níveis desse hormônio em dois momentos de sua vida: durante o desenvolvimento embrionário e durante a senilidade. No último trimestre de gestação ocorre exposição natural dos machos a estrógenos maternos. Nesse momento, os estrógenos estimulam diretamente a proliferação das células epiteliais prostáticas e causam metaplasia escamosa em diversos níveis, que regride imediatamente após o nascimento, quando os níveis estrogênicos diminuem (Prins e Korach 2008; Ellem e Risbridger 2009). Embora o papel natural dos estrógenos durante o desenvolvimento da próstata não seja bem compreendido, sabe-se que a exposição excessiva a estrógenos, durante o desenvolvimento da próstata, pode

contribuir para o desenvolvimento de lesões prostáticas na vida adulta (Prins e Korach 2008; Prins *et al.* 2007). O segundo momento em que os níveis hormonais se modificam é durante o envelhecimento, em que os níveis de testosterona sérica e sintetizada no testículo diminuem, principalmente devido ao declínio da responsividade das células de Leydig ao estímulo do LH (Beattie *et al.* 2015). Em contraste, os níveis de estradiol permanecem constantes ou aumentam ligeiramente, alterando a razão entre andrógenos e estrógenos, favorecendo a ação dos estrógenos (Ellem e Risbridger 2010). Essas alterações no microambiente hormonal relacionadas à idade, aliadas às alterações na expressão dos receptores de esteroides, podem contribuir para a evolução das lesões prostáticas que acometem os indivíduos idosos (Ellem e Risbridger 2010; Morais-Santos *et al.* 2015, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado a participação dos estrógenos no desenvolvimento de lesões prostáticas, que incluem inflamação, proliferação aberrante e metástase (Prins e Korach 2008; Ellem e Risbridger 2009). Altos níveis de estrógenos prostáticos alteram a diferenciação e proliferação das células epiteliais e estromais, gerando danos irreversíveis ao tecido. Nas células epiteliais, ocorre perturbação na diferenciação durante o desenvolvimento, a qual é evidenciada pela formação de várias camadas de células basais, caracterizando metaplasia escamosa (Bianco *et al.* 2002; Ellem *et al.* 2009). Também ocorre perda da expressão de proteínas das junções comunicantes, comprometendo a adesividade e a comunicação celular (Prins *et al.* 2007). Outras consequências incluem espessamento da camada de fibroblastos abaixo da membrana basal, aumento relativo dos elementos do estroma e infiltrado de células inflamatórias (Prins *et al.* 2001; Bianco *et al.* 2002; Risbridger *et al.* 2007; Ellem *et al.* 2009).

Os estrógenos geram seus efeitos localmente, a nível celular, através da ligação e ativação dos receptores de estrógeno, sendo eles ER α (ESR1) e ER β (ESR2), os quais são codificados por genes distintos (Matthews e Gustafsson 2003). Os ER α estão relacionados com papéis proliferativos e inflamatórios na próstata (Prins *et al.* 2001; Risbridger *et al.* 2001; Ellem *et al.* 2009; Takizawa *et al.* 2015; Ryl *et al.* 2015). De forma contrária, os ER β estão envolvidos em ações anti-proliferativas, pró-apoptóticas e pró-diferenciação celular (Prins *et al.* 2001; Weihua *et al.* 2001; Risbridger *et al.* 2001). Diversos relatos apontam que o silenciamento de ER β , associado à expressão de ER α , está associado às desordens na sinalização estrogênica e ao aparecimento de múltiplos e precoces focos de alterações prostática (Risbridger *et al.* 2001; Ellem e Risbridger 2010; Takizawa *et al.* 2015)

Dados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram redução de ER β e aumento de ER α em lesões pré-malignas na próstata de ratos idosos (Morais-Santos *et al.* 2015, 2018).

Paralelamente, nessas mesmas áreas, foi detectado um aumento marcante do número de células basais intensamente positivas para aromatase, revelando uma fonte local de estrógenos (Morais-Santos *et al.* 2018). Esses dados em conjunto reforçam a hipótese de que um possível desbalanço hormonal, favorável à ação de estrógenos, contribui para o desequilíbrio entre proliferação e morte celular, levando assim ao desenvolvimento das lesões prostáticas comuns no envelhecimento (Gonzaga *et al.* 2017; Morais-santos *et al.* 2015, 2018).

Interessantemente, a quantidade de células basais intensamente positivas para aromatase revelou-se proporcional ao número de células inflamatórias presente do estroma adjacente (Morais-Santos *et al.* 2018). Esse dado revela uma possível relação entre lesões prostáticas, estrógenos e inflamação, que serão estudados com mais detalhes no presente trabalho.

2. INFLAMAÇÃO

2.1. Inflamação na próstata

Apesar da principal função da próstata ser de secretar o líquido prostático contendo substâncias que proporcionam condições adequadas para a sobrevivência dos espermatozoides, acredita-se que essa glândula tenha também função na defesa contra agentes estranhos e/ou patógenos originários da bexiga ou da uretra que invadem o sistema genital masculino (Quintar e Maldonado 2017; Sfanos *et al.* 2018). Para isso, além de imunoglobulinas, a próstata secreta substâncias antimicrobianas como o íon zinco, lactoferrina e defensinas (Verze *et al.* 2016; Quintar e Maldonado 2017; Sfanos *et al.* 2018). Adicionalmente, a próstata apresenta populações residentes de células imunes, incluindo linfócitos B e T, macrófagos e mastócitos, situadas principalmente em regiões perivasculares e periglandulares (Bostwick *et al.* 2003; Difuccia *et al.* 2005; Fox *et al.* 2019). Neutrófilos, basófilos e eosinófilos são raramente observados na próstata em condições fisiológicas (Sfanos *et al.* 2018; Fox *et al.* 2019).

A inflamação é uma reação do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos, sendo considerada, portanto, um mecanismo de defesa do corpo. As causas da inflamação na próstata ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que alguns fatores podem contribuir para esse processo, como: (1) infecções virais, bacterianas e parasitárias (Quintar *et al.* 2010; Sfanos *et al.* 2018; Peiffer *et al.* 2019), (2) trauma físico devido à formação de corpos

amiláceos e concreções prostáticas (Sfanos *et al.* 2009), (3) injúria celular decorrente do refluxo urinário (Bernoulli *et al.* 2008) e (4) envelhecimento (Begley *et al.* 2008).

Naturalmente ao longo do envelhecimento, o número de células imunes que se infiltram na próstata aumenta (Bostwick *et al.* 2003; Begley *et al.* 2008; Bianchi-Frias *et al.* 2010). Uma das explicações para esse aumento se baseia no efeito dos estrógenos, que além de serem conhecidos por suas ações pró-inflamatórias (Harris *et al.* 2000; Cutolo *et al.* 2005; Ellem *et al.* 2009), contribuem para as alterações na morfologia e na composição celular da próstata ao longo do envelhecimento (Ellem *et al.* 2009; Bianchi-Frias *et al.* 2010; Crowell *et al.* 2019). Devido a essas alterações durante o envelhecimento, as células do estroma prostático começam a secretar fatores quimiotáticos associados à inflamação aguda, produzindo um gradiente quimiotático neutrofílico discreto, mas persistente, para a próstata (Begley *et al.* 2008). Os neutrófilos são o principal tipo de leucócito envolvido nas respostas inflamatórias agudas, que são as respostas iniciais do organismo a estímulos prejudiciais. Na próstata, os neutrófilos ativados podem liberar quimiocinas e citocinas quimiotáticas para macrófagos (Begley *et al.* 2008). Essas células imunes, por sua vez, desencadeiam eventos bioquímicos, como a secreção de fatores quimiotáticos para linfócitos, responsáveis pela mudança da resposta inflamatória de aguda para crônica (Begley *et al.* 2008; Sfanos *et al.* 2014). A inflamação crônica é caracterizada pela presença de grande quantidade de linfócitos e macrófagos, e promove principalmente a alteração do estroma prostático normal para um estroma reativo, responsável por suportar e promover o crescimento tumoral (Begley *et al.* 2008; Bianchi-Frias *et al.* 2010; Barron e Rowley 2012).

2.1.1. Associação entre inflamação e câncer

A associação entre inflamação crônica e a progressão de câncer é bem estabelecida em vários órgãos, tais como mama, pâncreas, intestino e cérebro (Heusinkveld e van der Burg 2011). Na próstata, a inflamação crônica é considerada crucial para o desenvolvimento do CaP (De Marzo *et al.* 2007; Thapa *et al.* 2015). Tal associação se baseia na existência de uma lesão pré-maligna, conhecida como atrofia inflamatória proliferativa (PIA), caracterizada por ser uma atrofia focal proliferativa associada às células inflamatórias (De Marzo *et al.* 1999). Essa lesão é mais frequentemente encontrada na zona periférica da próstata humana, região mais acometida por câncer (Difuccia *et al.* 2005; De Marzo *et al.* 2007). Por ser atrófica e proliferativa, a PIA é considerada uma lesão regenerativa em resposta a um dano celular causado pelos oxidantes inflamatórios (De Marzo *et al.* 1999; Nelson *et al.* 2003). De fato,

células epiteliais da PIA apresentam sinais moleculares de estresse, como altos níveis de glutathiona S-transferase A1, cicloxygenase-2 e BCL-2 (Nelson *et al.* 2003). A inflamação associada à PIA pode desencadear efeitos genotóxicos ou citotóxicos, contribuindo para a progressão dessa lesão para o câncer (De Marzo *et al.* 1999; Sfanos *et al.* 2014). Transição morfológica entre PIA, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e câncer já foi observada (**Figura 4**) (Putzi e De Marzo 2000), bem como similaridades genéticas entre essas lesões, incluindo perda de genes supressores de tumor (Bethel *et al.* 2006). O fato da PIA ser precursora das lesões malignas sugere que o microambiente inflamatório pode estar associado à iniciação da carcinogênese prostática (De Marzo *et al.* 1999).

As células imunes inicialmente agem para remover os agentes infecciosos e/ou reparar os tecidos, através da secreção de citocinas ou espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente pelos neutrófilos. Entretanto, durante a inflamação crônica, ocorre uma exposição prolongada a esses sinais, que passam a ser danosos. Por exemplo, ROS podem causar dano oxidativo ao DNA e mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (Mantovani *et al.* 2004; Khandrika *et al.* 2009). Esses papéis complexos e dicotômicos da inflamação também estão presentes no contexto tumoral, em que inicialmente as células imunes são recrutadas para prevenir o estabelecimento e a proliferação das células epiteliais malignas e, posteriormente, são recrutadas para sustentar a sobrevivência das células tumorais e a progressão do câncer, através da manutenção de um estado inflamatório crônico (Thapa *et al.* 2015).

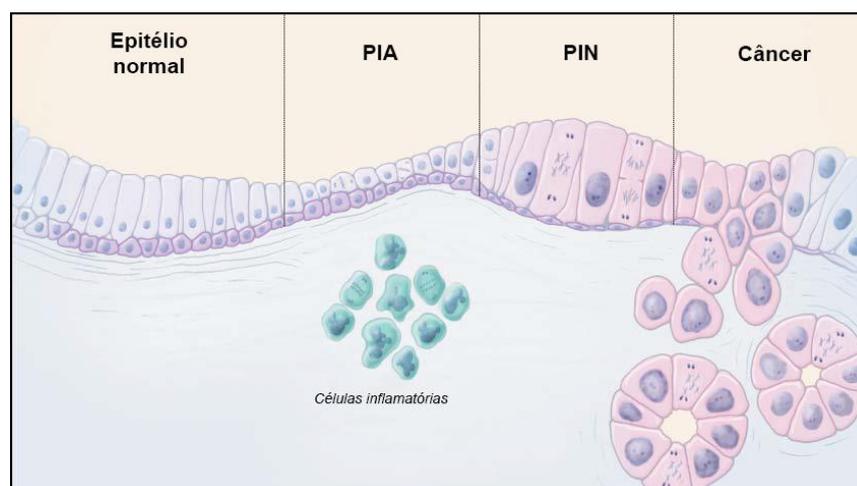


Figura 4. Esquema representando a progressão das lesões prostáticas. A infiltração de células imunes na próstata pode causar danos ao DNA e lesão celular, o que desencadeia o início da regeneração celular epitelial, manifestada morfológicamente como uma atrofia focal, conhecida como atrofia inflamatória proliferativa (PIA). A proliferação celular contínua das células geneticamente instáveis e o acúmulo adicional de alterações genômicas levam à progressão das lesões em direção ao câncer, passando pela neoplasia intraepitelial prostática (PIN). *Adaptado de Nelson et al. (2003).*

Durante o processo de transformação maligna as células mutadas começam a produzir moléculas imunogênicas, conhecidas como antígenos tumorais. As constantes injúrias ao epitélio prostático também contribuem para a liberação desses antígenos, que são reconhecidos pelas células do sistema imune, induzindo uma resposta inflamatória para eliminar as células tumorais antes delas ficarem clinicamente detectáveis (Sfanos *et al.* 2014). Porém, a longo prazo, a exposição prolongada a esses antígenos culmina na quebra da tolerância imunológica da próstata e no desenvolvimento de uma reação autoimune, contribuindo para a manutenção e a exacerbação da inflamação crônica (De Marzo *et al.* 2007).

A influência das células imunes na prevenção ou na progressão do câncer é difícil de discernir, e está relacionada ao tecido em questão, ao estágio do tumor e ao microambiente tecidual (Sica *et al.* 2008). Ainda não está bem compreendido quais tipos de células imunes são capazes de infiltrar no tumor prostático, bem como a maneira com que essas células interagem com as células epiteliais, porém vários tipos de células imunes já foram relacionados à progressão do CaP, incluindo macrófagos (Erlandsson *et al.* 2019; Zarif *et al.* 2019), mastócitos (Ellem *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2019), linfócitos (Davidsson *et al.* 2013; Erlandsson *et al.* 2019), dentre outros. No presente trabalho, por serem alvo do estudo, os macrófagos serão descritos com mais detalhes.

2.2. Macrófagos

Os macrófagos são células imunes extremamente plásticas, capazes de adaptar rapidamente a sua morfologia, localização, fenótipo e função em resposta aos diferentes sinais vindos do microambiente (Pollard 2009). De forma simplificada, os macrófagos podem apresentar dois estágios de polarização, sendo eles os macrófagos tipo 1 classicamente ativados, ou M1, e os macrófagos tipo 2 alternativamente ativados, ou M2. Esses estágios de polarização, conhecidos também como fenótipos, não são expressos ao mesmo tempo, mas regulados de tal maneira que os macrófagos exibem um padrão integrado e equilibrado de funções (Sica *et al.* 2008). Macrófagos M1 e M2 diferem em relação às funções exercidas, expressão de receptores e produção de citocinas e quimiocinas (**Figura 5**).

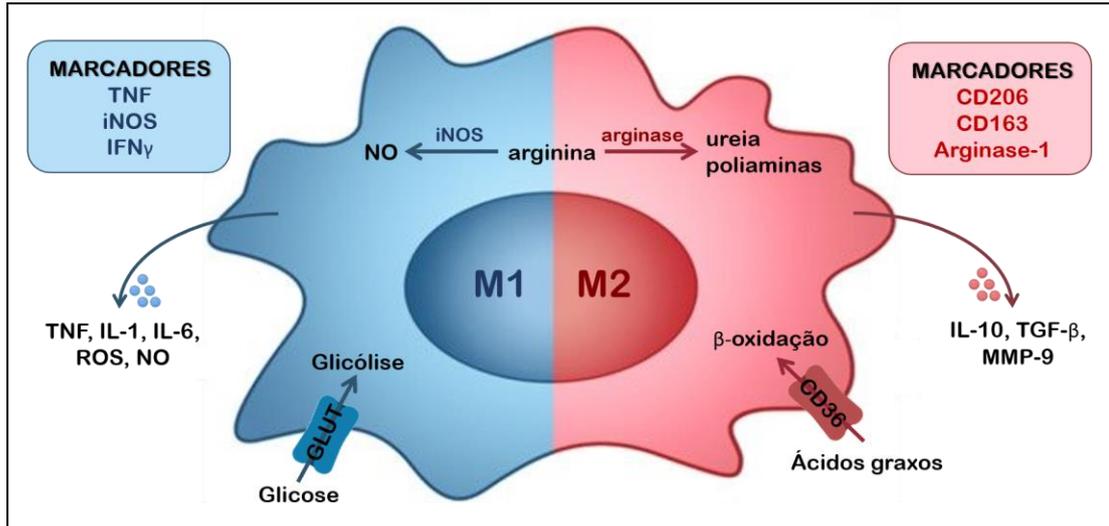


Figura 5. Representação esquemática exemplificando as diferenças entre macrófagos M1 e M2 em relação aos marcadores, produção de citocinas e metabolismo celular. Os macrófagos M1, reconhecidos pela expressão de TNF, iNOS e $IFN\gamma$, apresentam um perfil pró-inflamatório, e secretam moléculas como TNF, IL-1, IL-6, ROS e NO. Por outro lado, os macrófagos M2, reconhecidos pela expressão de CD206, CD163 e arginase apresentam um perfil anti-inflamatório, e secretam moléculas como IL-10, TGF- β e MMP-9. *Esquema do próprio autor (Hipácia Werneck Gomes).*

Os macrófagos M1 são ativados em situações de injúria ou infecção, e são caracterizados por apresentarem um perfil pró-inflamatório, produzindo citocinas como Interleucina-1 (IL-1), IL-6 e TNF (fator de necrose tumoral). Eles também produzem quantidades elevadas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e óxido nítrico (NO), moléculas essenciais no combate a agentes infecciosos e células tumorais (Mantovani *et al.* 2013; Martinez e Gordon 2014). Macrófagos M1 podem expressar TNF, iNOS (óxido nítrico sintase induzida), $IFN\gamma$ (interferon γ), dentre outras proteínas (Martinez e Gordon 2014).

Ao contrário dos macrófagos M1, os macrófagos com fenótipo M2 são reconhecidos por exercerem ações anti-inflamatórias. Eles apresentam alta capacidade fagocítica, estando envolvidos na fagocitose de células apoptóticas, processo conhecido como eferocitose, importante na manutenção da homeostase tecidual e para prevenir inflamação aberrante (Nagata *et al.* 2010; Myers *et al.* 2019). Além disso, são capazes de produzir componentes da matriz extracelular e fatores angiogênicos, participando no reparo e remodelamento tecidual (Mantovani *et al.* 2013). Macrófagos M2 também podem desempenhar funções não imunológicas clássicas, fornecendo suporte trófico para alguns tecidos durante a morfogênese e participando da sinalização endócrina a partir da produção de hormônios (Pollard 2004; Röszer 2015). Macrófagos M2 podem expressar CD206 (receptor de manose), CD163 (receptor *scavenger* da hemoglobina), arginase-1, Fizz-1 (fator mitogênico induzido por hipóxia), dentre outras proteínas (Martinez e Gordon 2014; Röszer 2015).

Além das diferenças mencionadas, o metabolismo celular é também importante na determinação do fenótipo dos macrófagos em resposta a estímulos polarizadores distintos no microambiente tecidual, tanto em condições normais quanto patológicas (**Figura 5**) (Mantovani *et al.* 2013; Mazzone *et al.* 2018). Por exemplo, o metabolismo da arginina é diferente entre as duas polarizações de macrófagos, uma vez que tanto iNOS quanto arginase-1 utilizam a arginina como substrato. Dessa forma, os macrófagos M1 são caracterizados pela alta expressão de iNOS, produzindo altos níveis de óxido nítrico para eliminar os patógenos, enquanto os macrófagos M2 apresentam maior quantidade de arginase-1, responsável por produzir ureia e poliaminas, substâncias importantes no remodelamento tecidual e na proliferação celular (Mantovani *et al.* 2013; Röszer 2015; Mazzone *et al.* 2018). Os macrófagos também apresentam uma regulação distinta em relação ao substrato energético principal utilizado. Enquanto os macrófagos M1 utilizam o metabolismo anaeróbico da glicose, como a glicólise, visando atender às suas rápidas necessidades de energia no combate a patógenos, os macrófagos M2 requerem um suprimento sustentado de energia para desempenhar suas funções, utilizando, portanto, a oxidação de ácidos graxos como substrato energético principal (Vats *et al.* 2006; Mantovani *et al.* 2013).

2.2.1. Macrófagos associados ao tumor

Os macrófagos são um dos principais componentes inflamatórios do microambiente tumoral em vários tipos de câncer, incluindo o CaP, onde participam do crescimento e progressão tumoral (**Figura 6**). Acredita-se que o próprio microambiente do tumor seja capaz de selecionar apenas os macrófagos com propriedades favoráveis ao crescimento tumoral (Mantovani *et al.* 2004). Considerando sua localização e suas funções pró-tumorigênicas, esses macrófagos são denominados macrófagos associados ao tumor (TAM – do inglês *tumor-associated macrophages*) e exibem um fenótipo do tipo M2 (Mantovani *et al.* 2004; Sica *et al.* 2008). CD206 é considerado o principal marcador de TAM (Sica *et al.* 2008; Zarif *et al.* 2019), porém esses macrófagos também podem expressar CD163, arginase-1 e iNOS (Martinez e Gordon 2014; Röszer 2015).

Os TAM são polarizados de acordo com os sinais específicos vindos do microambiente em que residem. Dessa forma, a integração de sinais distintos pode resultar na produção de um amplo espectro de fenótipos de TAM, dependendo do tipo de tecido em que esses macrófagos estão presentes (Mantovani *et al.* 2013).

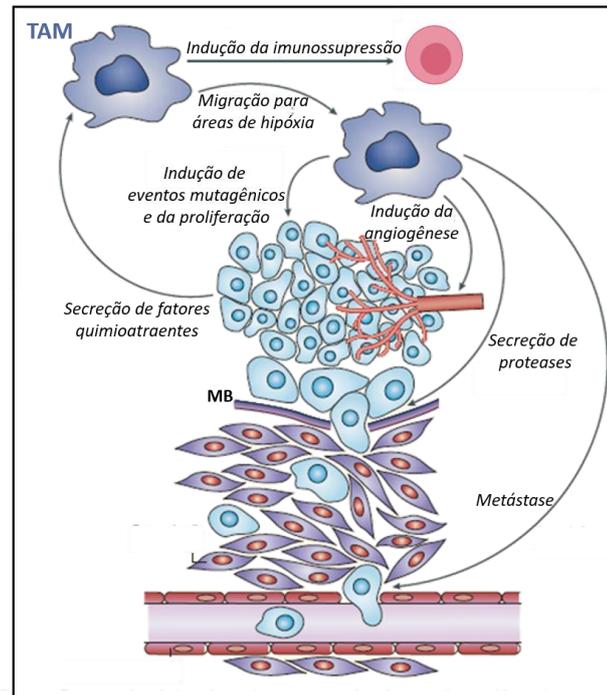


Figura 6. Representação das funções pró-tumorígenicas exercidas pelos macrófagos associados ao tumor (TAM). Os macrófagos são recrutados para as áreas tumorais através de fatores quimiotáticos secretados pelas próprias células tumorais, e exercem funções que promovem a progressão do tumor. TAM migram para áreas de hipóxia dentro do tumor, onde estimulam a angiogênese, induzem eventos mutagênicos e promovem a proliferação celular. TAM produzem proteases que degradam a membrana basal (MB) e contribuem para o remodelamento do estroma, promovendo assim a invasão tumoral e a metástase. Esses macrófagos também induzem um microambiente imunossuprimido, visando impedir respostas inflamatórias contra as células tumorais. *Adaptado de Pollard (2004).*

Quimiocinas desempenham um papel central no recrutamento de monócitos para os tecidos neoplásicos. As células tumorais são capazes de produzir citocinas e quimiocinas, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos) e CCL2 (conhecida como MCP-1, proteína quimiotática de monócitos), que estimulam a migração de monócitos para os tecidos. Além disso, esses mediadores também direcionam a diferenciação dessas células para macrófagos com fenótipo promotor do tumor (Mantovani *et al.* 2004; Linde *et al.* 2018).

Os macrófagos do tipo TAM modulam a inflamação local, de forma a criar um microambiente imunossuprimido, visando impedir respostas inflamatórias contra as células tumorais. Os TAM podem suprimir a resposta imune anti-tumoral interagindo diretamente com linfócitos T ou secretando fatores imunossupressores, como prostaglandinas, IL-10 e TGF- β (fator de crescimento transformante β), que inibem a infiltração e a atividade citotóxica dos linfócitos T (Liu e Cao 2015; Myers *et al.* 2019). Além disso, uma das características dos TAM é sua reduzida capacidade de apresentar antígenos, o que suprime o

reconhecimento das células tumorais pelos linfócitos T, permitindo assim o escape imunológico tumoral (Mantovani *et al.* 2004).

Os TAM podem também causar efeitos genotóxicos nas células epiteliais, uma vez que secretam continuamente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que reagem com o DNA, causando instabilidade genética que resulta em eventos mutagênicos nas células epiteliais e na indução da proliferação celular (Pollard 2004; Fukumura *et al.* 2006). Além disso, os macrófagos são capazes de potencializar a proliferação epitelial através da secreção de citocinas que ativam as vias das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, também conhecida como ERK) (Dang e Liou 2018).

Sabe-se que condições de hipóxia limitam a capacidade migratória dos macrófagos. Assim, ocorre um acúmulo de TAM preferencialmente em regiões tumorais com pouca vascularização, onde eles agem estimulando a angiogênese (Mantovani *et al.* 2004). Tal estímulo ocorre através da secreção de moléculas angiogênicas, como NO e VEGF, que induzem a proliferação e migração de células endoteliais para regiões específicas do tumor (Pollard 2004). Além de secretarem fatores angiogênicos, esses macrófagos agem fornecendo um suporte trófico para guiar a fusão de células endoteliais, facilitando a formação de novos vasos sanguíneos (Mantovani *et al.* 2013). A angiogênese induzida por TAM suporta o crescimento tumoral através de um aporte adequado de oxigênio, e permite o acesso das células tumorais à vasculatura, etapa essencial para a metástase (Pollard 2004).

Além de estimularem a angiogênese, os TAM ainda contribuem para a metástase através da produção de proteases e metaloproteinases da matriz (MMP), como MMP-9, que degradam a membrana basal, permitindo a disseminação das células tumorais para o estroma. Além disso, eles também secretam fatores de crescimento que estimulam a motilidade tumoral (Pollard 2004; Mantovani *et al.* 2013).

Assim como os macrófagos M2, os TAM apresentam alta capacidade fagocítica. Em condições fisiológicas, a fagocitose de células apoptóticas pelos macrófagos previne a liberação de sinais inflamatórios pelos corpos apoptóticos, auxiliando na manutenção da homeostase e na criação de um microambiente imunologicamente silencioso (Heckmann *et al.* 2017; Werfel e Cook 2018; Myers *et al.* 2019). Por outro lado, no contexto tumoral, a eferocitose favorece a progressão do câncer, uma vez que induz a produção de citocinas anti-inflamatórias e a secreção de fatores que estimulam o crescimento das demais células cancerígenas (Heckmann *et al.* 2017; Werfel e Cook 2018; Jones *et al.* 2019; Myers *et al.* 2019).

2.2.2. Hormônios esteroides sexuais e macrófagos

Os hormônios esteroides sexuais são moduladores chave da função e do fenótipo das células imunes em diversos órgãos (Miller e Hunt 1996; Cutolo *et al.* 2005; Rubinow 2018). Isso ocorre uma vez que as células imunes, incluindo os macrófagos, são capazes de expressar receptores de esteroides sexuais, como AR, ER α e ER β , permitindo a regulação de suas atividades por esses hormônios (Prins *et al.* 1991; D'Agostino *et al.* 1999; Carruba *et al.* 2003; Capellino *et al.* 2006). Nesse sentido, andrógenos e estrógenos regulam a proliferação, apoptose e diferenciação dos macrófagos, bem como a produção de citocinas por essas células (Miller e Hunt 1996; D'Agostino *et al.* 1999; Cutolo *et al.* 2005; Rubinow 2018). Esses hormônios exercem funções antagônicas na modulação da resposta inflamatória orquestrada pelos macrófagos, sendo que, enquanto os andrógenos estimulam o fenótipo anti-inflamatório, os estrógenos, promovem o fenótipo pró-inflamatório (D'Agostino *et al.* 1999; Carruba *et al.* 2003; Cutolo *et al.* 2005).

A relação entre o microambiente hormonal e os macrófagos é ainda mais complexa, uma vez que essas células imunes não são apenas influenciadas por hormônios esteroides sexuais, mas também são capazes de produzi-los. Confirmando essa habilidade, sabe-se que os macrófagos podem expressar enzimas esteroidogênicas, como aromatase, 3 β -HSD e 17 β -HSD, contribuindo com a produção local de andrógenos e estrógenos (Mor *et al.* 1998; Schmidt *et al.* 2000; Martins-Santos *et al.* 2017; Rubinow 2018). Os esteroides sexuais derivados de células imunes podem desempenhar importantes papéis autócrinos e parácrinos, com efeitos de sinalização conferidos tanto na célula de origem quanto nas células ao redor (Rubinow 2018).

Um exemplo clássico da importância dos macrófagos na produção de hormônios esteroides sexuais é observado nos testículos, onde os macrófagos estão estruturalmente associados às células de Leydig, fornecendo 25-hidroxicolesterol como substrato direto para a realização da esteroidogênese nessas células (Nes *et al.* 2000; Hutson 2006). Sabe-se que a etapa limitadora da taxa de biossíntese dos hormônios esteroides é a translocação do colesterol livre citoplasmático para a membrana interna das mitocôndrias, onde se encontra a enzima CYP11A1, responsável pela hidroxilação do colesterol e a posterior clivagem de sua cadeia lateral, produzindo pregnenolona (Stocco e Clak 1996). Através da enzima 25-hidroxilase, os macrófagos testiculares são capazes de produzir 25-hidroxicolesterol, que é então transportado até as células de Leydig, onde atua como substrato direto para a clivagem da cadeia lateral, produzindo pregnenolona (**Figura 7**). Dessa forma, os macrófagos fornecem

uma via alternativa para a esteroidogênese, que elimina a etapa tradicional de limitação da biossíntese dos hormônios esteroides (Nes *et al.* 2000). Estudos revelaram que esse mecanismo não é apenas alternativo, mas fisiologicamente relevante, uma vez que a depleção experimental de macrófagos testiculares causou redução da quantidade de testosterona produzida pelas células de Leydig (Bergh *et al.* 1993; Hutson 2006). Além disso, em situações que causam danos às células de Leydig, como após exposição crônica ao desregulador endócrino atrazina, essa função dos macrófagos se torna ainda mais importante, uma vez que o número dessas células no testículo aumenta na tentativa de reestimar a esteroidogênese (Martins-Santos *et al.* 2017).

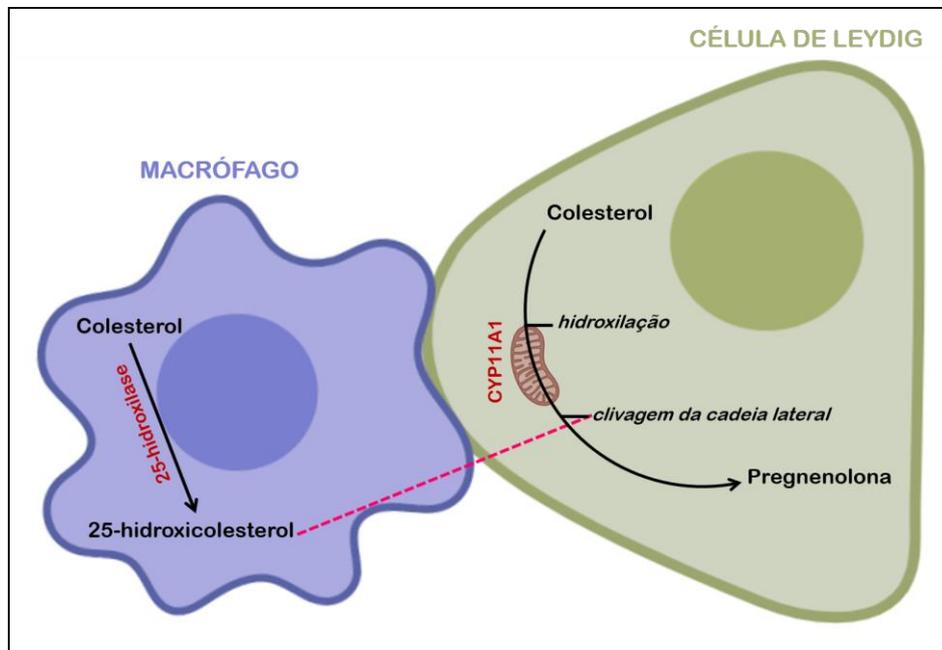


Figura 7. Representação da interação entre macrófagos e células de Leydig para realização da esteroidogênese. Nas células de Leydig testiculares, o colesterol livre citoplasmático é translocado para a membrana mitocondrial interna, onde se encontra a enzima CYP19A1, responsável pela hidroxilação do colesterol e a posterior clivagem de sua cadeia lateral, produzindo pregnenolona. Adicionalmente, através da enzima 25-hidroxilase, os macrófagos testiculares produzem 25-hidroxicolesterol, que é então transportado até as células de Leydig, onde atua como substrato direto para a clivagem da cadeia lateral, produzindo pregnenolona. *Adaptado de Nes et al. (2000).*

A produção de hormônios esteroides pelos macrófagos é também relevante no contexto tumoral. Os TAM encontrados no tecido mamário, por exemplo, podem expressar aromatase, sendo uma das fontes de estrógenos intratumorais, contribuindo assim para a progressão do câncer (Mor *et al.* 1998; Rubinow 2018). Adicionalmente, macrófagos foram capazes de induzir a proliferação de células de câncer de mama *in vitro*, um efeito que foi revertido após tratamento dos macrófagos com um inibidor da aromatase (Mor *et al.* 1998),

confirmando a importância dos estrógenos produzidos pelos macrófagos na progressão do câncer.

O recrutamento de macrófagos para os tecidos também pode ser regulado por hormônios esteroides (Miller e Hunt 1996; Cutolo *et al.* 2005). Há evidências de aumento da população de macrófagos na próstata de ratos após tratamento sistêmico com estradiol (Gillera *et al.* 2003), bem como nos testículos de camundongos que superexpressam aromatase (Li *et al.* 2006), sugerindo estímulo estrogênico no recrutamento dessas células.

2.2.3. Macrófagos na próstata

Na próstata, os macrófagos fazem parte das populações de células imunes residentes do tecido, e estão localizados principalmente no estroma (Fox *et al.* 2019). Alguns estudos relatam a presença de raros macrófagos no epitélio prostático em condições fisiológicas (Helminen e Ericsson 1972; Lu *et al.* 2012; Silva *et al.* 2018), porém expressiva quantidade de macrófagos intraepiteliais é observada após castração (Helminen e Ericsson 1972; Evans e Chandler 1987; Franck-Lissbrant *et al.* 1998; Desai *et al.* 2004; Silva *et al.* 2018). Nessa situação, macrófagos são recrutados para o compartimento epitelial prostático para fagocitar células epiteliais que entraram em apoptose após privação androgênica, contribuindo assim para a homeostase tecidual (Evans e Chandler 1987; Silva; *et al.* 2018).

Ao longo do envelhecimento, foi observado um aumento na quantidade de macrófagos na próstata de camundongos, o que levantou a hipótese de que essas células poderiam contribuir para o desenvolvimento de lesões relacionadas à idade (Bianchi-Frias *et al.* 2010). Essa hipótese foi testada posteriormente, realizando a inoculação de células tumorais na próstata de camundongos jovens e idosos (Bianchi-Frias *et al.* 2019). Observou-se que, apesar dos tumores formados serem maiores em camundongos idosos, a quantidade de macrófagos recrutados para a região tumoral foi semelhante em ambos os grupos. Porém, interessante, a quantidade de macrófagos com fenótipo TAM era maior nos tumores dos camundongos idosos, chamando a atenção para a influência do envelhecimento na polarização dos macrófagos para um fenótipo promotor de tumor. Dessa forma, é possível que o microambiente prostático senil possa favorecer o crescimento de células prostáticas malignas, destacando principalmente o papel dos macrófagos nesse processo (Begley *et al.* 2008; Bianchi-Frias *et al.* 2010, 2019).

A associação dos macrófagos no circuito inflamatório que promove a progressão do CaP vem sendo extensivamente estudada. Tal relação fica evidente em um estudo em que

células tumorais prostáticas foram inoculadas no tecido subcutâneo de camundongos, e a velocidade de crescimento do tumor foi proporcional à quantidade de macrófagos encontradas no tecido tumoral (Copeland *et al.* 2019). Adicionalmente, mostrou-se que quando essas células eram inoculadas no tecido subcutâneo de camundongos junto com macrófagos, a taxa de crescimento tumoral aumentava (Craig *et al.* 2008).

Diversos estudos mostram uma correlação positiva entre a quantidade de macrófagos presentes no tecido prostático e a progressão das lesões. Por exemplo, em ratos tratados com testosterona em adição ao carcinógeno MNU (N-metil-N-nitrosourea), observou-se que à medida que as lesões prostáticas iam se agravando, a densidade de macrófagos presente no estroma adjacente também aumentava (Narayanan *et al.* 2009). Além disso, camundongos Hi-myc, que superexpressam o oncogene *MYC*, apresentam acúmulo de macrófagos no estroma prostático desde as lesões pré-malignas (Melis *et al.* 2017).

Em humanos, a quantidade de macrófagos encontrados em biópsias prostáticas correlaciona-se positivamente com o estágio do tumor, de modo que os tumores classificados com maior escore de Gleason¹ apresentam mais macrófagos infiltrados que os tumores menos agressivos (Nanomura *et al.* 2011; Hu *et al.* 2015; Fan *et al.* 2017; Jones *et al.* 2019). Além disso, observou-se também aumento progressivo da quantidade de macrófagos M2 desde a próstata normal até o CaP metastático, sugerindo uma relação entre a infiltração de macrófagos e o risco de metástase (Hu *et al.* 2015; Erlandsson *et al.* 2019; Zarif *et al.* 2019).

Expressiva quantidade de macrófagos foi observada na próstata de pacientes após ADT (Gannon *et al.* 2009; Escamilla *et al.* 2015; Zarif *et al.* 2019). Assim como observado em roedores após castração, esses macrófagos são possivelmente recrutados para fagocitar células epiteliais que entram em apoptose após privação androgênica, contribuindo assim para a homeostase tecidual. Entretanto, o próprio processo de fagocitose pode repolarizar os macrófagos para um fenótipo promotor do tumor, onde atuam na proliferação de células tumorais, angiogênese e supressão imunológica (Werfel e Cook 2018; Jones *et al.* 2019; Myers *et al.* 2019). Corroborando esses dados, em um modelo experimental que mimetiza a ADT, foi observado uma redução do crescimento tumoral após depleção dos macrófagos (Lee *et al.* 2019). Dessa forma, é possível que os macrófagos também exerçam um papel essencial na recidiva tumoral.

¹ Escore de Gleason se refere à classificação dada a um tecido prostático, baseado em sua aparência microscópica, que revela a agressividade do tumor. A classificação varia de 6 a 10, em que 10 representa os tumores mais agressivos.



II. JUSTIFICATIVA

II. JUSTIFICATIVA

Além de seu papel na fisiologia reprodutiva, a próstata tem relevância clínica por ser alvo de desordens benignas e malignas, como a hiperplasia prostática benigna e o câncer, que afetam a fertilidade e a qualidade de vida dos homens. Entre a população masculina mundial, o CaP é o segundo câncer mais frequente e a quinta principal causa de morte diretamente relacionada ao câncer (Bray *et al.* 2018). Em relação ao Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o biênio de 2020 e 2021, o CaP é o tipo de câncer mais incidente entre os homens em todas as regiões do país (INCA 2019).

No contexto do câncer, as células basais prostáticas vêm ganhando destaque uma vez que elas podem estar envolvidas tanto na iniciação quanto na recidiva do CaP (Choi *et al.* 2012; Taylor *et al.* 2012; Wang *et al.* 2014b). Sabe-se que as células basais do epitélio prostático constituem uma população heterogênea, onde se encontram diversas subpopulações com diferentes contribuições estruturais e funcionais para a próstata, tanto no contexto fisiológico quanto patológico (Goldstein *et al.* 2010; Taylor *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014). Porém, pouco se sabe sobre a regulação do número, da morfologia e da função das diferentes subpopulações de células basais do epitélio prostático, bem como a influência dessas células nas modificações que acontecem no epitélio durante o processo carcinogênico.

Complicando ainda mais a compreensão sobre o compartimento basal do epitélio pseudoestratificado, esse pode abrigar macrófagos (Shum *et al.* 2014; Silva *et al.* 2018). Similaridades morfológicas e ultraestruturais entre células basais e macrófagos, assim como sua íntima relação espacial, já foram observadas, por exemplo no epitélio epididimário (Yeung *et al.* 1994; Seiller *et al.* 1999; Holschbach e Cooper 2002). Essa íntima relação levou alguns estudos mais antigos a descreverem marcadores e funções clássicas de macrófagos, como por exemplo habilidade fagocítica, em células basais do epidídimo (Yeung *et al.* 1994; Seiller *et al.* 1999). Mais recentemente demonstrou-se que as células basais são morfológica e fenotipicamente diferentes dos macrófagos, e apesar de coexistirem em alguns tecidos, desempenham funções distintas (Shum *et al.* 2014).

O que vem chamando atenção é a participação dos macrófagos no desenvolvimento e progressão do CaP. Diversos estudos mostram que à medida que as lesões prostáticas progridem, a quantidade de macrófagos encontrados no tecido aumenta (Hu *et al.* 2015; Fan *et al.* 2017; Bianchi-Frias 2019; Zarif *et al.* 2019). Esses macrófagos são encontrados no estroma próximo às lesões, principalmente em regiões perivasculares (Klotz *et al.* 1998; Narayanan *et al.* 2009; Bianchi-Frias *et al.* 2010; Copeland *et al.* 2019). Entretanto, as células

imunes parecem interagir com células epiteliais de maneira complexa, uma vez que os macrófagos em contato com as células tumorais desencadeiam efeitos parácrinos mais pronunciados que os macrófagos situados mais distante, como por exemplo induzindo a proliferação celular das células ao redor (Lissbrant *et al.* 2000). Na próstata, os relatos em relação a presença dessas células imunes no epitélio no contexto tumoral são escassos e superficiais. Por exemplo, apesar de alguns estudos não mencionarem a localização dos macrófagos, é possível observar a presença dessas células imunes no epitélio prostático de camundongos após a deleção do gene *NKX3.1* (um gene supressor de tumor cuja perda ou redução representa um evento chave na iniciação do CaP) (Le Magnen *et al.* 2018), ou após tratamento com diferentes carcinógenos (Nakai *et al.* 2007; Prins *et al.* 2017). Por outro lado, quando a localização dos macrófagos no epitélio é reportada, nenhuma referência é feita em relação à função desempenhada por eles ou à sua interação com as células epiteliais (Bianchi-Frias *et al.* 2010; Lu *et al.* 2012; Zarif *et al.* 2019).

Pelo exposto, fica evidente a necessidade de estudos que contribuam para a compreensão acerca da presença e das funções dos macrófagos epiteliais, bem como da contribuição das subpopulações de células basais e interação dessas células no compartimento basal do epitélio prostático, em diferentes microambientes, especialmente no contexto das patologias associadas à próstata.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral investigar possíveis alterações na morfologia e no fenótipo de células basais e de macrófagos no epitélio prostático de ratos em diferentes microambientes hormonais. Serão utilizados três diferentes modelos experimentais: (1) envelhecimento, (2) indução de lesões prostáticas através do tratamento prolongado com testosterona e estradiol e (3) castração e reposição hormonal.

Os objetivos específicos incluem:

- Investigar se os diferentes microambientes hormonais podem modular as subpopulações de células basais prostáticas;
- Investigar o possível recrutamento de macrófagos para o compartimento basal do epitélio prostático em diferentes microambientes hormonais;
- Avaliar a morfologia e o fenótipo dos macrófagos encontrados no epitélio,
- Investigar a possível interação entre macrófagos e células basais prostáticas.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão divididos em três capítulos, apresentados da seguinte maneira:

CAPÍTULO I – Artigo publicado

Com o objetivo de aumentar a incidência de lesões pré-malignas e malignas na próstata, ratos Wistar machos foram submetidos ao tratamento prolongado com testosterona e estradiol. A caracterização desse modelo experimental foi publicada, com primeira autoria compartilhada, no artigo:

Targeting Wistar rat as a model for studying benign, premalignant and malignant lesions of the prostate

Life Sciences, 2020

DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117149

CAPÍTULO II – Artigo submetido ao periódico *Andrology*

Tumor-Associated Macrophages (TAM) are recruited to the aging prostate epithelial lesions and become intermingled with basal cells

CAPÍTULO III – Resultados adicionais não publicados

CAPÍTULO I

Targeting Wistar rat as a model for studying benign, premalignant and malignant lesions of the prostate

CAPÍTULO II

Tumor-Associated Macrophages (TAM) are recruited to the aging prostate epithelial lesions and become intermingled with basal cells



Tumor-Associated Macrophages (TAM) are recruited to the aging prostate epithelial lesions and become intermingled with basal cells

Journal:	<i>Andrology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Werneck-Gomes, Hipácia; Universidade Federal de Minas Gerais, Morphology Campolina-Silva, Gabriel; Universidade Federal de Minas Gerais Maria, Bruna; Universidade Federal de Minas Gerais Mahecha, Germán; Universidade Federal de Minas Gerais Hess, Rex; University of Illinois, Comparative Biosciences Oliveira, Cleida; Universidade Federal de Minas Gerais, Department of Morphology
Major Area:	Basic Science
Clinical:	
Basic Science:	Morphology, Pathology, Physiology
Specific Topics:	Prostate, Ageing/aging, Cancer and Carcinogenesis, Reproductive immunology
<p>Note: The following files were submitted by the author for peer review, but cannot be converted to PDF. You must view these files (e.g. movies) online.</p>	
<p>Movie S1.mov</p>	

Tumor-Associated Macrophages (TAM) are recruited to the aging prostate epithelial lesions and become intermingled with basal cells

Hipácia Werneck-Gomes¹; Gabriel H. Campolina-Silva¹; Bruna T. Maria¹; Germán A. B. Mahecha¹; Rex A. Hess²; Cleida A. Oliveira^{1*}

1 Department of Morphology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31270-901

2 Department of Comparative Biosciences, University of Illinois, Urbana, Illinois, USA, 61802-6199

Short title: Intraepithelial macrophage in prostate lesion

Keywords: prostate; macrophage; epithelium; autophagy; aging

*** Corresponding author:**

Cleida Aparecida Oliveira

Av. Antônio Carlos, 6627

CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG - Brasil.

Phone: +55.31.3409-2795

E.mail: cleida@icb.ufmg.br

Abstract

Background: Prostate cancer remains one of the most common cancers in men. Macrophages are thought to be important regulators in cancers and their potential involvement in prostate cancer should not be overlooked. Therefore, the association between macrophages and the pre-tumorous changes in prostate epithelium during aging deserves further investigation.

Objectives: We sought to investigate whether macrophages would be recruited into the prostate epithelium that display pathological lesions commonly found during aging.

Materials and methods: Prostates of aging rats, with and without treatment with a combination of testosterone and estradiol, were examined for premalignant and malignant epithelial lesions. For comparison, prostates of castrated rats were also investigated. Induced and naturally formed lesions were observed. **Results:** Intraepithelial macrophages were found restricted to areas of premalignant and malignant lesions. An unprecedented interaction between macrophages and basal cells was observed in the aging pathological lesions. The intraepithelial macrophages were associated with autophagy, in contrast to those found after castration. In prostate lesions, the intraepithelial macrophages had TAM phenotype (CD68+/iNOS+/ CD206+/ARG+), denoting a possible involvement in cancer progression. However, M2 macrophages (CD68+/CD163+) were recruited into the epithelium after castration, possibly to phagocytize cells undergoing apoptosis. **Discussion and Conclusion:** In conclusion, macrophages were recruited into the prostate epithelium and presented diverse phenotypes and morphology, consistent with changes reflected in the hormonal environment. Macrophages with the TAM phenotype were found restricted to areas of premalignant and malignant lesions in aging prostates, denoting a possible involvement in cancer progression. In contrast, M2 macrophages were found in the regressed epithelium after castration.

Introduction

The prostate has clinical relevance as a prominent target for benign and malignant disorders that affect the quality of men's life. In particular, prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed cancer among men worldwide, with an estimated 1,276,000 cases and 359,000 deaths annually (Bray *et al.* 2018). The risk of PCa in men remains high in the aging population (Wang *et al.* 2018). Therefore, understanding the numerous cellular interactions associated with the onset of tumorigenesis is a major goal of prostate research. The reciprocal interaction between the epithelium and surrounding stroma is essential for normal prostate function, and disruption of this interface appears to induce uncontrolled growth and development of a malignant transformation (Taylor & Risbridger 2008; Goldstein & Witte 2013). Immune cells are one of the key components of the prostate stroma, having pronounced paracrine effects on epithelial cells (Lissbrant *et al.* 2000; Huang *et al.* 2018). Among the inflammatory cells of the prostate, macrophages have gained attention, due to the intrinsic association between stromal macrophage density and progression of prostatic lesions, including cancer (Lissbrant *et al.* 2000; Narayanan *et al.* 2009; Lindholm *et al.* 2010; Nonomura *et al.* 2011; Hu *et al.* 2015; Bergstrom *et al.* 2016; Fan *et al.* 2017; Melis *et al.* 2017; Jones *et al.* 2019; Erlandsson *et al.* 2019). Macrophages associated with pro-tumorigenic lesions, also called tumor-associated macrophages (TAM), have been recognized as a polarized M2 population (Mantovani *et al.* 2004; Sica *et al.* 2008). TAM participate in the promotion of angiogenesis, remodeling of the extracellular matrix, and in the release of growth factors that contribute to cell proliferation, thus playing a role in the support of tumor growth and metastasis (Sica *et al.* 2008; Hu *et al.* 2015; Dang & Liou 2018).

Macrophages have also been shown to interact with epithelial cells in a rather complex manner (Lissbrant *et al.* 2000), secreting factors that promote mutagenic events, cellular proliferation and motility (Mantovani *et al.* 2004; Sica *et al.* 2008; Dang & Liou 2018). In the prostate, aside from the presence of stromal and perivascular macrophages, these cells have long been reported within the epithelium after androgen withdraw induced by castration (Evans & Chandler 1987; Franck-Lissbrant *et al.* 1998; Desai *et al.* 2004; Silva *et al.* 2018; Barbosa *et al.* 2019). These intraepithelial macrophages appear to phagocytize apoptotic epithelial cells (efferocytosis) and contribute to the remodeling of the regressing prostate (Evans & Chandler 1987; Silva *et al.* 2018). Nevertheless, the presence of macrophages within the prostate epithelium has often been overlooked with regards to the pathological

context. Therefore, we asked whether macrophages would be recruited to the epithelium in premalignant and malignant lesions, commonly found in the aging prostate.

To answer this question and better evaluate the presence of intraepithelial macrophages in a broad spectrum of histopathological alterations arising in the prostate, we sought to investigate two experimental models that have been well characterized by the occurrence of prostate lesions: (1) aging Wistar rats, which present naturally occurring prostate lesions that mimic most of the histopathological changes affecting the human prostate (Morais-Santos *et al.* 2015; Campolina-Silva *et al.* 2019); and (2) Wistar rats chronically exposed to a combination of testosterone and estradiol (T+E₂), which is a well-known treatment that increases the incidence of prostate premalignant and malignant lesions (Bosland *et al.* 1995; Campolina-Silva *et al.* 2019; Ozten *et al.* 2019). Prostates of rats submitted to castration or castration followed by androgen replacement were also investigated, for comparison.

Materials and methods

Experimental approach

Prostates of adult male Wistar rats were obtained from multiple litters that were housed in the animal facilities at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). All the experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the UFMG (CEUA, process 30/2016 and 344/2018).

For investigations on aging prostates, male Wistar rats at 3, 6, 12, 18 and 24 months of age ($n = 8$) were used. To drive prostatic malignant lesions (Bosland *et al.* 1995), 12-month old male Wistar rats ($n = 8$) were treated surgically by subcutaneous implantation into the flank region with hormone-containing Silastic tubes (#508-009; 1.98 mm i.d. X 3.18 mm o.d.; Dow-Corning Corporation, Midland, USA). Under anesthesia, the animals received two 2.0 cm Silastic capsules filled with testosterone propionate (#T-1875, Sigma, St. Louis, USA) and one 1.0 cm Silastic capsule filled with 17- β -estradiol-3-benzoate (#E-8515, Sigma, St. Louis, USA). The rats were hormonally treated for 24 weeks. Freshly prepared tubes with the same dimensions were replaced after 12 weeks, to ensure consistent steroid levels over time. Control animals received empty Silastic tubes ($n = 5$).

For the castration experiment, 90-days-old male Wistar rats underwent bilateral castration ($n = 4$), performed by the scrotal incision under anesthesia. Sham-operations were performed as surgery controls. Starting on the same day of the bilateral castration, the rats

were subjected to hormone replacement for six days, with a daily subcutaneous injection of 5 mg of 5 α -dihydrotestosterone (DHT) (#A-8380, Sigma, St. Louis, USA), dissolved in 0.1 mL of corn oil as vehicle. The replacement control group received only vehicle. The treatment period and dosage used were chosen based on previous studies (Oliveira *et al.* 2007).

After reaching the ages of interest and after the treatments, the rats were anesthetized and the ventral (VP) and lateral (LP) prostates were dissected and embedded in paraffin (Histosec Pastilles, Merck, Darmstadt, Germany). Tissue sections (4.0 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS) for histopathological analysis. Alternatively, the freshly dissected lobes were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. VP and LP were chosen, respectively, for being the most involuted after castration (Evans & Chandler 1987; Banerjee *et al.* 2000; Desai *et al.* 2004) and the most affected by prostatitis (Prins *et al.* 2017; Morais-Santos *et al.* 2018; Campolina-Silva *et al.* 2018, 2019).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

In order to investigate the occurrence of intraepithelial macrophages in the rat prostates, tissues sectioned at 4.0 μ m were submitted to immunohistochemistry for CD68, a pan-macrophage marker (Silva *et al.* 2017). Additionally, to characterize the epithelial cells in close proximity to macrophages, immunostaining to detect cellular proliferation (MCM7) and apoptosis (cleaved caspase-3) was also performed. To detect the expression of retinoid X receptors (RXR), a transcription factor involved in M2 macrophages polarization (Myers *et al.* 2019), immunohistochemistry was performed combined with the PAS (Corbellini *et al.* 2001), in which macrophages could be visualized in pink and RXR-positive nuclei in brown. Negative controls were performed by omitting primary antibodies.

Oversimplifying the macrophage phenotypes, two distinct polarization states may be recognized: the classically activated type 1 macrophages (M1), and the alternative activated type 2 macrophages (M2). Aiming to distinguish these cell populations, immunofluorescence was performed, as described previously (Campolina-Silva *et al.* 2018), to colocalize CD68 with basal cell marker (CK5), M1 macrophage marker (iNOS), M2 macrophage markers (CD206, CD163, and arginase-1) or autophagy marker (LC3 β). The fluorescence was examined using a Zeiss ApoTome microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with specific filters suitable for the detection of the signals. Additionally, the association between intraepithelial macrophages and basal cells was investigated by immunofluorescence,

using 16.0µm-thick prostate sections. Multiple optical sections taken along the Z axis were acquired using a motorized Nikon Eclipse Ti microscope with NIS-Elements (Nikon Instruments, Tokyo, Japan) to produce 3D reconstructions.

All antibodies used herein were tested with appropriate negative (muscle) and positive (spleen and skin) control tissues. Serial dilutions were also performed to determine the optimal concentration before being used in the described assays. Antibodies used are specified in Table 1.

Transmission electron microscopy

Tissue fragments (1 mm³) from prostates were fixed in 2,5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, at 4°C for 24h. Samples were post-fixed in 2% osmium tetroxide, contrasted en bloc with 2% uranyl acetate, infiltrated and embedded in EPON resin. Ultrathin sections obtained were then examined with a Tecnai- G2-Spirit FEI/Quanta electron microscope (120 kV Philips) and digital images were acquired.

Western blotting

Western blotting assays were performed, as previously described (Campolina-Silva *et al.* 2018), in LP of control and T+E₂-treated animals to detect possible changes in the LC3 protein levels through assessment of the nonlipidated cytosolic LC3-I and the lipidated membrane-bound LC3-II levels (Klionsky *et al.* 2016). The assay was performed in duplicate to confirm the results.

Quantitative and statistical analysis

Quantification of the number of stromal and epithelial CD68 positive cells and caspase-3 positive epithelial cells was performed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, USA). For each tissue section, ten 40x magnification images were randomly taken from selected areas as close to the periphery of the gland as possible. In addition, 40x magnification images were taken from normal epithelium, as well as from prostate lesions areas (selected following the criteria described by Shappell *et al.* (2004)). Positive and negative cells were counted, and the results were expressed as the percentage.

The quantitative data were statistically analyzed by using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Initially, the D'Agostino-Pearson test was used to check the normality of the datasets. When normality was confirmed, the data were analyzed by Student t-test or ANOVA plus Tukey post-hoc test to compare means between two or

more groups, respectively. Otherwise, nonparametric data were analyzed using the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis plus Dunn's post-hoc test, to compare two or more groups, respectively. Correlations were also calculated using Spearman's correlation coefficient. As a categorical data, the incidence of prostatic lesions containing intraepithelial macrophages was presented as frequency and analyzed by Fisher's exact test. The results were expressed graphically as the mean \pm standard error of the mean and the significance level used for all tests was $p \leq 0.05$.

Results

Intraepithelial macrophages in age-related and hormone-induced prostate lesions

To investigate the possibility of macrophage recruitment to the prostate epithelial lesions we used the aging rat model. Epithelial CD68+ cells were not observed in the normal prostate epithelium, at any age analyzed. On the other hand, intraepithelial macrophages were observed in prostate epithelial lesions of rats at 18 and 24 months of age, such as in areas showing atrophy, PIA, HGPIN and cancer (Fig. 1A and Table 2). Macrophages were also observed in the stroma of both prostate lobes. The number of stromal CD68+ cells remained similar in the VP of Wistar rats at all ages analyzed, whereas in the LP the proportion of macrophages in the stroma was reduced at older ages (18 and 24 months) (Fig. 1A).

To test the hypothesis that intraepithelial macrophages are recruited into the prostatic lesions, premalignant and malignant lesions were induced by treating aged rats to chronic exposures to T+E₂ (Bosland *et al.* 1995; Campolina-Silva *et al.* 2019; Ozten *et al.* 2019). In control rats, CD68+ cells were restricted to the stromal areas (Fig. 1B). T+E₂ treatment increased the number of CD68+ macrophages in both stromal (from 6% and 14% to 15% and 31%) and epithelial (from undetectable to 1% and 5%) compartments of the VP and LP, respectively (Fig. 1B). T+E₂ treatment also increased the incidence of prostatic lesions containing intraepithelial macrophages (Table 2). The number of intraepithelial CD68+ macrophages recruited after T+E₂ treatment increased according to the severity of the prostate lesions, from normal to atrophy and LGPIN in the VP, as well as from normal to PIA to LGPIN to HGPIN to cancer in the LP (Fig. 1B). These lesions were identified through serial tissue sections stained by HE, CD68 and MCM7 (Fig. 1B). Proliferating MCM7 positive epithelial cells were found significantly associated with intraepithelial macrophages ($r = 0.9608$; $p < 0.0001$).

Basal cells projections were observed intermingled with the intraepithelial TAM phenotype macrophages

The intraepithelial CD68+ macrophages present in naturally occurring or hormone-induced prostatic lesions were typically round or globular in shape, but with considerable variation in size, sometimes forming large clusters of cells (Fig. 2A). The nuclei were vesicular and generally peripheral in location. The cytoplasm was characterized by intense PAS-positive and eosinophilic staining. Serial sections of the same area stained with HE and CD68 marker indicated that these eosinophilic cells were CD68+ macrophages. The presence of macrophages within the epithelium was further confirmed by their presence above the basement membrane, as seen with PAS staining (Fig. 2A).

Electron microscopy also confirmed the intraepithelial position of macrophages in prostate lesions, including a common observation of these cells located above basal cells (Fig. 2B and 3). Often, multiple macrophages were juxtaposed, forming large clusters and resembling multinucleated cells, but in fact these were individual cells, recognized by their nuclei and delimiting plasma membranes (Fig. 2B). Extensive cytoplasmic interdigitations were observed between macrophages in the base of the epithelium, as well as above the basal cells. No junctional structures were detected between the intraepithelial macrophages nor between macrophages and the surrounding epithelial cells.

To characterize the intraepithelial macrophages, immunofluorescence was used to distinguish M1 (iNOS) and M2 (CD163, CD206 and arginase) populations. Colocalization revealed that intraepithelial CD68+ macrophages, recruited after T+E₂ treatment, expressed iNOS, CD206 and arginase (Fig. 2C), but they did not express CD163 (data not shown). These macrophages also expressed nuclear RXR (Fig. 2C).

Colocalization of CD68 and CK5 further confirmed that macrophages were localized within the basal epithelium, highlighting an intricate relationship between CD68+ cells and basal cells (Fig. 3). Using 3D confocal microscopy, it was possible to observe a dense and sometimes continuous network of basal cells located at the base of the epithelial lesions ([Movie S1](#)). Besides emitting cytoplasmic projections towards the lumen, some basal cells also extended projections that partially or completely intermingled with the intraepithelial macrophages (Fig. 3B and [Movie S1](#)). Basal cells were also seen interacting with other basal cells, in order to involve the intraepithelial macrophages or even their clusters (Fig. 3B).

Intraepithelial macrophages show autophagic activity in the prostate epithelial lesions

Ultrastructurally, the intraepithelial macrophages observed in prostatic lesions were characterized by an abundance of lysosomes of different sizes and associated with autophagic vacuoles (Fig. 4). The autophagic-related structures varied in stage of formation, from initial phagophores or elongating membranes engulfing cytoplasmic components, to double-membraned autophagosomes and autophagic vacuoles containing debris in various stages of digestion (Fig. 4A). The vacuoles varied in size and occupied most of the macrophage cytoplasm (Fig. 4B). The association of initial autophagic structures with mitochondria and endoplasmic reticulum was commonly found (Fig. 4A). The nucleus, with clumps of heterochromatin under the nuclear envelope, was often located near the periphery.

Confirming the macrophage autophagic activity, serial sections stained for CD68, iNOS, and LC3 (an autophagy marker) revealed that the intraepithelial macrophages express LC3 (Fig. 4B). In control and T+E₂ treated animals, Western blotting assays specifically detected two main reactive bands of approximately 16 kDa and 14 kDa, corresponding to the nonlipidated LC3-I and lipidated LC3-II forms, respectively (Klionsky *et al.* 2016). An increase in LC3-II band intensity and a decrease in LC3-I expression was observed in the LP prostate of T+E₂ treated animals, indicative of lipidation and consequently, increased autophagy (Fig. 4B).

M2 macrophages recruited to prostate epithelium after androgen withdrawn are involved in efferocytosis

For comparison, macrophage phenotypes were investigated in the prostate of castrated animals, which is a well-known model of the recruitment of intraepithelial macrophages. In control rats, macrophages were not detected in the epithelium of the adult VP and LP; whereas, a small number of CD68⁺ cells were observed in the stroma (Fig. 5A). Conversely, under androgen deprivation through surgical castration, there was an induction of CD68⁺ macrophage recruitment into the basal portion of the prostate epithelium (Fig. 5A and B). After castration, the intraepithelial CD68⁺ macrophages were increased 10-fold greater in the VP than in the LP. Treatment with DHT returned macrophages to levels comparable to sham-treatment, in both lobes (Fig. 5A).

Intraepithelial CD68⁺ macrophages present in the base of the epithelium after castration showed considerable variation in morphology (Fig. 5B). Some macrophages had cytoplasmic processes that were parallel to the basement membrane or interposed transversely between epithelial cells. The location and morphology of these macrophages made it easy to

confuse with basal cells of the prostate epithelium (Fig. 5A). Therefore, immunofluorescence for dual staining of CD68 and CK5 (basal cell marker) was performed, confirming that, although morphologically similar, macrophages and basal cells were distinct cells populating the basal epithelial compartment (Fig. 5B).

Intraepithelial CD68+ macrophages were commonly observed engulfing apoptotic cells (Fig. 5C). This finding was confirmed by staining of cells with the apoptosis marker cleaved caspase-3. A strong positive correlation between the number of intraepithelial CD68+ macrophages and cleaved caspase-3 positive epithelial cells was observed ($r = 0.8155$; $p < 0.0001$). Ultrastructurally, it was possible to identify long and slender macrophage projections, sometimes parallel to the basement membrane and also extending apically between luminal cells. Some pseudopodia-like projections were also seen. Confirming the light microscopy findings, macrophages were shown to be engulfing apoptotic cells (Fig. 5C).

To further characterize intraepithelial macrophage phenotypes, immunofluorescence was performed to distinguish M1 (iNOS) and M2 (CD163, CD206 and arginase) populations. Colocalization revealed that intraepithelial CD68+ macrophages recruited after castration expressed CD163, but did not express iNOS, CD206 and arginase (Fig. 5D). Macrophages found in the epithelium after castration were also immunopositive for the retinoid receptor RXR (data not shown).

Discussion

This study revealed significant recruitment of CD68+ macrophages into the prostatic epithelium, but only into areas restricted to the premalignant and malignant lesions, either found naturally during aging or induced by T+E₂. The intraepithelial macrophages associated with premalignant and malignant changes were morphologically and phenotypically distinct from those found in the epithelium of prostates undergoing regression after castration. Macrophages in the epithelial lesions were heavily involved in autophagy, while those found in the regressed epithelium were observed engulfing apoptotic cells. The study also revealed an unprecedented interaction between macrophages and basal cells in the aging pathological lesions, suggesting a potential crosstalk between the cells.

Intraepithelial macrophages were not detected in the normal prostate under physiological conditions, whereas the infiltration of macrophages into the epithelium was observed after castration and in the epithelial lesions. It was noteworthy that the number of intraepithelial macrophages varied according to the severity of the lesion, as cancer and HGPIN, a well-recognized pre-cancerous lesion, presented greater numbers of macrophages

than LGPIN and atrophy. Although other studies have also associated macrophage density to prostatic lesion severity (Lissbrant *et al.* 2000; Narayanan *et al.* 2009; Lindholm *et al.* 2010; Hu *et al.* 2015; Bergstrom *et al.* 2016; Fan *et al.* 2017; Melis *et al.* 2017; Jones *et al.* 2019), this association was not specifically characterized for intraepithelial macrophages. It is likely that macrophages with the closest contact with epithelial cells will have more pronounced paracrine effects on the epithelium than macrophages situated in the stroma (Lissbrant *et al.* 2000). Such paracrine interactions may play a role in increasing the proliferation of prostatic epithelial cells, thereby accelerating tumor progression (Lissbrant *et al.* 2000; Dang & Liou 2018; Jones *et al.* 2019). In support of this hypothesis, proliferating MCM7-positive epithelial cells showed a significant positive correlation with the presence of intraepithelial macrophages.

It is noteworthy that an intricate relationship was observed between CD68+ macrophages and the basal cells located in prostatic lesions. Long, thin arms of basal cell cytoplasm were seen extended around the intraepithelial macrophages. To our knowledge, this is the first report to show such intimate interaction between basal cells and macrophages within the prostate epithelium. Similar intricate association between basal cells and mononuclear phagocytes was previously found in the epididymis under physiological conditions (Da Silva *et al.* 2011; Shum *et al.* 2014). Herein the coexistence of macrophages and basal cells was restricted to altered areas in the prostate epithelium, and the cell-cell associations appeared even more intimate, as basal cells were seen surrounding the macrophages. It has been shown that prostate basal cells may function as a barrier to protect the luminal cells from insults, such as cytokines secreted by immune cells (Choi *et al.* 2012; Goldstein & Witte 2013). Therefore, it is possible that this reorganization of the basal cells may protect the luminal epithelial cells from potential harmful actions of immune cells, by isolating the macrophages.

Of particular interest was the differences observed in intraepithelial macrophage phenotypes, depending on the hormonal microenvironment. In the prostate from castrated rats, intraepithelial macrophages were CD68+/iNOS-/ CD163+/CD206-/ARGINASE-, whereas those in the prostatic lesions of aging males were CD68+/iNOS+/ CD163-/CD206+/ARGINASE+. These features are consistent with the M2 and TAM phenotypes, respectively. Corroborating our findings, CD68+/iNOS- macrophages were also found in the rat VP on day 5 after castration, although without being positive for CD163 (Silva *et al.* 2018; Barbosa *et al.* 2019). The M2 phenotype observed in the present study is compatible with the morphology showing frequent engulfment of apoptotic cells by intraepithelial macrophages,

which would indicate an active scavenging function involved in the clearance of apoptotic cells, an essential role for preventing the buildup of dangerous inflammation signals (Nagata *et al.* 2010). Indeed, data presented here show a strong positive correlation between the number of intraepithelial CD68+ macrophages and cleaved caspase-3 positive epithelial cells. It is known that M2 macrophages have greater capacity for clearance of apoptotic cells, a process also known as efferocytosis, which is important for the maintenance of tissue homeostasis (Werfel & Cook 2018; Jones *et al.* 2019; Myers *et al.* 2019).

Macrophages positive for CD206, a biomarker for the M2/TAM macrophage phenotype (Fan *et al.* 2017; Zarif *et al.* 2019), were observed in rat prostates showing early proliferative lesions, even before malignancy was established. Similar findings have been reported previously in breast tissue (Linde *et al.* 2018) and the prostate (Fan *et al.* 2017). In human PCa, a positive correlation has been reported between CD206+ cell density and the tumor grade, metastasis and castration resistance (Fan *et al.* 2017; Zarif *et al.* 2019). However, the determination of a functional role for macrophages having the CD68+/iNOS+/CD163-/CD206+/ARGINASE+ phenotype is more complicated. Although M2/TAM are considered poor nitric oxide (NO) producers (Mantovani *et al.* 2004), macrophages may score positive for iNOS in PCa (Klotz *et al.* 1998; Narayanan *et al.* 2009), as found in prostatic lesions of the present study. It has been proposed that contrasting with the high levels of NO produced by M1 macrophages, which is the mediator in tumor-cell killing, attenuated iNOS but increased arginase in M2 cells leads to low concentrations of NO associated with arginase-derived polyamines, thus contributing to vascularization and tumor cell proliferation and survival (Mantovani *et al.* 2004; Fukumura *et al.* 2006). The simultaneous expression of iNOS and arginase, considered M1 and M2 markers respectively, in the intraepithelial macrophages found in prostatic lesions further corroborate that the macrophage heterogeneity may not always fit well in the oversimplified dichotomy of the macrophage functional states of M1 and M2 (Jablonski *et al.* 2015; Lin *et al.* 2016).

Macrophages with diverse morphological features were recruited to the epithelium under different conditions, reinforcing the plasticity of these immune cells, depending on the hormonal environment. As such, frequent cytoplasmic projections from the intraepithelial macrophages were seen associated with apoptotic cells after androgen deprivation. In contrast, intraepithelial macrophages located in prostatic lesions were mostly enlarged, rounded cells, containing numerous and large autophagic vacuoles. It has been shown that engulfment of multiple targets induces molecular and morphological changes in macrophages, making them rounder in shape with less membrane extension, thus reducing their capacity to engulf new

targets (Zent & Elliott 2017). Such macrophage features corroborate our present findings. One possible mechanism for enhancing the degradation of excess cytoplasmic cargo by macrophages is the involvement of autophagic pathways, which would lead to the LC3-associated phagocytosis (Zent & Elliott 2017). Consistent with these events, the engorged macrophages were usually found in clusters within the prostate lesions and were proven positive for the autophagic-specific marker LC3. Autophagic activity in these cells was also confirmed by transmission electron microscopy, a well-recognized approach to study autophagy (Klionsky *et al.* 2016).

It should be pointed out that the clearance of apoptotic cells by macrophages, as observed in the regressed prostate after androgen withdrawn, may have physiological significance in the maintenance of homeostasis and an immune-silent environment (Silva *et al.* 2018; Werfel & Cook 2018; Myers *et al.* 2019). In the context of prostatic lesions, characterized by dysregulation in cell proliferation and death (Gonzaga *et al.* 2017), the immunosuppression created by efferocytosis may have deleterious consequences, favoring cancer progression (Werfel & Cook 2018; Jones *et al.* 2019; Myers *et al.* 2019). The degradation of cellular debris by macrophages induces the production of cholesterol-derivatives responsible for activating the nuclear receptor family of transcriptional factors, specifically retinoid X receptors (RXR), liver X receptor (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) (Werfel & Cook 2018; Myers *et al.* 2019). These nuclear receptors have been shown to be associated with the transcription of genes related to M2 polarization, as well as the activation of genes encoding anti-inflammatory cytokines and proteins involved in efferocytosis (Werfel & Cook 2018; Jones *et al.* 2019; Myers *et al.* 2019). In the present study, macrophages found in the epithelium after castration, as well as in the prostatic lesions, expressed RXR, thus corroborating the M2 phenotype observed and their possible functional role in efferocytosis.

In conclusion, morphologically and phenotypically distinct macrophages were found in aging prostatic epithelial lesions and in the castration-induced regressed epithelium. This highlights the plasticity of these inflammatory cells depending on the microenvironment. Intraepithelial macrophages with the TAM phenotype were found restricted to areas of premalignant and malignant lesions, in both the naturally formed lesions observed during aging and those induced by T+E₂ treatment. These data support the hypothesis that TAMs may be part of the inflammatory pathway involved in prostate cancer progression (Nonomura *et al.* 2011).

Acknowledgements

We are grateful to Dra. Vanessa Pinho for the donation of the anti-iNOS and anti-arginase antibodies. We are grateful to Dr. Gustavo Menezes and Maria Alice Lopes for the donation of the anti-CD206 antibody and for providing the equipment and technical support to produce 3D reconstructions. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy and fluorescence. Fluorescent pictures shown in this work were also obtained using the microscopes and equipment in the Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI- ICB/UFMG).

Financial support

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/Brazil (Grant and research fellowship to C.A.O., fellowship to H.W.G.); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Brazil (fellowships to G.H.C.S. and B.T.M.); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG/Brazil (Grant to C.A.O.) and Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG).

Author contributions statement

Study design: HWG GHCS CAO. Execution of experiments: HWG GHCS BTM. Data analysis and interpretation: HWG GHCS BTM CAO. Writing of the manuscript HWG RAH CAO. Technical and Intellectual support: HWG GABM RAH CAO.

The authors have nothing to disclose.

Supplementary information

[Movie S1](#). 3D reconstructions from a z-series of confocal images, evidencing basal cells projections (green) involving intraepithelial macrophages (orange).

References

- Banerjee S, Banerjee PP & Brown TR. (2000) Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology* 141,821-832.
- Barbosa GO, Silva JAF, Siqueira-Berti A, Nishan U, Rosa-Ribeiro R, Oliveira SBP, Baratti MO, Ferrucci D, Santana JCO, Damas-Souza DM, Bruni-Cardoso A, Augusto TM, Correada-Silva F, Moraes-Vieira PM, Stach-Machado DR, Felisbino SL, Menezes GB, Cesar CL & Carvalho HF. (2019) Castration-induced prostate epithelial cell apoptosis results from targeted oxidative stress attack of M1142 -macrophages. *J Cell Physiol* 234(10),19048-19058.
- Bergstrom SH, Hagglof C, Thysell E, Bergh A, Wikstrom P & Lundholm M. (2016) Extracellular Vesicles from Metastatic Rat Prostate Tumors Prime the Normal Prostate Tissue to Facilitate Tumor Growth. *Sci Rep* 6,31805.
- Bosland MC, Ford H & Horton L. (1995) Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17 beta or diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 16,1311-1317.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA & Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68,394-424.
- Campolina-Silva GH, Maria BT, Mahecha GAB & Oliveira CA. (2018) Reduced vitamin D receptor (VDR) expression and plasma vitamin D levels are associated with aging-related prostate lesions. *Prostate* 78,532-546.
- Campolina-Silva GH, Werneck-Gomes H, Maria BT, Barata MC, Torres MJ, Contreras HR, Mahecha GAB & Oliveira CA. Targeting Wistar rat as a model for studying benign, premalignant and malignant lesions of the prostate. *Life Sciences* 2019: in press (10.1016/j.lfs.2019.117149)
- Choi N, Zhang B, Zhang L, Ittmann M & Xin L. (2012) Adult murine prostate basal and luminal cells are self-sustained lineages that can both serve as targets for prostate cancer initiation. *Cancer Cell* 21,253-265.
- Corbellini LG, Driemeier D & Cruz CE. (2001) Immunohistochemistry combined with periodic acid-Schiff for bovine mammary gland with protothecal mastitis. *Biotech Histochem* 76,85-88.
- Dang T & Liou GY. (2018) Macrophage Cytokines Enhance Cell Proliferation of Normal Prostate Epithelial Cells through Activation of ERK and Akt. *Sci Rep* 8,7718.
- Desai KV, Michalowska AM, Kondaiah P, Ward JM, Shih JH & Green JE. (2004) Gene expression profiling identifies a unique androgen-mediated inflammatory/immune signature and a PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)-mediated apoptotic response specific to the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 18,2895-2907.

Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ & Breton S. (2011) A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141,653-663.

Erlandsson A, Carlsson J, Lundholm M, Falt A, Andersson SO, Andren O & Davidsson S. (2019) M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. *Prostate*. 79,363-369.

Evans GS & Chandler JA. (1987) Cell proliferation studies in the rat prostate: II. The effects of castration and androgen-induced regeneration upon basal and secretory cell proliferation. *Prostate* 11,339-351.

Fan HH, Li L, Zhang YM, Yang J, Li MC, Zeng FY & Deng F. (2017) PKCzeta in prostate cancer cells represses the recruitment and M2 polarization of macrophages in the prostate cancer microenvironment. *Tumour Biol* 39(6),1-9.

Franck-Lissbrant I, Haggstrom S, Damber JE & Bergh A. (1998) Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology* 139,451-456.

Goldstein AS & Witte ON. (2013) Does the microenvironment influence the cell types of origin for prostate cancer? *Genes Dev* 27,1539-1544.

Gonzaga ACR, Campolina-Silva GH, Werneck-Gomes H, Moura-Cordeiro JD, Santos LC, Mahecha GAB, Morais-Santos M & Oliveira CA. (2017) Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats. *Prostate* 77,937-948.

Hu W, Qian Y, Yu F, Liu W, Wu Y, Fang X & Hao W. (2015) Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. *Oncol Lett* 10,1390-1396.

Huang H, Wang C, Liu F, Li HZ, Peng G, Gao X et al. et Sun YH. Reciprocal Network between Cancer Stem-Like Cells and Macrophages Facilitates the Progression and Androgen Deprivation Therapy Resistance of Prostate Cancer. (2018) *Clin Cancer Res* 24,4612-4626.

Jones JD, Sinder BP, Paige D, Soki FN, Koh AJ, Thiele S, Shiozawa Y, Hofbauer LC, Daignault S, Roca H & McCauley LK. (2019) Trabectedin Reduces Skeletal Prostate Cancer Tumor Size in Association with Effects on M2 Macrophages and Efferocytosis. *Neoplasia* 21,172-184.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A et al. et Zughayer SM. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12,1-222.

Lindholm PF, Lu Y, Adley BP, Vladislav T, Jovanovic B, Sivapurapu N, Yang XJ & Kajdacsy-Balla A. (2010) Role of monocyte-lineage cells in prostate cancer cell invasion and tissue factor expression. *Prostate* 70,1672-1682.

- Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L & Bergh A. (2000) Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol* 17,445-451.
- Mantovani A, Allavena P & Sica A. (2004) Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 40,1660-1667.
- Melis MHM, Nevedomskaya E, van Burgsteden J, Cioni B, van Zeeburg HJT, Song JY, Zevenhoven J, Hawinkels L, de Visser KE & Bergman AM. (2017) The adaptive immune system promotes initiation of prostate carcinogenesis in a human c-Myc transgenic mouse model. *Oncotarget* 8,93867-93877.
- Morais-Santos M, Nunes AE, Oliveira AG, Moura-Cordeiro JD, Mahecha GA, Avellar MC & Oliveira CA. (2015) Changes in Estrogen Receptor ERbeta (ESR2) Expression without Changes in the Estradiol Levels in the Prostate of Aging Rats. *PLoS One* 10(7),e0131901.
- Morais-Santos M, Werneck-Gomes H, Campolina-Silva GH, Santos LC, Mahecha GAB, Hess RA & Oliveira CA. (2018) Basal Cells Show Increased Expression of Aromatase and Estrogen Receptor alpha in Prostate Epithelial Lesions of Male Aging Rats. *Endocrinology* 159,723-732.
- Myers KV, Amend SR & Pienta KJ. (2019) Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Mol Cancer* 18,94.
- Nagata S, Hanayama R & Kawane K. (2010) Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140,619-630.
- Narayanan NK, Nargi D, Horton L, Reddy BS, Bosland MC & Narayanan BA. (2009) Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. *Prostate* 69,133-141.
- Nonomura N, Takayama H, Nakayama M, Nakai Y, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Aozasa K & Tsujimura A. (2011) Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *Bju Int* 107, 1918-22.
- Oliveira AG, Coelho PH, Guedes FD, Mahecha GA, Hess RA & Oliveira CA. (2007) 5alpha-Androstane-3beta,17beta-diol (3beta-diol), an estrogenic metabolite of 5alpha-dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ERbeta expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids* 72,914-922.
- Ozten N, Vega K, Liehr J, Huang X, Horton L, Cavalieri EL, Rogan EG & Bosland MC. (2019) Role of Estrogen in Androgen-Induced Prostate Carcinogenesis in NBL Rats. *Horm Canc* 10,77-88.
- Prins GS, Ye SH, Birch L, Zhang X, Cheong A, Lin H, Calderon-Gierszal E, Groen J, Hu WY, Ho SM, & van Breemen RB. (2017) Prostate Cancer Risk and DNA Methylation Signatures in Aging Rats following Developmental BPA Exposure: A Dose-Response Analysis. *Environ Health Perspect* 125,077007

Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM & Cardiff RD. (2004) Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 64,2270-2305.

Shum WW, Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Roy JW, Hill E, Pittet MJ, Breton S & Da Silva N. (2014) Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 90(5),1-10.

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P & Mantovani A. (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Cancer Biol* 18,349-355.

Silva JAF, Bruni-Cardoso A, Augusto TM, Damas-Souza DM, Barbosa GO, Felisbino SL, Stach-Machado DR & Carvalho HF. (2018) Macrophage roles in the clearance of apoptotic cells and control of inflammation in the prostate gland after castration. *Prostate* 78,95-103.

Taylor RA & Risbridger GP. (2008) Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. *Curr Cancer Drug Targets* 8,490-497.

Wang G, Zhao D, Spring DJ & DePinho RA. (2018) Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev* 32, 1105-1140.

Werfel TA & Cook RS. (2018) Efferocytosis in the tumor microenvironment. *Semin Immunopathol* 40,545-554.

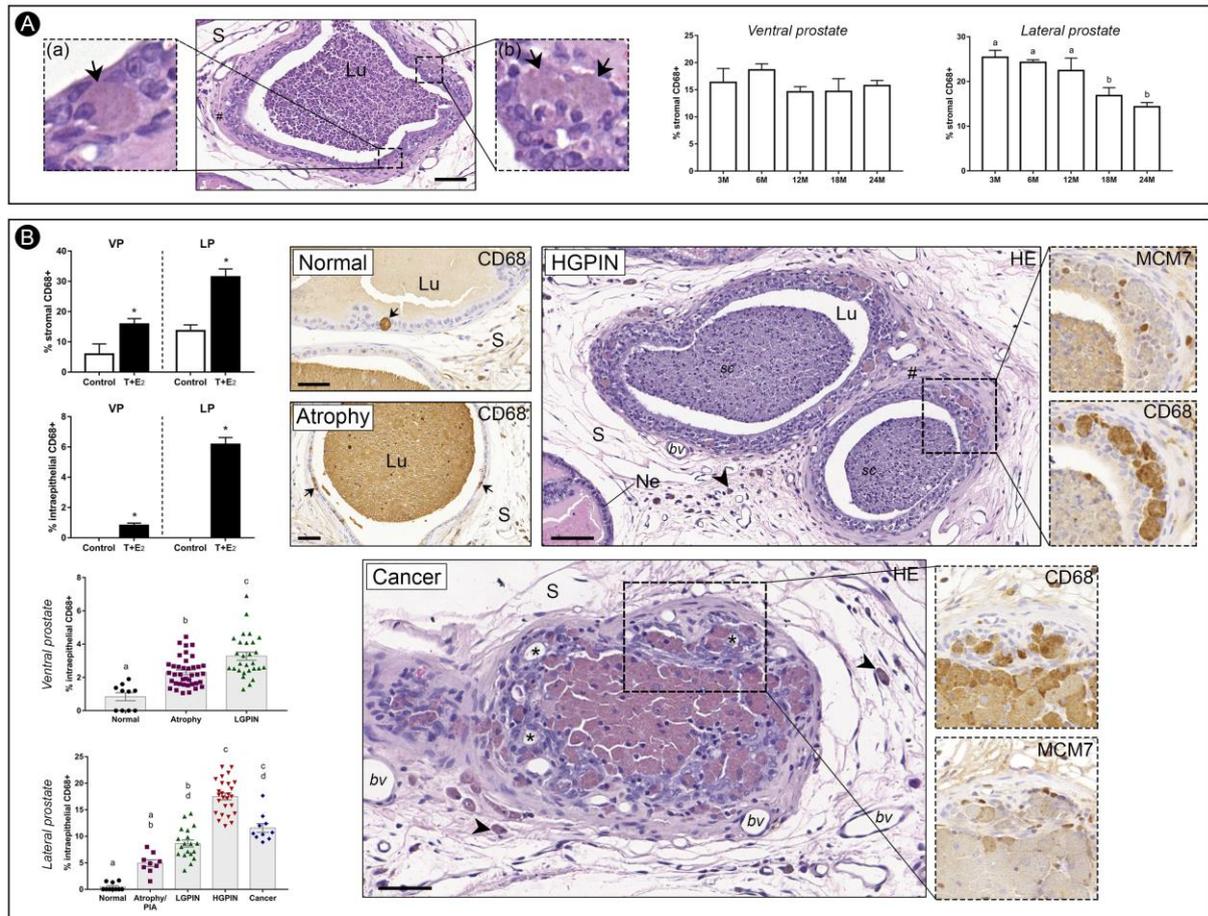


Fig. 1. Identification of macrophages in the rat prostate during aging and after T+E₂ treatment. (A) HE staining shows intraepithelial macrophages (arrow) at PIA lesion, highlighting isolated (a) and clustered (b) macrophages. Graphical representation of the variation in stromal CD68+ macrophages at aging ventral and lateral lobes. Mean values with different letters represent statistically significant differences ($p \leq 0.05$). (B) Graphical representation of the variation in stromal and intraepithelial CD68+ macrophages in ventral and lateral lobes after T+E₂ treatment. Mean values with different letters or * represent statistically significant differences ($p \leq 0.05$). HE, CD68 and MCM7 staining reveal stromal (arrowhead) and intraepithelial (arrow) macrophages in areas of normal epithelium, atrophy, HGPIN and cancer. Ne: normal epithelium. Lu: lumen. S: stroma. bv: blood vessel. sc: sloughed cells into the lumen. #: thickening of the periacinar stroma. Scale bars = 50 μ m.

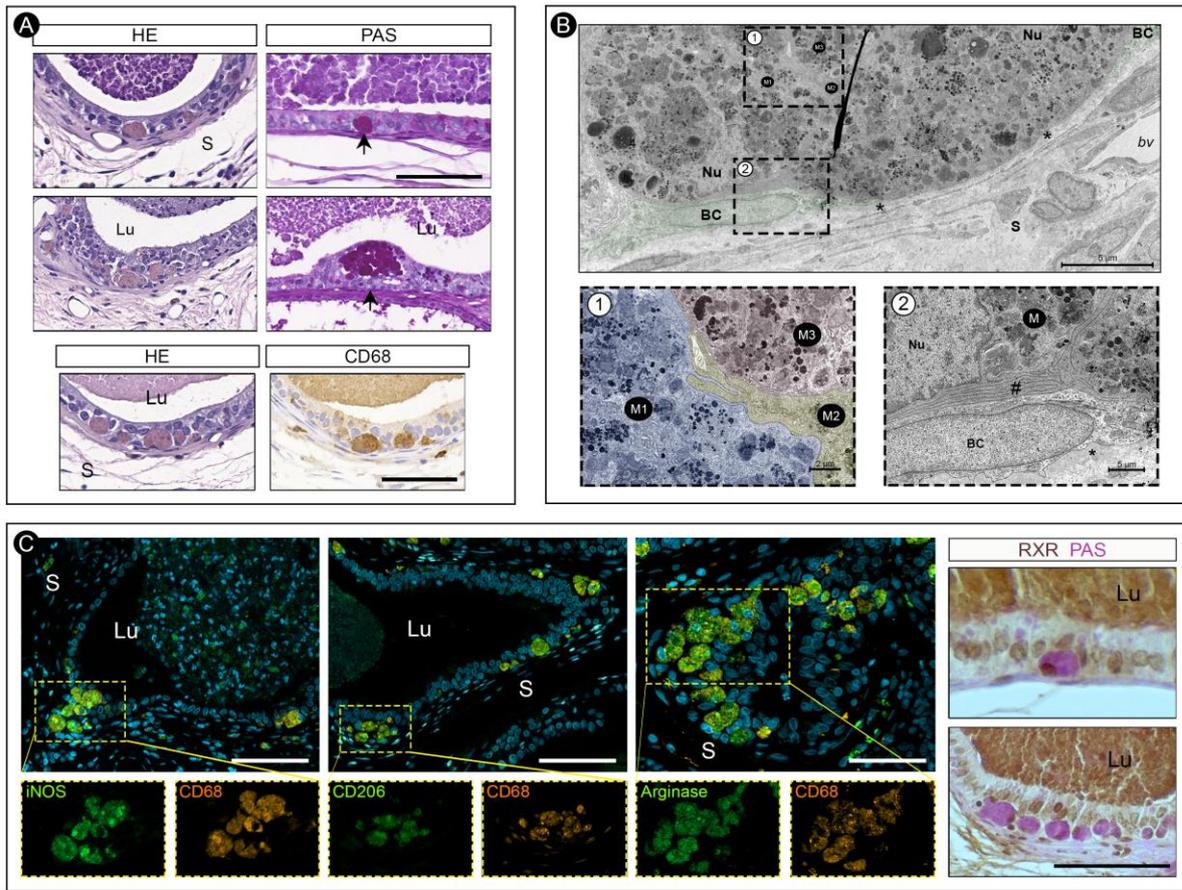


Fig. 2. Characterization of intraepithelial macrophages in the rat prostate found during aging and after T+E₂ treatment. (A) Identification of macrophages by HE, PAS and CD68 staining. Arrow: PAS-positive basement membrane. (B) Illustrative electron micrograph of a cluster of intraepithelial macrophages localized alongside basal cells (green) and basement membrane (*). The cluster area delimited by rectangle 1 was amplified depicting three juxtaposed macrophages (M1, M2 and M3). Amplified rectangle 2 area shows cytoplasmic interdigitations (#) between different macrophages of the cluster located above basal cell (green). BC: basal cell. M: macrophage. Nu: macrophage nuclei. *: basement membrane. bv: blood vessel. (C) Immunofluorescence showing the expression of iNOS, CD206 and arginase by the intraepithelial CD68+ macrophages. Dual staining revealed that PAS-positive macrophage (pink) also express RXR (brown). Lu: lumen. S: stroma. Scale bars = 50 μ m.

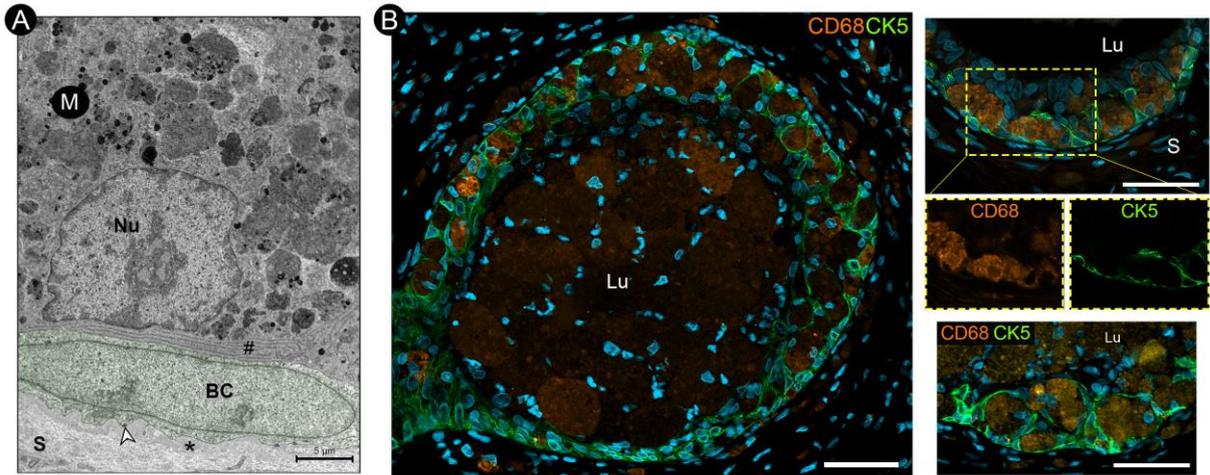


Fig. 3. Interaction between intraepithelial macrophages and basal cells in prostate lesions found after T+E₂ treatment. (A) Electron micrograph confirming the location of macrophages (M) above the epithelial basal cell (green). BC: basal cell. Arrowhead: hemidesmosome in basal cell. *: basement membrane. #: cytoplasmic interdigitations between different macrophages. **(B)** Colocalization of CD68 and the basal cell marker CK5 evidencing basal cells projections involving isolated or clusters of intraepithelial macrophages. Lu: lumen. S: stroma. Scale bars = 50 μ m.

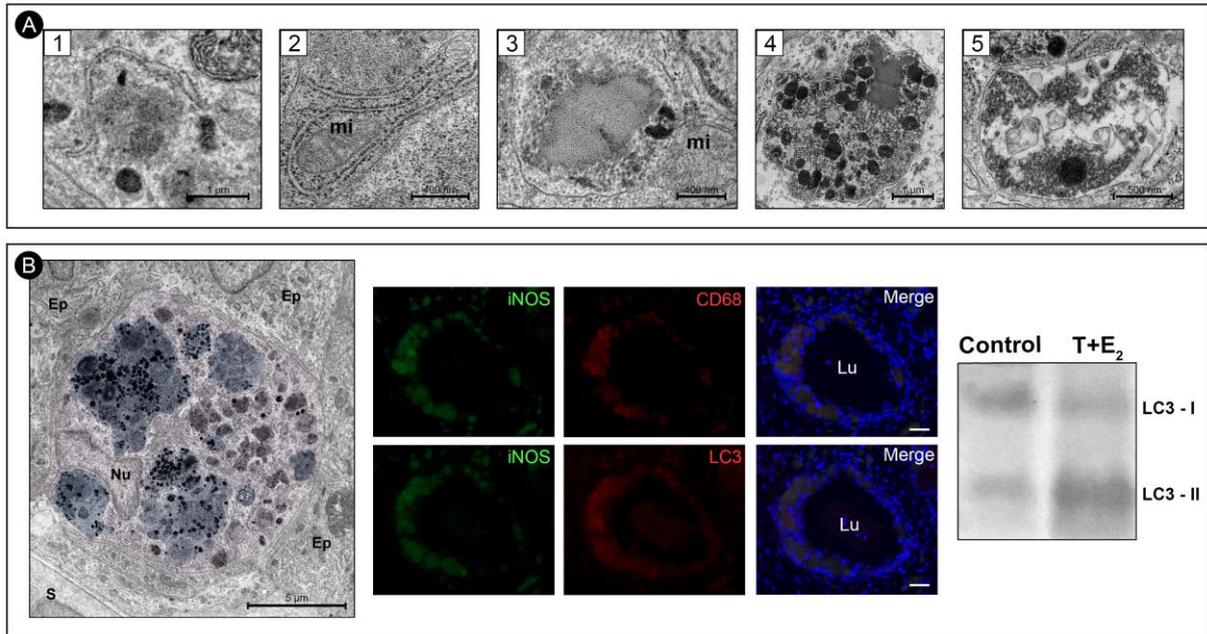


Fig. 4. Ultrastructural characterization and autophagic activity in intraepithelial macrophages found in prostate lesions after T+E₂ treatment. (A) Electron micrograph showing autophagy related structures in different stage of formation, from phagophore initial to autophagosome and autophagic vacuoles (numbered 1 to 5). Mi: mitochondria. (B) The autophagic vacuoles (blue) varied in size, occupying most of the macrophage cytoplasm (pink). Colocalization of iNOS and CD68 or LC3 markers by using serial sections confirm autophagic activity in the intraepithelial macrophages. Representative bands from the Western blotting of LC3 revealed two main bands corresponding to LC3-I (16 kDa) and LC3-II (14 kDa). Ep: epithelial cells. Nu: macrophage nuclei. S: stroma. Scale bars = 50 μ m.

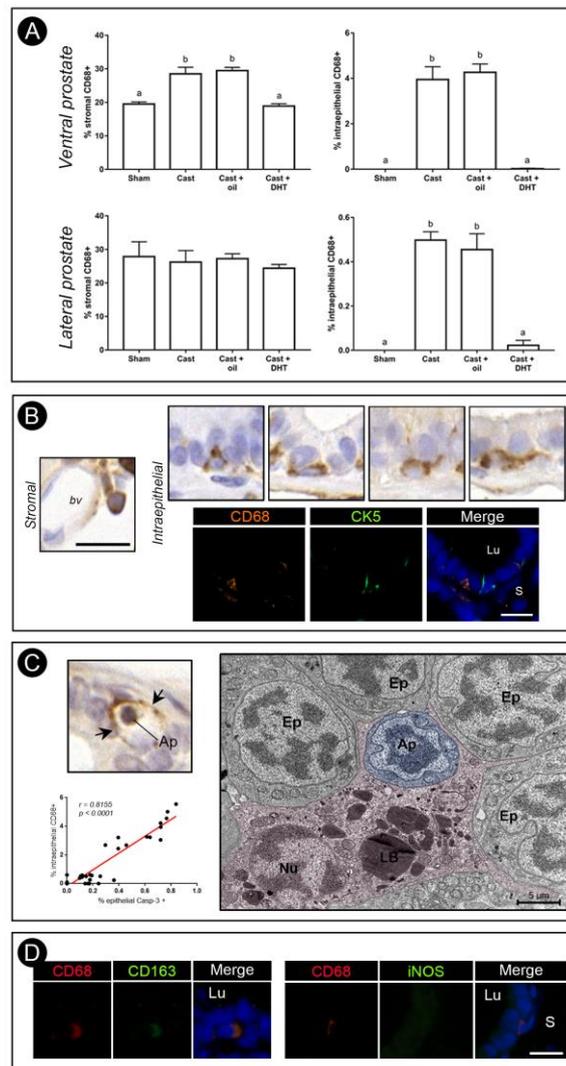


Fig. 5. Characterization of macrophages in the rat prostate after castration and androgen replacement. (A) Graphical representation of variation in the stromal and intraepithelial CD68+ macrophages in the ventral and lateral prostates. Mean values with different letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$). (B) CD68 immunostaining showing stromal and intraepithelial macrophages with varied morphology. Colocalization of CD68 and the basal cell marker CK5 confirmed that macrophages and basal cells are distinct cells. *bv* = blood vessel. (C) CD68 immunostaining showing intraepithelial macrophage (between arrows) apparently engulfing an apoptotic cell (Ap). There was strong positive correlation between the number of intraepithelial CD68+ macrophages and epithelial caspase-3 positive cells ($r = 0.8155$; $p < 0.0001$). Electron micrograph of castrated ventral prostate showing macrophage (pink) engulfing apoptotic cell (blue). (D) Colocalization of CD68 and CD163 or iNOS. Ep: epithelial cell. LB: lipid body. Lu: lumen. Nu: macrophage nuclei. S: stroma. Figures are representative of castrated rats. Scale bars in IHC = 20 μm , IF = 50 μm .

Table 1. Primary antibodies used in this study

Antibody	Type	Manufacturer, Catalogue number	Dilution	RRID
CD68	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, sc-59103	1:600 (IHC) 1:100 (IF)	AB_1120614
MCM7	Mouse monoclonal	Thermo Scientific, MS-862-P0	1:800 (IHC)	AB_145298
cleaved caspase-3	Rabbit polyclonal	Cell Signaling Technology, 9661	1:400 (IHC)	AB_2341188
RXR	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, sc-46659	1:300 (IHC)	AB_2184877
CK5	Rabbit polyclonal	BioLegend, 905501	1:4000 (IF)	AB_2565050
iNOS	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, sc-651	1:100 (IF)	AB_2298577
CD206	Mouse monoclonal	BD Biosciences, 564062	1:50 (IF)	AB_2738570
CD163	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, sc-33560	1:50 (IF)	AB_2074556
arginase-1	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, sc-20150	1:100 (IF)	AB_2058955
LC3 β	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, sc-376404	1:100 (IF) 1:1000 (WB)	AB_11150489

Abbreviations: IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; RRID, research resource identifier; WB, Western blotting.

Table 2. Incidence of prostatic lesions containing intraepithelial macrophages.

	<i>Ventral prostate</i>		<i>Lateral prostate</i>			
	Atrophy	LGPIN	PIA	LGPIN	HGPIN	Cancer
Natural lesions at aging (18 and 24 M)	12,5%	0	12,5%	0	18,7%	12,5%
Induced lesions (T+E₂ treatment)	85,7%	85%	100%	57,1%	100%	71,4%
<i>p-value</i>	0.0017	0.0001	0.0001	0.0040	0.0005	0.0107

M = months; PIA = proliferative inflammatory atrophy; LGPIN = low or high grade prostatic intraepithelial neoplasia; HGPIN = high grade prostatic intraepithelial neoplasia.

CAPÍTULO III

Resultados adicionais não publicados

Modulação das células basais de acordo com o microambiente hormonal prostático

Os ensaios de imuno-histoquímica e imunofluorescência para CK5 mostraram que as células basais estão amplamente distribuídas na próstata ventral de ratos Wistar, independentemente da idade dos animais, e apresentam morfologia variada (**Figura 8**). Algumas células são pequenas, arredondadas ou triangulares, e aparentemente restritas à base do epitélio, (**Figura 8 a, b**). Outras apresentam projeções citoplasmáticas paralelas à membrana basal, que se estendem na base do epitélio (**Figura 8 c, i**), ou projeções citoplasmáticas apicais, delgadas, de tamanhos variados, que se estendem em direção ao lúmen prostático, chegando às vezes a alcançá-lo (**Figura 8 d, g, h, j**). Adicionalmente, algumas células basais emitem projeções citoplasmáticas apicais que se curvam em direção à célula epitelial vizinha (**Figura 8 e, f, g, k** [Vídeo 1](#)).

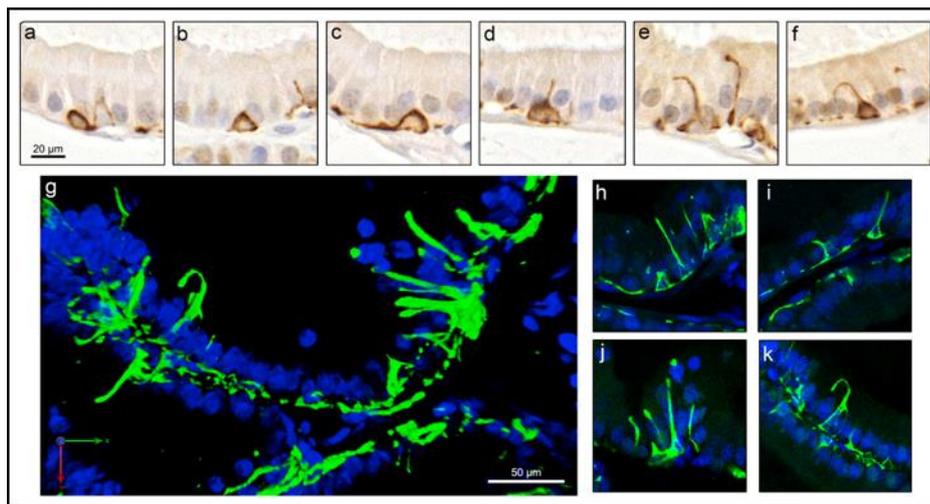


Figura 8. Variação morfológica das células basais CK5-positivas encontradas ao longo do epitélio prostático de ratos Wistar. As células basais são pequenas, arredondadas ou triangulares, situadas normalmente na base do epitélio, podendo apresentar projeções basais ou apicais. Células basais CK5-positivas marcadas em marrom na imuno-histoquímica e em verde na imunofluorescência. Imagem g é representativa do [Vídeo 1](#).

Ao longo do envelhecimento, considerando áreas de epitélio normal, foi detectado um discreto aumento do número de células basais CK5-positivas, que representaram cerca de 10% das células epiteliais prostáticas em ratos adultos jovens (3 e 6 meses) e 17% em ratos idosos (18 e 24 meses) (**Figura 9**). Por outro lado, o número de células basais que emitem projeções citoplasmáticas apicais (definida como a célula cuja projeção citoplasmática estava localizada acima dos núcleos das células epiteliais adjacentes, de acordo com critério estabelecido por Shum *et al.* (2008)) reduziu ao longo do envelhecimento (**Figura 9**).

Enquanto essas células representaram cerca de 40% das células basais encontradas no epitélio de ratos Wistar aos 3 meses de idade, elas representaram 20% aos 18 meses e 14% aos 24 meses, uma redução de mais de 50%.

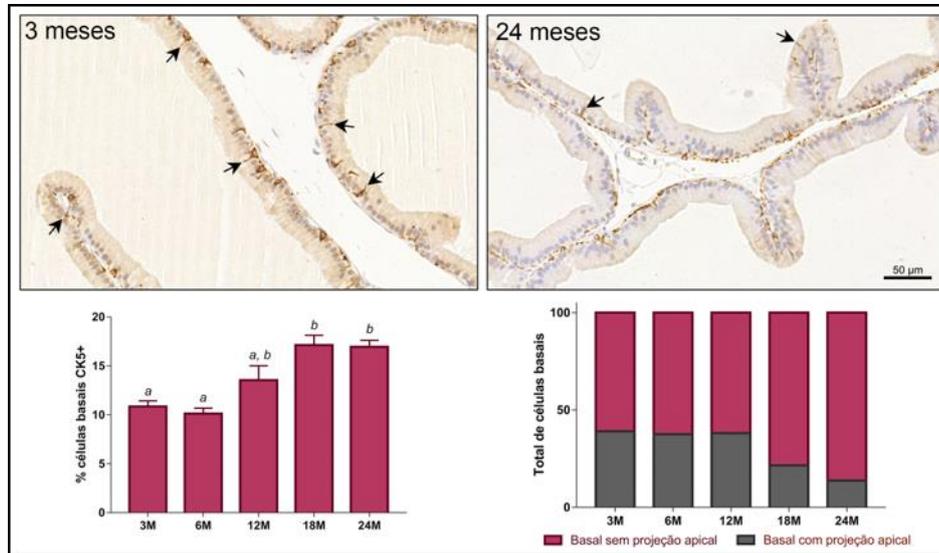


Figura 9. Variação quantitativa das células basais CK5-positivas encontradas no epitélio prostático de ratos Wistar ao longo do envelhecimento. Setas: células basais emitindo projeções citoplasmáticas apicais. Letras (*a*, *b*) indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; $n = 5$).

Em seguida, visando compreender a modulação das células basais prostáticas de acordo com o microambiente hormonal, ratos Wistar machos de 3 meses de idade foram submetidos à castração cirúrgica bilateral, seguida de reposição hormonal com estradiol (E_2) ou DHT, durante 7 dias. Os ensaios de imuno-histoquímicas para CK5 mostraram que nos animais controle (sham), as células basais corresponderam a cerca de 9% das células epiteliais prostáticas. A castração bilateral aumentou o número de células basais do epitélio para aproximadamente 14%, proporção que se manteve após reposição com E_2 . O tratamento com DHT reduziu a quantidade de células basais para níveis comparáveis ao controle (**Figura 10**).

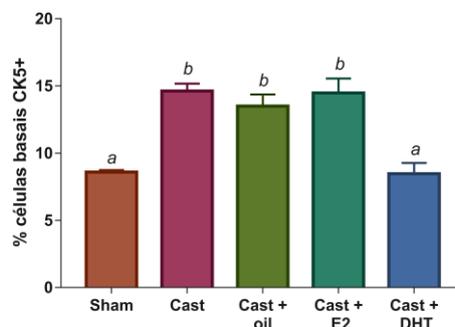


Figura 10. Variação quantitativa das células basais CK5-positivas presentes no epitélio prostático de ratos Wistar após castração e reposição hormonal. Letras (*a*, *b*) indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; $n = 5$).

Sabendo que as células basais constituem uma população heterogênea, decidimos investigar a possibilidade de modulação tanto de uma subpopulação indiferenciada quanto de uma mais diferenciada, conforme proposto por Wang *et al.* (2001). Para isso, investigamos a subpopulação p63+, importante por conter as células tronco basais prostáticas (Lee *et al.* 2014), e as células basais que expressam aromatase mais intensamente, considerada uma subpopulação com fenótipo mais diferenciado (Morais-Santos *et al.* 2018).

Ao longo do envelhecimento, considerando áreas de epitélio normal, foi detectada uma redução do número de células basais p63-positivas, que representaram cerca de 5% das células epiteliais prostáticas em ratos adultos jovens (3 e 6 meses) e 2% em ratos idosos (18 e 24 meses) (**Figura 11**).

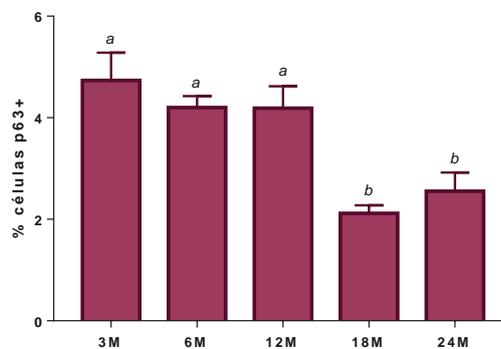


Figura 11. Variação quantitativa das células basais p63-positivas encontradas no epitélio prostático de ratos Wistar ao longo do envelhecimento. Letras (*a*, *b*) indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; $n = 5$).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram a presença de células intensamente coradas para aromatase no epitélio prostático, e que essas células pertenciam à população de células basais (Morais-Santos *et al.* 2018). Essas células foram denominadas células basais Arom+. Foi previamente mostrado que a quantidade de células basais Arom+ no epitélio prostático normal não variou ao longo do envelhecimento (Morais-Santos *et al.* 2018). Em ratos de 3 meses de idade, as células basais Arom+ representaram cerca de 2% do total de células do epitélio prostático, ou seja, 20% das células basais (**Figura 12**). A castração bilateral aumentou o número de células basais Arom+ do epitélio para cerca de 6% do total de células epiteliais e 45% das células basais. Após castração + reposição com E₂, o aumento foi ainda maior, alcançando 14% do total de células epiteliais e 99% das células basais. O tratamento com DHT reduziu o número de células basais Arom+ para níveis comparáveis ao controle.

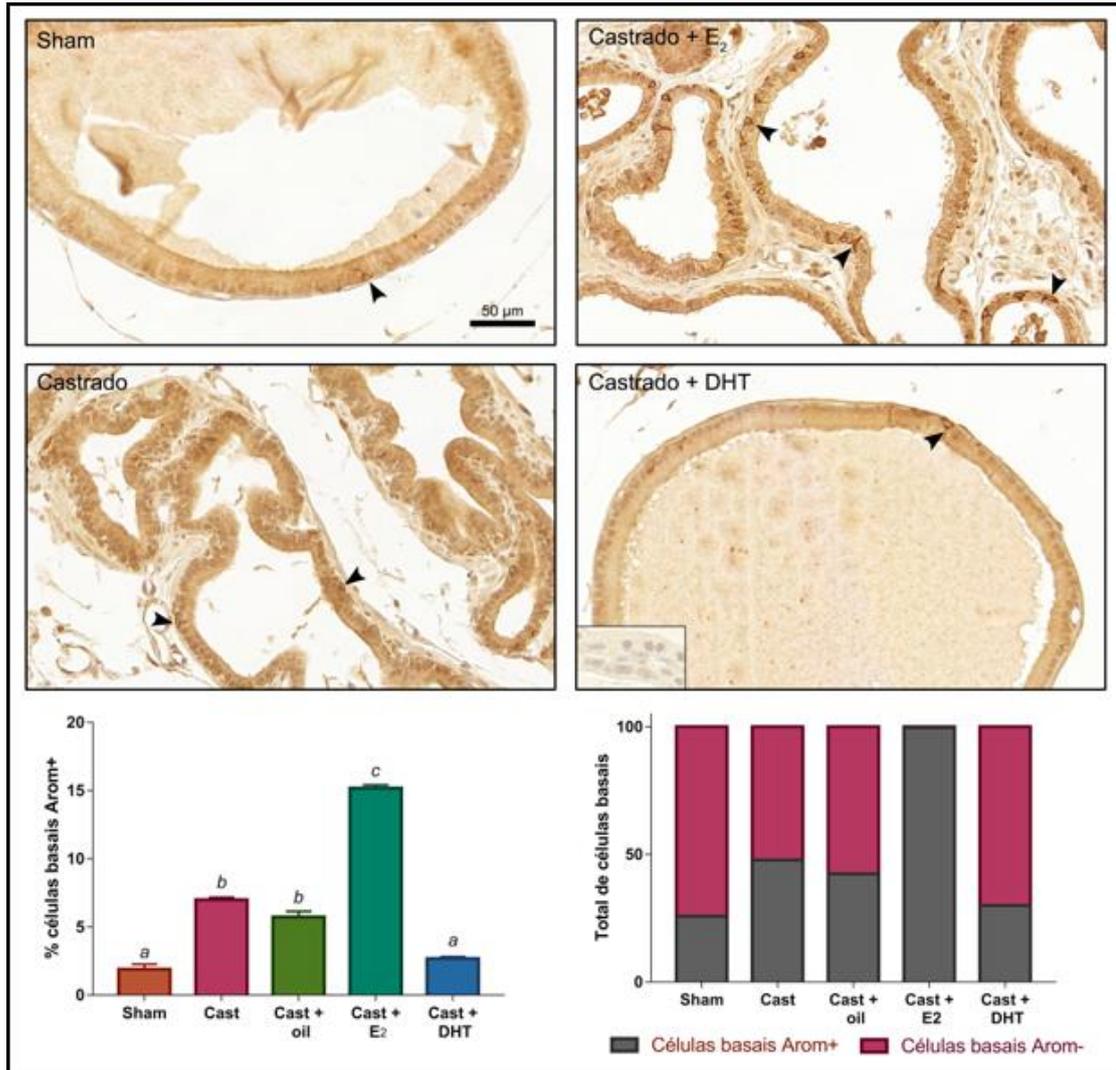


Figura 12. Variação quantitativa das células basais intensamente coradas para aromatase presentes no epitélio prostático de ratos Wistar após castração e reposição hormonal. Letras (*a*, *b*, *c*) indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$; $n = 5$).

V. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

V. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

Nossos resultados fornecem evidências de que ratos Wistar podem ser um modelo pré-clínico adequado para os estudos referentes às desordens prostáticas relacionadas ao envelhecimento, como o CaP. Tal conclusão é baseada na observação do surgimento de lesões benignas, pré-malignas e malignas em ratos idosos, além de uma incidência de CaP de 36% que aumentou para 100% após a exposição à testosterona e estradiol. Dessa forma, assim como observado em humanos, o desenvolvimento de CaP em ratos Wistar parece resultar de um processo lento e de várias etapas envolvendo o desenvolvimento e a progressão de lesões pré-malignas.

O tratamento de ratos Wistar com testosterona e estradiol causou um maciço infiltrado de células imunes mononucleares para a próstata. Essas células foram observadas no estroma circundando os ácinos, no lúmen e até mesmo no epitélio, onde estavam intimamente associadas às lesões pré-malignas como PIA e PIN. Considerando que a identificação dos tipos de leucócitos envolvidos na progressão das lesões pode ser valiosa para entender melhor a relação entre inflamação e câncer, observamos que macrófagos estão presentes no epitélio prostático em áreas restritas às lesões pré-malignas e malignas, tanto observadas naturalmente ao longo do envelhecimento quanto após tratamento com testosterona e estradiol. Esses macrófagos apresentaram fenótipo TAM e foram encontrados associados às células epiteliais em proliferação, corroborando a hipótese de que as TAM podem fazer parte da via inflamatória envolvida na progressão do CaP (Nonomura *et al.* 2011).

De forma pioneira, mostramos uma íntima interação entre os macrófagos e as células basais em lesões prostáticas, onde delgadas projeções citoplasmáticas das células basais foram observadas se estendendo ao redor dos macrófagos intraepiteliais. Considerando que as células basais da próstata podem funcionar como uma barreira para proteger as células luminais de insultos vindos do estroma adjacente (Choi *et al.* 2012; Goldstein e Witte 2013), é possível que essa reorganização das células basais, de forma a isolar os macrófagos intraepiteliais, possa proteger as demais células epiteliais das possíveis ações nocivas dessas células imunes.

Assim como descrito no epidídimo (Shum *et al.* 2008; Roy *et al.* 2016), observamos também que algumas células basais prostáticas apresentaram projeções citoplasmáticas apicais que por vezes atingiam o lúmen prostático. Sabe-se que as projeções citoplasmáticas apicais encontradas nas células basais se entendem e retraem periodicamente em direção ao lúmen, podendo até ultrapassá-lo para monitorar o ambiente luminal, modulando sua função

em resposta à demanda fisiológica (Roy *et al.* 2016). No presente trabalho, ampliamos a concepção do monitoramento exercido pelas células basais, uma vez que observamos que elas emitem projeções citoplasmáticas apicais que se estendem não apenas em direção ao lúmen, mas também se curvam em direção às células epiteliais vizinhas. Dessa forma, é possível que as projeções emitidas pelas células basais sejam capazes de monitorar também as células epiteliais ao seu redor, demonstrando assim uma forma alternativa de interação entre essas células. Mais estudos são necessários para compreender as funções exercidas pelos prolongamentos emitidos pelas células basais, bem como os mecanismos que regulam essa plasticidade de movimento.

Foi previamente mostrado que a quantidade de células basais intensamente coradas para aromatase não variou ao longo do envelhecimento (Morais-Santos *et al.* 2018). No presente trabalho, observamos um aumento da quantidade de células basais CK5-positivas no epitélio prostático ao longo do envelhecimento, enquanto as células basais p63-positivas reduziram. Esses resultados mostram que de fato, as células basais constituem uma população heterogênea, cujas subpopulações são moduladas de maneira diferente de acordo com o microambiente. Mais estudos são necessários para compreender a função desempenhada por cada uma dessas subpopulações tanto no contexto fisiológico quanto no patológico.

Considerando o conjunto de resultados obtidos, podemos concluir que os macrófagos e as células basais são células extremamente plásticas, capazes de adaptar a morfologia e o fenótipo dependendo do microambiente local. Além disso, mostramos a importância desses dois tipos celulares, bem como a interação entre elas, no desenvolvimento e progressão das lesões prostáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANERJEE, S.; BANERJEE, P. P.; BROWN, T. R. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. **Endocrinology**. v. 141, n. 2, p. 821-832, 2000
- BARRON, D. A.; ROWLEY, D. R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. **Endocrine-Related Cancer**. v. 19, n. 6, p. R187-204, 2012
- BEATTIE, M. C.; ADEKOLA, L.; PAPADOPOULOS, V.; CHEN, H.; ZIRKIN, B. R. Leydig cell aging and hypogonadism. **Experimental Gerontology**. v. 68, p. 87-91, 2015
- BECKER, D. J.; IYENGAR, A. D.; PUNEKAR, S. R.; NG, J.; ZAMAN, A.; LOEB, S.; BECKER, K. D.; MAKAROV, D. Treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer with abiraterone and enzalutamide despite PSA progression. **Anticancer Research**. v. 39, n. 5, p. 2467-2473, 2019
- BEGLEY, L. A.; KASINA, S.; MACDONALD, J.; MACOSKA, J. A. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. **Cytokine**. v. 43, n. 2, p. 194-199, 2008
- BERGH, A.; DAMBER, J. E.; VAN ROOIJEN, N. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. **Journal of Endocrinology**. v. 136, n. 3, p. 407-413, 1993
- BERNOULLI, J.; YATKIN, E.; KONKOL, Y.; TALVITIE, E. M.; SANTTI, R.; STRENG, T. Prostatic inflammation and obstructive voiding in the adult Noble rat: impact of the testosterone to estradiol ratio in serum. **Prostate**. v. 68, n. 12, p. 1296-1306, 2008
- BETHEL, C. R.; FAITH, D.; LI, X.; GUAN, B.; HICKS, J. L.; LAN, F.; JENKINS, R. B.; BIEBERICH, C. J.; DE MARZO, A. M. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. **Cancer Research**. v. 66, n. 22, p. 10683-10690, 2006
- BIANCHI-FRIAS, D.; DAMODARASAMY, M.; HERNANDEZ, S. A.; GIL DA COSTA, R. M.; VAKAR-LOPEZ, F.; COLEMAN, I. M.; REED, M. J.; NELSON, P. S. The Aged Microenvironment Influences the Tumorigenic Potential of Malignant Prostate Epithelial Cells. **Molecular Cancer Research**. v. 17, n. 1, p. 321-331, 2019
- BIANCHI-FRIAS, D.; VAKAR-LOPEZ, F.; COLEMAN, I. M.; PLYMATE, S. R.; REED, M. J.; NELSON, P. S. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. **PloS One**. v. 5, n. 9, 2010
- BIANCO, J. J.; HANDELSMAN, D. J.; PEDERSEN, J. S.; RISBRIDGER, G. P. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. **Endocrinology**. v. 143, n. 12, p. 4922-4933, 2002

BOSTWICK, D. G.; DE LA ROZA, G.; DUNDORE, P.; CORICA, F. A.; ICZKOWSKI, K. A. Intraepithelial and stromal lymphocytes in the normal human prostate. **Prostate**. v. 55, n. 3, p. 187-193, 2003

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018

BRETON, S.; NAIR, A. V.; BATTISTONE, M. A. Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. **Andrology**. v. 7, n. 5, p. 631-643, 2019

CAPELLINO, S.; MONTAGNA, P.; VILLAGGIO, B.; SULLI, A.; SOLDANO, S.; FERRERO, S.; REMORGIDA, V.; CUTOLO, M. Role of estrogens in inflammatory response: expression of estrogen receptors in peritoneal fluid macrophages from endometriosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1069, p. 263-267, 2006

CARREAU, S.; SILANDRE, D.; BOURGUIBA, S.; HAMDEN, K.; SAID, L.; LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; DELALANDE, C. Estrogens and male reproduction: a new concept. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, n. 6, p. 761-768, 2007

CARRUBA, G.; D'AGOSTINO, P.; MIELE, M.; CALABRO, M.; BARBERA, C.; BELLA, G. D.; MILANO, S.; FERLAZZO, V.; CARUSO, R.; ROSA, M. L.; COCCIADIFERRO, L.; CAMPISI, I.; CASTAGNETTA, L.; CILLARI, E. Estrogen regulates cytokine production and apoptosis in PMA-differentiated, macrophage-like U937 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 90, n. 1, p. 187-196, 2003

CHOI, N.; ZHANG, B.; ZHANG, L.; ITTMANN, M.; XIN, L. Adult murine prostate basal and luminal cells are self-sustained lineages that can both serve as targets for prostate cancer initiation. **Cancer Cell**. v. 21, n. 2, p. 253-265, 2012

COPELAND, B. T.; SHALLAL, H.; SHEN, C.; PIENTA, K. J.; FOSS, C. A.; POMPER, M. G. Imaging and Characterization of Macrophage Distribution in Mouse Models of Human Prostate Cancer. **Molecular Imaging and Biology**. v. 21, n 6, p. 1054-1063, 2019

CRAIG, M.; YING, C.; LOBERG, R. D. Co-inoculation of prostate cancer cells with U937 enhances tumor growth and angiogenesis in vivo. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 103, n. 1, p. 1-8, 2008

CROWELL, P. D.; FOX, J. J.; HASHIMOTO, T.; DIAZ, J. A.; NAVARRO, H. I.; HENRY, G. H.; FELDMAR, B. A.; LOWE, M. G.; GARCIA, A. J.; WU, Y. E.; SAJED, D. P.; STRAND, D. W.; GOLDSTEIN, A. S. Expansion of Luminal Progenitor Cells in the Aging Mouse and Human Prostate. **Cell Reports**. v.28, n 6, p. 1499-1510 e1496, 2019

CUNHA, G. R.; ALARID, E. T.; TURNER, T.; DONJACOUR, A. A.; BOUTIN, E. L.; FOSTER, B. A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. **Journal of Andrology**. v. 13, n. 6, p. 465-475, 1992

CUTOLO, M.; CAPELLINO, S.; MONTAGNA, P.; GHIORZO, P.; SULLI, A.; VILLAGGIO, B. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. **Arthritis Research & Therapy**. v. 7, n. 5, p. R1124-1132, 2005

D'AGOSTINO, P.; MILANO, S.; BARBERA, C.; DI BELLA, G.; LA ROSA, M.; FERLAZZO, V.; FARRUGGIO, R.; MICELI, D. M.; MIELE, M.; CASTAGNETTA, L.; CILLARI, E. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 876, p. 426-429, 1999

DANG, T.; LIOU, G. Y. Macrophage Cytokines Enhance Cell Proliferation of Normal Prostate Epithelial Cells through Activation of ERK and Akt. **Scientific Reports**. v. 8, n. 1, p. 7718, 2018

DAVIDSSON, S.; OHLSON, A. L.; ANDERSSON, S. O.; FALL, K.; MEISNER, A.; FIORENTINO, M.; ANDREN, O.; RIDER, J. R. CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3(+) regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer. **Modern Pathology**. v. 26, n. 3, p. 448-455, 2013

DE MARZO, A. M.; MARCHI, V. L.; EPSTEIN, J. I.; NELSON, W. G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **American Journal of Pathology**. v. 155, n. 6, p. 1985-1992, 1999

DE MARZO, A. M.; MEEKER, A. K.; EPSTEIN, J. I.; COFFEY, D. S. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. **American Journal of Pathology**. v. 153, n. 3, p. 911-919, 1998

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRONBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews: Cancer**. v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007

DE RONDE, W.; DE JONG, F. H. Aromatase inhibitors in men: effects and therapeutic options. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 9, p. 93, 2011

DESAI, K. V.; MICHALOWSKA, A. M.; KONDAIAH, P.; WARD, J. M.; SHIH, J. H.; GREEN, J. E. Gene expression profiling identifies a unique androgen-mediated inflammatory/immune signature and a PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)-mediated apoptotic response specific to the rat ventral prostate. **Molecular Endocrinology**. v. 18, n. 12, p. 2895-2907, 2004

DIFUCCIA, B.; KEITH, I.; TEUNISSEN, B.; MOON, T. Diagnosis of prostatic inflammation: efficacy of needle biopsies versus tissue blocks. **Urology**. v. 65, n. 3, p. 445-448, 2005

EL-ALFY, M.; LUU-THE, V.; HUANG, X. F.; BERGER, L.; LABRIE, F.; PELLETIER, G. Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. **Endocrinology**. v. 140, n. 3, p. 1481-1491, 1999

EL-ALFY, M.; PELLETIER, G.; HERMO, L. S.; LABRIE, F. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. **Microscopy Research and Technique**. v. 51, n. 5, p. 436-446, 2000

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1155, p. 174-186, 2009

ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 118, n. 4-5, p. 246-251, 2010

ELLEM, S. J.; TAYLOR, R. A.; FURIC, L.; LARSSON, O.; FRYDENBERG, M.; POOK, D.; PEDERSEN, J.; CAWSEY, B.; TROTТА, A.; NEED, E.; BUCHANAN, G.; RISBRIDGER, G. P. A pro-tumourigenic loop at the human prostate tumour interface orchestrated by oestrogen, CXCL12 and mast cell recruitment. **Journal of Pathology**. v. 234, n. 1, p. 86-98, 2014

ELLEM, S. J.; WANG, H.; POUTANEN, M.; RISBRIDGER, G. P. Increased endogenous estrogen synthesis leads to the sequential induction of prostatic inflammation (prostatitis) and prostatic pre-malignancy. **American Journal of Pathology**. v. 175, n. 3, p. 1187-1199, 2009

ENGLISH, H. F.; SANTEN, R. J.; ISAACS, J. T. Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. **Prostate**. v. 11, n. 3, p. 229-242, 1987

ERLANDSSON, A.; CARLSSON, J.; LUNDHOLM, M.; FALT, A.; ANDERSSON, S. O.; ANDREN, O.; DAVIDSSON, S. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. **Prostate**. v. 79, n. 4, p. 363-369, 2019

ESCAMILLA, J.; SCHOKRPUR, S.; LIU, C.; PRICEMAN, S. J.; MOUGHON, D.; JIANG, Z.; POULIOT, F.; MAGYAR, C.; SUNG, J. L.; XU, J.; DENG, G.; WEST, B. L.; BOLLAG, G.; FRADET, Y.; LACOMBE, L.; JUNG, M. E.; HUANG, J.; WU, L. CSF1 receptor targeting in prostate cancer reverses macrophage-mediated resistance to androgen blockade therapy. **Cancer Research**. v. 75, n. 6, p. 950-962, 2015

EVANS, G. S.; CHANDLER, J. A. Cell proliferation studies in the rat prostate: II. The effects of castration and androgen-induced regeneration upon basal and secretory cell proliferation. **Prostate**. v. 11, n. 4, p. 339-351, 1987

FAIR, W. R.; CORDONNIER, J. J. The pH of prostatic fluid: a reappraisal and therapeutic implications. **Journal of Urology**. v. 120, n. 6, p. 695-698, 1978

FAN, H. H.; LI, L.; ZHANG, Y. M.; YANG, J.; LI, M. C.; ZENG, F. Y.; DENG, F. PKCzeta in prostate cancer cells represses the recruitment and M2 polarization of macrophages in the prostate cancer microenvironment. **Tumour Biology**. v.39, n. 6, 2017

FLINT, M.; MCALISTER, D. A.; AGARWAL, A.; PLESSIS, S. Male Accessory Sex Glands: Structure and Function. In: **Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology**. CRC Press, 1st, cap 9, 2015

FOX, J. J.; NAVARRO, H. I.; HASHIMOTO, T.; GARCIA, A. J.; GOLDSTEIN, A. S. Mass cytometry reveals species-specific differences and a new level of complexity for immune cells in the prostate. **Am J Clin Exp Urol**. v. 7, n. 4, p. 281-296, 2019

FRANCK-LISSBRANT, I.; HAGGSTROM, S.; DAMBER, J. E.; BERGH, A. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. **Endocrinology**. v. 139, n. 2, p. 451-456, 1998

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews: Cancer**. v. 6, n. 7, p. 521-534, 2006

GANNON, P. O.; POISSON, A. O.; DELVOYE, N.; LAPOINTE, R.; MES-MASSON, A. M.; SAAD, F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. **Journal of Immunological Methods**. v. 348, n. 1-2, p. 9-17, 2009

GILLERAN, J. P.; PUTZ, O.; DEJONG, M.; DEJONG, S.; BIRCH, L.; PU, Y.; HUANG, L.; PRINS, G. S. The role of prolactin in the prostatic inflammatory response to neonatal estrogen. **Endocrinology**. v. 144, n. 5, p. 2046-2054, 2003

GOLDSTEIN, A. S.; HUANG, J.; GUO, C.; GARRAWAY, I. P.; WITTE, O. N. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. **Science**. v. 329, n. 5991, p. 568-571, 2010

GOLDSTEIN, A. S.; WITTE, O. N. Does the microenvironment influence the cell types of origin for prostate cancer? **Genes and Development**. v. 27, n. 14, p. 1539-1544, 2013

GONZAGA, A. C. R.; CAMPOLINA-SILVA, G. H.; WERNECK-GOMES, H.; MOURA-CORDEIRO, J. D.; SANTOS, L. C.; MAHECHA, G. A. B.; MORAIS-SANTOS, M.; OLIVEIRA, C. A. Profile of cell proliferation and apoptosis activated by the intrinsic and extrinsic pathways in the prostate of aging rats. **Prostate**. v. 77, n. 9, p. 937-948, 2017

GRIGORE, A. D.; BEN-JACOB, E.; FARACH-CARSON, M. C. Prostate cancer and neuroendocrine differentiation: more neuronal, less endocrine? **Frontiers in Oncology**. v. 5, p. 37, 2015

GROSSMANN, M. E.; HUANG, H.; TINDALL, D. J. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 93, n. 22, p. 1687-1697, 2001

HABERMANN, H.; CHANG, W. Y.; BIRCH, L.; MEHTA, P.; PRINS, G. S. Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate. **Endocrinology**. v. 142, n. 1, p. 359-369, 2001

HARRIS, M. T.; FELDBERG, R. S.; LAU, K. M.; LAZARUS, N. H.; COCHRANE, D. E. Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate. **Prostate**. v. 44, n. 1, p. 19-25, 2000

HAYWARD, S. W.; BASKIN, L. S.; HAUGHNEY, P. C.; FOSTER, B. A.; CUNHA, A. R.; DAHIYA, R.; PRINS, G. S.; CUNHA, G. R. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. **Acta Anatomica**. v.155, n.2, p. 94-103, 1996a

HAYWARD, S. W.; BRODY, J. R.; CUNHA, G. R. An edgewise look at basal epithelial cells: three-dimensional views of the rat prostate, mammary gland and salivary gland. **Differentiation**. v. 60, n. 4, p. 219-227, 1996b

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiologic Clinics of North America**. v. 38, n. 1, p. 1-14, 2000

HECKMANN, B. L.; BOADA-ROMERO, E.; CUNHA, L. D.; MAGNE, J.; GREEN, D. R. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. **Journal of Molecular Biology**. v. 429, n. 23, p. 3561-3576, 2017

HELMINEN, H. J.; ERICSSON, J. L. Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Evidence for focal irreversible damage to epithelium, and heterophagic digestion in macrophages. **Journal of Ultrastructure Research**. v. 39, n. 5, p. 443-455, 1972

HEUSINKVELD, M.; VAN DER BURG, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. **Journal of Translational Medicine**. v. 9, p. 216, 2011

HOLSCHBACH, C.; COOPER, T. G. A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. **Reproduction**. v. 123, n. 4, p. 517-525, 2002

HU, W.; QIAN, Y.; YU, F.; LIU, W.; WU, Y.; FANG, X.; HAO, W. Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. **Oncology Letters**. v. 10, n. 3, p. 1390-1396, 2015

HUANG, Y.; HAMANA, T.; LIU, J.; WANG, C.; AN, L.; YOU, P.; CHANG, J. Y.; XU, J.; MCKEEHAN, W. L.; WANG, F. Prostate Sphere-forming Stem Cells Are Derived from the P63-expressing Basal Compartment. **Journal of Biological Chemistry**. v. 290, n. 29, p. 17745-17752, 2015

HUGGINS, C.; HODGES, C. V. Studies on prostatic cancer. The effect of castration, of estrogen and of androgen interaction on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. **Cancer Research**. v. 1, n. 4, p. 293-297, 1941

HUSSAIN, S.; LAWRENCE, M. G.; TAYLOR, R. A.; LO, C. Y.; FRYDENBERG, M.; ELLEM, S. J.; FURIC, L.; RISBRIDGER, G. P. Estrogen receptor beta activation impairs prostatic regeneration by inducing apoptosis in murine and human stem/progenitor enriched cell populations. **PLoS One**. v. 7, n. 7, p. e40732, 2012

HUTSON, J. C. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. **Experimental Biology and Medicine**. v. 231, n. 1, p. 1-7, 2006

INCA, 2019. Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2020

JONES, J. D.; SINDER, B. P.; PAIGE, D.; SOKI, F. N.; KOH, A. J.; THIELE, S.; SHIOZAWA, Y.; HOFBAUER, L. C.; DAIGNAULT, S.; ROCA, H.; MCCAULEY, L. K. Trabectedin Reduces Skeletal Prostate Cancer Tumor Size in Association with Effects on M2 Macrophages and Efferocytosis. **Neoplasia**. v. 21, n. 2, p. 172-184, 2019

JOSEF MARX, F.; KARENBERG, A. History of the term prostate. **Prostate**. v. 69, n. 2, p. 208-213, 2009

KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; MARONI, P.; KOUL, H. K. Oxidative stress in prostate cancer. **Cancer Letters**. v. 282, n. 2, p. 125-136, 2009

KLOTZ, T.; BLOCH, W.; VOLBERG, C.; ENGELMANN, U.; ADDICKS, K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer**. v. 82, n. 10, p. 1897-1903, 1998

KUMAR, V. L.; MAJUMDER, P. K. Prostate gland: structure, functions and regulation. **International Urology and Nephrology**. v. 27, n. 3, p. 231-243, 1995

KURITA, T.; MEDINA, R. T.; MILLS, A. A.; CUNHA, G. R. Role of p63 and basal cells in the prostate. **Development**. v. 131, n. 20, p. 4955-4964, 2004

KURITA, T.; WANG, Y. Z.; DONJACOUR, A. A.; ZHAO, C.; LYDON, J. P.; O'MALLEY, B. W.; ISAACS, J. T.; DAHIYA, R.; CUNHA, G. R. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. **Cell Death and Differentiation**. v. 8, n. 2, p. 192-200, 2001

KWON, O. J.; ZHANG, L.; ITTMANN, M. M.; XIN, L. Prostatic inflammation enhances basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 111, n. 5, p. E592-600, 2014

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; LIN, S. X.; SIMARD, J.; LABRIE, C.; EL-ALFY, M.; PELLETIER, G.; BELANGER, A. Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 25, n. 1, p. 1-16, 2000

LE MAGNEN, C.; VIRK, R. K.; DUTTA, A.; KIM, J. Y.; PANJA, S.; LOPEZ-BUJANDA, Z. A.; CALIFANO, A.; DRAKE, C. G.; MITROFANOVA, A.; ABATE-SHEN, C. Cooperation of loss of NKX3.1 and inflammation in prostate cancer initiation. **Disease Models & Mechanisms**. v. 11, n. 11, 2018

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 40, n. 3, p. 565-575, viii-ix, 2011

LEE, D. K.; LIU, Y.; LIAO, L.; WANG, F.; XU, J. The prostate basal cell (BC) heterogeneity and the p63-positive BC differentiation spectrum in mice. **International Journal of Biological Sciences**. v. 10, n. 9, p. 1007-1017, 2014

- LEE, G. T.; KIM, J. H.; KWON, S. J.; STEIN, M. N.; HONG, J. H.; NAGAYA, N.; BILLAKANTI, S.; KIM, M. M.; KIM, W. J.; KIM, I. Y. Dihydrotestosterone Increases Cytotoxic Activity of Macrophages on Prostate Cancer Cells via TRAIL. **Endocrinology**. v. 160, n. 9, p. 2049-2060, 2019
- LI, X.; STRAUSS, L.; KAATRASALO, A.; MAYERHOFER, A.; HUHTANIEMI, I.; SANTTI, R.; MAKELA, S.; POUTANEN, M. Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. **Endocrinology**. v. 147, n. 3, p. 1271-1277, 2006
- LINDE, N.; CASANOVA-ACEBES, M.; SOSA, M. S.; MORTHA, A.; RAHMAN, A.; FARIAS, E.; HARPER, K.; TARDIO, E.; REYES TORRES, I.; JONES, J.; CONDEELIS, J.; MERAD, M.; AGUIRRE-GHISO, J. A. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. **Nature Communications**. v. 9, n. 1, p. 21, 2018
- LISSBRANT, I. F.; STATIN, P.; WIKSTROM, P.; DAMBER, J. E.; EGEVAD, L.; BERGH, A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. **International Journal of Oncology**. v. 17, n. 3, p. 445-451, 2000
- LIU, X.; GOLDSTEIN, A. S. Inflammation promotes prostate differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 111, n. 5, p. 1666-1667, 2014
- LIU, Y.; CAO, X. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Cellular & Molecular Immunology**. v. 12, n. 1, p. 1-4, 2015
- LU, T.; LIN, W. J.; IZUMI, K.; WANG, X.; XU, D.; FANG, L. Y.; LI, L.; JIANG, Q.; JIN, J.; CHANG, C. Targeting androgen receptor to suppress macrophage-induced EMT and benign prostatic hyperplasia (BPH) development. **Molecular Endocrinology**. v. 26, n. 10, p. 1707-1715, 2012
- LU, T. L.; HUANG, Y. F.; YOU, L. R.; CHAO, N. C.; SU, F. Y.; CHANG, J. L.; CHEN, C. M. Conditionally ablated Pten in prostate basal cells promotes basal-to-luminal differentiation and causes invasive prostate cancer in mice. **American Journal of Pathology**. v. 182, n. 3, p. 975-991, 2013
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. **European Journal of Cancer**. v. 40, n. 11, p. 1660-1667, 2004
- MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **Journal of Pathology**. v. 229, n. 2, p. 176-185, 2013
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **Prime Reports**. v. 6, p. 13, 2014
- MARTINS-SANTOS, E.; PIMENTA, C. G.; CAMPOS, P. R. N.; FRANCO, M. B.; GOMES, D. A.; MAHECHA, G. A. B.; OLIVEIRA, C. A. Persistent testicular structural and functional

alterations after exposure of adult rats to atrazine. **Reproductive Toxicology**. v. 73, n., p. 201-213, 2017

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. **Molecular Interventions**. v. 3, n. 5, p. 281-292, 2003

MAZZONE, M.; MENGA, A.; CASTEGNA, A. Metabolism and TAM functions-it takes two to tango. **FEBS Journal**. v. 285, n. 4, p. 700-716, 2018

MCPHERSON, S. J.; HUSSAIN, S.; BALANATHAN, P.; HEDWARDS, S. L.; NIRANJAN, B.; GRANT, M.; CHANDRASIRI, U. P.; TOIVANEN, R.; WANG, Y.; TAYLOR, R. A.; RISBRIDGER, G. P. Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 107, n. 7, p. 3123-3128, 2010

MELIS, M. H. M.; NEVEDOMSKAYA, E.; VAN BURGSTEDEN, J.; CIONI, B.; VAN ZEEBURG, H. J. T.; SONG, J. Y.; ZEVENHOVEN, J.; HAWINKELS, L.; DE VISSER, K. E.; BERGMAN, A. M. The adaptive immune system promotes initiation of prostate carcinogenesis in a human c-Myc transgenic mouse model. **Oncotarget**. v. 8, n. 55, p. 93867-93877, 2017

MILLER, L.; HUNT, J. S. Sex steroid hormones and macrophage function. **Life Sciences**.v. 59, n. 1, p. 1-14, 1996

MOR, G.; YUE, W.; SANTEN, R. J.; GUTIERREZ, L.; ELIZA, M.; BERSTEIN, L. M.; HARADA, N.; WANG, J.; LYSIAK, J.; DIANO, S.; NAFTOLIN, F. Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 67, n. 5-6, p. 403-411, 1998

MORAIS-SANTOS, M.; NUNES, A. E.; OLIVEIRA, A. G.; MOURA-CORDEIRO, J. D.; MAHECHA, G. A.; AVELLAR, M. C.; OLIVEIRA, C. A. Changes in Estrogen Receptor ERbeta (ESR2) Expression without Changes in the Estradiol Levels in the Prostate of Aging Rats. **PloS One**. v. 10, n. 7, p. e0131901, 2015

MORAIS-SANTOS, M.; WERNECK-GOMES, H.; CAMPOLINA-SILVA, G. H.; SANTOS, L. C.; MAHECHA, G. A. B.; HESS, R. A.; OLIVEIRA, C. A. Basal Cells Show Increased Expression of Aromatase and Estrogen Receptor alpha in Prostate Epithelial Lesions of Male Aging Rats. **Endocrinology**. v. 159, n. 2, p. 723-732, 2018

MOSTAGHEL, E. A.; ZHANG, A.; HERNANDEZ, S.; MARCK, B. T.; ZHANG, X.; TAMAE, D.; BIEHL, H. E.; TRETIAKOVA, M.; BARTLETT, J.; BURNS, J.; DUMPIT, R.; ANG, L.; MATSUMOTO, A. M.; PENNING, T. M.; BALK, S. P.; MORRISSEY, C.; COREY, E.; TRUE, L. D.; NELSON, P. S. Contribution of Adrenal Glands to Intratumor Androgens and Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 25, n. 1, p. 426-439, 2019

MYERS, K. V.; AMEND, S. R.; PIENTA, K. J. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment. **Molecular Cancer**. v. 18, n. 1, p. 94, 2019

NAGATA, S.; HANAYAMA, R.; KAWANE, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell**. v. 140, n. 5, p. 619-630, 2010

NAKAI, Y.; NELSON, W. G.; DE MARZO, A. M. The dietary charred meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine acts as both a tumor initiator and promoter in the rat ventral prostate. **Cancer Research**. v. 67, n. 3, p. 1378-1384, 2007

NARAYANAN, N. K.; NARGI, D.; HORTON, L.; REDDY, B. S.; BOSLAND, M. C.; NARAYANAN, B. A. Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib. **Prostate**. v. 69, n. 2, p. 133-141, 2009

NELSON, W. G.; DE MARZO, A. M.; ISAACS, W. B. Prostate cancer. **New England Journal of Medicine**. v. 349, n. 4, p. 366-381, 2003

NES, W. D.; LUKYANENKO, Y. O.; JIA, Z. H.; QUIDEAU, S.; HOWALD, W. N.; PRATUM, T. K.; WEST, R. R.; HUTSON, J. C. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. **Endocrinology**. v. 141, n. 3, p. 953-958, 2000

NONOMURA, N.; TAKAYAMA, H.; NAKAYAMA, M.; NAKAI, Y.; KAWASHIMA, A.; MUKAI, M.; NAGAHARA, A.; AOZASA, K.; TSUJIMURA, A. Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. **BJU International**. v. 107, n. 12, p. 1918-1922, 2011

OLIVEIRA, A. G.; COELHO, P. H.; GUEDES, F. D.; MAHECHA, G. A.; HESS, R. A.; OLIVEIRA, C. A. 5alpha-Androstane-3beta,17beta-diol (3beta-diol), an estrogenic metabolite of 5alpha-dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ERbeta expression in the ventral prostate of adult rats. **Steroids**. v. 72, n. 14, p. 914-922, 2007

OUSSET, M.; VAN KEYMEULEN, A.; BOUVENCOURT, G.; SHARMA, N.; ACHOURI, Y.; SIMONS, B. D.; BLANPAIN, C. Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. **Nature Cell Biology**. v. 14, n. 11, p. 1131-1138, 2012

PEIFFER, L. B.; POYNTON, S. L.; ERNST, S. E.; HICKS, J. L.; DE MARZO, A. M.; SFANOS, K. S. Inflammation-associated pathologies in a case of prostate schistosomiasis: Implications for a causal role in prostate carcinogenesis. **Prostate**. v. 79, n. 11, p. 1316-1325, 2019

PELLETIER, G. Expression of steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in human prostate. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 22, n. 2, p. 223-228, 2008

PELLETIER, G.; LUU-THE, V.; EL-ALFY, M.; LI, S.; LABRIE, F. Immunoelectron microscopic localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 26, n. 1, p. 11-19, 2001

PEREIRA, B. A.; LISTER, N. L.; HASHIMOTO, K.; TENG, L.; FLANDES-IPARRAGUIRRE, M.; EDER, A.; SANCHEZ-HERRERO, A.; NIRANJAN, B.; MELBOURNE UROLOGICAL RESEARCH, A. Tissue engineered human prostate microtissues reveal key role of mast cell-derived tryptase in potentiating cancer-associated fibroblast (CAF)-induced morphometric transition in vitro. **Biomaterials**. v. 197, p. 72-85, 2019

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews: Cancer**. v. 4, n. 1, p. 71-78, 2004

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews: Immunology**. v. 9, n. 4, p. 259-270, 2009

PRINS, G. S.; BIRCH, L.; GREENE, G. L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. **Endocrinology**. v. 129, n. 6, p. 3187-3199, 1991

PRINS, G. S.; BIRCH, L.; HABERMANN, H.; CHANG, W. Y.; TEBEAU, C.; PUTZ, O.; BIEBERICH, C. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. **Reproduction, Fertility, and Development**. v. 13, n. 4, p. 241-252, 2001

PRINS, G. S.; BIRCH, L.; TANG, W. Y.; HO, S. M. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. **Reproductive Toxicology**. v. 23, n. 3, p. 374-382, 2007

PRINS, G. S.; KORACH, K. S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. **Steroids**. v. 73, n. 3, p. 233-244, 2008

PRINS, G. S.; YE, S. H.; BIRCH, L.; ZHANG, X.; CHEONG, A.; LIN, H.; CALDERON-GIERSZAL, E.; GROEN, J.; HU, W. Y.; HO, S. M.; VAN BREEMEN, R. B. Prostate Cancer Risk and DNA Methylation Signatures in Aging Rats following Developmental BPA Exposure: A Dose-Response Analysis. **Environmental Health Perspectives**. v. 125, n. 7, p. 077007, 2017

PUTZI, M. J.; DE MARZO, A. M. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Urology**. v. 56, n. 5, p. 828-832, 2000

QUINTAR, A. A.; DOLL, A.; LEIMGRUBER, C.; PALMERI, C. M.; ROTH, F. D.; MACCIONI, M.; MALDONADO, C. A. Acute inflammation promotes early cellular stimulation of the epithelial and stromal compartments of the rat prostate. **Prostate**. v. 70, n. 11, p. 1153-1165, 2010

QUINTAR, A. A.; MALDONADO, C. A. Androgen regulation of host defenses and response to inflammatory stimuli in the prostate gland. **Cell Biology International**. v. 41, n. 11, p. 1223-1233, 2017

RAHMAN, H. P.; HOFLAND, J.; FOSTER, P. A. In touch with your feminine side: how oestrogen metabolism impacts prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**. v. 23, n. 6, p. R249-266, 2016

RISBRIDGER, G.; TAYLOR, R. Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Elsevier, 3rd, cap 23, 2006

RISBRIDGER, G.; TAYLOR, R. Castrate-tolerant cells: what are the implications for the treatment of localized prostate cancer? **Asian Journal of Andrology**. v. 15, n. 6, p. 708, 2013

RISBRIDGER, G.; WANG, H.; YOUNG, P.; KURITA, T.; WANG, Y. Z.; LUBAHN, D.; GUSTAFSSON, J. A.; CUNHA, G. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. **Developmental Biology**. v. 229, n. 2, p. 432-442, 2001

RISBRIDGER, G. P.; ELLEM, S. J.; MCPHERSON, S. J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 39, n. 3, p. 183-188, 2007

RODRIGUEZ, R.; POZUELO, J. M.; MARTIN, R.; HENRIQUES-GIL, N.; HARO, M.; ARRIAZU, R.; SANTAMARIA, L. Presence of neuroendocrine cells during postnatal development in rat prostate: Immunohistochemical, molecular, and quantitative study. **Prostate**. v. 57, n. 2, p. 176-185, 2003

RÖSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators of Inflammation**. v. 2015, n., p. 816460, 2015

ROY, J.; KIM, B.; HILL, E.; VISCONTI, P.; KRAPF, D.; VINEGONI, C.; WEISSLEDER, R.; BROWN, D.; BRETON, S. Tyrosine kinase-mediated axial motility of basal cells revealed by intravital imaging. **Nature Communications**. v. 7, 2016

RUBINOW, K. B. An intracrine view of sex steroids, immunity, and metabolic regulation. **Molecular Metabolism**. v. 15, n., p. 92-103, 2018

RYL, A.; ROTTER, I.; SLOJEWSKI, M.; DOLEGOWSKA, B.; GRABOWSKA, M.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; LASZCZYNSKA, M. Hormone concentration, metabolic disorders and immunoexpression of androgen and estrogen-alpha receptors in men with benign prostatic hyperplasia and testosterone deficiency syndrome. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. v. 53, n. 3, p. 227-235, 2015

SCHMIDT, M.; KREUTZ, M.; LOFFLER, G.; SCHOLMERICH, J.; STRAUB, R. H. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. **Journal of Endocrinology**. v. 164, n. 2, p. 161-169, 2000

SEILER, P.; COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; NIESCHLAG, E. Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors. **Journal of Andrology**. v. 20, n. 6, p. 738-746, 1999

SFANOS, K. S.; HEMPEL, H. A.; DE MARZO, A. M. The Role of Inflammation in Prostate Cancer. In: **Inflammation and Cancer: Advances in Experimental Medicine and Biology**. Springer, cap 7, 2014

SFANOS, K. S.; WILSON, B. A.; DE MARZO, A. M.; ISAACS, W. B. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 106, n. 9, p. 3443-3448, 2009

SFANOS, K. S.; YEGNASUBRAMANIAN, S.; NELSON, W. G.; DE MARZO, A. M. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**. v. 15, n. 1, p. 11-24, 2018

SHARIFI, N.; AUCHUS, R. J. Steroid biosynthesis and prostate cancer. **Steroids**. v. 77, n. 7, p. 719-726, 2012

SHUM, W. W.; DA SILVA, N.; MCKEE, M.; SMITH, P. J.; BROWN, D.; BRETON, S. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. **Cell**. v. 135, n. 6, p. 1108-1117, 2008

SHUM, W. W.; SMITH, T. B.; CORTEZ-RETAMOZO, V.; GRIGORYEVA, L. S.; ROY, J. W.; HILL, E.; PITTET, M. J.; BRETON, S.; DA SILVA, N. Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. **Biology of Reproduction**. v. 90, n. 5, p. 90, 2014

SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; RUBINO, L.; PORTA, C.; TOTARO, M. G.; RIMOLDI, M.; BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**. v. 18, n. 5, p. 349-355, 2008

SILVA, J. A. F.; BRUNI-CARDOSO, A.; AUGUSTO, T. M.; DAMAS-SOUZA, D. M.; BARBOSA, G. O.; FELISBINO, S. L.; STACH-MACHADO, D. R.; CARVALHO, H. F. Macrophage roles in the clearance of apoptotic cells and control of inflammation in the prostate gland after castration. **Prostate**. v. 78, n. 2, p. 95-103, 2018

SIMPSON, E. R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; BOON, W. C.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. Aromatase: a brief overview. **Annual Review of Physiology**. v. 64, n., p. 93-127, 2002

SOEFFING, W. J.; TIMMS, B. G. Localization of androgen receptor and cell-specific cytokeratins in basal cells of rat ventral prostate. **Journal of Andrology**. v. 16, n. 3, p. 197-208, 1995

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocrine Reviews**. v. 17, n. 3, p. 221-244, 1996

TAKIZAWA, I.; LAWRENCE, M. G.; BALANATHAN, P.; REBELLO, R.; PEARSON, H. B.; GARG, E.; PEDERSEN, J.; POULIOT, N.; NADON, R.; WATT, M. J.; TAYLOR, R. A.; HUMBERT, P.; TOPISIROVIC, I.; LARSSON, O.; RISBRIDGER, G. P.; FURIC, L. Estrogen receptor alpha drives proliferation in PTEN-deficient prostate carcinoma by stimulating survival signaling, MYC expression and altering glucose sensitivity. **Oncotarget**. v. 6, n. 2, p. 604-616, 2015

TAN, M. H.; LI, J.; XU, H. E.; MELCHER, K.; YONG, E. L. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 36, n. 1, p. 3-23, 2015

TAYLOR, R. A.; RISBRIDGER, G. P. The path toward identifying prostatic stem cells. **Differentiation**. v. 76, n. 6, p. 671-681, 2008

TAYLOR, R. A.; TOIVANEN, R.; FRYDENBERG, M.; PEDERSEN, J.; HAREWOOD, L.; AUSTRALIAN PROSTATE CANCER, B.; COLLINS, A. T.; MAITLAND, N. J.; RISBRIDGER, G. P. Human epithelial basal cells are cells of origin of prostate cancer, independent of CD133 status. **Stem Cells**. v. 30, n. 6, p. 1087-1096, 2012

THAPA, D.; GHOSH, R. Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression. **Biochemical Pharmacology**. v. 94, n. 2, p. 53-62, 2015

TOIVANEN, R.; MOHAN, A.; SHEN, M. M. Basal Progenitors Contribute to Repair of the Prostate Epithelium Following Induced Luminal Anoikis. **Stem Cell Reports**. v. 6, n. 5, p. 660-667, 2016

VAN LEENDERS, G.; DIJKMAN, H.; HULSBERGEN-VAN DE KAA, C.; RUITER, D.; SCHALKEN, J. Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. **Laboratory Investigation**. v. 80, n. 8, p. 1251-1258, 2000

VATS, D.; MUKUNDAN, L.; ODEGAARD, J. I.; ZHANG, L.; SMITH, K. L.; MOREL, C. R.; WAGNER, R. A.; GREAVES, D. R.; MURRAY, P. J.; CHAWLA, A. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metabolism**. v. 4, n. 1, p. 13-24, 2006

VERHAGEN, A. P.; RAMAEKERS, F. C.; AALDERS, T. W.; SCHAAFSMA, H. E.; DEBRUYNE, F. M.; SCHALKEN, J. A. Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. **Cancer Research**. v. 52, n. 22, p. 6182-6187, 1992

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Review Urology**. v. 13, n. 7, p. 379-386, 2016

WADOSKY, K. M.; KOOCHEKPOUR, S. Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. **Oncotarget**. v. 7, n. 39, p. 64447-64470, 2016

WANG, J.; ZHU, H. H.; CHU, M.; LIU, Y.; ZHANG, C.; LIU, G.; YANG, X.; YANG, R.; GAO, W. Q. Symmetrical and asymmetrical division analysis provides evidence for a hierarchy of prostate epithelial cell lineages. **Nature Communications**. v. 5, p. 4758, 2014

WANG, X.; KRUIHOF-DE JULIO, M.; ECONOMIDES, K. D.; WALKER, D.; YU, H.; HALILI, M. V.; HU, Y. P.; PRICE, S. M.; ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. **Nature**. v. 461, n. 7263, p. 495-500, 2009

WANG, Y.; HAYWARD, S.; CAO, M.; THAYER, K.; CUNHA, G. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation**. v. 68, n. 4-5, p. 270-279, 2001

WANG, Z. A.; MITROFANOVA, A.; BERGREN, S. K.; ABATE-SHEN, C.; CARDIFF, R. D.; CALIFANO, A.; SHEN, M. M. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. **Nature Cell Biology**. v. 15, n. 3, p. 274-283, 2013

WANG, Z. A.; TOIVANEN, R.; BERGREN, S. K.; CHAMBON, P.; SHEN, M. M. Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer. **Cell Reports**. v. 8, n. 5, p. 1339-1346, 2014

WEIHUA, Z.; MAKELA, S.; ANDERSSON, L. C.; SALMI, S.; SAJI, S.; WEBSTER, J. I.; JENSEN, E. V.; NILSSON, S.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 98, n. 11, p. 6330-6335, 2001

WERFEL, T. A.; COOK, R. S. Efferocytosis in the tumor microenvironment. **Seminars in Immunopathology**. v. 40, n. 6, p. 545-554, 2018

YEUNG, C. H.; NASHAN, D.; SORG, C.; OBERPENNING, F.; SCHULZE, H.; NIESCHLAG, E.; COOPER, T. G. Basal cells of the human epididymis: antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. **Biology of Reproduction**. v. 50, n. 4, p. 917-926, 1994

ZANG, T.; TAPLIN, M. E.; TAMAE, D.; XIE, W.; MESAROS, C.; ZHANG, Z.; BUBLEY, G.; MONTGOMERY, B.; BALK, S. P.; MOSTAGHEL, E. A.; BLAIR, I. A.; PENNING, T. M. Testicular vs adrenal sources of hydroxy-androgens in prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**. v. 24, n. 8, p. 393-404, 2017

ZARIF, J. C.; BAENA-DEL VALLE, J. A.; HICKS, J. L.; HEAPHY, C. M.; VIDAL, I.; LUO, J.; LOTAN, T. L.; HOOPER, J. E.; ISAACS, W. B.; PIENTA, K. J.; DE MARZO, A. M. Mannose Receptor-positive Macrophage Infiltration Correlates with Prostate Cancer Onset and Metastatic Castration-resistant Disease. **European Urology Oncology**. v. 2, n. 4, p. 429-436, 2019