

MONICA MORAIS SANTOS

**Alterações na expressão dos receptores de estrógenos ER $\beta$  na próstata  
ventral de ratos em envelhecimento**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro de 2011

MONICA MORAIS SANTOS

**Alterações na expressão dos receptores de estrógenos ER $\beta$  na próstata ventral de ratos em envelhecimento**

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.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cleida Aparecida de Oliveira.

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro de 2011

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleida Aparecida de Oliveira, e contou com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal 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).

*Ao papai e à mamãe... porto seguro da minha vida! Vocês sempre se doaram e se dedicaram a mim, muitas vezes abdicando de seus planos e anseios. O incentivo às minhas escolhas, a satisfação pelas conquistas, a preocupação incansável e o acolhimento que me deram perante as adversidades foram essenciais para que eu chegasse até aqui. A vocês meus amores, eu dedico essa dissertação.*

*A minha querida orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Cleida Aparecida de Oliveira, pela grandiosa contribuição em minha formação, pelos ensinamentos e sabedoria compartilhados e pela convivência e amizade. Ser orientada por você foi, sem dúvida, uma grande honra.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por Se fazer presente em minha vida, por me sustentar, me guiar, me levantar e me renovar a cada dia. Obrigada por ter colocado pessoas maravilhosas em minha vida, quer por tempo passageiro ou indeterminado, às quais também devo e tenho o imenso prazer em agradecer:

Cleida, obrigada pela competente e eficiente forma de orientar e ensinar, por me proporcionar crescimento profissional e intelectual. Obrigada pelas portas que me abriu, pela confiança, preocupação, paciência e incentivo.

Queridos companheiros do LABRE, da velha e nova geração, o que teria sido de mim sem a ajuda indispensável de vocês?! Cada um com suas limitações foram importantes para que eu conseguisse concluir este trabalho. O carinho, a paciência, a colaboração e a amizade de vocês fizeram toda a diferença. Em especial ao André Gustavo, Lílian Praes, Rachel Pires, Regiana Lúcia e Pollyana Campos.

Professor Germán A.B. Mahecha, obrigada pela paciência e por compartilhar sua grandiosa sabedoria.

Minha amada família, como o amor não se agradece, obrigada por tornarem minha vida mais amena. Esse amor foi indispensável a todo o momento. Pai, Mãe, Cris, Gra, William, Enrico e Maria, obrigada por acreditarem e torcerem por mim! Meus “pecorruchos”, Juliano e Matheus, grandes pessoinhas que tornam minha vida mais alegre. Vocês me revitalizam.

Felipe meu amor, obrigada por ter sido a todo o momento meu companheiro e cúmplice, por confortar meu coração nos momentos conturbados e compreender minha ausência quando se fez necessária. Ter você ao meu lado é um das graças que Deus reservou para mim!

Meus familiares, vovô e vovó, tios, tias e primos, que sempre estiveram na torcida, vibrando por mim. Vocês são maravilhosos!

Meus queridos amigos, obrigada pelo carinho e descontração. Em especial, à Lilian Mendes, minha eterna amiga/irmã, por sempre se preocupar comigo, Mari Moreira pela divertida companhia, e Carol D'Angelis pela prontidão em ajudar e pelo carinho.

Professor José Carlos Nogueira, sua alegria de viver é contagiante. Obrigada pela agradável companhia e por compartilhar sua incrível sabedoria.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular que foram grandes companheiros de jornada, em especial ao Marcos Augusto, Fernando Mauad e à Thalita Marcolan pelo carinho.

A Paula Sales, Kátia Maciel e Thalita Marcolan, por sempre terem sido atenciosas em me ajudar.

À adorável Sibebe, pelo imenso carinho, ajuda, paciência e amizade.

Aos professores por terem contribuído com a minha formação e aos funcionários do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

A todos, meu mais sincero OBRIGADA!

## RESUMO

A próstata constitui um dos principais focos de câncer em homens, sendo que o adenocarcinoma prostático é o tipo não-cutâneo de câncer mais freqüente no Brasil e no mundo. Sabe-se que a idade constitui um importante fator de risco para essa patologia, sendo que sua frequência e mortalidade aumentam significativamente após os 50 anos. Embora a próstata seja um tecido andrógeno dependente, aumentam as evidências que apontam a participação dos estrógenos nos processos de diferenciação e crescimento do órgão, bem como em suas patologias. Os estrógenos agem através de ligação a receptores nucleares específicos, denominados ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Enquanto os ER $\alpha$  são expressos apenas em algumas células do estroma da próstata, chama atenção a intensa expressão de ER $\beta$  no epitélio glandular, onde este exerce funções pró-apoptótica, anti-proliferativa e pró-diferenciação. Diversos estudos indicam que a expressão de ER $\beta$  reduz drasticamente com o avanço no desenvolvimento de adenocarcinomas na próstata, de forma que em 75% dos casos o receptor não se expressa no tecido alterado. Reintrodução de ER $\beta$  em células malignas promove redução da proliferação e da capacidade invasiva das mesmas. Apesar dessa íntima relação entre redução de ER $\beta$  e crescimento anormal do tecido prostático, pouco se sabe sobre a ocorrência de variação idade-dependente de sua expressão na glândula. Dessa forma, o propósito do presente estudo foi elucidar se a expressão de ER $\beta$  sofre alterações com o envelhecimento na próstata ventral de ratos Wistar em diferentes idades (3, 6, 12, 18 e 24 meses). Alterações morfológicas marcantes foram observadas na próstata ventral de ratos senis, incluindo intensa atrofia dos adenômeros, hiperplasia, focos de proliferação intraepitelial, sugestivo de neoplasia intraepitelial (PIN), assim como acúmulo de material mucoide citoplasmático e atipias nucleares. A análise da expressão de ER $\beta$  pela técnica de *Western blotting* não revelou alterações na expressão da proteína entre as diferentes idades. Já a técnica de imunohistoquímica detectou que nos animais senis houve alteração na expressão de ER $\beta$  em áreas específicas, relacionadas aos distúrbios proliferativos intraepiteliais e atrofia dos adenômeros. Esses relevantes resultados somam-se às descrições sobre redução de ER $\beta$  também em áreas de desordens proliferativas pré-malignas e malignas de próstatas em humanos e em cães, sugerindo uma forte associação de patologias da próstata com uma potencial desordem na via mediada por ER $\beta$ , que é considerado um fator anti-proliferativo e pró-diferenciação, sendo em última análise protetor contra alterações malignas. Os dados obtidos no presente estudo são inéditos, uma vez que não foram encontradas referências sobre como a expressão de ER $\beta$  se comporta durante o envelhecimento em nenhuma outra espécie.



## ABSTRACT

The prostate is one of the main targets for cancer development in men. The prostatic adenocarcinoma is the most common type of non-cutaneous cancer in Brazil and worldwide. It is known that age is an important risk factor in this pathology and that its frequency and mortality increase significantly after 50 years old. Although the prostate is an androgen dependent organ, an increasing body of evidences point out that estrogens also participate on the growing and differentiation of this organ, as well as in its pathologies. Estrogens act through the binding to specific nuclear receptors named ER $\alpha$  and ER $\beta$ . ER $\alpha$  is expressed only in some cells of the prostatic stroma, whereas ER $\beta$  is highly expressed in the glandular epithelium, playing important pro-apoptotic, anti-proliferative and pro-differentiation roles. Several studies suggest that the expression of ER $\beta$  is drastically reduced during the progression of prostatic adenocarcinoma, as in 75% of the cases the receptor is not expressed in the affected tissue. The reintroduction of ER $\beta$  in the malignant cells promotes the reduction in proliferation and invasive ability of these cells. In despite of this relationship between the decrease in ER $\beta$  expression and the abnormal growing of the prostatic tissue common during aging, little is known about the age-dependent variation in the expression of this receptor in the prostate. Therefore, the aim of this study is to investigate whether ER $\beta$  expression is altered with aging in the ventral prostate of Wistar rats of different ages (3, 6, 12, 18, 24 months). Remarkable morphological alterations were observed in the ventral prostate of aging rats, including intense atrophy, hyperplasia, focuses of intraepithelial proliferation, suggestive of intraepithelial neoplasia, as well as the accumulation of cytoplasmatic mucoid material and nuclear atipies. The analysis of ER $\beta$  expression by Western blotting did not show differences in the expression of this protein among prostates at different ages. On the other hand, the immunohistochemistry revealed that in senile animals there were alterations in the expression of this receptor in specific areas, related to the intraepithelial proliferative and atrophic abnormalities. These relevant results add to previous findings about reduced ER $\beta$  expression in pre-malignant and malignant disorders in human and dog prostates, suggesting an association of prostatic pathologies with a putative disorder in the pathway mediated by ER $\beta$ , which is considered as an anti-proliferative and pro-differentiation factor, consisting in protector against cancer. The results of the present study are of remarkable interest, since information about the expression of ER $\beta$  in the aging prostate was not found in any other species.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|  |   |
|--|---|
| <b>3<math>\beta</math>-diol</b> –                          | 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol    |
| <b>3<math>\beta</math>-HSD</b> –                           | 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase             |
| <b><math>\alpha</math>ERKO</b> –                           | animal <i>knockout</i> para ER $\alpha$               |
| <b><math>\beta</math>ERKO</b> –                            | animal <i>knockout</i> para ER $\beta$                |
| <b>AF-1</b> –  | função de ativação transcricional 1                   |
| <b>AF-2</b> –  | função de ativação transcricional 2                   |
| <b>ANOVA</b> –   | análise de variância                                  |
| <b>AP</b> –  | próstata anterior                                     |
| <b>AR</b> –  | receptores de andrógenos                              |
| <b>CYP7B1</b> –  | cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1 |
| <b>D</b> –   | região de dobradiça                                   |
| <b>DBD (ou domínio C)</b> –                                | domínio de ligação ao DNA                             |
| <b>DHT</b> –   | diidrotestosterona                                    |
| <b>DNA</b> –   | ácido desoxirribonucleico                             |
| <b>DNAc</b> –  | ácido desoxirribonucleico complementar                |
| <b>DP</b> –  | próstata dorsal                                       |
| <b>E2</b> –  | estradiol   |
| <b>ER<math>\alpha</math> (ESR1)</b> –                      | receptor de estrógeno do tipo $\alpha$                |
| <b>ER<math>\beta</math> (ESR2)</b> –                       | receptor de estrógeno tipo $\beta$                    |
| <b>ER<math>\beta</math>1</b> –                             | ER $\beta$ (diferenciado de seus variantes)           |
| <b>ER<math>\beta</math>2 (ou ER<math>\beta</math>cx)</b> – | variante 2 de ER $\beta$                              |
| <b>ER<math>\beta</math>3</b> –                             | variante 3 de ER $\beta$                              |
| <b>ER<math>\beta</math>4</b> –                             | variante 4 de ER $\beta$                              |
| <b>ER<math>\beta</math>5</b> –                             | variante 5 de ER $\beta$                              |
| <b>ER</b> –  | receptores de estrógenos                              |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>ERE</b> –                  | elementos responsivos a estrógenos   |
| <b>F</b> –                    | domínio C-terminal   |
| <b>HE</b> –                   | hematoxilina e eosina  |
| <b><i>hsp</i></b> –           | proteínas de choque térmico ( <i>heat shock protein</i> )                  |
| <b>INCA</b> –                 | Instituto Nacional do Câncer   |
| <b>kDa</b> –                  | kilodalton   |
| <b>LBD (ou domínio E)</b> –   | domínio de ligação ao ligante  |
| <b>LP</b> –                   | próstata lateral   |
| <b>NTD (ou domínio A/B)</b> – | domínio N-terminal   |
| <b>PAS</b> –                  | ácido periódico-reativo de Schiff ( <i>periodic acid-Schiff</i> )          |
| <b>PBS</b> –                  | salina tampão fosfato  |
| <b>PBST</b> –                 | salina tampão fosfato contendo 0,05% tween                                 |
| <b>PIN</b> –                  | neoplasias intra-epiteliais prostáticas                                    |
| <b>PSA</b> –                  | antígeno prostático específico   |
| <b>RNA<sub>m</sub></b> –      | ácido ribonucleico mensageiro  |
| <b>RT-PCR</b> –               | reação da transcriptase reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase |
| <b>SDS</b> –                  | dodecil sulfato de sódio   |
| <b>SDS-PAGE</b> –             | dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida             |
| <b>TBS</b> –                  | tampão salina Tris-HCl   |
| <b>VP</b> –                   | próstata ventral   |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 1</b> – Histologia da próstata de rato, cão e humana.   | 4             |
| <b>Figura 2</b> – Padrão de organização lobar da próstata de ratos e concêntrico da próstata de humanos.  | 6             |
| <b>Figura 3</b> – Principais hormônios sexuais reguladores da próstata e seus respectivos receptores.   | 10            |
| <b>Figura 4</b> – Estrutura molecular dos receptores de estrógenos.   | 13            |
| <b>Figura 5</b> – Peso corporal e peso relativo dos testículos de ratos Wistar em diferentes idades.  | 27            |
| <b>Figura 6</b> – Peso relativo do complexo prostático de ratos Wistar em diferentes idades.  | 28            |
| <b>Figura 7</b> – Histopatologia da próstata ventral de ratos Wistar em diferentes idades.  | 30            |
| <b>Figura 8</b> – Aspectos histopatológicos da próstata ventral de ratos Wistar.  | 32            |
| <b>Figura 9</b> – <i>Western blotting</i> para o receptor de estrógeno ER $\beta$ extraído da próstata ventral de ratos Wistar em diferentes idades e representação gráfica da análise densitométrica da banda de 54 kDa. | 33            |
| <b>Figura 10</b> – Imunomarcção para receptores de estrógenos ER $\beta$ na próstata ventral de ratos Wistar em diferentes idades.  | 34            |
| <b>Figura 11</b> – Comparação da imunomarcção para receptores de estrógenos ER $\beta$ no epitélio normal e com alterações histopatológicas na próstata ventral de ratos Wistar senis.                                    | 35            |

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>I. REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA</b>                                   | 1             |
| <b>1. GENERALIDADES SOBRE O SISTEMA GENITAL MASCULINO</b>                         | 1             |
| <b>2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PRÓSTATA</b>                                      | 2             |
| <b>2.1. Histologia da Próstata</b>  | 2             |
| <b>2.2. Embriologia e Organização Estrutural da Próstata</b>                      | 5             |
| <b>2.2.1. Próstata de ratos</b>   | 5             |
| <b>2.2.2. Próstata de humanos</b>   | 7             |
| <b>3. REGULAÇÃO HORMONAL DA PRÓSTATA</b>  | 9             |
| <b>3.1. Os andrógenos e seus receptores</b>                                       | 9             |
| <b>3.2. Os estrógenos e seus receptores</b>                                       | 11            |
| <b>3.2.1. Estrutura molecular dos receptores de estrógenos</b>                    | 12            |
| <b>3.2.2. Distribuição e função dos receptores de estrógenos na próstata</b>      | 15            |
| <b>4. RELAÇÃO ENTRE CÂNCER DE PRÓSTATA, ENVELHECIMENTO E ER<math>\beta</math></b> | 17            |
| <b>II. OBJETIVOS</b>  | 21            |
| <b>1. Objetivo geral</b>  | 21            |
| <b>2. Objetivos específicos</b>   | 21            |
| <b>III. METODOLOGIA</b>   | 22            |
| <b>IV. RESULTADOS</b>   | 27            |
| <b>1. PESO CORPORAL, DOS TESTÍCULOS E DO COMPLEXO PRÓSTATA</b>                    | 27            |
| <b>2. HISTOPATOLOGIA DA PRÓSTATA VENTRAL</b>                                      | 28            |
| <b>3. WESTERN BLOTTING</b>  | 32            |
| <b>4. IMUNOHISTOQUÍMICA</b>   | 33            |
| <b>V. DISCUSSÃO</b>   | 36            |
| <b>VI. CONCLUSÕES</b>   | 42            |
| <b>VII. PERSPECTIVAS</b>  | 43            |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | 44            |

---

## **I. REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA**

## **I. REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA**

### **1. GENERALIDADES SOBRE O SISTEMA GENITAL MASCULINO**

O sistema genital masculino de mamíferos eutérios é constituído pelos testículos, por um sistema de vias espermáticas, pelas glândulas genitais anexas e pelo órgão copulador, o pênis. Este sistema é responsável pela produção contínua, nutrição e estocagem temporária dos espermatozoides, além da síntese e secreção de hormônios, principalmente os andrógenos (Setchell & Breed, 2006).

Os testículos são responsáveis pela produção dos espermatozoides, e pela esteroidogênese. Seu parênquima consiste dos túbulos seminíferos e do compartimento intertubular, onde se encontram as células de Leydig, responsáveis pela síntese de testosterona e estrógenos, além de vasos sanguíneos e linfáticos, essenciais para o transporte dos hormônios e nutrientes (Russel et al., 1990). Os espermatozoides produzidos pelo epitélio seminífero são transportados pelas vias espermáticas, que compreendem os túbulos retos, a rede testicular, ductulos eferentes, epidídimos, ductos deferentes e uretra. Além de servirem como meio de transporte, estas vias são essenciais para que importantes eventos ocorram, dentre os quais destacam-se a reabsorção de fluido nos ductulos eferentes e a maturação, proteção e armazenamento dos gametas nos epidídimos (Ilio & Hess, 1994; Hermo & Robaire, 2000), o que é imprescindível para garantir a fertilidade.

Além dessas estruturas, há três tipos principais de glândulas genitais anexas, sendo elas: as glândulas bulbouretrais, as vesículas seminais e a próstata. A secreção das glândulas bulbo uretrais que precede o restante do sêmen, lubrifica e neutraliza a uretra esponjosa, preparando a mesma para a passagem dos espermatozoides. A próstata e as vesículas seminais são responsáveis pela formação da maior parte da porção acelular do sêmen, o plasma seminal, que além de fornecer nutrientes aos espermatozoides a serem ejaculados, funciona como veículo de lançamento dos gametas no sistema genital feminino através do pênis (Aumüller, 1979). As secreções das glândulas anexas contribuem ainda para proteger o sistema genital e urinário pela produção de muco e outras substâncias, que irão bloquear a entrada dos patógenos na uretra, tais como, íons zinco, espermina e proteases, como as lisozimas, além de imunoglobulinas (Aumüller, 1979).

## **2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PRÓSTATA**

No homem, a próstata é um órgão ímpar, localizado na cavidade pélvica entre a sínfise púbica e o reto, e posicionado na base da bexiga, onde se dispõe ao redor da porção inicial da uretra, que dessa forma é denominada uretra prostática (Aumüller, 1979). Consiste na maior das glândulas anexas, sendo constituída por numerosos adenômeros túbulo-alveolares ramificados, que liberam suas secreções na uretra prostática através de ductos excretores. A próstata é envolvida por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroelástico, contendo quantidade variável de fibras musculares lisas, dependendo da espécie. A cápsula se estende para o interior do órgão dando origem ao estroma, que sustenta as várias glândulas, componentes do parênquima prostático (Kumar & Majumder, 1995).

A próstata é responsável pela produção do líquido prostático, uma secreção homogênea, leitosa e alcalina, com odor característico, que corresponde a aproximadamente 30% do líquido seminal (Aumüller, 1979; Kumar & Majumder, 1995). Nessa secreção, encontram-se diversas enzimas como fibrinolisinase, coagulase, fosfatase ácida, antígeno prostático específico (PSA), além de lípidos, citrato de cálcio, zinco, dentre outras (Aumüller, 1979; Kumar & Majumder, 1995). A fibrinolisinase, a coagulase, o PSA e outras enzimas estão envolvidos no processo de liquefação do sêmen e do muco cervical, facilitando a veiculação dos espermatozoides. Já a fosfatase ácida, através da conversão da fosforilcolina em colina, e os lípidos, como o colesterol, são responsáveis pela nutrição dos espermatozoides. O citrato de cálcio é de grande importância, pois atua alcalinizando o pH vaginal, o que é fundamental para a sobrevivência dos gametas masculinos nas vias genitais femininas. Os altos níveis de zinco justificam-se pela importante função protetora, devido a sua ação antioxidante e antibacteriana (Aumüller, 1979; Kumar & Majumder, 1995). Em suma, a secreção prostática é essencial para o sucesso da fertilização já que promove algumas das condições necessárias para a manutenção dos espermatozoides.

### **2.1. Histologia da Próstata**

Os adenômeros prostáticos são revestidos por epitélio geralmente prismático, cujos componentes são semelhantes para as diversas espécies de animais experimentais e em humanos, estando bem estabelecida a presença de três tipos celulares morfológica e funcionalmente distintos: as células basais, as células luminais ou secretoras e as células



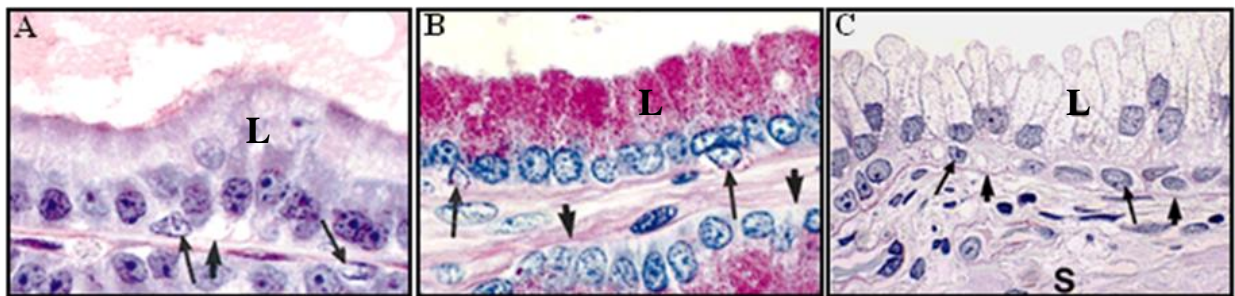
neuroendócrinas (Abrahamsson & Sant'Agnes, 1993; Hayward et al., 1996A; El-Alfy et al., 2000). Estas células podem ser distinguidas baseado em sua localização, morfologia e características fenotípicas.

As células basais são pequenas, contendo relativamente pouco citoplasma e núcleo pequeno e de formas variadas (El-Alfy et al., 2000; Taylor & Risbridger, 2008). Em algumas espécies de animais como ratos, camundongos, cães e macacos, estas células são pouco numerosas e localizam-se entre as células secretoras em contato com a membrana basal, sem, porém, atingir a superfície luminal (Fig. 1A-B) (El-Alfy et al., 2000; Taylor & Risbridger, 2008). Dessa forma, o epitélio de revestimento dos adenômeros prostáticos desses animais é classificado como pseudoestratificado. Embora esta clássica descrição de células basais restritas ao compartimento basal do epitélio esteja bem estabelecida, um estudo recente em roedores mostrou longas e delgadas projeções destas células por entre as células adjacentes alcançando a superfície luminal (Shum et al., 2008). Já em humanos, as células basais são mais numerosas e formam uma camada contínua de células que repousam sobre a membrana basal sem também atingirem o lúmen (Fig. 1C). Em termos numéricos, a proporção de células basais:luminais varia de 1:1 em humanos e 1:7 em outras espécies, como cão, macaco e rato (Fig. 1) (El-Alfy et al., 2000). A classificação do epitélio glandular em humanos tem sido mais controversa, sendo que alguns ainda o classificam como pseudoestratificado, enquanto outros o consideram biestratificado colunar, por apresentar duas camadas celulares: a camada basal e a camada superficial (El-Alfy et al., 2000). Estudos de microscopia eletrônica de transmissão confirmam que as células luminais em humanos não alcançam a membrana basal assim como as células basais não alcançam o lúmen do adenômero (El-Alfy, et al., 2000).

Algumas células basais apresentam-se relativamente indiferenciadas e são consideradas células-tronco (El-Alfy et al., 2000). Outras apresentam numerosas vesículas pinocitóticas ao longo da superfície basal sugerindo envolvimento no transporte de material entre o epitélio e o tecido subepitelial (Ichihara et al., 1978). As células basais da próstata em humanos possuem características distintas das células encontradas em animais experimentais, como a presença de junções oclusivas entre elas, o que sugere que elas formem uma barreira epitelial (El-Alfy et al., 2000). Também, a presença de junções comunicantes entre células basais, células secretoras e entre células basais e secretoras, indicam um importante papel na comunicação célula-célula. Outra importante característica de algumas células basais humanas é que elas são células diferenciadas e caracterizam-se pela presença de numerosas

enzimas esteroidogênicas, tais como  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase,  $17\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 5 e  $5\alpha$ -redutase tipo 2 (Pelletier et al., 2001; Takase et al., 2006).

As células secretoras são colunares, altas, com núcleo localizado no terço basal e citoplasma basófilo, exceto na região supranuclear, o qual se cora fracamente (Fig. 1). Estas células são altamente diferenciadas e responsáveis pela produção da secreção prostática, possuindo abundante retículo endoplasmático granular, desenvolvido aparelho de Golgi, além de numerosos grânulos de secreção (Aumüller, 1979; Hayashi et al., 1991).



**Figura 1:** Histologia da próstata de rato (A), cão (B) e humana (C). Células secretoras (L); células basais (setas compridas); estroma (S); membrana basal (setas curtas). Adaptado de El-Alfy et al., 2000.

As células neuroendócrinas são células regulatórias que possuem características neurais e endócrinas, como o próprio nome sugere, estando distribuídas nos vários sistemas do organismo, inclusive na próstata. Na próstata, estas células estão dispostas isoladamente ou em pequenos grupos no epitélio glandular, sendo, porém mais abundantes nas regiões ductais (Abrahamsson & Sant'Agnese, 1993; Abrahamsson, 1999). Colorações convencionais como a de hematoxilina e eosina mostram essas células não coradas, mas sua distinção das demais células do epitélio pode ser feita com uso de marcadores específicos de suas secreções, tais como: serotonina, cromogranina A, sinaptofisina, enolase específica de neurônio, somatostatina e calcitonina (Abrahamsson & Sant'Agnese, 1993; Abrahamsson, 1999). Estudos ultra-estruturais mostraram que essas células podem ser classificadas como abertas, onde projeções citoplasmáticas apicais contendo microvilosidades fazem contato com a superfície luminal; ou como células fechadas, que repousam sobre a membrana basal e formam extensões semelhantes a dendritos entre as células adjacentes. Investigações ultra-estruturais também revelaram uma vasta gama de grânulos neurosecretórios de tamanhos e morfologias distintas que se correlacionam com o grande número de produtos secretados pelas células neuroendócrinas, sugerindo a diversidade das mesmas. O conteúdo desses

grânulos pode ser de hormônios peptídicos ou pró-hormônios, e ainda podem conter uma ou mais substância (Abrahamsson & Sant'Agnese, 1993; Abrahamsson, 1999; Komiya et al., 2009). As substâncias liberadas pelas células neuroendócrinas podem agir de forma endócrina, parácrina, autócrina ou neuroendócrina, já que estas células podem fazer associações com neurônios (Abrahamsson & Sant'Agnese, 1993; Abrahamsson, 1999). Ainda, alguns dos produtos secretados por essas células, como a calcitonina e somatostatina, já foram encontrados no líquido seminal, o que leva a possibilidade deles regular a função dos espermatozoides (Sjoberg et al., 1980; Sasaki & Yoshinaga, 1989). Além disso, tem sido sugerido que estas células participem da regulação da atividade proliferativa, diferenciação e atividade secretória do órgão (Abrahamsson & Sant'Agnese, 1993; Sun et al., 2009).

Entremado ao parênquima glandular há o estroma de sustentação composto por músculo liso, fibroblastos, fibras do tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, além de componentes do sistema imune, como mastócitos (Hayward et al., 1996B). Em roedores, as células musculares lisas se restringem a uma delgada camada de três a cinco células de espessura que envolvem os adenômeros. A espessura dessa camada muscular aumenta progressivamente na convergência dos ductos em direção à uretra (Aumüller, 1979; Hayward et al., 1996B). Já em humanos, uma cápsula fibroelástica rica em músculo liso envolve a próstata e emite septos que dão origem ao estroma conjuntivo-muscular liso. Este se caracteriza por ser mais fibromuscular que o do rato, embora apresente os mesmos tipos celulares. A diferença é que as células musculares lisas são mais abundantes e se distribuem por todo o estroma, não ficando restritas em torno dos adenômeros. Esta musculatura lisa sofre contrações durante a ejaculação, auxiliando na ejeção da secreção prostática no lúmen da uretra (Aumüller, 1979; Hayward et al., 1996B).

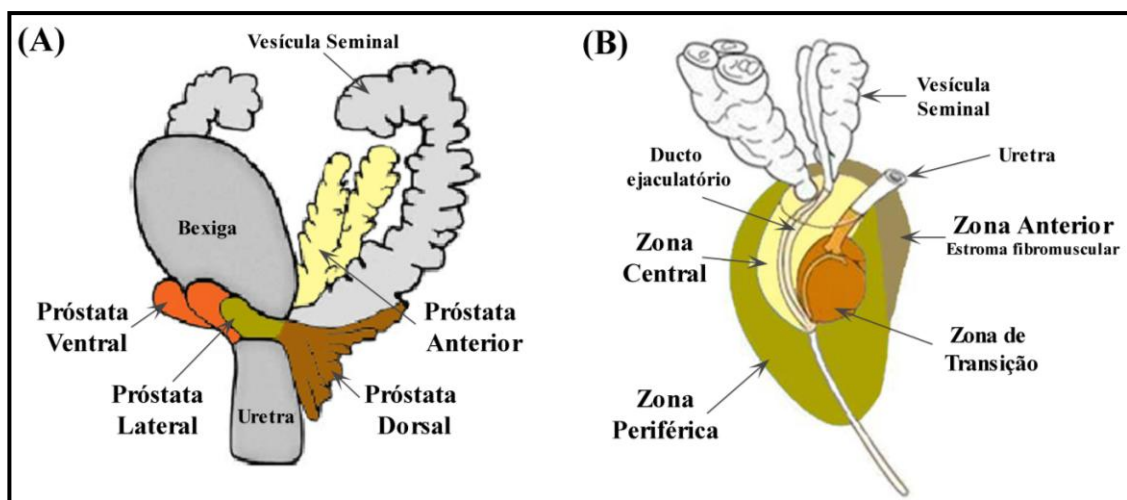
## **2.2. Embriologia e Organização Estrutural da Próstata**

### **2.2.1. Próstata de ratos**

O desenvolvimento embrionário da próstata é semelhante para humanos e roedores (ratos e camundongos), sendo sua origem a partir da parte pélvica do seio urogenital (Risbridger & Taylor, 2006). Em ratos, por volta do 19º dia de gestação, cordões celulares se formam a partir do endoderma do seio urogenital como brotos bilaterais que invadem o mesênquima adjacente (Hayward et al., 1996B; Risbridger & Taylor, 2006). Ao nascimento, a

glândula possui aspecto rudimentar, onde se inicia a morfogênese de sua ramificação, processo que se caracteriza pelo alongamento e bifurcação dos cordões celulares formados no embrião, e se completa no fim da puberdade (Sugimura et al., 1986; Hayashi et al., 1991; Risbridger & Taylor, 2006). Neste período, o epitélio passa por uma série de modificações, incluindo extensa proliferação e polarização, enquanto o mesênquima adjacente se diferencia em estroma (Risbridger & Taylor, 2006). Interações recíprocas entre epitélio/mesênquima promovem brotamento e ramificações das estruturas glandulares, que resultam em uma glândula multilobar disposta ao redor da uretra no colo da bexiga (Risbridger & Taylor, 2006).

Assim sendo, a próstata de roedores é composta por quatro pares de lobos, cada um formado por uma porção direita e outra esquerda, apresentando simetria bilateral. Os lobos prostáticos são denominados, de acordo com sua posição anatopográfica relativa à uretra, como: próstata ventral (VP), próstata dorsal (DP), próstata lateral (LP) e próstata anterior (AP) ou glândula de coagulação (Fig. 2A) (Hayashi et al., 1991; Hayward et al., 1996A; Risbridger & Taylor, 2006).



**Figura 2.** Padrão de organização lobar da próstata de ratos (A) e concêntrico da próstata em humanos (B). Adaptado de Risbridger & Taylor, 2006; Willian, 2000.

A próstata ventral emerge da porção ventral da uretra, imediatamente abaixo da bexiga, constituindo aproximadamente metade da massa do complexo prostático, sendo o principal lobo utilizado como modelo experimental (Hayashi et al., 1991). Numerosos ductos terminais (ou adenômeros), localizados na porção distal da glândula, se convergem formando

ductos secundários que por sua vez, convergem para formação dos ductos principais. Estes ductos desembocam na região ventral da uretra prostática, onde a secreção da glândula é lançada. O epitélio pseudoestratificado prismático que forma os adenômeros é pouco pregueado nesse lobo (Hayashi et al., 1991).

A próstata anterior encontra-se localizada na concavidade da superfície medial da vesícula seminal (Fig. 2). Apresenta estrutura tubular em vez de túbulo-alveolar como a dos outros lobos, possuindo apenas um ducto principal em cada lado, que emerge da porção postero-superior da uretra. O ducto principal se ramifica em numerosos ductos terminais. Neste lobo, a altura e o pregueamento do epitélio são muito variados, o que indica diferente atividade secretora ao longo da glândula (Hayashi et al., 1991).

A próstata dorsal localiza-se abaixo das vesículas seminais e da próstata anterior, dispondo-se caudalmente à bexiga e posterior à próstata lateral. Ela possui de cinco a seis ductos principais em cada lado do lobo sendo sua morfologia complexa, apresentando-se extensamente ramificados. Os adenômeros apresentam uma estrutura em forma de túbulo-alvéolo com poucas pregas do epitélio, e altura do epitélio de cilíndrico a cúbico, sendo mais baixo que na próstata ventral (Hayashi et al., 1991).

A próstata lateral ocupa posição logo abaixo da vesícula seminal e da próstata anterior, estendendo-se parcialmente sobre a próstata ventral e por fim misturando-se caudalmente à próstata dorsal. Seus túbulo-alvéolos são mais pregueados e seu epitélio mais baixo que o dos lobos ventrais e dorsais (Hayashi et al., 1991).

A cápsula de tecido conjuntivo que envolve os lobos do complexo próstata de ratos, além de unir os ductos de um mesmo lobo no seu interior, permite que cada lobo se mantenha em um compartimento separado e com forma característica (Hayashi et al., 1991).

### **2.2.2. Próstata em humanos**

O desenvolvimento da próstata humana começa durante a 11<sup>a</sup> – 12<sup>a</sup> semana de gestação como cinco pares de brotos epiteliais que emergem a partir da porção uretral do seio urogenital (Risbridger & Taylor, 2006; Huang et al., 2009; Sluczanska-Glabowska et al., 2010). Os cinco pares de brotos epiteliais (anterior, posterior, medial e dois laterais) também sofrem ramificações formando um arranjo lobar, sustentado por um estroma que circunda a

uretra e os ductos ejaculatórios em desenvolvimento (Risbridger & Taylor, 2006). Os brotos superiores, que formam as regiões mais centrais da próstata sexualmente madura são compostos por um epitélio que se acredita ser de origem mesodérmica, enquanto os brotos inferiores, que formam as regiões mais periféricas da glândula, são de origem endodérmica (Risbridger & Taylor, 2006). Assim, por muito tempo acreditou-se que a glândula apresentasse estrutura lobar mesmo após o nascimento, sendo dividida em cinco lobos baseados em sua origem. Porém, em estágios mais avançados do desenvolvimento, os lobos prostáticos se unem pelo encapsulamento do tecido conjuntivo-muscular liso para a formação de uma única glândula (Shappel et al., 2004; Sluczankowska-Glabowska et al., 2010). Sendo assim, na década de 80, McNeal criou o conceito de zonas concêntricas para a classificação da glândula em humanos, denominando-as zona anterior (estroma fibromuscular), zona central, zona de transição ou periuretral, e zona periférica (Fig. 2B). Esta classificação está de acordo com sua significância morfológica, fisiológica, patológica e sua disposição em relação à uretra (McNeal, 1988; Shappel et al., 2004; Laczko et al., 2005).

A zona central constitui cerca de 20% do volume da glândula circundando os ductos ejaculatórios (Shappel et al., 2004). Caracteriza-se morfológicamente por ácinos grandes com superfície luminal irregular e separados por um estroma contendo fibras musculares lisas bem compactadas que se estendem em direção à periferia dos ácinos (Shappel et al., 2004; Laczko et al., 2005).

A zona de transição constitui menos de 10% do volume da próstata humana normal, que se organiza disposta em torno da porção proximal da uretra prostática (Shappel et al., 2004). Seus ácinos são relativamente pequenos e circundados por um estroma fibromuscular proeminente, que se estende além do perímetro dos adenômeros (Laczko et al., 2005). Apesar de corresponder a uma pequena porcentagem da glândula, a zona de transição é de grande importância médica, pois é a região acometida por hiperplasias benignas da glândula (McNeal, 1988; Shappel et al., 2004; Risbridger & Taylor, 2006). Mais raramente, a zona de transição pode ser acometida por cânceres (cerca de 20% das ocorrências), mas esses em geral são menos graves que aqueles que ocorrem na zona periférica (Shappel et al., 2004).

A zona periférica, maior das subdivisões anatômicas da próstata humana, envolve as zonas central e de transição, bem como a porção distal da uretra, constituindo cerca de 70% do tecido glandular total (McNeal, 1988; Shappel et al., 2004). Nesta região, a caracterização

histológica da glândula assemelha-se com a da zona de transição. A maioria dos adenocarcinomas de próstata surge nessa zona, de forma que as amostras para biópsias de próstata são retiradas da mesma (McNeal, 1988; Risbridger & Taylor, 2006).

A zona anterior é aglandular e caracteriza-se pela constituição exclusivamente de estroma fibromuscular (McNeal, 1988; Shappel et al., 2004; Risbridger & Taylor, 2006).

### **3. REGULAÇÃO HORMONAL DA PRÓSTATA**

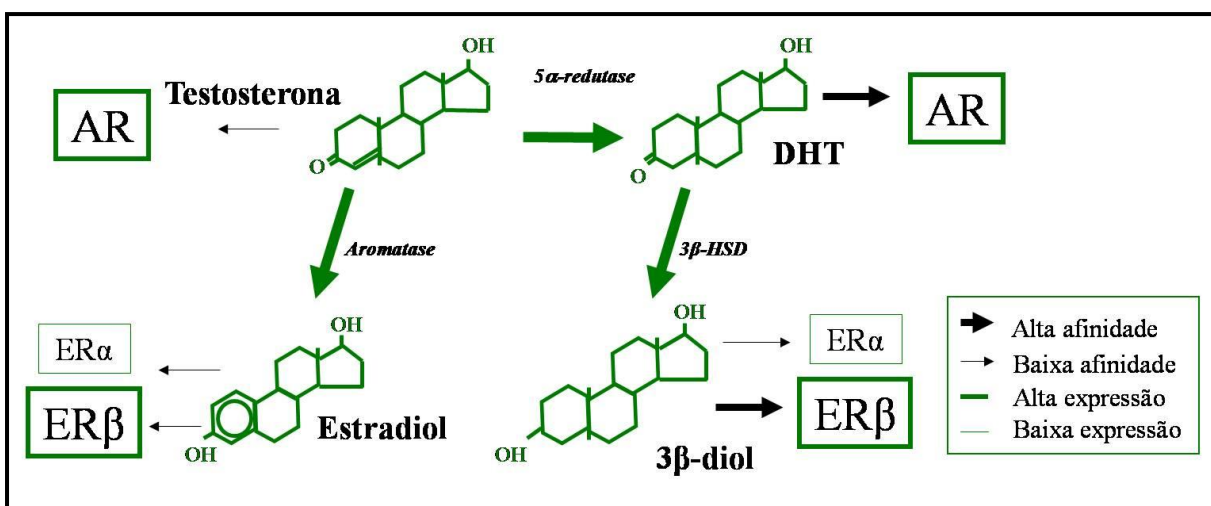
A próstata é influenciada tanto por andrógenos como por estrógenos, que são hormônios esteroides produzidos a partir do colesterol. Tanto as gônadas quanto o córtex da glândula adrenal são responsáveis por esta produção, sendo as gônadas as principais produtoras (Labrie et al., 2000; Risbridger et al., 2001).

#### **3.1. Os andrógenos e seus receptores**

O principal andrógeno presente no sistema genital masculino é a testosterona, produzida pelas células de Leydig, através de estímulo do hormônio luteinizante produzido por células gonadotróficas da parte distal da adenohipófise (Sundaram & Kumar, 1996). Durante o período embrionário, a testosterona estimula a diferenciação dos ductos mesonéfricos (de Wolff) em epidídimo, ductos deferentes e vesículas seminais (Cunha et al., 1992). Na puberdade este hormônio promove o início e a manutenção da espermatogênese e o desenvolvimento do pênis, das vesículas seminais, além dos caracteres sexuais secundários masculinos (Luu-The et al., 2008). Em diversos órgãos genitais, incluindo a próstata, a testosterona pode ser metabolizada, pela enzima 5 $\alpha$ -redutase em diidrotestosterona (DHT) (Fig. 3) (Russel & Wilson, 1994), um andrógeno mais potente, que se liga com afinidade até dez vezes maior aos receptores de andrógenos (AR) que a testosterona (Grossmann et al., 2001; Penning et al., 2007). Com essa maior afinidade pelo AR, a DHT é também duas a dez vezes mais potente na indução da atividade transcricional comparada com a testosterona (Wright et al., 1999). Durante o período fetal, a DHT é essencial para a diferenciação da genitália externa masculina e para o desenvolvimento da próstata (Cunha et al., 1992; Russel & Wilson, 1994), enquanto que na puberdade, ela é fundamental para a maturação sexual por promover o crescimento do escroto e da próstata, além de estimular o crescimento de pêlos

em regiões específicas do corpo, que caracterizam as características sexuais secundárias masculinas (Russel & Wilson, 1994).

Tanto a testosterona quanto a DHT exercem seus efeitos fisiológicos a partir da ativação de proteínas específicas, denominadas receptores de andrógenos (AR), os quais estão amplamente distribuídos por todo o sistema genital masculino, incluindo a próstata. Nessa glândula, esses receptores são encontrados nas células epiteliais secretoras e em algumas células do estroma, como as células musculares lisas perialveolares (Prins et al., 1991). Para alguns autores, as células basais são negativas para AR (Prins et al., 1991; Wang et al., 2001; Taylor et al., 2010), enquanto que para outros, são positivas (Soeffing & Timms, 1995; Mirosevich et al., 1999; Pelletier, 2002). Estes dados contraditórios podem estar relacionados com os estágios de diferenciação fenotípicos dessas células. A DHT, via ligação a AR, promove o desenvolvimento da próstata, a partir da parte pélvica do seio urogenital (Hayward et al., 1996A), assim como a indução e a manutenção da atividade secretora da glândula em animais adultos. Isso é facilmente demonstrado quando é feita castração em ratos, procedimento que resulta em rápida involução da glândula, devido à redução dos níveis de andrógenos com consequente redução da ativação do receptor (Kiplesund et al., 1988; Prins & Birch, 1993; Oliveira et al., 2007). O mesmo ocorre quando há inibição da atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase com consequente redução dos níveis de DHT onde também se observam efeitos semelhantes (Imperato-McGinley et al., 1992).



**Figura 3.** Principais hormônios sexuais reguladores da próstata e seus respectivos receptores. O esquema mostra a metabolização da testosterona a estradiol ou diidrotestosterona (DHT) e dessa para 3 $\beta$ -diol, bem como os respectivos receptores desses hormônios. AR = receptor de andrógeno; ER $\alpha$  = receptor de estrógeno  $\alpha$ ; ER $\beta$  = receptor de estrógeno  $\beta$ .



### **3.2. Os estrógenos e seus receptores**

Além de servir como fonte de DHT, a testosterona pode também ser metabolizada em estradiol pela enzima citocromo P450 aromatase (Fig. 3) (Simpson et al., 1994; Carreau et al., 1999). A produção de estrógenos nos machos ocorre em locais específicos, como testículos, cérebro e tecido adiposo, sendo a fonte principal os testículos (Carreau et al., 2003; Carreau & Hess, 2010). Nesses, a atividade da aromatase foi localizada em células de Sertoli (de animais imaturos), células de Leydig e células espermatogênicas, incluindo os espermatozoides que passam pelas vias espermáticas (Janulis et al., 1996 e 1998; Levallet et al., 1998; Carreau et al., 2003). Dessa forma, os estrógenos têm sido encontrados em concentrações relativamente altas no fluido testicular e no sêmen de diversas espécies animais (Hess, 2000 e 2003; Carreau & Hess, 2010). O tecido adiposo, principalmente abdominal é também considerado uma importante fonte de estrógenos circulantes nos homens (Sundaram & Kumar, 1996).

Os estrógenos agem através de ligação a receptores nucleares específicos, denominados receptores de estrógenos (ER), sendo que até o momento são descritos dois subtipos destes receptores, os ER $\alpha$  (ESR1) e os ER $\beta$  (ESR2) (Kuiper et al., 1996). Os ER pertencem à superfamília de receptores nucleares, que incluem os receptores de andrógenos, progesterona, glicocorticoides, mineralocorticoides, hormônios da tireoide, vitamina D3 e ácido retinoico (White & Parker, 1998; Weatherman et al., 1999). Esses receptores são fatores de transcrição dependentes de ligantes, que quando ativados pelo hormônio específico ligam-se a curtas sequências de DNA dos genes alvos, que no caso dos ER são denominadas elementos responsivos a estrógenos (ERE), desta forma, modulando a transcrição gênica (Parker et al., 1993; White & Parker, 1998).

Os ER são encontrados no compartimento nuclear tanto na ausência quanto na presença de ligante, ao contrário de outros receptores de esteroides, que são translocados para este compartimento após a ativação pelo hormônio específico (Htun et al., 1999). Na ausência de ligante, os ER estão uniformemente distribuídos em fraca interação com a matriz nuclear, associados a um grande complexo multiproteico de chaperonas, especialmente proteínas de choque térmico *hsp90*, *hsp70*, *hsp56* (Knoblauch & Garabedian, 1999). Esse complexo mantém os receptores inativos e auxilia no correto dobramento da molécula além de protegê-la da degradação por proteases nucleares (Knoblauch & Garabedian, 1999). A ativação pelo ligante resulta em mudanças conformacionais da molécula promovendo formação de dímeros

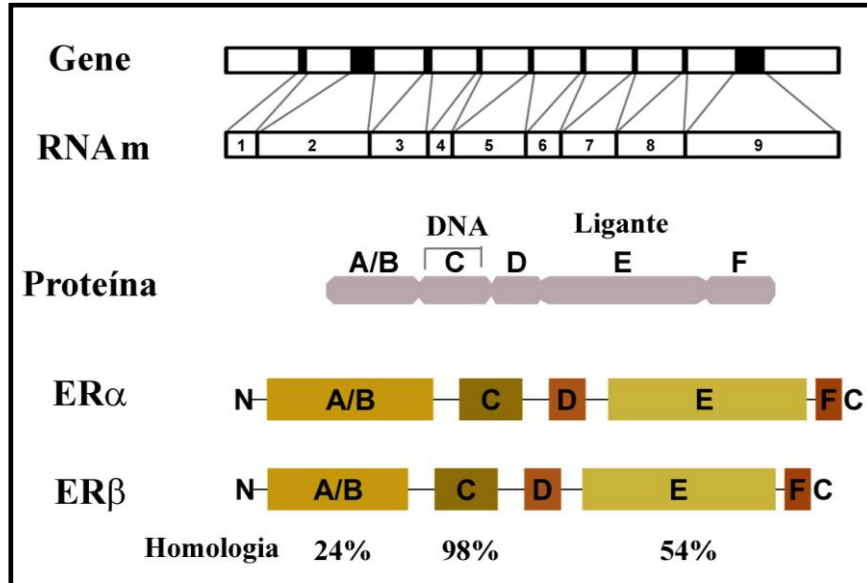
e redistribuição pontual pelo núcleo, aumentando sua afinidade pelos componentes da matriz nuclear e sua interação com moléculas coativadoras/repressoras, permitindo assim a regulação gênica (Htun et al., 1999; Hager et al., 2000; Stenoien et al., 2000). Apesar desta localização predominantemente nuclear no estado de equilíbrio, os receptores de estrógenos estão em dinâmica movimentação nucleocitoplasmática, onde o receptor sai do núcleo, mas é rapidamente transportado de volta por um processo dependente de energia (Guiochon-Mantel et al., 1991; Htun et al., 1999).

Sítios de ligação específicos para estrógenos foram identificados em 1958, sendo que em 1986, os receptores de estrógenos foram clonados pela primeira vez a partir de DNA complementar (DNAC) de células cancerígenas de mama, e em seguida isolado de outras espécies (Green et al., 1986; Enmark & Gustafsson, 1999). Por muitos anos acreditou-se haver um único receptor para os estrógenos, mas com o desenvolvimento de camundongos *Knockout* para ER observou-se que, ainda assim, havia ligação de estrógenos em alguns tecidos, sugerindo a existência de outro receptor (Enmark & Gustafsson, 1999). Dez anos mais tarde foi clonado de DNAC da próstata de rato um segundo tipo de ER, de forma que o primeiro receptor identificado foi renomeado ER $\alpha$ , e o segundo denominado ER $\beta$  (Kuiper et al., 1996). Apesar da homologia destas proteínas, elas não são subtipos uma da outra, sendo produtos de genes de diferentes cromossomos que variam entre as espécies. Enquanto ER $\alpha$  está localizado no braço longo do cromossomo 6 em humanos e no cromossomo 10 de camundongos, ER $\beta$  está localizado no braço longo do cromossomo 14 e 12 de humanos e camundongos, respectivamente (Enmark et al., 1997; Matthews & Gustafsson, 2003).

### **3.2.1. Estrutura molecular dos receptores de estrógenos**

ER $\alpha$  é uma proteína com cerca de 595 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 66 kDa (Greene et al., 1986), enquanto que ER $\beta$  possui 485 e 549 aminoácidos e massa molecular de cerca de 54,2 kDa e 60-63 kDa para roedores e humanos, respectivamente (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Enmark et al., 1997; Tremblay et al., 1997). O gene transcrito corresponde a um RNA mensageiro (RNAm) composto por nove exons, que por sua vez, codifica uma proteína com seis domínios funcionais: domínio amino-terminal (NTD – regiões A/B), domínio de ligação ao DNA (DBD – região C), região de dobradiça (região D), domínio de ligação ao ligante (LDB – região E) e região F

correspondente à porção carboxi-terminal da proteína (Fig. 4) (Weatherman et al., 1999; Beato & Klug, 2000).



**Figura 4.** Estrutura molecular dos receptores de estrógenos. O gene é transcrito para um RNAm composto por nove exons, que por sua vez codifica a proteína com seis diferentes domínios funcionais, sendo os domínios A/B (N-terminal), C (DBD), D (região de dobradiça), E (LBD) e F. Comparação entre ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Adaptado de Prins & Korach, 2008.

O domínio amino-terminal contém a função de ativação transcricional AF-1, responsável por ativar de forma específica os genes alvos das células juntamente com proteínas coativadoras e corressoras da maquinaria transcricional (Beato & Klug, 2000; Pettersson & Gustafsson, 2001). É a região menos conservada entre os receptores nucleares, apresentando apenas cerca de 24% de homologia entre ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Fig. 4) (Pettersson & Gustafsson, 2001; Prins & Korach, 2008).

O domínio DBD é a região mais conservada, apresentando mais de 98% de homologia entre ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Fig. 4) (Pettersson & Gustafsson, 2001; Prins & Korach, 2008). Os resíduos de cisteína presentes nesta região estão envolvidos com a formação de dois dedos de zinco onde o primeiro medeia o reconhecimento específico ao segmento de DNA denominado elemento responsivo a estrógenos (ERE), enquanto que o segundo está envolvido com a dimerização do receptor, além da estabilização do complexo DNA/receptor (Weatherman et al., 1999; Beato & Klug, 2000).

A região de dobradiça confere flexibilidade ao receptor, permitindo sua estrutura adequada para os processos de dimerização e interação específica da região DBD ao DNA.

Além disso, o sinal de localização nuclear foi encontrado nesta região e na região DBD, implicando na participação destes domínios na translocação do receptor para o núcleo (Beato & Klug, 2000).

O domínio LBD, como o próprio nome sugere, medeia a interação específica entre o receptor e seu ligante, sendo também uma região de interação do receptor com chaperonas na ausência do ligante (Beato & Klug, 2000). Esta região consiste de 12  $\alpha$ -hélices que se dispõem de forma a circunscrever uma cavidade, onde ocorre a interação com o ligante. Após o acoplamento do ligante, mudanças conformacionais desta região resultam na estabilização do complexo receptor/ligante desempenhando importante papel na dimerização do receptor (Beato & Klug, 2000). A região também está envolvida no recrutamento de corre reguladores durante a ativação transcricional. Possui ainda a função ativadora AF-2, responsável por promover a atividade transcricional dependente de ligante e sujeita a sofrer alterações pós-traducionais (Beato & Klug, 2000; Pettersson & Gustafsson, 2001). Apesar da homologia de apenas 54%, os estrógenos endógenos (estradiol, estrona, estriol) interagem com os dois receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ , com similar afinidade (Kuiper et al., 1998). Porém, alguns fitoestrógenos como genisteína e cumestrol se ligam aos ER $\beta$  com maior afinidade comparado ao ER $\alpha$  (Kuiper et al., 1998).

Ao contrário de outros receptores esteroides, o domínio F é bem definido apenas nos ER (Prins & Korach, 2008). Localizado na extremidade carboxi-terminal da molécula, esse domínio é relativamente pequeno comparado aos outros domínios da proteína. ER $\alpha$  e ER $\beta$  possuem pouca homologia no domínio F, o que suporta a ideia de que ele possa estar envolvido nas diferentes funções biológicas entre estes dois receptores. Estudos indicam sua participação na modulação da ligação do ligante, no recrutamento de proteínas corre reguladoras e na atividade transcricional do receptor (Prins & Korach, 2008; Skafar et al., 2008).

Após a descoberta de ER $\beta$ , numerosas investigações vêm mostrando a existência de *splices* variantes de seu RNAm, que são eficientemente traduzidos tanto em roedores quanto em humanos (Petersen et al., 1998). Para diferenciar essas formas variantes da molécula inicialmente descoberta, essas proteínas foram identificadas cronologicamente de 1 a 5, sendo que as descrições feitas anteriormente são referentes a ER $\beta$ 1. Em roedores, ER $\beta$ 2 foi identificado contendo inserção de 18 aminoácidos na região LBD, enquanto que em humano (também nomeado ER $\beta$ cx) constatou-se a deleção de 61 aminoácidos na região carboxi-

terminal (Maruyama et al., 1998; Saunders et al., 2002; Scobie et al., 2002). ER $\beta$ 3 possui deleção do exon 5, onde a proteína resultante possui os domínios A/B, C e D e pequena parte do domínio E. As variantes de ER $\beta$ 4 e ER $\beta$ 5 sofrem deleções mais maciças resultando em uma proteína com parte da região E e a região F (Scobie et al., 2002; Matthews & Gustafsson, 2003). Essas modificações da molécula, como esperado, resultam em proteínas funcionalmente diferentes da original (ER $\beta$ 1). Há evidências de que essas variantes podem formar heterodímeros com ER $\beta$ 1 e ER $\alpha$ , de forma a modular negativamente estes receptores (Maruyama et al., 1998; Scobie et al., 2002). As descrições a seguir referem-se a ER $\beta$ 1, que representaremos apenas como ER $\beta$ .

### **3.2.2. Distribuição e função dos receptores de estrógenos na próstata**

Os receptores de estrógenos são encontrados em diversos órgãos do sistema genital masculino, indicando que estrógenos também possam desempenhar importantes papéis nos machos (Hess et al., 1997; Saunders et al., 2001; Oliveira et al., 2003 e 2005). Embora a próstata seja um clássico tecido andrógeno-dependente, numerosos estudos experimentais e epidemiológicos, na última década, têm revelado a participação relevante dos estrógenos nos processos de diferenciação e crescimento do órgão, bem como em suas desordens patológicas (Prins et al., 1993; Prins et al., 2001; McPherson et al., 2007).

Os dois subtipos de receptores de estrógenos estão presentes na próstata, porém com diferenças quanto à intensidade de expressão e à distribuição dos mesmos (Makela et al., 2000; Imamov et al., 2004; Prins & Korach, 2008). ER $\alpha$  é expresso no epitélio da próstata ventral de ratos recém nascidos o que é importante para modular a morfologia da ramificação dos ductos prostáticos. Após as primeiras duas semanas de vida, a expressão de ER $\alpha$  é reduzida, enquanto que ER $\beta$  começa a se tornar o principal ER no órgão (Omoto et al., 2005). Na glândula sexualmente madura, o epitélio deixa de expressar ER $\alpha$ , que passa a se expressar apenas em algumas células de seu estroma, sendo essa expressão tão baixa que técnicas de imunohistoquímica não podem detectá-lo facilmente (Pelletier et al., 2000; Prins & Korach, 2008). Ao nascimento, a expressão de ER $\beta$  é baixa, porém aumenta progressivamente na medida em que as células epiteliais se diferenciam e chega a sua expressão máxima na fase adulta, com cerca de 90 dias de idade (Prins et al., 1998), sendo intensamente expressos nas

células secretoras e basais, além de algumas células do estroma (Saunders, 1998; Horvarth et al., 2001).

Através de modelos experimentais *knockouts* para ER $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) e para ER $\beta$  ( $\beta$ ERKO), algumas funções mediadas por esses receptores estão sendo elucidadas e sugerem que os mesmos tenham papéis fisiológicos distintos na próstata (Krege et al., 1998; Dupont et al., 2000; Chen et al., 2008). Foi atribuído papel proliferativo para o ER $\alpha$ , visto que ele é o mediador da indução de metaplasia escamosa em animais  $\beta$ ERKO, mas não em animais  $\alpha$ ERKO (Prins et al., 2001; Risbridger et al., 2001). Essa função pode explicar ainda as observações de que a exposição de ratos a estrógenos durante estágios críticos de desenvolvimento pode levar ao quadro de hiperplasia ou displasia prostática (Bianco et al., 2002). Já o ER $\beta$  tem propriedades anti-proliferativa, pró-apoptótica e, ainda, promove a diferenciação celular (Cheng et al., 2004; Imamov et al., 2004; McPherson et al., 2007 e 2010). O papel antiproliferativo de ER $\beta$  na próstata fica evidenciado em camundongos  $\beta$ ERKO, os quais apresentam múltiplos e precoces focos de hiperplasia da próstata, sendo que por volta de 1 ano de idade cerca de 80% dos animais apresentam lesões hiperplásicas (Weihua et al., 2001). Esses efeitos de ER $\beta$  explicam o fato de que uma dieta rica em fitoestrógenos, os quais se ligam com maior afinidade aos ER $\beta$  do que aos ER $\alpha$ , está associada com a diminuição do risco de câncer de próstata (Weihua et al., 2001).

A presença de altos níveis de ER $\beta$  na próstata é intrigante, considerando que a concentração prostática de estradiol é baixa (0.1 pmol/g) (Voigt & Bartsch, 1986). Da mesma forma, apesar de existir informação sobre a ocorrência de alguma atividade aromatase no estroma da próstata humana, essa enzima geralmente não é detectada no epitélio prostático normal em homens e em roedores (Brodie et al., 1989; Takase et al., 2006; Risbridger et al., 2003; Ellem et al., 2004). Tais informações levaram à especulação de que o estradiol poderia não ser a principal molécula estrogênica a atuar na próstata (Weihua et al., 2001). De fato, na via metabólica dos andrógenos, existe uma via alternativa que é a metabolização da DHT, de forma virtualmente irreversível, para 3 $\beta$ -diol (5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol), através da ação da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) (Steckelbroeck et al., 2004). Diferente dos demais andrógenos, o 3 $\beta$ -diol não se liga aos receptores de andrógenos, mas sim aos receptores de estrógenos, especialmente do subtipo ER $\beta$  (Fig. 3), que são abundantes na próstata (Kuiper et al., 1997; Pak et al., 2005). Ainda, a concentração prostática de 3 $\beta$ -diol (10pmol/g) é cerca de 100 vezes mais alta que a de estradiol (Voigt & Bartsch, 1986),

revelando assim a possibilidade de que esse metabólito da DHT possa de fato ser o ligante alternativo de ER $\beta$  no local.

O 3 $\beta$ -diol foi até recentemente considerado um metabólito inativo da DHT, mas confirmando sua atividade estrogênica intrínseca, já está determinado que sua capacidade de estimular a atividade de transcrição induzida por ER $\beta$  é similar ou até maior que a do ligante clássico estradiol (Pak et al., 2005; Sneddon et al., 2005). Ainda, diversos estudos mostram que o 3 $\beta$ -diol tem atividade hormonal ativa, participando em várias funções biológicas (Morali et al., 1994; Aspinall et al., 2004; Weihua et al., 2002; Imamov et al., 2004; Sneddon et al., 2005; Picciarelli-Lima et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Na próstata, um estudo comparativo sobre o papel relativo de 3 $\beta$ -diol, estradiol e DHT na regulação da expressão de ER $\beta$  e AR, duas proteínas chave na manutenção da morfofisiologia do órgão, mostrou que 3 $\beta$ -diol é o mais potente indutor da expressão de ER $\beta$ , enquanto DHT é mais efetivo na modulação de AR (Oliveira et al., 2007). Por outro lado, os efeitos do estradiol na expressão de ER $\beta$  e AR foram inexpressivos (Oliveira et al., 2007). Outras evidências também sugerem que a expressão de ER $\beta$  na próstata não seja estrógeno-sensível (Prins et al., 2001).

#### **4. RELAÇÕES ENTRE CÂNCER DE PRÓSTATA, ENVELHECIMENTO E ER $\beta$**

O adenocarcinoma de próstata é o tipo de câncer não-cutâneo mais freqüente na população masculina brasileira de todas as regiões do país, além de constituir a segunda maior causa de morte por câncer no país (INCA, 2010; <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010>). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA – Ministério da Saúde, 2010), o número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil no ano de 2010 – 2011 é de 52.350, o que corresponde a um risco de 54 casos a cada 100 mil homens. No mundo, essa patologia configura igualmente o segundo tipo de câncer de maior incidência em homens (Parkin et al., 2005).

A idade é um fator de risco com significado especial para o câncer da próstata, uma vez que tanto sua incidência quanto a mortalidade aumentam exponencialmente após os 50 anos, sendo que  $\frac{3}{4}$  dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (INCA – Ministério da Saúde, 2010). Segundo a *American Cancer Society*, a probabilidade dos homens desenvolverem câncer da próstata cresce de 0,01% da infância até a quarta década de vida para 2.6%, 7.0%, 13.8% e 17.1%, respectivamente, da quinta até a oitava década (Begley et

al., 2008). Este fato pode estar relacionado com as mudanças hormonais que ocorrem ao longo do envelhecimento, destacando-se a marcante redução dos níveis de testosterona e aumento dos níveis de estrógenos, levando a um aumento de até 40% na proporção de estrógeno:andrógeno séricos (Banerjee et al., 2001). Vale ressaltar que os níveis de estrógenos intraprostáticos, tanto absolutos quanto relativos à testosterona, também aumentam com a idade (Shibata et al., 2000).

Evidências do envolvimento de ER $\beta$  com a patogênese de câncer estão se acumulando rapidamente, sendo que há estudos que demonstram relação entre esse receptor e os cânceres de mama (Leclercq, 2002; Palmieri et al., 2002) e de cólon (Foley et al., 2000). Em ambos foi percebida tendência de diminuição da expressão de ER $\beta$  com o desenvolvimento do carcinoma. Na próstata, há também diversas evidências de que o mesmo efeito ocorra em sua carcinogênese (Horvath et al., 2001; Leav et al., 2001; Pasquali et al., 2001B). Estudos em próstatas humanas e de cães mostram que há silenciamento progressivo de ER $\beta$  com o avanço dos carcinomas (Horvath et al., 2001, Grieco et al., 2006), sendo que a expressão de ER $\beta$  reduz drasticamente com o desenvolvimento da doença, de forma que, em 75% dos casos, o receptor não se expressa (Horvath et al., 2001). Mais impressionante ainda é o fato de que a reintrodução de ER $\beta$  em células malignas promove redução da proliferação e capacidade invasiva das mesmas (Cheng et al., 2004; Guerini et al., 2005). Além disso, pacientes cujas células cancerosas ainda expressam ER $\beta$  apresentam regressão mais rápida da doença e menor taxa de reincidência após a cura (Horvath et al., 2001).

É fato que os carcinomas acometem mais as glândulas da zona periférica da próstata humana, em contraste com a zona de transição, que se relaciona mais com a origem de hiperplasia benigna. Evidências recentes indicam que a diferença na incidência de tumores malignos entre as zonas prostáticas envolve o grau de expressão dos receptores de hormônios esteroides, entre eles o ER $\beta$  (Kirschenbaum et al., 2006). Foi demonstrado que, nas células basais da próstata saudável a expressão de ER $\beta$  é extremamente baixa na zona periférica e mais intensa na zona de transição (Kirschenbaum et al., 2006). Em contraste com ER $\beta$ , a expressão de AR é maior na zona periférica em relação à zona de transição (Kirschenbaum et al., 2006), corroborando o fato de que o adenocarcinoma prostático é andrógeno dependente (Guerini et al., 2005). É interessante destacar que o ER $\alpha$  não apresenta diferença na expressão entre as duas zonas prostáticas analisadas, indicando que este receptor não exerce forte influência na carcinogênese nesse órgão (Kirschenbaum et al., 2006).



A expressão diferencial de ER $\beta$  nas diferentes zonas morfológicas da próstata aponta para um papel protetor desse receptor na zona de transição, onde sua expressão é alta. Por outro lado, a mais baixa expressão de ER $\beta$  nas glândulas periféricas pode estar relacionada com a maior incidência de carcinoma nesta região (McNeal et al., 1988). As propriedades anti-proliferativa, pró-apoptótica e pró-diferenciação celular podem justificar esse papel anti-cancerígeno atribuído aos ER $\beta$  (Cheng et al., 2004; Imamov et al., 2004). Além disso, evidências obtidas a partir de transfecção viral de ER $\beta$  para células cancerosas, mostraram que a recuperação da expressão destes receptores induz a redução de 50% na capacidade invasiva das células cancerosas, assim como redução de 60% da proliferação celular e aumento na taxa de apoptose (Cheng et al., 2004). Juntos, esses dados sugerem que o ER $\beta$  pode agir como supressor de tumores na próstata.

Apesar das evidências de que ER $\beta$  exercem papel importante tanto na fisiologia quanto nas patologias da próstata, e de que existe íntima relação entre redução de ER $\beta$  e crescimento anormal do tecido prostático comum na velhice, pouco se sabe sobre a ocorrência de variação idade-dependente na expressão de ER $\beta$  nessa glândula. Na verdade, apenas um estudo *in vitro*, utilizando como modelo células prostáticas de cães, foi encontrado na literatura consultada, sendo que os autores descrevem redução nos níveis prostáticos de RNA mensageiro de ER $\beta$ , mas não mencionam os níveis proteicos (Jiang et al., 2005). Dessa forma, no presente estudo a proposta é examinar se a expressão de ER $\beta$  sofre variação associada com idade, na próstata ventral de ratos adultos jovens a idosos (3 a 24 meses), vislumbrando possíveis contribuições para o conhecimento científico na área.

---

## **II. OBJETIVOS**

## **II. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo geral**

O objetivo geral do trabalho é elucidar se a expressão de ER $\beta$  na próstata ventral de ratos sofre alterações com o envelhecimento.

### **2. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos incluem:

- Determinar o peso corporal, dos testículos e dos diversos lobos prostáticos dos ratos de diferentes idades;
- Comparar a morfologia da próstata ventral dos ratos de diferentes idades;
- Avaliar possíveis variações na expressão de ER $\beta$  na próstata ventral de ratos de diferentes idades, usando *Western blotting* e imunohistoquímica.

---

### **III. METODOLOGIA**

### III. METODOLOGIA

#### **Obtenção dos animais**

Foram utilizados 51 ratos Wistar machos adultos, com 3 (adultos jovens), 6 e 12 (adultos) e 18 e 24 (senis) meses de idade, adquiridos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos em estante climatizada (Alesco, Austrália), no biotério do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG. Os animais foram submetidos a ciclos de luz (12 horas de luz e 12 horas no escuro) e temperatura (22 °C) constantes e receberam água e ração peletizada *ad libitum*. A escolha da idade de início do experimento foi determinada com base no fato de que a expressão do RNAm de ER $\beta$  atinge o padrão de adulto com 90 dias de idade (Prins et al., 1998). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG – processo 286/2008) e seguiram o protocolo publicado pela Universidade Federal de Minas Gerais ([www.ufmg.br/coep/cetea.html](http://www.ufmg.br/coep/cetea.html)).

#### **Preparação dos tecidos**

Após atingirem as respectivas idades de interesse, os animais foram pesados e posteriormente sacrificados pela administração de anestésico em concentração letal (pentobarbital sódico 50mg/Kg e cloridrato de quetamina 10mg/kg), precedido de heparinização. Os animais destinados aos estudos histopatológicos e imunohistoquímicos foram perfundidos por via intracardíaca, através do ventrículo esquerdo, com solução de formalina neutra tamponada a 10%, após a perfusão com solução Ringer bicarbonato. Após fixação, os lobos prostáticos foram devidamente dissecados, pesados e seccionados. Os fragmentos obtidos foram lavados em salina tampão fosfato (PBS), desidratados em série crescente de etanol e incluídos em resina glicolmetacrilato (Technovit 7100 – Heraeus Kulzer, Alemanha), ou ainda, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Histotec<sup>®</sup> Pastilles – Merck, Alemanha). Cortes dos tecidos de 3 e 5 $\mu$ m de espessura, respectivamente, foram obtidos em micrótomo semi-automático (Microm HM335E, EUA) e colocados em lâminas silanizadas, para serem submetidas às colorações histológicas ou procedimentos imunohistoquímicos.

Para a realização do *Western Blotting*, os animais foram perfundidos apenas com solução Ringer bicarbonato, sendo em seguida dissecados, e os lobos prostáticos de interesse congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem processados.

### **Histopatologia**

Para avaliar possíveis alterações morfológicas e/ou patológicas da próstata ventral de ratos, decorrentes da idade (n=5, exceto 24 meses onde o n foi de 6), fragmentos de tecidos incluídos em parafina ou em glicolmetacrilato foram seccionados e submetidos a colorações histológicas de rotina. Para tecidos incluídos em parafina, as secções de tecidos (5  $\mu\text{m}$ ) foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série decrescente de etanol. Os mesmos foram corados com hematoxilina de Mayer seguidos pela eosina alcoólica (HE), ou com tricrômico de Masson seguido de contra-coloração em hematoxilina de Mayer.

Para os tecidos incluídos em glicolmetacrilato, secções de 3  $\mu\text{m}$  de espessura foram hidratadas em água destilada precedente às colorações com azul de toluidina-borato de sódio, HE ou PAS (*periodic acid-Schiff*). Para HE, os tecidos foram corados com hematoxilina de Delafield seguido de eosina aquosa. Para a coloração por PAS, as lâminas foram incubas em ácido periódico, seguido de incubação com reagente de Schiff, lavagem em água sulfurosa e contracoloração com hematoxilina de Mayer. Posteriormente às colorações, os cortes foram desidratados, diafanizados e as lâminas montadas para análise.

As descrições histopatológicas foram feitas de acordo com o Sistema de Classificação de Patologias Prostáticas, desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer de Modelos Murinos para Câncer Humano (Shappel et al., 2004).

### ***Western Blotting***

Possíveis alterações na expressão de ER $\beta$  na próstata ventral de ratos de diferentes idades foram investigadas inicialmente pela técnica de *Western Blotting*, seguindo protocolo previamente padronizado, com algumas modificações que aperfeiçoaram a técnica (Oliveira et al., 2007). Com essa finalidade, as próstatas ventrais dos animais de diferentes idades (n = 5), congeladas em nitrogênio líquido, foram maceradas em gelo seco. Os tecidos pulverizados foram pesados (~100 mg) e homogeneizados em 300 $\mu\text{L}$  de tampão de ureia 8M, contendo

Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 0,5 mM pH 8.0, e inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail* – Sigma, EUA), com auxílio de aparelho homogeneizador (IKA T10 *Basic*, Alemanha). Seguido esse processo, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 14000 rotações por minuto à temperatura de 4°C, para extração de proteínas totais, as quais se encontravam na fração sobrenadante. Em seguida, procedeu-se a sonicação do sobrenadante, utilizando-se o aparelho Ultrasonic Processor (Asia Manufacturer). Em seguida, adicionou-se às amostras, na proporção de 1:1, tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, Tris-HCl 30 mM pH 6.8, β-mercaptoetanol, glicerol 12% e azul de bromofenol, seguido de fervura das mesmas por cinco minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese contínua usando SDS-PAGE 10% (eletroforese em gel de poliacrilamida) para separação das proteínas, seguida de transferência lenta (*overnight* a 24V mais uma hora a 48V) para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio das membranas com soro normal de cabra 10%, realizou-se a incubação das mesmas com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-ERβ de humano (NCL-ER Novocastra, Reino Unido), diluído 1:500 em PBS durante uma hora. Após lavagem da membrana em PBS-*tween* 0,05% (PBST) foi feita incubação com anticorpo secundário biotiniliado, cabra-anti-camundongo (Dako, EUA), diluído 1:1000 em PBS por uma hora. Seguidas as lavagens em PBST, as membranas ainda foram incubadas por 30 minutos com solução de complexo avidina-biotina conjugados com peroxidase (*Vectastain Standard ABC kit* – *Vector Laboratories*, EUA). Após várias lavagens, a revelação adveio pela adição de substrato contendo 0,1% de 3,3'-diaminobenzidina em PBS contendo 0,05% cloronaftol, 16,6% metanol e 0,04% peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida pela adição de água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As membranas obtidas foram escaneadas (HP *Officejet J5780*) e as imagens salvas em formato TIFF. Em seguida, as imagens foram convertidas para escala de cinza e, posteriormente invertidas utilizando-se o programa de imagem *Adobe Photoshop* (*Adobe Systems*, CA). Essas imagens foram exportadas para o programa *Image Tool* (version 3.00; *University of Texas Health Sciences Center*, TX), onde as bandas específicas foram delimitadas e medidas.

## **Imunohistoquímica**

Para determinar possíveis alterações na expressão tecidual, bem como investigar alterações na distribuição celular e/ou subcelular de ER $\beta$ , foi realizada a técnica de imunohistoquímica. Para tal, fragmentos da próstata ventral dos ratos nas diferentes idades estabelecidas (sendo os mesmos animais utilizados para histopatologia: n = 5, exceto 24 meses cujo n foi 6), foram incluídos em parafina e submetidos ao protocolo de rotina previamente padronizado (Oliveira et al., 2007).

Primeiramente, os cortes de tecidos foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol, lavados em água corrente e tampão salina Tris-HCl (TBS), seguido de bloqueio da peroxidase endógena em solução 0,6% de peróxido de hidrogênio em metanol. A reação imunohistoquímica precedeu-se de recuperação antigênica, que foi realizada pelo aquecimento dos cortes, mergulhados em tampão citrato 0,01M pH 6.0, em forno micro-ondas. Após esfriamento e lavagem dos tecidos em TBS, procedeu-se o bloqueio de avidina e biotina endógenas com uso de kit de bloqueio comercial (*Avidin/biotin blocking kit* – *Vector Laboratories*, EUA), para seguinte bloqueio de ligações inespecíficas com soro normal de cabra 10%, por uma hora. A etapa seguinte constituiu-se da incubação dos tecidos com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-ER $\beta$  de humano (NCL-ER Novocastra, Reino Unido), diluído 1:20 em 1% de albumina de soro bovino e TBS, durante 48 horas a 4°C. Para os controles negativos da imunomarcagem, os cortes foram incubados com TBS em substituição ao anticorpo primário. Após lavagens em TBS, os fragmentos foram expostos ao anticorpo secundário biotiniliado, cabra-anti-camundongo (Dako, EUA), diluídos 1:50 em TBS por uma hora. Novas lavagens em tampão seguiram-se para seguinte incubação dos tecidos com estreptavidina (*Horseradish Peroxidase Streptavidin* – *Vector Laboratories*, EUA) por 45 minutos, seguido de lavagens em TBS. A imunorreação foi visualizada usando-se solução de 0,05% diaminobenzidina, contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl, 0,05M, pH 7.4. A reação foi interrompida por imersão em água destilada. Ao final, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados para análise. Os ensaios foram realizados em triplicata.



### **Documentação fotomicrográfica**

Os preparados histológicos e imunohistoquímicos foram fotografados utilizando-se câmera digital (Moticam 2300, Motic®, China), acoplada ao fotomicroscópio (Nikon Eclipse E600). As imagens obtidas foram salvas em formato TIFF e processadas utilizando-se o programa *Adobe Photoshop* (*Adobe Systems, CA*).

### **Análise estatística**

Os dados referentes ao peso corporal, testicular e dos lobos prostáticos, assim como a intensidade das bandas obtidas pelo *Western blotting* foram analisados estatisticamente através do programa *STATISTIC 7* (*StatSoft, Inc, EUA*) usando os testes de múltipla variância *One-Way ANOVA* e *Newman-Keuls* para comparação *post-hoc* entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

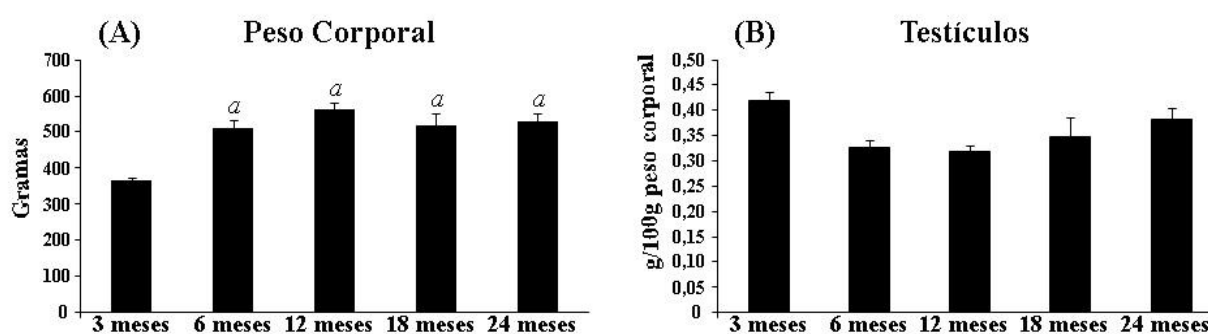
---

## **IV. RESULTADOS**

## IV. RESULTADOS

### 1. PESO CORPORAL, DOS TESTÍCULOS E DO COMPLEXO PRÓSTATA

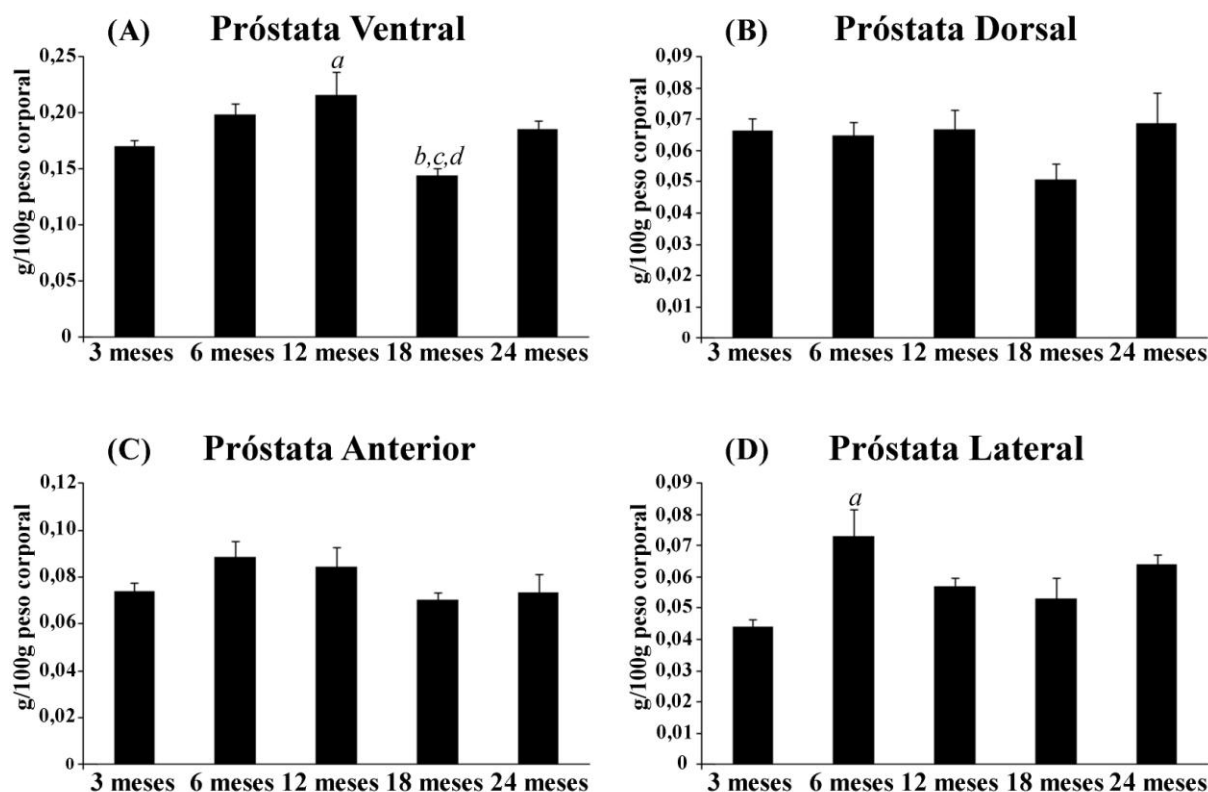
A análise do peso corporal mostrou que a partir dos 6 meses de idade foi estabilizado o peso dos animais adultos, que permaneceu similar até o final do período experimental (24 meses) (Fig. 5A). O peso relativo dos testículos não mostrou diferença significativa entre os grupos (Fig. 5B).



**Figura 5.** (A) Peso corporal e (B) peso relativo dos testículos de ratos Wistar em diferentes idades. *a*:  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo de três meses de idade.

A próstata ventral mostrou aumento progressivo de peso dos 6 aos 12 meses de idade, sendo a diferença estatisticamente significativa aos 12 meses em comparação aos animais de 3 meses de idade (Fig. 6A). Dos 18 aos 24 meses a glândula mostrou redução de peso, sendo mais acentuada aos 18 meses, onde diferenças significativas foram encontradas em relação aos animais de 6, 12 e 24 meses de idade.

Os pesos relativos das próstatas dorsal e anterior não mostraram diferenças significativas entre os grupos (Fig. 6B e C). Por outro lado, a próstata lateral apresentou aumento no peso relativo aos 6 meses em relação ao grupo de 3 meses de idade, sendo que dos 12 até 24 meses este peso se equiparou ao dos animais de 3 meses (Fig. 6D).



**Figura 6.** Peso relativo do complexo próstata de ratos Wistar em diferentes idades. (A) próstata ventral, (B) próstata dorsal, (C) próstata anterior e (D) próstata lateral. *a*:  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo de três meses, *b*:  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo de seis meses, *c*:  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo de 12 meses e *d*:  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo de 24 meses.

## 2. HISTOPATOLOGIA DA PRÓSTATA VENTRAL

A próstata ventral de ratos é formada por adenômeros túbulo-alveolares, cujo epitélio secretor é do tipo pseudoestratificado prismático com presença de células luminiais ou secretoras e escassas células basais. O epitélio apoia-se em delgada lâmina própria. Externamente, os adenômeros são circundados por duas a três camadas de células musculares lisas. O estroma interalveolar apresenta-se frouxo, com poucas fibras de tecido conjuntivo, além de vasos sanguíneos. No tecido conjuntivo destaca-se a presença de abundantes mastócitos, caracterizados pelo citoplasma repleto de grânulos metacromáticos, quando corados pelo azul de toluidina-borato de sódio, ou PAS-positivos.

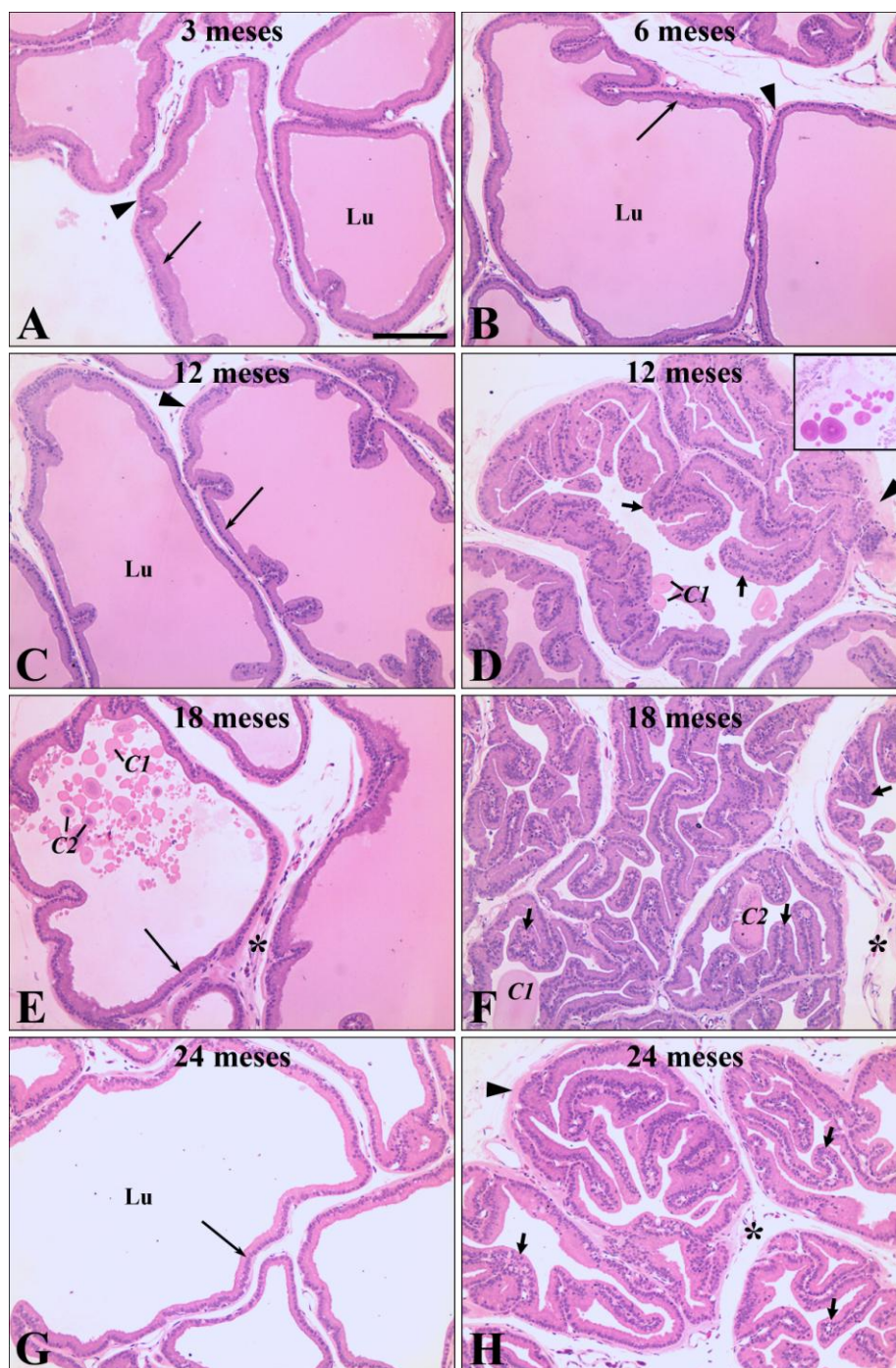
Aos três meses de idade, a próstata ventral aparece histologicamente normal, com algumas regiões de discreto pregueamento da mucosa. Os adenômeros encontram-se repletos de

secreção eosinofílica, PAS-positiva, bastante homogênea em seu lúmen. Descamação de células epiteliais e células em apoptose são raras nesta idade (Fig. 7A).

Aos seis meses de idade, as características morfológicas da próstata ventral são similares ao grupo anterior, com exceção da presença de algumas células descamadas no lúmen dos adenômeros. Os adenômeros nesta idade são mais dilatados pelo conteúdo luminal abundante, enquanto o pregueamento da mucosa é menos evidente na maioria das glândulas (Fig. 7B).

Aos 12 meses de idade, o epitélio dos adenômeros apresenta-se prismático, oscilando com algumas regiões onde este se torna cúbico. A aparência dos adenômeros é variável neste grupo, onde há ocorrência de túbulo-alvéolos similares aos dos grupos anteriores e outros onde o epitélio apresenta aumento de seu padrão de pregueamento, sugestivo de hiperplasia (Fig. 7C e D). O maior pregueamento epitelial ocorre especialmente nas porções terminais dos adenômeros. Discreta vacuolização citoplasmática, principalmente na região supranuclear das células secretoras, pode ser observada em algumas células epiteliais. A presença de células descamadas no lúmen dos adenômeros é maior, sendo ainda detectadas pequenos corpos eosinofílicos, intensamente PAS-positivos, correspondentes a corpos amiláceos (inserto Fig. 7D).

Aos 18 e 24 meses de idade, grande heterogeneidade histopatológica é observada nos animais dentro de cada grupo, entre os dois grupos, e até mesmo na glândula de um mesmo animal. Os corpos amiláceos que antes eram homoganeamente eosinofílicos passam a apresentar basofilia central, característica de processo de calcificação, caracterizando as concreções prostáticas. Essas concreções aumentam em frequência e tamanho, assim como a intensidade do pregueamento epitelial (focos hiperplásicos) (Fig. 7E – H). A secreção intraluminal torna-se menos homogênea e menos intensa para a coloração com PAS, sendo também menos abundante na maioria dos adenômeros (Fig. 7 e 8).

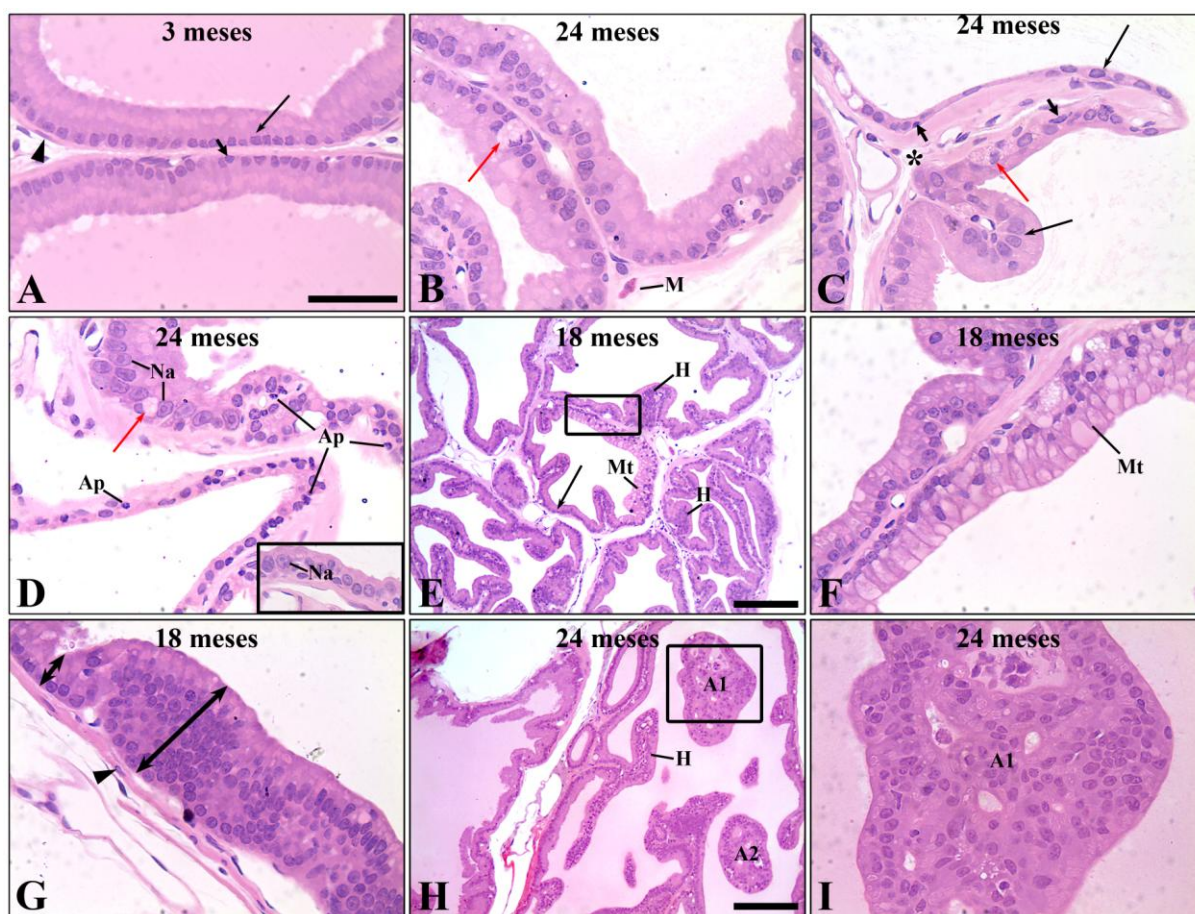


**Figura 7.** Histopatologia da próstata ventral de ratos Wistar em diferentes idades. (A) 3 meses de idade, (B) 6 meses de idade, (C e D) 12 meses de idade, (E e F), 18 meses de idade e (G e H) 24 meses de idade. Em F e H destaca-se intenso pregueamento da mucosa, característico de hiperplasia. Seta longa: epitélio pseudoestratificado; cabeça de seta: camada muscular lisa perialveolar; Lu: lúmen; \*: estroma; C1: corpos amiláceos; C2: corpos amiláceos em calcificação (concreções); seta curta: focos hiperplásicos. Inseto em D = concreções prostáticas PAS-positivas. Barra em A = 150µm.

Diferentes alterações do tecido glandular estão presentes entre os animais senis (18 a 24 meses de idade). Uma das alterações mais frequentes foi o aparecimento de atrofia do epitélio glandular. Os adenômeros atróficos são caracterizados pelo lúmen dilatado e revestido por epitélio cúbico baixo a pavimentoso. Em alguns adenômeros foi possível identificar áreas de transformação gradativa do epitélio prismático para cúbico, cúbico baixo a pavimentoso (Fig. 8C e D). Não raramente, áreas de atrofia epitelial alternavam-se com regiões glandulares sem aparentes alterações ou com áreas de hiperplasias, sendo essas últimas caracterizadas pelo intenso pregueamento da mucosa. Figuras de apoptose, identificadas pelos critérios morfológicos (condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos), foram mais frequentes em próstatas de animais idosos, especialmente nas áreas de atrofia epitelial (Fig. 8D). A musculatura lisa perialveolar também aparentou ser mais espessa, principalmente nas regiões onde a atrofia é mais intensa (Fig. 8C e D).

Além de atrofia, o epitélio glandular dos animais senis foi caracterizado pela presença de áreas com marcante atipia nuclear, onde foi possível identificar núcleos grandes, vesiculosos, com formas variadas, muitas vezes bizarras, e nucléolos extremamente proeminentes (Fig. 8D). Outra variação epitelial frequente foi a presença de vacúolos citoplasmáticos mais abundantes e maiores que aqueles vistos aos 12 meses, sendo que em algumas células a formação de vacúolos foi tão exacerbada que preencheu a maior parte do citoplasma, tornando o núcleo achatado e deslocado para a base da célula. Células com aparente acúmulo de material mucoide no citoplasma também foram frequentemente identificadas (Fig. 8B – F). Em sua maioria, estas células com acúmulo de material mucoide foram encontradas dispersas pelo epitélio (a partir de 12 meses de idade), mas também foram encontradas formando pequenos e grandes grupos celulares, indicativo de metaplasia mucoide (Fig. 8E e F).

Adicionalmente, foram encontradas, em menor frequência, regiões hiperplásicas com aparecimento de estratificação do epitélio, preservando, porém, o limite da membrana basal, alterações estas com características de neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN) (Fig. 8G). Em dois animais examinados foram identificadas proliferações celulares dentro de adenômeros pré-existentes, formando estruturas com características de pequenos ácinos, às vezes com secreção em seu interior, e com rica vascularização subjacente, sugestivos de adenoma (Fig. 8H e I). É importante ressaltar que os animais usados para o estudo foram apenas sujeitos ao envelhecimento natural, sem administração de qualquer substância que justificasse as alterações observadas.



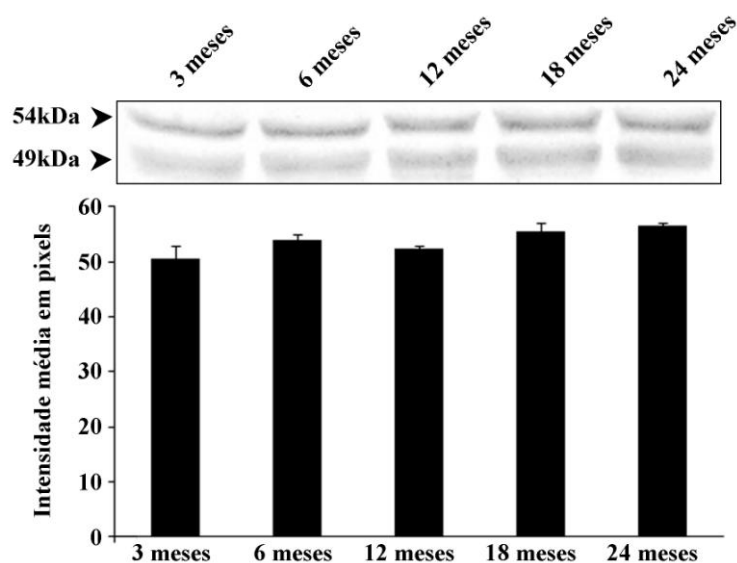
**Figura 8.** Aspectos histopatológicos da próstata ventral de ratos Wistar. (A) Histologia normal da próstata ventral de ratos jovens, para comparação. (B – I) Alterações histopatológicas observadas na próstata ventral. (B) Epitélio com algumas células vacuolizadas (seta longa vermelha). M = mastócito. (C) Área de transição de epitélio prismático para pavimentoso. (D) Epitélio contendo células com núcleos e nucléolos atípicos (Na) e epitélio atrofiado com abundantes células em apoptose (Ap). (E) Vista panorâmica de vários focos hiperplásicos (H) onde é possível visualizar um adenômero com formação metaplásica. (F) Ampliação do campo delimitado em E evidenciando metaplasia mucípara (Mt). (G) Epitélio com foco hiperproliferativo característico de neoplasia intraepitelial prostática (PIN). (H) Vista panorâmica de adenômero com dois adenomas intraluminais (A1 e A2). (I) Ampliação do adenoma delimitado em H (A1), evidenciando as neoformações glandulares. Seta longa preta: células secretoras; seta curta preta: células basais; cabeça de seta: células musculares lisas; \*: estroma; seta dupla: comparação da altura epitelial. Barras em A (=B,C,D,F,G,I) = 50µm; barra em E e H =

### 3. WESTERN BLOTTING

A especificidade do anticorpo utilizado foi comprovada pela detecção de uma banda de 54 kDa compatível com o peso molecular descrito para ER $\beta$  em roedores (Kuiper et al., 1996 e 1998). No entanto, foi detectada também uma segunda banda reativa de 49 kDa, que comigrou com a banda principal. A intensidade média em pixels não revelou nenhuma



diferença significativa na expressão do receptor de estrógeno ER $\beta$  em extrato de proteína total dos lobos ventrais da próstata de ratos jovens e senis (Fig. 9).



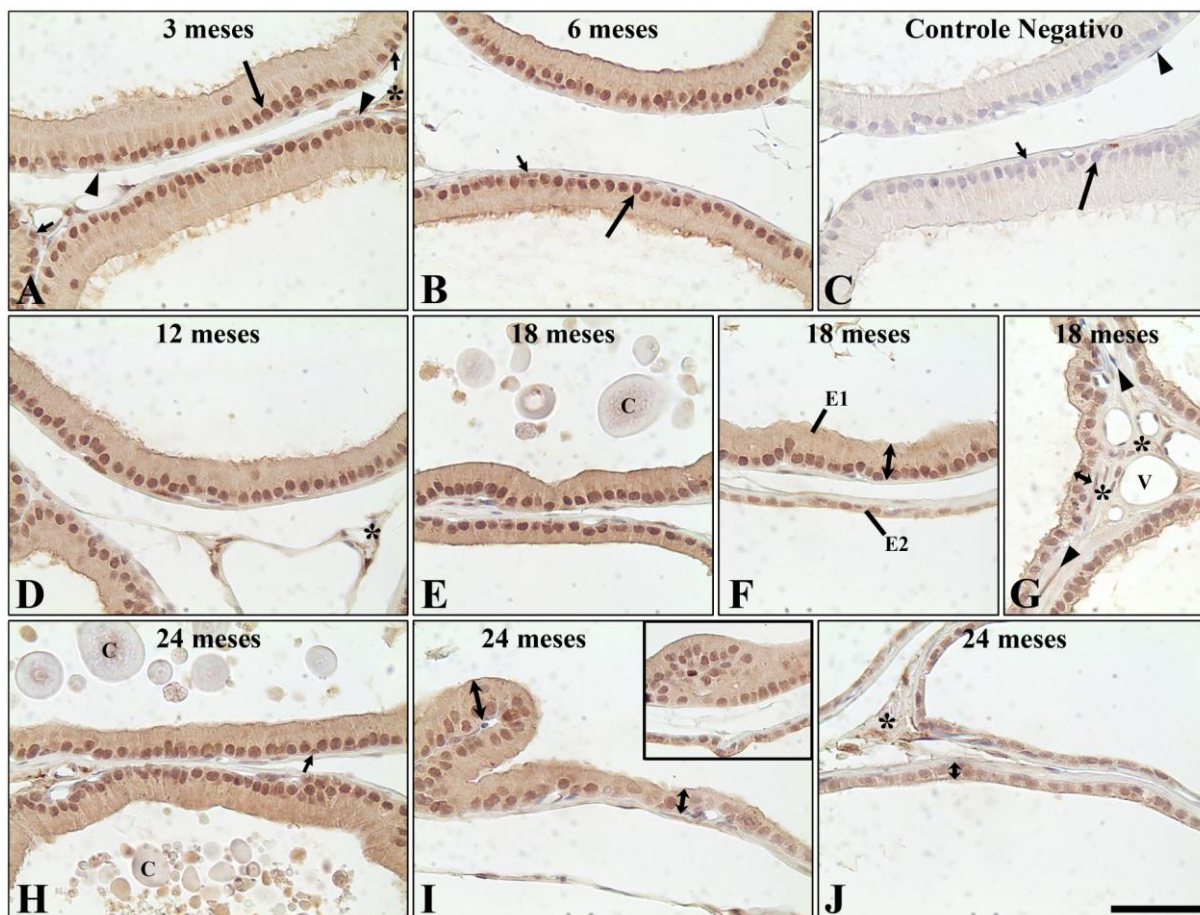
**Figura 9.** *Western blotting* para o receptor de estrógeno ER $\beta$  extraído da próstata ventral de ratos Wistar em diferentes idades e representação gráfica da análise densitométrica da banda de 54kDa.

#### 4. IMUNOHISTOQUÍMICA

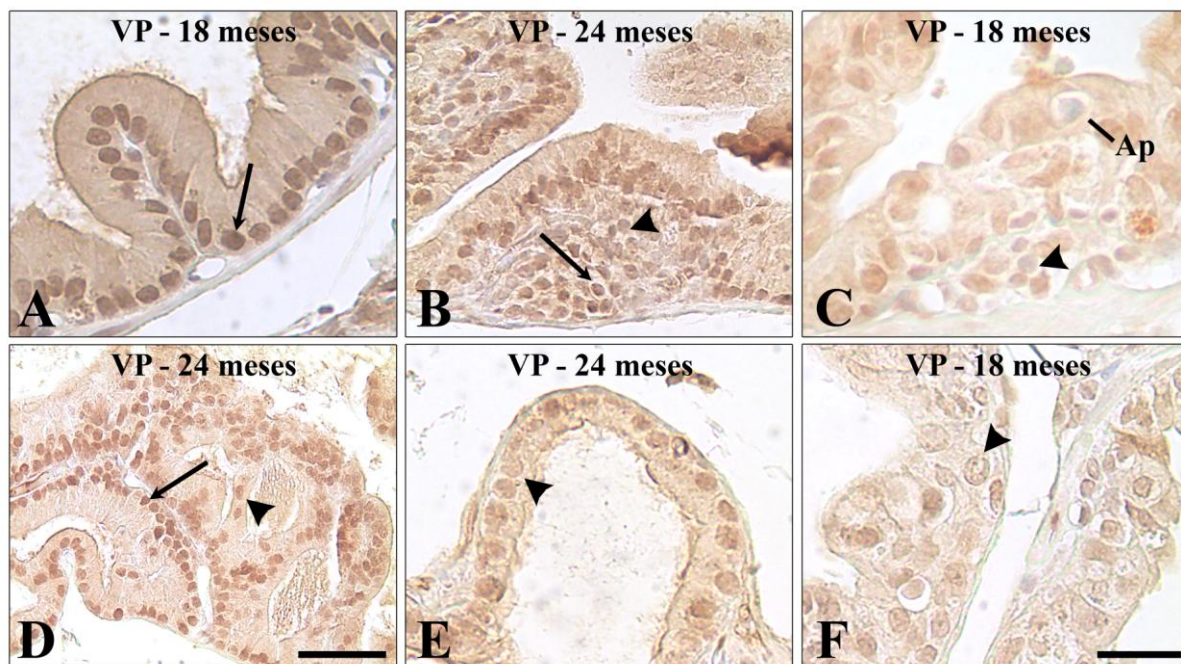
Intensa imunomarcção para receptores de estrógenos ER $\beta$  foi detectada no núcleo das células secretoras e células basais do epitélio glandular da próstata ventral de ratos, além de moderada positividade citoplasmática (Fig.10). As células musculares lisas perialveolares apresentaram expressão intermitente desse receptor. Algumas células do estroma e células endoteliais também se mostraram positivas para ER $\beta$ . O controle negativo da imunorreção não mostrou positividade, indicando especificidade do anticorpo usado.

O padrão de expressão de ER $\beta$  aparentemente não se altera nas diferentes idades, considerando os adenômeros com aparência morfológica normal, incluindo as áreas com pregueamento da mucosa resultante de hiperplasia (Fig. 10A, B, D, E e H). Por outro lado, acompanhando a grande heterogeneidade morfológica dos adenômeros de animais senis, principalmente a partir dos 18 meses de idade, foi possível notar que em regiões onde o epitélio apresenta-se atrofiado, a expressão da proteína é notavelmente reduzida, sendo esta redução gradativa de acordo com o grau de atrofia do mesmo (Fig. 10F, G, I e J e Fig. 11E). As regiões com focos proliferativos intraepiteliais também mostraram padrão heterogêneo de positividade para ER $\beta$ , onde estão presentes células que se coram intensamente, enquanto outras não se coram ou se coram mais fracamente (inserto Fig. 10I e Fig. 11B e C). As

formações de adenomas encontradas exibiram padrão heterogêneo de expressão de ER $\beta$ , onde o epitélio que forma os novos adenômeros cora-se fracamente em relação ao epitélio adjacente (Fig. 11D). Foram vistas também áreas hiperproliferativas e com atipias celulares mostrando intensa redução de ER $\beta$  (Fig. 11F).



**Figura 10.** Imunomarcção para receptores de estrógenos ER $\beta$  na próstata ventral de ratos Wistar em diferentes idades. (A, B, D e H) Epitélio normal, mostrando intensa imunopositividade para ER $\beta$  nas células secretoras (seta longa) e basais (seta curta), enquanto as células musculares lisas apresentam positividade intermitente (cabeça de seta). (C) controle negativo da imunomarcção contracorado com hematoxilina. (E) Epitélios de altura variada ainda contendo intensa positividade para ER $\beta$ . (F) Epitélio normal (E1) contrastando com epitélio atrófico (E2), com intensa redução da positividade para ER $\beta$ . (G) Epitélios em diferentes estágios de atrofia mostrando intensidades diferentes de imunomarcção para ER $\beta$ . (I) Epitélio em transição de prismático para cúbico mostrando gradativa alteração da expressão de ER $\beta$ . No inserto, região de PIN com heterogeneidade de imunorreatividade para ER $\beta$ . (J) Epitélios atróficos com baixa expressão de ER $\beta$ . v: vaso sanguíneo; C: corpos amiláceos; \*: estroma; seta dupla: comparação da altura epitelial. Barra em J = 50 $\mu$ m.



**Figura 11.** Comparação da imunomarcagem para receptores de estrógenos ER $\beta$  no epitélio normal e com alterações histopatológicas na próstata ventral de ratos Wistar senis. **(A)** Epitélio normal com expressão padrão de ER $\beta$ , com células intensamente positivas para a proteína (seta). **(B)** Foco de PIN mostrando heterogeneidade na positividade para ER $\beta$  com células que se coram fracamente (cabeça e seta) e outras intensamente. **(C)** Foco de PIN com expressão de ER $\beta$  mais alterada, sendo possível ver células que praticamente não se coram (cabeça de seta) e célula em apoptose (Ap) ER $\beta$  negativa. **(D)** Formação de adenoma com mesma expressão heterogênea para ER $\beta$ , onde o epitélio que forma as pequenas glândulas mostra positividade reduzida para a proteína (cabeça de seta). **(E)** Intensa redução da expressão de ER $\beta$  em regiões atróficas (cabeça de seta). **(F)** Área de atipias celulares com intensa redução da expressão de ER $\beta$  (cabeça de seta). Barra em D = 50 $\mu$ m; barra em F (=A, B, C e E) = 25 $\mu$ m.

---

## **V. DISCUSSÃO**

## V. DISCUSSÃO

Ratos Wistar em diferentes idades (3, 6, 12, 18 e 24 meses) foram utilizados para o estudo comparativo do efeito do envelhecimento no padrão de expressão do receptor de estrógeno ER $\beta$  na próstata ventral. Os resultados revelaram que existe marcante redução na imunomarcção para ER $\beta$ , restrita a locais com alterações histopatológicas na próstata ventral, a partir dos 12 meses de idade. Este é um dado inédito, uma vez que não foram encontradas referências sobre como a expressão dessa proteína se comporta durante o envelhecimento em nenhuma outra espécie.

O peso corporal dos animais investigados aumentou significativamente entre os três e seis meses de idade permanecendo estável a partir de então, enquanto o peso testicular foi similar entre os animais desde os 3 meses de idade. Esse dado indica que apesar da maturidade sexual ser atingida com cerca de 90 dias em ratos, quando os níveis de testosterona atingem valores máximos (Tucker, 1997; Prins et al., 1998, Chen et al., 2009; Wu et al., 2009), o peso corporal requer um tempo mais longo para se estabilizar. Por outro lado, a próstata ventral mostrou progressivo aumento do peso relativo até os 12 meses de idade. Intervalo de tempo proporcionalmente similar é necessário para o máximo desenvolvimento da próstata ventral também em outras linhagens de ratos, tais como ACI e Copenhagen (Isaacs, 1984).

Nos animais senis (18 a 24 meses), o peso da glândula reduz quando comparado com animais sexualmente maduros (12 meses). Essa redução do peso é compatível com a observação de intensa atrofia nos adenômeros da próstata ventral, prevalente em animais senis e descrita para ratos de diversas linhagens (Ward et al., 1980; Isaacs, 1984; Tucker, 1997; Lau et al., 2003; Bianchi-Frias et al., 2010). Sabe-se que os níveis de andrógenos em ratos reduzem significativamente com a idade (Isaacs, 1984; Hoover et al., 1990; Zirkin et al., 2000; Wu et al., 2009; Chen et al., 2009). Sendo a próstata um tecido andrógeno-dependente, alterações nos níveis de testosterona, e consequentemente de DHT, que é o principal andrógeno regulador da morfofisiologia da próstata, podem levar à apoptose das células secretoras e atrofia da glândula (Kiplesund et al., 1988; Prins & Birch, 1993; Xie et al., 2000). Dados mais recentes envolvendo expressão gênica e proteômica também indicam que com a idade há redução de genes e proteínas diretamente relacionadas com síntese, anabolismo e *turnover* de proteínas que podem estar implicados nesse processo de atrofia epitelial da

próstata ventral (Lau et al., 2003; Lam et al., 2008; Bethel et al., 2009; Bianchi-Frias et al., 2010).

Diferindo da próstata ventral, os demais lobos prostáticos não tiveram variação de peso entre os grupos, exceto pelo aumento na próstata lateral aos 6 meses de idade. É fato que a variação individual do peso dos lobos prostáticos foi considerável, o que pode justificar a não significância estatística para a maioria dos lobos e idades. Mas também é fato que a próstata ventral é o lobo que possui os mais altos níveis teciduais de DHT (Leav et al., 1988) e o que expressa os mais altos níveis de receptores de andrógenos (AR), indicando sua maior sensibilidade a andrógenos, os quais reduzem com a idade (Prins et al., 1991; Banerjee et al., 2001). Paralelamente à redução de andrógenos, os níveis de AR também reduzem na próstata ventral, mas aumentam nos lobos dorsolaterais em envelhecimento (Banerjee et al., 2001). Essa diferença pode ser a base para a presença de atrofia glandular mais freqüente na próstata ventral que nas próstatas dorsolaterais ou anterior, o que pode levar a diferença de peso com a idade.

As características histológicas da próstata ventral dos animais adultos jovens (3 e 6 meses de idade) foram condizentes com os dados da literatura (Hayashi et al., 1991; Hayward et al., 1996A; El-Alfy et al., 2000). Aos 6 meses, entretanto, observa-se um aparente aumento do conteúdo luminal dos adenômeros, que se tornam mais dilatados, sendo sugestivo de uma maior atividade secretora da glândula. Essas características morfofuncionais da próstata ventral indicam que a maturidade funcional do lobo é atingida entre os 6 e 12 meses de idade. Por outro lado, alterações morfológicas marcantes foram encontradas em ratos a partir de 12 meses de idade, as quais se intensificaram dos 18 aos 24 meses. Dentre as alterações destacam-se atrofia glandular, hiperplasias e focos de proliferação celular, sugestivos de neoplasias intraepiteliais (PIN), acúmulo citoplasmático de material mucoide, além de formação de adenomas. Essas alterações espontâneas corroboram dados da literatura relacionados ao envelhecimento da próstata de diversas linhagens de ratos e outras espécies de roedores (Ward et al., 1980 - ACI/Seg; Isaacs, 1984 – ratos ACI/Seg e Copenhagen; Banerjee et al., 1998 – Ratos Brown Norway; Lau et al., 2003 – ratos Noble; Campos et al., 2008 - gerbil; Bianchi-Frias et al., 2010 - camundongos C57BL/6; Xie et al., 2000 – ratos Noble), bem como em cães (Grieco et al., 2006; Gallardo et al., 2007).

Os ensaios de *Western blotting* detectaram a ocorrência de duas bandas de massa molecular de aproximadamente 54 e 49 kDa, onde a banda principal foi a de 54 kDa, compatível com o peso molecular descrito para ER $\beta$  em roedores (Kuiper et al., 1996 e 1998; Zhou et al., 2002; Tirado et al., 2004). Detecção de mais de uma banda nos ensaios de *Western blotting* para ER $\beta$  tem sido frequentemente descrita em diversas espécies (Leav et al., 2001 – humano; Saunders et al., 2001 – primatas; Zhou et al., 2002 – camundongos; Gaskell et al., 2003; Rago et al., 2007 – porco; Gist et al., 2006 - tartaruga). Acredita-se que esses produtos de reação adicionais possam ser resultado da tradução de ER $\beta$  a partir de sítios de iniciação alternativos do RNAm, que resultam em proteínas de tamanhos diferentes, denominadas ER $\beta$  longo e curto (Leav et al., 2001; Scobie et al., 2002; Gaskell et al., 2003). O ER $\beta$  longo representa a proteína traduzida do primeiro códon de iniciação do transcrito, enquanto o ER $\beta$  curto resulta de tradução a partir do segundo códon de iniciação (Leav et al., 2001). Essas proteínas são funcionalmente similares (Leav et al., 2001; Scobie et al., 2002) e não equivalem aos diversos *splices* variantes de ER $\beta$ , que em geral possuem deleções ou inserções de aminoácidos na molécula final, resultando em alteração de sua função (Maruyama et al., 1998; Petersen et al., 1998; Saunders et al., 2002).

A intensidade das bandas detectadas pelo *Western blotting* mostrou que não há alterações na expressão de ER $\beta$  na próstata ventral de ratos jovens e em envelhecimento. Estes dados sobre os níveis proteicos contrastam com os achados para os níveis prostáticos de RNAm de ER $\beta$  encontrados por estudos *in vitro* de células prostáticas de cães jovens (1 ano) e idosos (4 anos), visto que foi encontrada redução do RNAm nos animais mais velhos (Jiang et al., 2005). Entretanto, no referido estudo não foram relatadas as condições de saúde dos animais, como a presença ou não de alterações histopatológicas na glândula. Também, os níveis de RNAm nem sempre condizem com os níveis reais do produto final e funcional, que é a proteína.

A imunorreatividade de ER $\beta$  na próstata ventral de ratos adultos jovens está de acordo com dados da literatura, onde núcleos de células secretoras e basais coram-se intensamente, assim como algumas células do estroma (Prins et al., 1998; Makela et al., 2000; Sar & Welsch, 2000; Wehuia et al., 2001). Além do núcleo, houve perceptível marcação citoplasmática no epitélio glandular, no presente estudo. Diversos protocolos de neutralização de colorações inespecíficas foram usados na tentativa de eliminar essa coloração, mas não houve sucesso, indicando que a mesma é uma reação positiva ao anticorpo utilizado. Detecção

citoplasmática de ER $\beta$  é um achado comum na literatura (Pasquali et al., 2001A; Tirado et al., 2004; Gallardo et al., 2009). Marcações citoplasmáticas similares são também descritas para outros receptores de esteroides normalmente encontrados na próstata, como receptores de andrógenos (Prins & Birch, 1993 - rato; Gallardo et al., 2009 - cão). Uma possível explicação para esta localização citoplasmática de ER $\beta$  é o fato de que, embora predominantemente nuclear, os ER sofrem dinâmica movimentação do núcleo para o citoplasma e vice-versa (Guiochon-Mantel et al., 1991; Htun et al., 1999). Mesmo no compartimento nuclear, os ER não se localizam de forma estática, sendo que comparativamente ER $\beta$  tem maior mobilidade que ER $\alpha$  (Damdimopolous et al., 2008).

Corroborando os resultados do *Western blotting*, não se detectou variação na imunomarcação de ER $\beta$  com o avanço da idade dos animais na maioria dos adenômeros onde o epitélio glandular se manteve histologicamente normal, incluindo os locais de pregueamento hiperplásico da mucosa. No entanto, o que não se detecta no *Western blotting*, técnica que utiliza extrato de tecido total, mas foi claramente identificado pela imunohistoquímica, é que nos adenômeros atróficos ou com focos proliferativos intraepiteliais ocorre uma nítida redução local na expressão dessa proteína. Nas regiões atróficas, a diminuição na intensidade da imunomarcação para ER $\beta$  ocorreu de forma gradativa, acompanhando o grau de atrofia dos adenômeros. Nessas regiões, onde as células perdem suas características secretoras normais, também foram observadas células em apoptose mais frequentes, indicando que possa ser uma resposta aos níveis reduzidos de andrógenos locais.

Em regiões com focos proliferativos intraepiteliais, onde o epitélio tendeu a estratificar, sugerindo neoplasias intraepiteliais, o padrão de marcação das células para ER $\beta$  foi heterogêneo, sendo vistas células que se coraram intensamente, enquanto outras se coraram fracamente ou não se coraram. Esses resultados se revestem de extrema importância desde que resultados similares são descritos em adenocarcinomas prostáticos humanos e caninos (Horvath et al., 2001; Leav et al., 2001; Pasquali et al., 2001A e B; Grieco et al., 2006; Gallardo et al., 2007). Pelo fato da ocorrência de regiões com PIN ser considerada uma condição pré-maligna, esses dados sugerem uma forte associação dessas alterações com uma potencial desordem na via mediada por ER $\beta$ , que é considerado um fator antiproliferativo e pró-diferenciação, sendo em última análise protetor contra câncer. É interessante o fato de que em regiões com intenso pregueamento hiperplásico da mucosa, mas onde o epitélio se manteve com morfologia normal, os níveis de ER $\beta$  permaneceram similares àqueles de áreas



não afetadas. Esse achado também se assemelha ao descrito para humanos, onde ao contrário das regiões afetadas por alterações malignas, as áreas com hiperplasia benigna permanecem positivas para ER $\beta$  (Pasquali et al., 2001A).

O significado do silenciamento de ER $\beta$  em adenocarcinomas prostáticos não está estabelecido, mas há sugestão de que a expressão de ER $\beta$  e o grau de diferenciação das células presentes nos tumores estejam relacionados, desde que tumores em estágios menos diferenciados são mais propensos à redução e/ou ausência desta proteína (Horvath et al., 2001; Leav et al., 2001; Pasquali et al., 2001B; Grieco et al., 2006). Estudos do crescimento e desenvolvimento da próstata também apontam a expressão de ER $\beta$  como sendo um marco da diferenciação das células secretoras da glândula, sendo sua expressão heterogênea até a puberdade (Prins et al., 1998; Weihua et al., 2002). Interessantemente, as células negativas para ER $\beta$ , nessa ocasião, são exatamente as que se revelam positivas para ciclina A, um marcador de proliferação celular (Weihua et al., 2002).

Sabe-se que a idade é um importante fator de risco para o desenvolvimento de patologias prostáticas. Uma das explicações plausíveis para esse fato são as mudanças hormonais que ocorrem ao longo do envelhecimento, destacando-se a marcante redução dos níveis de testosterona e aumento dos níveis de estrógenos, levando a um aumento de até 40% na proporção de estrógeno:andrógeno séricos (Isaacs, 1984; Banerjee et al., 2001; Wu et al., 2009). Também os níveis de estrógenos intraprostáticos, tanto absolutos quanto relativos a testosterona e DHT, aumentam com a idade (Shibata et al., 2000). Da mesma forma, a enzima aromatase, responsável pela produção de estrógenos e que é pouco expressa na próstata normal, tem seus níveis aumentados significativamente em células epiteliais tumorais, o que confirma uma possível relação entre estrógenos e alterações malignas da próstata. Embora ER $\alpha$  seja predominante no estroma prostático, ele também ocorre no epitélio em menor proporção (Risbridger et al., 2001). Dessa forma, considerando a redução local de ER $\beta$ , mas o aumento dos níveis de estrógenos, é possível supor que agindo principalmente via ER $\alpha$ , os estrógenos possam atuar diretamente no epitélio ou alterar fatores parácrinos que medeiam a comunicação estroma/epitélio resultando em aberrante diferenciação e proliferação da próstata (Prins et al., 1998; Risbridger et al., 2001; McPherson et al., 2007). Por outro lado, os níveis de ER $\beta$  são baixos nos locais de alterações prostáticas proliferativas. Essa redução pode estar associada à redução dos níveis de testosterona, que por sua vez reflete em redução da fonte de 3 $\beta$ -diol, o qual é um importante modulador da expressão de ER $\beta$  (Oliveira et al.,

2007). Com a redução de ER $\beta$  e seu ligante 3 $\beta$ -diol, o tecido prostático perde um de seus mecanismos protetores contra as desordens proliferativas.

Não se pode mais ignorar a possível participação do 3 $\beta$ -diol, como ligante alternativo de ER $\beta$  na próstata, uma vez que cada vez mais informações se acumulam indicando que muitos dos efeitos benéficos de ER $\beta$  contra a carcinogênese prostática são induzidos por 3 $\beta$ -diol. Nesse contexto, estão incluídos processos importantes como modulação da proliferação, morte e diferenciação celular (Weihua et al., 2002; Imamov et al., 2004), bem como inibição da migração de células prostáticas cancerosas (Guerini et al., 2005). Adicionalmente, a inativação da enzima CYP7B1, que metaboliza e inativa 3 $\beta$ -diol, resulta em tecido prostático hipoproliferativo, resultante da elevação nos níveis de 3 $\beta$ -diol (Weihua et al., 2002), enquanto a super-expressão dessa enzima está associada com casos de adenocarcinoma (Olsson et al., 2007). Ainda, alteração genética da enzima 3 $\beta$ -HSD que medeia a formação de 3 $\beta$ -diol resulta em risco aumentado de câncer de próstata relacionado com os níveis mais baixos de 3 $\beta$ -diol (Chang et al., 2002). Esses dados apontam para a necessidade de se discriminar os efeitos estrogênicos dos produtos de metabolismo tecidual da testosterona não só a partir da aromatização para estradiol, mas também a partir de sua redução para DHT, o qual, embora não-aromatizável, pode ser fonte de 3 $\beta$ -diol que tem potente atividade estrogênica.

Uma das dificuldades de estudo sobre as patologias de próstata tem sido a falta de um modelo animal adequado. De maneira similar aos homens, o desenvolvimento espontâneo de hiperplasia benigna é frequente em cães idosos (Berry et al., 1986), mas casos de adenocarcinomas prostáticos são mais raros nesses animais (Grieco et al., 2006; Gallardo et al., 2007). Ainda, os cães têm expectativa de vida longa, se comparados a roedores, o que dificulta seu uso como modelo experimental de rotina, especialmente para investigações que envolvem envelhecimento. Conforme já extensamente descrito na literatura e confirmado no presente estudo, ratos idosos desenvolvem quadros patológicos espontâneos na próstata similares aos de humanos, incluindo alterações pré-malignas e malignas (Pollard, 1973; Ward et al., 1980; Isaacs, 1984; Mitsumori & Elwell, 1988; Hoover et al., 1990; Xie et al., 2000). As alterações histopatológicas, corroboradas pela semelhança nas alterações moleculares, como a redução na expressão de ER $\beta$  aqui descrita, revelam que os ratos senis podem servir como um modelo experimental alternativo para as investigações de patologias prostáticas de interesse clínico.

---

## **VI. CONCLUSÕES**

**VI. CONCLUSÕES**

Este estudo é pioneiro e mostra que a expressão de ER $\beta$  na próstata ventral de ratos em envelhecimento sofre alteração em regiões específicas, relacionadas com distúrbios proliferativos intraepiteliais e atrofia epitelial, enquanto que no tecido normal sua expressão não se altera. Essa redução seletiva de ER $\beta$  com o envelhecimento, em conjunto com dados relevantes da literatura sobre redução similar associada ao desenvolvimento de PIN e adenocarcinomas, aponta uma potencial desordem na via mediada por ER $\beta$ , que é considerado um fator anti-proliferativo e pró-diferenciação, sugerindo uma forte relação entre o silenciamento desse receptor com condições malignas ou pré-malignas da próstata.

---

## **VII. PERSPECTIVAS**

## VII. PERSPECTIVAS

Considerando que as alterações de ER $\beta$  foram restritas as áreas de distúrbios proliferativos intraepiteliais e de atrofia do epitélio, torna-se ainda necessária a quantificação imunohistoquímica de ER $\beta$  avaliando separadamente estas diferentes áreas, uma vez que a técnica de *Western blotting* não foi capaz de revelar o verdadeiro comportamento da expressão da proteína no tecido. Ainda, a análise do RNAm da proteína poderia fornecer um dado complementar sobre seu comportamento em relação ao envelhecimento.

É fato que existem diferenças morfofuncionais entre a próstata humana e a próstata de roedores e que a próstata ventral, apesar de ser afetada por alterações relacionadas ao envelhecimento, não possui homologia com nenhuma zona prostática humana. Diferentemente, os lobos dorsais e laterais se assemelham com a zona periférica da próstata humana, local de maior incidência de câncer, enquanto que a próstata anterior é correspondente à zona central, que é mais resistente a carcinogênese e hiperplasia benigna. Nesse contexto, a fim de se correlacionar de forma mais similar o modelo experimental com a realidade das desordens prostáticas em humanos, fica clara a necessidade de se investigar a expressão dessa importante proteína nos demais lobos prostáticos de ratos em envelhecimento para um melhor entendimento do comportamento de ER $\beta$  nas diferentes fases da vida. Ainda seria interessante correlacionar a esses achados, o perfil de sobrevivência e morte celular no tecido dos animais em envelhecimento, uma vez que este equilíbrio é alterado nas desordens proliferativas.

Por fim, uma investigação comparativa sobre os níveis de estradiol e 3 $\beta$ -diol na próstata em envelhecimento seria importante para esclarecer se os efeitos observados na morfologia da glândula e nos níveis locais de ER $\beta$  estão relacionados diretamente com o papel do ligante clássico estradiol ou do ligante alternativo 3 $\beta$ -diol, ou de ambos.

---

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer*, 6(4), 503-519.
- Abrahamsson, P. A., & di Sant'Agnesse, P. A. (1993). Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *J Androl*, 14(5), 307-309.
- Aspinall, S. R., Stamp, S., Davison, A., Shenton, B. K., & Lennard, T. W. (2004). The proliferative effects of 5-androstene-3 beta,17 beta-diol and 5 alpha-dihydrotestosterone on cell cycle analysis and cell proliferation in MCF7, T47D and MDAMB231 breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 88(1), 37-51.
- Aumüller, G. (1979). *Prostate Gland and Seminal Vesicles* (Vol. 7). Berlin: Springer.
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., & Brown, T. R. (2001). Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate. *Endocrinology*, 142(9), 4066-4075.
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., Lai, J. M., Strandberg, J. D., Zirkin, B. R., & Brown, T. R. (1998). Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the brown Norway rat prostate. *Biol Reprod*, 59(5), 1163-1170.
- Beato, M., & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update*, 6(3), 225-236.
- Begley, L. A., Kasina, S., MacDonald, J., & Macoska, J. A. (2008). The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine*, 43(2), 194-199.
- Berry, S. J., Coffey, D. S., Strandberg, J. D., & Ewing, L. L. (1986). Effect of age, castration, and testosterone replacement on the development and restoration of canine benign prostatic hyperplasia. *Prostate*, 9(3), 295-302.
- Bethel, C. R., Chaudhary, J., Anway, M. D., & Brown, T. R. (2009). Gene expression changes are age-dependent and lobe-specific in the brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. *Prostate*, 69(8), 838-850.



- Bianchi-Frias, D., Vakar-Lopez, F., Coleman, I. M., Plymate, S. R., Reed, M. J., & Nelson, P. S. (2010). The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PLoS One*, *5*(9).
- Bianco, J. J., Handelsman, D. J., Pedersen, J. S., & Risbridger, G. P. (2002). Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*, *143*(12), 4922-4933.
- Brodie, A. M., Son, C., King, D. A., Meyer, K. M., & Inkster, S. E. (1989). Lack of evidence for aromatase in human prostatic tissues: effects of 4-hydroxyandrostenedione and other inhibitors on androgen metabolism. *Cancer Res*, *49*(23), 6551-6555.
- Campos, S. G., Zanetoni, C., Scarano, W. R., Vilamaior, P. S., & Taboga, S. R. (2008). Age-related histopathological lesions in the Mongolian gerbil ventral prostate as a good model for studies of spontaneous hormone-related disorders. *Int J Exp Pathol*, *89*(1), 13-24.
- Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B., & Levallet, J. (1999). Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl*, *22*(4), 211-223.
- Carreau, S., & Hess, R. A. (2010). Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *365*(1546), 1517-1535.
- Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., & Bourguiba, S. (2003). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol*, *1*, 35.
- Chen, M., Hsu, I., Wolfe, A., Radovick, S., Huang, K., Yu, S., et al. (2009). Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor-alpha null male mice. *Endocrinology*, *150*(1), 251-259.
- Chen, M., Hsu, I., Wolfe, A., Radovick, S., Huang, K., Yu, S., et al. (2009). Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor-alpha null male mice. *Endocrinology*, *150*(1), 251-259.
- Cheng, J., Lee, E. J., Madison, L. D., & Lazennec, G. (2004). Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Lett*, *566*(1-3), 169-172.

- Cunha, G. R., Alarid, E. T., Turner, T., Donjacour, A. A., Boutin, E. L., & Foster, B. A. (1992). Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl*, *13*(6), 465-475.
- Damdimopoulos, A. E., Spyrou, G., & Gustafsson, J. A. (2008). Ligands differentially modify the nuclear mobility of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, *149*(1), 339-345.
- Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., & Mark, M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development*, *127*(19), 4277-4291.
- El-Alfy, M., Pelletier, G., Hermo, L. S., & Labrie, F. (2000). Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microsc Res Tech*, *51*(5), 436-446.
- Ellem, S. J., Schmitt, J. F., Pedersen, J. S., Frydenberg, M., & Risbridger, G. P. (2004). Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*, *89*(5), 2434-2441.
- Enmark, E., & Gustafsson, J. A. (1999). Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med*, *246*(2), 133-138.
- Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., et al. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, *82*(12), 4258-4265.
- Foley, E. F., Jazaeri, A. A., Shupnik, M. A., Jazaeri, O., & Rice, L. W. (2000). Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res*, *60*(2), 245-248.
- Gallardo, F., Mogas, T., Baro, T., Rabanal, R., Morote, J., Abal, M., et al. (2007). Expression of androgen, oestrogen alpha and beta, and progesterone receptors in the canine prostate: differences between normal, inflamed, hyperplastic and neoplastic glands. *J Comp Pathol*, *136*(1), 1-8.
- Gaskell, T. L., Robinson, L. L., Groome, N. P., Anderson, R. A., & Saunders, P. T. (2003). Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(1), 424-432.

- Gist, D. H., Bradshaw, S., Morrow, C. M., Congdon, J. D., & Hess, R. A. (2006). Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: an immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol*, 151(1), 27-33.
- Green, S., Kumar, V., Krust, A., Walter, P., & Chambon, P. (1986). Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 2, 751-758.
- Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., & Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231(4742), 1150-1154.
- Grieco, V., Riccardi, E., Rondena, M., Romussi, S., Stefanello, D., & Finazzi, M. (2006). The distribution of oestrogen receptors in normal, hyperplastic and neoplastic canine prostate, as demonstrated immunohistochemically. *J Comp Pathol*, 135(1), 11-16.
- Grossmann, M. E., Huang, H., & Tindall, D. J. (2001). Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93(22), 1687-1697.
- Guerini, V., Sau, D., Scaccianoce, E., Rusmini, P., Ciana, P., Maggi, A., et al. (2005). The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype. *Cancer Res*, 65(12), 5445-5453.
- Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M., & Milgrom, E. (1991). Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *Embo J*, 10(12), 3851-3859.
- Hager, G. L., Lim, C. S., Elbi, C., & Baumann, C. T. (2000). Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74(5), 249-254.
- Hayashi, N., Sugimura, Y., Kawamura, J., Donjacour, A. A., & Cunha, G. R. (1991). Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod*, 45(2), 308-321.
- Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Cunha, A. R., Foster, B. A., Dahiya, R., et al. (1996). Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat*, 155(2), 81-93.

- Hayward, S. W., Baskin, L. S., Haughney, P. C., Foster, B. A., Cunha, A. R., Dahiya, R., et al. (1996). Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat*, 155(2), 94-103.
- Hermo, L., & Robaire, B. (2000). Epididymal Cell Types and Their Functions. In B. Robaire & B. T. Hinton (Eds.), *The Epididymis - From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic.
- Hess, R. A. (2000). Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod*, 5(2), 84-92.
- Hess, R. A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 52.
- Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., et al. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390(6659), 509-512.
- Hoover, D. M., Best, K. L., McKenney, B. K., Tamura, R. N., & Neubauer, B. L. (1990). Experimental induction of neoplasia in the accessory sex organs of male Lobund-Wistar rats. *Cancer Res*, 50(1), 142-146.
- Horvath, L. G., Henshall, S. M., Lee, C. S., Head, D. R., Quinn, D. I., Makela, S., et al. (2001). Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res*, 61(14), 5331-5335.
- Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R., & Hager, G. L. (1999). Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell*, 10(2), 471-486.
- Huang, L., Pu, Y., Hu, W. Y., Birch, L., Luccio-Camelo, D., Yamaguchi, T., et al. (2009). The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol*, 328(2), 188-199.
- Ichihara, I., Kallio, M., & Pelliniemi, L. J. (1978). Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. *Cell Tissue Res*, 192(3), 381-390.
- Ilio, K. Y., & Hess, R. A. (1994). Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc Res Tech*, 29(6), 432-467.

- Imamov, O., Morani, A., Shim, G. J., Omoto, Y., Thulin-Andersson, C., Warner, M., et al. (2004). Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(25), 9375-9380.
- Imperato-McGinley, J., Sanchez, R. S., Spencer, J. R., Yee, B., & Vaughan, E. D. (1992). Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. *Endocrinology*, *131*(3), 1149-1156.
- Isaacs, J. T. (1984). The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis. *Cancer Res*, *44*(12 Pt 1), 5785-5796.
- Isaacs, J. T. (1984). The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis. *Cancer Res*, *44*(12 Pt 1), 5785-5796.
- Janulis, L., Bahr, J. M., Hess, R. A., Janssen, S., Osawa, Y., & Bunick, D. (1998). Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl*, *19*(1), 65-71.
- Janulis, L., Hess, R. A., Bunick, D., Nitta, H., Janssen, S., Asawa, Y., et al. (1996). Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J Androl*, *17*(2), 111-116.
- Jiang, J., Chang, H. L., Sugimoto, Y., & Lin, Y. C. (2005). Effects of age on growth and ERbeta mRNA expression of canine prostatic cells. *Anticancer Res*, *25*(6B), 4081-4090.
- Kiplesund, K. M., Halgunset, J., Fjosne, H. E., & Sunde, A. (1988). Light microscopic morphometric analysis of castration effects in the different lobes of the rat prostate. *Prostate*, *13*(3), 221-232.
- Kiplesund, K. M., Halgunset, J., Fjosne, H. E., & Sunde, A. (1988). Light microscopic morphometric analysis of castration effects in the different lobes of the rat prostate. *Prostate*, *13*(3), 221-232.
- Kirschenbaum, A., Liu, X. H., Yao, S., Narla, G., Friedman, S. L., Martignetti, J. A., et al. (2006). Sex steroids have differential effects on growth and gene expression in primary human prostatic epithelial cell cultures derived from the peripheral versus transition zones. *Carcinogenesis*, *27*(2), 216-224.

- Knoblauch, R., & Garabedian, M. J. (1999). Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol Cell Biol*, *19*(5), 3748-3759.
- Komiya, A., Suzuki, H., Imamoto, T., Kamiya, N., Nihei, N., Naya, Y., et al. (2009). Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol*, *16*(1), 37-44.
- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., et al. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(26), 15677-15682.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., et al. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, *138*(3), 863-870.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(12), 5925-5930.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, *139*(10), 4252-4263.
- Kumar, V. L., & Majumder, P. K. (1995). Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*, *27*(3), 231-243.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S. X., Simard, J., Labrie, C., El-Alfy, M., et al. (2000). Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol*, *25*(1), 1-16.
- Laczko, I., Hudson, D. L., Freeman, A., Feneley, M. R., & Masters, J. R. (2005). Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate*, *62*(3), 260-266.
- Lam, Y. W., Tam, N. N., Evans, J. E., Green, K. M., Zhang, X., & Ho, S. M. (2008). Differential proteomics in the aging Noble rat ventral prostate. *Proteomics*, *8*(13), 2750-2763.

- Lau, K. M., Tam, N. N., Thompson, C., Cheng, R. Y., Leung, Y. K., & Ho, S. M. (2003). Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. *Lab Invest*, 83(5), 743-757.
- Leav, I., Ho, S. M., Ofner, P., Merk, F. B., Kwan, P. W., & Damassa, D. (1988). Biochemical alterations in sex hormone-induced hyperplasia and dysplasia of the dorsolateral prostates of Noble rats. *J Natl Cancer Inst*, 80(13), 1045-1053.
- Leav, I., Lau, K. M., Adams, J. Y., McNeal, J. E., Taplin, M. E., Wang, J., et al. (2001). Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol*, 159(1), 79-92.
- Leclercq, G. (2002). Molecular forms of the estrogen receptor in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 80(3), 259-272.
- Levallet, J., Bilinska, B., Mittre, H., Genissel, C., Fresnel, J., & Carreau, S. (1998). Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod*, 58(4), 919-926.
- Luu-The, V., Belanger, A., & Labrie, F. (2008). Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22(2), 207-221.
- Makela, S., Strauss, L., Kuiper, G., Valve, E., Salmi, S., Santti, R., et al. (2000). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol*, 170(1-2), 219-229.
- Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, H., Shimaya, E., Hashimoto, S., et al. (1998). A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. *Biochem Biophys Res Commun*, 246(1), 142-147.
- Matthews, J., & Gustafsson, J. A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, 3(5), 281-292.
- McNeal, J. E. (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*, 12(8), 619-633.

- McNeal, J. E., Redwine, E. A., Freiha, F. S., & Stamey, T. A. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol*, *12*(12), 897-906.
- McPherson, S. J., Ellem, S. J., Simpson, E. R., Patchev, V., Fritzemeier, K. H., & Risbridger, G. P. (2007). Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*, *148*(2), 566-574.
- McPherson, S. J., Hussain, S., Balanathan, P., Hedwards, S. L., Niranjana, B., Grant, M., et al. (2010). Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(7), 3123-3128.
- Mirosevich, J., Bentel, J. M., Zeps, N., Redmond, S. L., D'Antuono, M. F., & Dawkins, H. J. (1999). Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *J Endocrinol*, *162*(3), 341-350.
- Mitsumori, K., & Elwell, M. R. (1988). Proliferative lesions in the male reproductive system of F344 rats and B6C3F1 mice: incidence and classification. *Environ Health Perspect*, *77*, 11-21.
- Morali, G., Oropeza, M. V., Lemus, A. E., & Perez-Palacios, G. (1994). Mechanisms regulating male sexual behavior in the rat: role of 3 alpha- and 3 beta-androstane diols. *Biol Reprod*, *51*(3), 562-571.
- Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, *392*(1), 49-53.
- Oliveira, A. G., Coelho, P. H., Guedes, F. D., Mahecha, G. A., Hess, R. A., & Oliveira, C. A. (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*(14), 914-922.
- Oliveira, A. G., Coelho, P. H., Guedes, F. D., Mahecha, G. A., Hess, R. A., & Oliveira, C. A. (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*(14), 914-922.



- Oliveira, C. A., Carnes, K., Franca, L. R., Hermo, L., & Hess, R. A. (2005). Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol Cell*, 97(6), 385-395.
- Oliveira, C. A., Mahecha, G. A., Carnes, K., Prins, G. S., Saunders, P. T., Franca, L. R., et al. (2004). Differential hormonal regulation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction*, 128(1), 73-86.
- Oliveira, C. A., Nie, R., Carnes, K., Franca, L. R., Prins, G. S., Saunders, P. T., et al. (2003). The antiestrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor-alpha but has no effect on estrogen receptor-beta and androgen receptor in rat efferent ductules. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 75.
- Olsson, M., Gustafsson, O., Skogastierna, C., Tolf, A., Rietz, B. D., Morfin, R., et al. (2007). Regulation and expression of human CYP7B1 in prostate: overexpression of CYP7B1 during progression of prostatic adenocarcinoma. *Prostate*, 67(13), 1439-1446.
- Omoto, Y., Imamov, O., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2005). Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5), 1484-1489.
- Pak, T. R., Chung, W. C., Lund, T. D., Hinds, L. R., Clay, C. M., & Handa, R. J. (2005). The androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells. *Endocrinology*, 146(1), 147-155.
- Palmieri, C., Cheng, G. J., Saji, S., Zelada-Hedman, M., Warri, A., Weihua, Z., et al. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 9(1), 1-13.
- Parker, M. G., Arbuckle, N., Dauvois, S., Danielian, P., & White, R. (1993). Structure and function of the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 684, 119-126.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74-108.
- Pasquali, D., Rossi, V., Esposito, D., Abbondanza, C., Puca, G. A., Bellastella, A., et al. (2001B). Loss of estrogen receptor beta expression in malignant human prostate cells

- in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(5), 2051-2055.
- Pasquali, D., Staibano, S., Prezioso, D., Franco, R., Esposito, D., Notaro, A., et al. (2001A). Estrogen receptor beta expression in human prostate tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 178(1-2), 47-50.
- Pelletier, G. (2002). Effects of estradiol on prostate epithelial cells in the castrated rat. *J Histochem Cytochem*, 50(11), 1517-1524.
- Pelletier, G., Labrie, C., & Labrie, F. (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol*, 165(2), 359-370.
- Pelletier, G., Luu-The, V., El-Alfy, M., Li, S., & Labrie, F. (2001). Immunoelectron microscopic localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland. *J Mol Endocrinol*, 26(1), 11-19.
- Penning, T. M., Bauman, D. R., Jin, Y., & Rizner, T. L. (2007). Identification of the molecular switch that regulates access of 5alpha-DHT to the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 265-266, 77-82.
- Petersen, D. N., Tkalcevic, G. T., Koza-Taylor, P. H., Turi, T. G., & Brown, T. A. (1998). Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology*, 139(3), 1082-1092.
- Pettersson, K., & Gustafsson, J. A. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol*, 63, 165-192.
- Picciarelli-Lima, P., Oliveira, A. G., Reis, A. M., Kalapothakis, E., Mahecha, G. A., Hess, R. A., et al. (2006). Effects of 3-beta-diol, an androgen metabolite with intrinsic estrogen-like effects, in modulating the aquaporin-9 expression in the rat efferent ductules. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 51.
- Pollard, M. (1973). Spontaneous prostate adenocarcinomas in aged germfree Wistar rats. *J Natl Cancer Inst*, 51(4), 1235-1241.

- Prins, G. S., & Birch, L. (1993). Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology*, *132*(1), 169-178.
- Prins, G. S., & Birch, L. (1997). Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*, *138*(5), 1801-1809.
- Prins, G. S., Birch, L., & Greene, G. L. (1991). Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*, *129*(6), 3187-3199.
- Prins, G. S., Birch, L., Habermann, H., Chang, W. Y., Tebeau, C., Putz, O., et al. (2001). Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev*, *13*(4), 241-252.
- Prins, G. S., & Korach, K. S. (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, *73*(3), 233-244.
- Prins, G. S., Marmer, M., Woodham, C., Chang, W., Kuiper, G., Gustafsson, J. A., et al. (1998). Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*, *139*(3), 874-883.
- Prins, G. S., Woodham, C., Lepinske, M., & Birch, L. (1993). Effects of neonatal estrogen exposure on prostatic secretory genes and their correlation with androgen receptor expression in the separate prostate lobes of the adult rat. *Endocrinology*, *132*(6), 2387-2398.
- Rago, V., Aquila, S., Panza, R., & Carpino, A. (2007). Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reprod Biol Endocrinol*, *5*, 23.
- Rajfer, J., & Coffey, D. S. (1978). Sex steroid imprinting of the immature prostate. Long-term effects. *Invest Urol*, *16*(3), 186-190.
- Risbridger, G., Wang, H., Young, P., Kurita, T., Wang, Y. Z., Lubahn, D., et al. (2001). Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol*, *229*(2), 432-442.
- Risbridger, G. P., Bianco, J. J., Ellem, S. J., & McPherson, S. J. (2003). Oestrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, *10*(2), 187-191.

- Russel, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., & Clegg, E. D. (1990). Mammalian Spermatogenesis. In L. D. Russel, R. A. Ettlin, A. P. S. Hikim & E. D. Clegg (Eds.), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis* (pp. 1-40): Cache River Press.
- Russell, D. W., & Wilson, J. D. (1994). Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, 63, 25-61.
- Sar, M., & Welsch, F. (2000). Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. *Andrologia*, 32(4-5), 295-301.
- Sasaki, A., & Yoshinaga, K. (1989). Immunoreactive somatostatin in male reproductive system in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 68(5), 996-999.
- Saunders, P. T. (1998). Oestrogen receptor beta (ER beta). *Rev Reprod*, 3(3), 164-171.
- Saunders, P. T., Millar, M. R., Macpherson, S., Irvine, D. S., Groome, N. P., Evans, L. R., et al. (2002). ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6), 2706-2715.
- Saunders, P. T., Sharpe, R. M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D. S., et al. (2001). Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod*, 7(3), 227-236.
- Scobie, G. A., Macpherson, S., Millar, M. R., Groome, N. P., Romana, P. G., & Saunders, P. T. (2002). Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids*, 67(12), 985-992.
- Setchell, B. P., & Breed, W. G. (2006). Anatomy, vasculature and innervations of the male reproductive tract. In J. D. Neill, Plant, T. M., Pfaff, D. W., Challis, J. R. G., Kretser, D. M., Richards, J. S., and Wassarman, P. M. (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 771-825). New York: Raven Press.
- Shappell, S. B., Thomas, G. V., Roberts, R. L., Herbert, R., Ittmann, M. M., Rubin, M. A., et al. (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(6), 2270-2305.
- Shibata, Y., Ito, K., Suzuki, K., Nakano, K., Fukabori, Y., Suzuki, R., et al. (2000). Changes in the endocrine environment of the human prostate transition zone with aging: simultaneous quantitative analysis of prostatic sex steroids and comparison with human prostatic histological composition. *Prostate*, 42(1), 45-55.
- Shum, W. W., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P. J., Brown, D., & Breton, S. (2008). Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell*, 135(6), 1108-1117.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., et al. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, 15(3), 342-355.
- Sjoberg, H. E., Arver, S., & Bucht, E. (1980). High concentration of immunoreactive calcitonin of prostatic origin in human semen. *Acta Physiol Scand*, 110(1), 101-102.
- Skafar, D. F., & Zhao, C. (2008). The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine*, 33(1), 1-8.
- Sluczanowska-Glabowska, S., Laszczynska, M., Wylot, M., Glabowski, W., Piasecka, M., & Gaczewicz, D. (2010). Morphological and immunohistochemical compare of three rat prostate lobes (lateral, dorsal and ventral) in experimental hyperprolactinemia. *Folia Histochem Cytobiol*, 48(3), 447-454.
- Sneddon, S. F., Walther, N., & Saunders, P. T. (2005). Expression of androgen and estrogen receptors in Sertoli cells: studies using the mouse SK11 cell line. *Endocrinology*, 146(12), 5304-5312.
- Soeffing, W. J., & Timms, B. G. (1995). Localization of androgen receptor and cell-specific cytokeratins in basal cells of rat ventral prostate. *J Androl*, 16(3), 197-208.
- Steckelbroeck, S., Jin, Y., Oyesanmi, B., Kloosterboer, H. J., & Penning, T. M. (2004). Tibolone is metabolized by the 3alpha/3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four human isozymes of the aldo-keto reductase 1C subfamily: inversion of stereospecificity with a delta5(10)-3-ketosteroid. *Mol Pharmacol*, 66(6), 1702-1711.

- Stenoien, D. L., Mancini, M. G., Patel, K., Allegretto, E. A., Smith, C. L., & Mancini, M. A. (2000). Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol*, *14*(4), 518-534.
- Sugimura, Y., Cunha, G. R., & Donjacour, A. A. (1986). Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod*, *34*(5), 961-971.
- Sun, Y., Niu, J., & Huang, J. (2009). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res*, *1*(2), 148-162.
- Sundaram, K., & Kumar, N. (1996). Metabolism of testosterone in Leydig cells and peripheral tissues. In A. H. Payne, M. P. Hardy & D. L. Russell (Eds.), *The Leydig Cell* (pp. 287-306). Viena: Cache River Press.
- Takase, Y., Levesque, M. H., Luu-The, V., El-Alfy, M., Labrie, F., & Pelletier, G. (2006). Expression of enzymes involved in estrogen metabolism in human prostate. *J Histochem Cytochem*, *54*(8), 911-921.
- Taylor, R. A., & Risbridger, G. P. (2008). The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*, *76*(6), 671-681.
- Taylor, R. A., Toivanen, R., & Risbridger, G. P. (2010). Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem. *Endocr Relat Cancer*, *17*(4), R273-285.
- Tirado, O. M., Selva, D. M., Toran, N., Suarez-Quian, C. A., Jansen, M., McDonnell, D. P., et al. (2004). Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration. *J Androl*, *25*(1), 84-94.
- Tremblay, G. B., Tremblay, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Labrie, F., et al. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, *11*(3), 353-365.
- Tucker, M. J. (1997). The Male Genital System. In M. J. Tucker (Ed.), *Diseases of the Wistar Rat* (pp. 163-178). Bristol: Taylor & Francis.
- Voigt, K. D., & Bartsch, W. (1986). Intratissular androgens in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *J Steroid Biochem*, *25*(5B), 749-757.
- Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., & Cunha, G. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, *68*(4-5), 270-279.

- Ward, J. M., Reznik, G., Stinson, S. F., Lattuada, C. P., Longfellow, D. G., & Cameron, T. P. (1980). Histogenesis and morphology of naturally occurring prostatic carcinoma in the ACI/segHapBR rat. *Lab Invest*, 43(6), 517-522.
- Weatherman, R. V., Fletterick, R. J., & Scanlan, T. S. (1999). Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu Rev Biochem*, 68, 559-581.
- Weihua, Z., Lathe, R., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2002). An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21), 13589-13594.
- Weihua, Z., Makela, S., Andersson, L. C., Salmi, S., Saji, S., Webster, J. I., et al. (2001). A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11), 6330-6335.
- White, R., & Parker, M. G. (1998). Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocrine Related Cancer*, 5, 1-14.
- Wright, A. S., Douglas, R. C., Thomas, L. N., Lazier, C. B., & Rittmaster, R. S. (1999). Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase. *Endocrinology*, 140(10), 4509-4515.
- Wu, D., Lin, G., & Gore, A. C. (2009). Age-related changes in hypothalamic androgen receptor and estrogen receptor alpha in male rats. *J Comp Neurol*, 512(5), 688-701.
- Xie, W., Wong, Y. C., & Tsao, S. W. (2000). Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *Prostate*, 44(1), 31-39.
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G. S., Saunders, P. T., Katzenellenbogen, B. S., & Hess, R. A. (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl*, 23(6), 870-881.
- Zirkin, B. R., & Chen, H. (2000). Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod*, 63(4), 977-981.