

MÔNICA MORAIS SANTOS

**Investigação da expressão do receptor de estrógeno ER β e de
componentes relacionados à via metabólica de esteroides
estrogênicos no complexo prostático de ratos Wistar durante
o envelhecimento**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Setembro de 2015

MÔNICA MORAIS SANTOS

Investigação da expressão do receptor de estrógeno ER β e de componentes relacionados à via metabólica de esteroides estrogênicos no complexo prostático de ratos Wistar durante o envelhecimento

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Cleida Aparecida de Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Setembro de 2015

Esta tese foi desenvolvida 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 Profa. Dra. 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).

Aos meus amados pais que dignamente me apresentaram a importância da família, o caminho da honestidade e da persistência e que nunca mediram esforços para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu amado Felipe, que aguentou firme ao meu lado, sempre trazendo palavras de conforto, confiança e paz. Seu apoio e paciência foram essenciais em todos os momentos, principalmente nas incertezas.

*À minha querida orientadora, Cleida Oliveira. A você devo a confiança em
minha capacidade como pesquisadora e a sabedoria para me transmitir os
ensinamentos de uma ciência séria e de qualidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fonte de luz, fortaleza e sabedoria, e que dá essência à minha vida. Ele é sem dúvida a fonte inesgotável de minha força, que muitas vezes duvidei que houvesse em mim. Ele provou que as adversidades são essenciais para despertar capacidades que teriam ficado adormecidas se houvessem apenas circunstâncias favoráveis. Muito obrigada por mais essa vitória! Também sou grata a Ele pelas pessoas maravilhosas que conheci nesta caminhada e que permitiram minha evolução pessoal, espiritual e científica.

À minha estimada orientadora, Dra Cleida Oliveira, que tanto admiro e respeito. Sou muito grata por tudo que fez por mim. Foram muitos anos de convivência que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente. Obrigada pela paciência, incentivo e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade. Obrigada por me conduzir firme em meio às adversidades enfrentadas e por todas as oportunidades confiadas. Você é para mim um exemplo de cientista e educadora.

Professor Germán A.B. Mahecha, obrigada pela paciência e por compartilhar sua grandiosa sabedoria. Aprendi valiosos ensinamentos com você por todos esses anos.

Aos Professores da banca examinadora por gentilmente terem aceitado meu convite para contribuir com meu trabalho.

Queridos amigos do LABRE, o que teria sido de mim sem a ajuda indispensável de vocês? Por todos esses anos, sempre tive o prazer de trabalhar com pessoas especiais. Obrigada por toda ajuda, carinho, companheirismo, pelos bons momentos que passamos dentro e fora do laboratório e por me aguentarem em meus dias de mau humor. Lelezinha (Letícia Santos), pessoa tão divertida e sincera que aprendi a cada dia a admirar mais e mais. Todo o carinho que tem por mim não há Mastercard que pague, e tenha certeza de que é completamente recíproco. O que seria de nossos asteriscos sem você?! Obrigada pela competência doada, você é fantástica. Brevelineazinha (Hipácia Werneck), pessoa tão doce e de sorriso fácil. Mesmo com todo o sono do mundo, sempre

se dispôs em me ajudar. Minhas filhinhas, vocês foram essenciais para a condução do trabalho. Obrigada por abraçarem este projeto comigo. Aryzinha (Aryane), raio de sol mesmo em dias nublados. Tão dedicada e cativante. Obrigada por toda a ajuda. Xúnezita (Júnia Dayrell), pessoa tão doce e divertida. Obrigada por toda amizade e ajuda sempre dispendida. Gabrielzito (Gabriel Campolina), meu consultor estatístico, entre suas mil e uma habilidades! Obrigada por me ajudar sempre com a maior boa vontade do mundo e pela paciência. Bruninha (Bruna Maria), pessoa aplicada e adorável, sempre pronta a ajudar. Wivi (Wiviane Alves), só não mais desastrada que eu. Obrigada por ser sempre tão solícita. Elisângela Martins, obrigada pela ajuda nos momentos necessários. Carina, Cristiano, Amanda e Regiana que também fizeram parte desta trajetória e sempre se dispuseram a me ajudar. As pessoas do LABRE são as melhores pessoas do mundo! Os dias de trabalho foram muito mais divertidos e prazerosos com vocês por perto.

Ao meu amado marido Felipe, agradeço por ter aguentado toda minha bagunça de livros, cadernos e papéis espalhados pela mesa. Por compreender minha falta de tempo e minha ausência mesmo que em presença física, e por ter me ajudado e apoiado tanto por todos esses anos.

Minha querida e amada família, vocês são essenciais. Meus pais (Wilson e Cleusa) irmãos (Grazi, William e Cris), cunhados (Enrico, Fátua e Maria), e minha sogra (Suzi), agradeço por todo carinho e acolhimento. Obrigada pelas palavras de força e otimismo que me impulsionaram sempre em frente nesta trajetória, independentemente do tamanho dos obstáculos. Por vibrarem comigo a cada conquista e por compreenderem minha constante ausência.

Meus amados sobrinhos, Juliano, Matheus, Laura, Valentina e Lívia. Os sinceros sorrisos, abraços e as brincadeiras deixam qualquer dia mais feliz, qualquer frustração esquecida e qualquer cansaço revigorado. Obrigada por me apresentarem um amor tão fascinante que é o de ser tia.

Meus familiares, vovô Moraes, tios, tias, primos e primas, que sempre estiveram na torcida e me incentivaram.

Ao Professor José Carlos Nogueira, obrigada pela agradável companhia e por compartilhar de sua incrível sabedoria. Sua paixão pela ciência é contagiante. Eu não apenas aprendi muito com o senhor como me apaixonei ainda mais pela morfologia.

Ao André Oliveira, pessoa tão profissional e carismática. Obrigada por todas as ajudas, ensinamentos, paciência, atenção e incentivo.

Aos amigos Thalita Marcolan, Marcos Sá e Patrícia Martins, e aos demais colegas do Departamento de Morfologia (em especial a Paula Prado, Fabíola Níhi, Priscila Valadão, Kátia Maciel, Patricia Silva, Aline Martins, Fernando Abreu, Lindisley Gomides e Denise Peres) pelas conversas e momentos de descontração que atenuaram a seriedade do curso de doutorado.

Aos integrantes do laboratório de Biologia Celular (em especial Dra. Samyra Nassif, Prof. Gleide Avelar, Prof. Guilherme Mattos, Marcela Procópio e Mara Lívia) e do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (em especial a Fabíola Níhi e Marcos Gomes) que sempre se prontificaram em me socorrer e ajudar.

À professora Janice Henriques pelo incentivo, conhecimento compartilhado e pela oportunidade que me concedeu de atuar em aulas na graduação como Professora voluntária. Obrigada especialmente por ter acreditado em meu potencial.

Às amigas, Lílian Mendes, Mariana Meneses, Anna Caroline, Nayra Soares, Mariana Eduarda, Ana Paula Vasconcelos e Patrícia Catizani por estarem sempre e na torcida pelo meu sucesso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular por terem contribuído brilhantemente com a minha formação. Em especial à Prof^{ta} Fernanda Radicchi, Prof^{ta} Cristina Guatimosim e Prof^{ta} Tânia Sagatelli por serem sempre tão adoráveis comigo.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular ICB/UFMG, em especial à Rhuanna, Francisco, Maria e Rose, sempre dispostos a ajudar.

À todos, o meu mais sincero OBRIGADA!

*“Eu pedi forças...
E Deus me deu dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi sabedoria...
E Deus me deu problemas para solucionar.
Eu pedi prosperidade...
E Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar.
Eu pedi coragem...
E Deus me deu perigos para superar.
Eu pedi amor...
E Deus me deu pessoas com problemas para ajudar.
Eu pedi favores...
E Deus me deu oportunidades.
Não recebi exatamente o que pedi...
Mas recebi tudo aquilo que mais precisava...”*

-Autor desconhecido-

RESUMO

Embora a próstata seja um órgão andrógeno-dependente, ela também sofre influência dos estrógenos que agem através de seus receptores específicos ER α e ER β , sendo este último altamente expresso no epitélio glandular. Evidências apontam que 3 β -diol, metabolito da diidrotestosterona (DHT), seja o ligante alternativo de ER β , regulando a proliferação, apoptose e diferenciação celular. Ainda, existem relatos sobre a redução de ER β no câncer de próstata, indicando seu importante papel protetor no tecido. Embora haja relação entre a redução de ER β com o crescimento prostático anormal, pouco se sabe sobre variação idade-dependente de sua expressão. Neste contexto, a proposta deste trabalho foi elucidar se ocorrem alterações na expressão de ER β com o envelhecimento, assim como em outros componentes da via metabólica de esteroides estrogênicos, como aromatase e CYP7B1 e com os níveis de estradiol e DHT na próstata de ratos Wistar em diferentes idades (3 a 24 meses). Investigamos também se o tratamento de ratos senis com 3 β -diol seria capaz de reverter as alterações prostáticas decorrentes da idade. Com o envelhecimento foram detectadas alterações histopatológicas como hiperplasia, atipias nucleares e neoplasia prostática intraepitelial (PIN) em todos os lobos prostáticos. Na próstata ventral foram detectadas ainda áreas de atrofia e proliferação de arquitetura cribriforme, enquanto a próstata lateral foi frequentemente acometida por prostatite. Houve redução seletiva de ER β em áreas de atrofia, atipia celular e PIN em animais senis, sendo que em áreas de PIN, esta redução foi paralela ao aumento de proliferação celular, corroborando o papel anti-proliferativo de ER β . Estas alterações ocorreram em um ambiente hormonal com níveis constantes de estradiol e redução de DHT. Estes dados apontam que a redução local de ER β possa estar associada com as condições malignas e pré-malignas na próstata. Aromatase foi detectada no epitélio glandular, sendo que esparsas células basais coraram mais intensamente para a enzima (células basais/Aro+). Em animais senis, houve aumento da densidade de células basais/Aro+, especialmente em áreas de proliferação cribriforme, PIN e prostatite, corroborando que os estrógenos possam ocasionar efeitos adversos na próstata com o envelhecimento, similares à estrogenização induzida. Nestas áreas houve ainda moderada redução da expressão de CYP7B1, reforçando um possível desequilíbrio hormonal local, uma vez que a disponibilidade de DHT para conversão em 3 β -diol está reduzida. O tratamento de animais senis com 3 β -diol promoveu melhora substancial na citoarquitetura do complexo prostático, assim como promoveu aumento

da expressão de ER β , redução da proliferação celular e aumento de apoptose, sem alterar os níveis intraprostáticos de DHT, corroborando o papel anti-proliferativo, pró-apoptótico e pró-diferenciação de ER β /3 β -diol na próstata. Esses dados apontam que a exposição de animais senis a 3 β -diol pode ser uma alternativa na prevenção de patologias prostáticas. Considerando o conjunto de resultados, podemos concluir que os estrógenos, 3 β -diol e seus receptores, possuem importância significativa para o desenvolvimento e progressão de patologias prostáticas. Os resultados reforçam ainda a importância do estudo tecidual minucioso na próstata para melhor entendimento das alterações relacionadas às patologias prostáticas.

Palavras chaves: próstata, envelhecimento, ER β , 3 β -diol, aromatase, estrógenos, CYP7B1, rato Wistar

ABSTRACT

Although the prostate is androgen-dependent, it is also influenced by estrogens, which act via the estrogen receptors ER α and ER β , the last one being highly expressed in the glandular epithelium. It has been shown that 3 β -diol, a DHT metabolite, is the alternative ER β ligand, regulating the cell proliferation, apoptosis and differentiation in the prostate. There is a body of evidences that ER β is decreased in malignant prostate, suggesting that it plays an important role in protecting this tissue. Despite the relationship between reductions in ER β and abnormal growth of the gland, few are known about the age-dependent variation of this receptor. Therefore, we aimed to investigate ER β expression, as well as others components of the metabolic pathway of estrogenic steroids, such as aromatase and CYP7B1, as well as estradiol and DHT levels in the prostatic lobes of aging Wistar rats (3 to 24 months). We also investigated whether the treatment of senile rats with 3 β -diol would be able to reverse the aging prostate changes. Histopathological alterations, including hyperplasia, intraluminal concretions, nuclear atypia and prostate intraepithelial neoplasias (PIN), were observed in the prostates of aging rats. In the ventral prostate, areas of cribriform proliferation and epithelial atrophy were also observed, whereas in the lateral prostate, there was frequent prostatitis. Immunohistochemistry revealed that the expression of ER β was reduced in restricted areas related to atrophy, cellular atypia and PIN in senile animals. Corroborating the involvement of the receptor with anti-proliferative activity, the punctual reduction in ER β paralleled the increase in cell proliferation especially in areas of PIN and nuclear atypies. These changes occurred in a hormonal milieu characterized by a constant concentration of estradiol but decreased plasmatic and tissue DHT. These data point out that the focal ER β reduction may be associated with the premalignant and malignant conditions in the prostate. Aromatase was detected in the glandular epithelium, in which some sparse basal cells were found intensely stained for the enzyme (basal cell/Aro+). In senile animals, there were an increased in the basal cell/Aro+ density, especially in cribriform proliferation areas, PIN and prostatitis corroborating that the estrogens may lead to adverse effects on the aging prostate, similar to those induced by estrogenization. In these areas there was also moderate reduction in the CYP7B1 expression, reinforcing a possible hormonal imbalance, since the DHT availability for conversion to 3 β -diol is reduced. The treatment of senile rats with 3 β -diol promoted substantial improvement in the cytoarchitecture of the prostate complex, as well as promoted increase in ER β expression, decrease in cell proliferation

and increase in apoptosis without changing the intra-prostatic DHT levels, thus corroborating the anti-proliferative, pro-apoptotic and pro-differentiation role of ER β /3 β -diol in the prostate. These data point out that exposure of senile animals to 3 β -diol may be an alternative in the prevention of prostate diseases. Considering the set of results, it may be concluded that estrogens, 3 β -diol and their receptors have significant importance for the development and progression of prostate diseases. The results also reinforce the importance of careful study in the prostate tissue to better understand the changes related to prostate diseases.

Keywords: prostate, aging, ER β , 3 β -diol, aromatase, estrogens, CYP7B1, Wistar rat

LISTA DE FIGURAS

Figuras introdução	Página
Figura 1 - Representação esquemática da organização da próstata de roedores e humanos em torno da uretra.....	6
Figura 2 - Representação esquemática das principais vias esteroidogênicas direcionadas à formação de hormônios sexuais.....	9
Figura 3 - Representação esquemática da formação intracrina dos principais hormônios ativos na próstata humana (DHT e 3 β -diol).....	11
Figure 4 - Representação esquemática do gene <i>CYP19</i>	13
Figura 5 - Representação esquemática comparativa da estrutura proteica de ER α e ER β	19
 Figuras resultados – Capítulo I 	
Figura 6 - Histopatologia do complexo prostático de ratos em diferentes idades.....	46
Figura 7 - Imunomarcção para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos em diferentes idades.....	49
Figura 8 - Quantificação da intensidade de imunorreação para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos em diferentes idades.....	51
Figura 9 - <i>Western blotting</i> para o receptor ER β na próstata de ratos em diferentes idades e comparativo da expressão proteica entre os diferentes lobos prostáticos.	53
Figura 10 - Níveis de RNAm de ER β na próstata de ratos em diferentes idades.	54
Figura 11 - Imunohistoquímica e quantificação de células MCM7 positivas na próstata ventral de ratos em diferentes idades.....	55
Figura 12 - Colocalização de ER β e marcador de proliferação celular Ki67 na próstata ventral de ratos idosos.	57
Figura 13 - Níveis de 17 β -estradiol (E2) e diidrotestosterona (DHT) no plasma e na próstata ventral de ratos em diferentes idades.....	58

Figuras resultados – Capítulo II

Figura 14 - Imunolocalização da enzima aromatase na próstata ventral, dorsal, lateral e anterior de ratos em diferentes idades.....	59
Figura 15 - Imunolocalização da enzima aromatase na próstata ventral, dorsal e lateral de ratos senis em áreas de alterações teciduais.....	61
Figura 16 - <i>Western blotting</i> para enzima Aromatase na próstata ventral de ratos em diferentes idades.	62
Figura 17 - Colocalização de aromatase e células basais em áreas de epitélio normal na próstata ventral, dorsal e lateral de ratos Wistar.....	64
Figura 18 - Colocalização de aromatase e células basais em áreas afetadas pelo envelhecimento na próstata ventral, dorsal e lateral de ratos Wistar entre 18 e 24 meses de idade.	66
Figura 19 - Imunolocalização da enzima CYP7B1 na próstata ventral, dorsal, lateral e anterior de ratos em diferentes idades.....	68
Figura 20 - Análise do peso corporal e do complexo prostático de ratos senis controles e tratados com 3 β -diol nas doses de 1 e 3 mg.....	69
Figura 21 - Análise do peso corporal e do complexo prostático de ratos senis controles e tratados na dose de 5 mg de 3 β -diol.....	70
Figura 22 - Análise do peso corporal e do complexo prostático de ratos senis controles e tratados na dose de 3 mg de 3 β -diol por 60 dias.....	71
Figura 23 - Histopatologia da próstata ventral de ratos senis submetidos a diferentes regimes de administração de 3 β -diol.	72
Figura 24 - Histopatologia da próstata dorsal de ratos senis submetidos a diferentes regimes de administração de 3 β -diol.	73
Figura 25 - Histopatologia da próstata lateral de ratos senis submetidos a diferentes regimes de administração de 3 β -diol.	75
Figura 26 - Imunomarcção para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos senis tratados ou não com 3 β -diol, nas doses de 1 e 3 mg por 42 dias.....	77
Figura 27 - Imunomarcção para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos senis tratados ou não com 3 β -diol, na dose de 5 mg por 42 dias.....	78
Figura 28 - Imunomarcção para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos senis tratados ou não com 3 β -diol, na dose de 3 mg por 60 dias.....	79

Figura 29 - <i>Western blotting</i> para o receptor de estrógenos ER β extraído da próstata ventral e dorsal de ratos Wistar senis de todos os tratamentos realizados com 3 β -diol.	80
Figura 30 - Taxas de proliferação celular no complexo prostático de ratos senis submetidos a diferentes regimes de tratamento com 3 β -diol.....	81
Figura 31 - Taxas de morte celular no complexo prostático de ratos senis submetidos a diferentes regimes de tratamento com 3 β -diol.....	82
Figura 32 - Níveis hormonais de diidrotestosterona (DHT) no plasma e na próstata ventral de ratos idosos tratados ou não com 3 β -diol.....	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Relação dos anticorpos usados para os ensaios de imunohistoquímica.....	35
Tabela 2 – Relação dos anticorpos usados para os ensaios de imunofluorescência.....	38
Tabela 3 – Peso corporal e relativo dos lobos prostáticos frescos e fixados.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
(na sequencia em que são citadas no texto)

PSA	- Antígeno prostático específico
NSE	- Enolase específica de neurônio
VP	- Próstata ventral
DP	- Próstata dorsal
LP	- Próstata lateral
AP	- Próstata anterior
DHEA	- Deidroepiandrosterona
LH	- Hormônio luteinizante
SHBG	- <i>Sex hormone-binding globulin</i>
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
DHT	- Diidrotestosterona
AR	- Receptores de andrógenos
E2	- 17 β -estradiol
3 β -diol	- 5 α -androstane-3 β -17 β -diol
3 β -HSD	- Enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
CYP	- <i>Cytochrome</i> P450
UTR	- <i>Untranslated region</i>
E1	- Estrona
E3	- Estriol
RNA _m	- RNA mensageiro
DNA _c	- DNA complementar
ER	- Receptor de estrógeno
ER α (ou ESR1)	- Receptor de estrógeno α
ER β (ou ESR2)	- Receptor de estrógeno β
GPR30 ou GPER-1	- Receptores de estrógeno acoplados à proteína G
ERE	- Elementos responsivos a estrógenos
NTD	- Domínio amino-terminal
DBD	- Domínio de ligação ao DNA
LBD	- Domínio de ligação ao ligante
ERE	- Elementos responsivos a estrógenos
α ERKO	- <i>knockouts</i> para ER α
β ERKO	- <i>knockouts</i> para ER β
HBP	- Hiperplasia benigna prostática /hiperplasia nodular prostática
PIN	- <i>proliferative intraepithelial neoplasia</i>

SUMÁRIO

	Página
I. REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1. Características Gerais da Próstata.....	2
1.1 Aspectos histológicos da próstata.....	3
1.2 Próstata de roedores e de humanos.....	5
2. Regulação Hormonal da Próstata.....	8
3. A Enzima Aromatase.....	12
4. A Enzima CYP7B1.....	15
5. Esteroides Estrogênicos na Próstata.....	16
6. Receptores de Estrógenos.....	18
7. Distribuição e Funções dos Receptores de Estrógenos na Próstata.....	22
8. Câncer de Próstata, Envelhecimento e ER β	23
II. JUSTIFICATIVA.....	26
III. OBJETIVOS.....	29
IV. MATERIAIS E METÓDOS.....	31
1. Aquisição dos animais.....	32
2. Tratamento de ratos idosos com 3 β -diol.....	32
3. Preparação dos tecidos.....	33
4. Histopatologia.....	33
5. Imunohistoquímica.....	33
6. TUNEL.....	35
7. Análises quantitativas.....	36
8. Imunofluorescência e microscopia confocal.....	37
9. <i>Western blotting</i>	38
10. RT-PCR.....	39
11. ELISA.....	40
12. Análises estatísticas.....	41
V. RESULTADOS.....	42
CAPÍTULO I – Artigo publicado.....	44
1. Histopatologia e expressão de ER β no complexo prostático de ratos em envelhecimento.....	44
1.1 Peso corporal e do complexo prostático.....	44
1.2 Histopatologia do complexo prostático.....	45
1.3 Imunolocalização de ER β no complexo prostático.....	48

1.4 <i>Western blotting</i>	52
1.5 RT-PCR.....	54
1.6 Proliferação celular.....	55
1.7 Níveis hormonais.....	58
CAPÍTULO II – Resultados não publicados.....	59
1. Análise e expressão da enzima aromatase no complexo prostático de ratos em envelhecimento.....	59
1.1 Imunolocalização de aromatase.....	59
1.2 Detecção de aromatase por <i>Western blotting</i>	61
1.3 Colocalização de células basais e aromatase.....	63
2. Imunolocalização da enzima CYP7B1 no complexo prostático de ratos em envelhecimento.....	67
3. Tratamento de ratos senis com 3 β -diol.....	69
3.1 Peso corporal e do complexo prostático.....	69
3.2 Histopatologia do complexo prostático.....	71
3.3 Expressão de ER β no complexo prostático.....	76
a) Imunohistoquímica.....	76
b) <i>Western blotting</i>	80
3.4 Proliferação celular e apoptose.....	81
3.5 Níveis de DHT no plasma e na próstata ventral.....	83
VI. DISCUSSÃO.....	84
CAPÍTULO 1 – Artigo publicado	
Alterações na expressão do Receptor de Estrógeno ER β (ESR2) sem alterações nos níveis de estradiol na próstata de ratos em envelhecimento.....	85
CAPÍTULO II – Resultados não publicados	89
1. Expressão de Aromatase.....	89
2. Expressão de CYP7B1.....	91
3. Tratamento de ratos senis com 3 β -diol.....	92
VII. CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

I. REVISÃO DE LITERATURA

I. REVISÃO DE LITERATURA

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PRÓSTATA

A próstata é uma das glândulas anexas ao sistema genital masculino, sendo sua secreção importante para a fertilização, por promover condições favoráveis para a sobrevivência dos espermatozoides. Localizada na cavidade pélvica, a próstata está posicionada abaixo do colo da bexiga, onde se dispõe ao redor da porção inicial da uretra, que dessa forma é denominada uretra prostática (Aumüller, 1979).

A próstata produz e secreta um complexo proteolítico, o líquido prostático, caracterizado por ser uma secreção homogênea, leitosa e alcalina, com odor inerente, que corresponde a aproximadamente 30% do plasma seminal em humanos (Aumüller, 1989; Kumar e 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 e Majumder, 1995). A fibrinolisinase, a coagulase, o PSA e outras enzimas estão envolvidas no processo de liquefação do sêmen e do muco cervical, facilitando o trânsito 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 e Majumder, 1995). Em suma, a secreção prostática é fundamental para o sucesso reprodutivo já que promove algumas das condições necessárias para a manutenção dos espermatozoides.

Durante a ejaculação, as células musculares lisas, componentes do estroma fibromuscular da próstata, se contraem promovendo a eliminação dos produtos secretados pela glândula, que serão conduzidos até a uretra. Neste momento, o líquido prostático irá se misturar aos espermatozoides conduzidos pelos ductos deferentes e aos produtos da vesícula seminal, formando assim o sêmen.

1.1 Aspectos Histológicos da Próstata

O epitélio glandular da próstata é 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 morfofuncionalmente distintos: as células basais, as células secretoras ou luminais e as células neuroendócrinas (Abrahamsson e Sant'Agnesse, 1993; Hayward et al,1996A; El-Alfy et al, 2000). Esses tipos celulares podem ser distinguidos baseado em sua localização, morfologia e características fenotípicas, como por exemplo, o perfil de citoqueratinas que estas células apresentam.

As células basais são pequenas, contendo pouco citoplasma, núcleo pequeno de formas variadas e expressam as citoqueratinas 5 e 14 (Verhagen et al, 1992). Em algumas espécies de animais como ratos, camundongos, cães e macacos, estas células são pouco numerosas, localizadas entre as células secretoras em contato com a membrana basal, sem, porém, atingir a superfície luminal (El-Alfy et al, 2000; Taylor & Risbridger, 2008). Devido a essa característica, o epitélio glandular desses animais é classificado como pseudoestratificado. Embora haja esta clássica descrição de células basais restritas ao compartimento basal do epitélio, estudos recentes em roedores têm mostrado que algumas destas células exibem longas e delgadas projeções que se insinuam por entre as células adjacentes alcançando a superfície luminal (Shum et al, 2008 e 2014; Kim et al, 2015). Já em humanos, as células basais são numerosas e formam uma camada descontínua de células que repousam sobre a membrana basal sem também atingirem o lúmen (El-Alfy et al, 2000). Por essa razão, a classificação do epitélio glandular em humanos tem sido mais controversa, sendo que alguns o classificam como pseudoestratificado, enquanto outros o consideram biestratificado colunar (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 pinocíticas 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 da próstata humana é que elas são células diferenciadas e caracterizam-se pela presença de numerosas enzimas esteroideogênicas, tais como 3β -hidroxiesteroide desidrogenase, 17β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 5 e 5α -redutase tipo 2 (Pelletier et al, 2001; Takase et al, 2006).

As células luminais ou secretoras são colunares altas, com núcleo localizado no terço basal da célula e citoplasma basófilo, exceto na região supranuclear, o qual se cora fracamente. As citoquetinas expressas pelas células luminais são as 8 e 18 (Verhagen et al, 1992). Estas células são altamente diferenciadas e responsáveis pela produção dos principais componentes do líquido prostático, possuindo abundante retículo endoplasmático granular, desenvolvido complexo de Golgi, além de numerosos grânulos de secreção apicais (Aumüller, 1979; Hayashi et al, 1991).

As células neuroendócrinas são células regulatórias que possuem características neurais e endócrinas. Estas células estão dispostas isoladamente ou em pequenos grupos em todo tecido prostático, incluindo o epitélio glandular e regiões ductais, sendo mais abundantes nesta última região (Abrahamsson & Sant'Agnes, 1993; Abrahamsson, 1999). Essas células contêm uma vasta gama de grânulos de neurosecreção de tamanhos e morfologias distintas que se correlacionam com o grande número de moléculas secretadas, sugerindo a diversidade das mesmas (Abrahamsson & Sant'Agnes, 1993; Abrahamsson, 1999; Komiya et al, 2009). 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). Outras moléculas como serotonina, glucagon, histamina, cromogranina, sinaptofisina, enolase específica de neurônio (NSE) entre outras, também são produzidos por estas células (di Sant'Agnes, 1992; Abrahamsson & Sant'Agnes, 1993; Angelsen et al, 1997). Devido a esta vasta variedade de neuropeptídeos e aminas biogênicas produzidos, tem sido sugerido que estas células participem da regulação da atividade proliferativa, diferenciação e atividade secretória da próstata (Abrahamsson & Sant'Agese, 1993; Sun et al, 2009). Homens de etnia africana, que são mais propensos a desenvolver câncer de próstata, possuem menor densidade de células neuroendócrinas, indicando que estas células possam exercer efeito protetor contra a carcinogênese prostática (Daneshmand et al, 2005). Adicionalmente, esta maior prevalência também se correlaciona com os menores níveis de vitamina D e maiores níveis de níveis estrógenos (John et al, 2005;), os quais são comuns nesta etnia.

Em humanos, o estroma que sustenta os ácinos é de natureza conjuntivo-muscular liso. Esta musculatura lisa sofre contrações durante a ejaculação, auxiliando na ejeção da secreção prostática no lúmen da uretra (Aumüller, 1979; Hayward et al, 1996B). Em roedores, o estroma interacinar é composto por tecido conjuntivo frouxo, enquanto as células musculares lisas se restringem a uma delgada camada de três a cinco células de espessura que se dispõem em torno dos adenômeros. A espessura dessa camada muscular aumenta progressivamente na convergência dos ductos em direção à uretra (Aumüller, 1979; Hayward et al, 1996B). Em ambas as espécies, o estroma contém ainda nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, e células de defesa, como mastócitos (Hayward et al, 1996B).

1.2 Próstata de roedores e de humanos

- *Roedores*

A próstata de roedores é composta por quatro lobos bilateralmente simétricos (Fig. 1), que são denominados de acordo com sua posição quadrúpede anatomotopográfica relativa à uretra, como: próstata ventral (VP), próstata dorsal (DP), próstata lateral (LP) e próstata anterior (AP) ou glândula de coagulação (Hayashi et al, 1991; Hayward et al, 1996A; Risbridger & Taylor, 2006). Estudos da ramificação dos ductos prostáticos mostram que estas glândulas possuem um comportamento de ramificações arbóreas, possuindo ductos terminais ou adenômeros, localizados na porção distal da glândula, que convergem formando ductos secundários que por sua vez, culminam para formação dos ductos principais. Estes ductos desembocam na uretra prostática, onde a secreção da glândula é lançada. O padrão de ramificação glandular é particular em cada lobo, assim como o padrão de expressão gênica, respostas hormonais, síntese proteica e conseqüentemente o tipo de secreção produzido (Takeda et al, 1990; Hayashi et al, 1991; Prins et al, 1992; Berquin et al, 2005).

A próstata ventral está localizada imediatamente abaixo da bexiga, sendo que seus 2 a 3 ductos principais desembocam na porção ventral da uretra (Fig.1A). Este lobo constitui aproximadamente metade da massa do complexo prostático, sendo o principal lobo utilizado como modelo experimental (Hayashi et al, 1991). O epitélio pseudoestratificado prismático que forma os adenômeros é pouco pregueado nesse lobo (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 uretra e à próstata lateral (Fig.1A). Ela possui de 5 a 6 ductos principais em cada 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 se juntando caudalmente à próstata dorsal (Fig.1A). Seus túbulo-ácinos são mais pregueados e seu epitélio mais baixo que o dos lobos ventrais e dorsais (Hayashi et al, 1991).

A próstata anterior encontra-se adjacente à vesícula seminal, situando-se em sua concavidade medial (Fig.1A). Apresenta estrutura tubular em vez de túbulo-acinar como a dos outros lobos, possuindo apenas um ducto principal em cada lado, que emerge da porção pósterio-superior da uretra. O ducto principal é formado pela convergência dos numerosos ductos distais ramificados. 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 cápsula de tecido conjuntivo que envolve os lobos prostáticos 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).

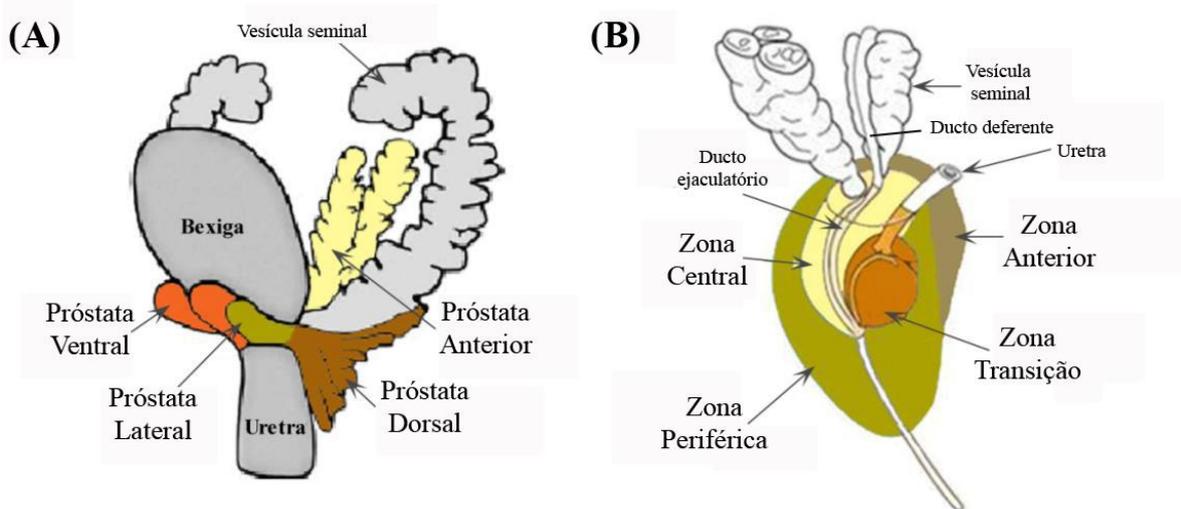


Figura 1: Representação esquemática da organização da próstata de roedores (A) e da próstata humana (B) em torno da uretra. Adaptado de Cunha et al, 1987.

- *Humanos*

Em humanos, a próstata é uma glândula ímpar e bem individualizada, sendo constituída por quatro regiões organizadas concentricamente em torno da uretra, denominadas: zona de transição, zona central, zona periférica e zona anterior, essa última sendo aglandular e de constituição puramente fibromuscular (McNeal, 1988; Lacsco et al, 2005) (Fig. 1B). Essas zonas se distinguem não só pela organização e morfofisiologia, mas também pela significância patológica, uma vez que a zona de transição é o principal local de origem de hiperplasia prostática benigna (HPB), enquanto a zona periférica é o local de origem da maioria dos adenocarcinomas (McNeal, 1988; Shappel et al, 2004).

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 arredondados, circundados por um estroma fibromuscular frouxamente organizado (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 próstata, também conhecida como HBP (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 central constitui cerca de 20% do volume da glândula, circundando os ductos ejaculatórios (Shappel et al, 2004) (Fig. 1B). Caracteriza-se morfológicamente por ácinos grandes com superfície luminal irregular e separados por 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 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) (Fig. 1B). Nesta região, as glândulas assemelham-se morfológicamente com as da zona de transição. A maioria dos adenocarcinomas de próstata surge nessa região, de forma que as amostras para biópsias de próstata são retiradas da mesma (McNeal, 1988; Risbridger & Taylor, 2006).

2. REGULAÇÃO HORMONAL DA PRÓSTATA

A morfofisiologia da próstata é influenciada tanto por andrógenos como por estrógenos, hormônios esteroides provenientes da circulação sanguínea e/ou produzidos localmente, utilizando precursores provenientes tanto dos testículos quanto do córtex da glândula adrenal (Labrie et al, 2000; Risbridger et al, 2001). A biossíntese dos hormônios esteroides ocorre a partir do colesterol, que é transformado através de uma série de reações que envolvem hidroxilação, desidrogenação, oxirredução e aromatização, produzindo compostos hidrofóbicos biologicamente ativos, como os mineralocorticoides, glicocorticoides e hormônios sexuais (andrógenos, estrógenos e progestógenos).

De forma resumida, o colesterol é transferido para a mitocôndria, onde ocorre a quebra de sua cadeia lateral, resultando na formação da pregnenolona, que se difunde desta organela para sofrer novas modificações no retículo endoplasmático agranular. Em roedores, no sentido da via esteroideogênica direcionada à formação dos hormônios sexuais, a pregnenolona é convertida em progesterona, que após metabolizações é transformada em androstenediona (Payne & Youngblood, 1995). Em outros animais como primatas, cães, coelhos e suínos, a pregnenolona é convertida em hidroxipregnenolona e desta para deidroepiandrosterona (DHEA), antes da formação de androstenediona (Stocco & McPhaul, 2006). Em ambos os casos, esta via dará origem aos hormônios sexuais de caráter androgênico e/ou estrogênico (Simpson et al, 1994; Carreau et al, 1999) (Fig. 2). As principais enzimas envolvidas nestas sínteses estão especificadas na Figura 2.

A partir da androstenediona ocorre formação de testosterona, principal molécula androgênica circulante nos machos. As células de Leydig nos testículos são as principais responsáveis pela biossíntese de testosterona, sob o estímulo do hormônio luteinizante (LH), que por sua vez é produzido por células gonadotróficas da parte distal da adenohipófise (Sundaram & Kumar, 1996). Aproximadamente 2% da testosterona circulante se encontra livre no plasma, enquanto sua maior proporção está conjugada a proteínas séricas como a SHBG (*sex hormone-binding globulin*), albumina e globulina (Ho & Habid, 2011). A glândula adrenal, especialmente a zona reticular, também contribui com aproximadamente 5-10% dos andrógenos séricos, com a produção de androstenediona e, principalmente, DHEA (Aumüller, 1989), sob o estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), também produzido pela adenohipófise. Os

andrógenos produzidos nas adrenais podem ser metabolizados em tecidos alvo, como a próstata, levando a formação de testosterona.

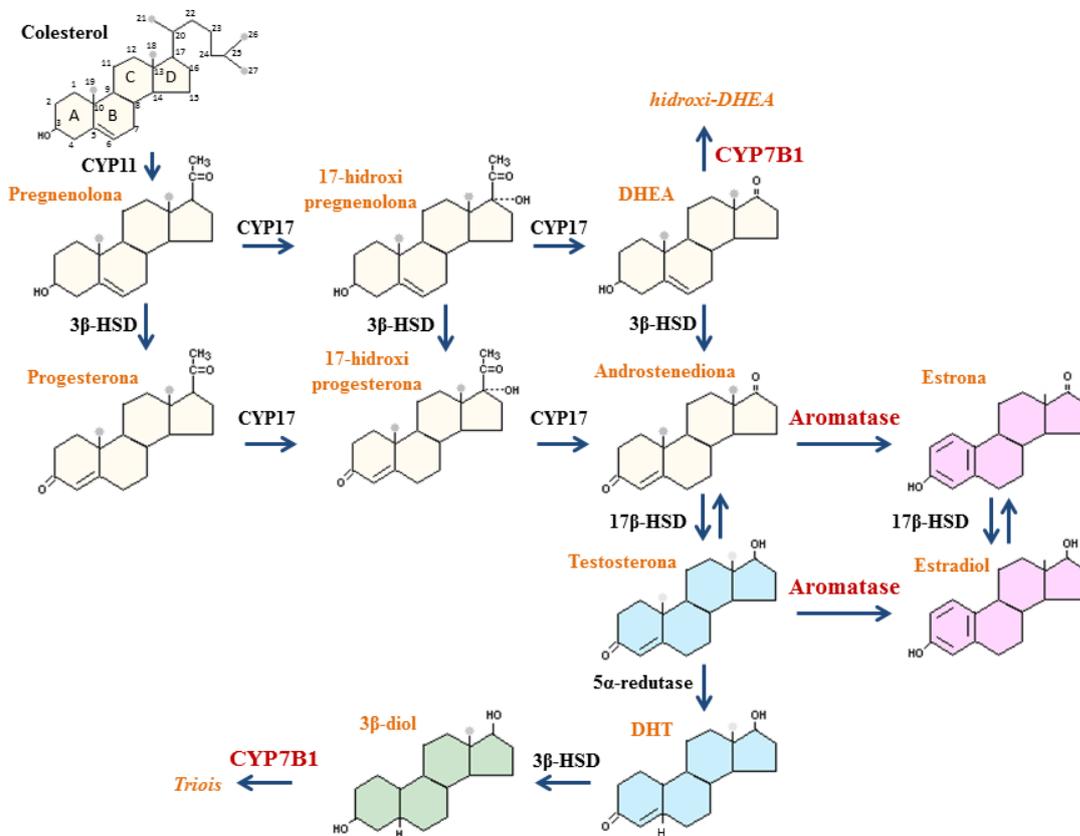


Figura 2: Representação esquemática das principais vias esteroidogênicas direcionadas à formação de hormônios sexuais. 3β-HSD e 17β-HSD = 3β e 17β hidroxisteroide desidrogenase; DHEA = deidroepiandrosterona; DHT = diidrotestosterona; † = grupo metil. Baseado de Bowen, 2001.

Em diversos órgãos genitais, incluindo a próstata, a testosterona pode ser metabolizada, pela enzima 5α-redutase em diidrotestosterona (DHT), que é o principal andrógeno local (Fig. 2) (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 (Grossmann et al, 2001; Penning et al, 2007). Na ausência do ligante, o AR localiza-se no citoplasma associado à chaperonas, sendo que a ativação pela testosterona ou DHT promove sua dimerização e translocação para o núcleo, onde em conjunto com a maquinaria transcricional celular,

promove a regulação de genes alvos (Beato & Klug, 2000). A DHT é um andrógeno mais potente, apresentando afinidade até dez vezes maior aos AR, comparado ao seu precursor, 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 a partir do seio urogenital, enquanto que na puberdade, este hormônio é fundamental para estimular o crescimento da próstata e induzir e manter sua atividade secretora em animais adultos (Cunha et al, 1992; Russel & Wilson, 1994). A dependência da próstata pelos andrógenos é facilmente demonstrada por experimento de castração química e/ou cirúrgica em ratos, procedimento que resulta em rápida involução da glândula, devido à redução dos níveis de andrógenos com consequente redução da ativação dos AR (Kiplesund et al, 1988; Prins & Birch, 1993; Oliveira et al, 2007). O mesmo ocorre quando há inibição da atividade da enzima 5α -redutase, onde ocorrem efeitos semelhantes aos observados na castração (Imperato-McGinley et al, 1992).

Embora a próstata seja um clássico órgão andrógeno-dependente, numerosos estudos experimentais e epidemiológicos têm revelado a participação relevante dos estrógenos nos processos de diferenciação e crescimento da glândula, bem como em suas desordens patológicas (Prins et al, 1993; Prins et al, 2001; McPherson et al, 2007). O principal estrógeno obtido da metabolização da testosterona é o 17β -estradiol (E2), conversão essa que ocorre pela ação da enzima aromatase.

Na via metabólica dos andrógenos na próstata, existe ainda uma rota alternativa de metabolismo, onde a DHT é transformada em 3β -diol (5α -androstane- 3β - 17β -diol), através da ação da enzima 3β -hidroxiesteroide desidrogenase (3β -HSD) (Steckelbroeck et al, 2004) (Fig. 2). O 3β -diol por sua vez é metabolizado e inativado por ação da enzima oxiesteroide 7α -hidroxilase (CYP7B1), que resulta na formação de compostos hidrossolúveis inativos que são excretados da próstata. Dentre estes compostos, 6α - e 7α -triois somam mais de 80% dos metabolitos formados a partir de 3β -diol (Sundin et al, 1987).

É importante destacar que o epitélio prostático dispõe de maquinaria enzimática essencial para produção dos diversos esteroides que a regulam, incluindo testosterona, DHT, estradiol e 3β -diol, a partir de precursores provenientes dos testículos e da adrenal

(Labrie, 1991; El-Alfy et al, 1999; Labrie et al, 2000). Esta condição permite que a próstata possua regulação hormonal autônoma, ajustando a formação e o metabolismo dos hormônios sexuais de acordo com seus requerimentos locais (Labrie et al, 2000). Os hormônios ativos produzidos localmente irão exercer seus efeitos nas próprias células que promoveram esta síntese e/ou em células vizinhas, de forma que dificilmente alcançarão o espaço extracelular e, conseqüentemente, a corrente sanguínea (Fig. 3). Este importante mecanismo que a próstata e outros tecidos possuem é conhecido como intracrinologia (Labrie et al, 1988).

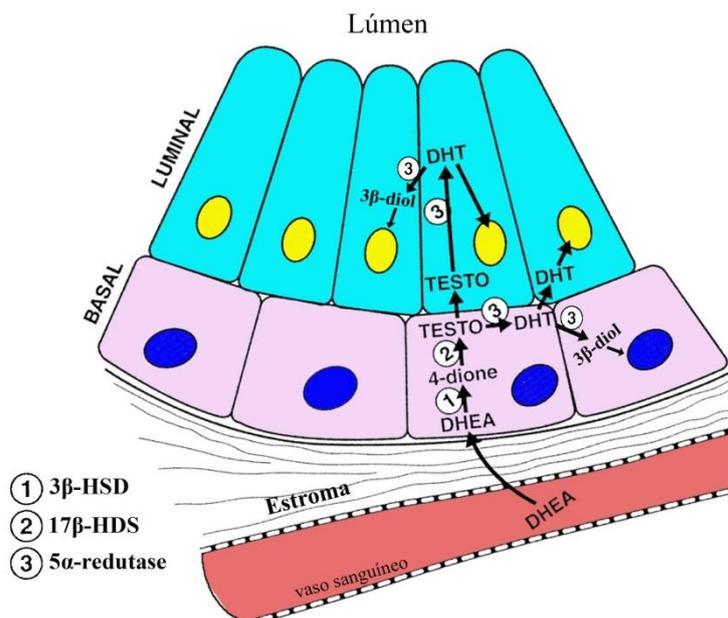


Figura 3: Representação esquemática da formação intracrina dos principais hormônios ativos na próstata humana (DHT e 3β-diol). DHEA = deidroepiandrosterona; Andros = androstenediona; Testo = testosterona; DHT = diidrotestosterona; 3β e 17β-HSD = 3β e 17β-hidroxiesteroide-desidrogenase. Adaptado e modificado de Labrie et al, 2000.

Por serem temas do presente estudo, destacaremos a seguir as enzimas aromatase e CYP7B1, que fazem parte da maquinaria enzimática da próstata, bem como seus respectivos produtos (estrógenos) e alvo (3β-diol).

3. A ENZIMA AROMATASE

A síntese irreversível de estrógenos a partir de andrógenos é catalisada pela aromatase, enzima que pertence à superfamília do citocromo P450. Esta superfamília codifica várias enzimas que participam de diversos processos metabólicos vitais, dentre eles os dos hormônios esteroides, ácidos biliares e vitaminas, além do metabolismo de

drogas (Gonzalez, 1990). As enzimas P450 compartilham três características em comum: (1) são proteínas intrínsecas de membrana; (2) utilizam redutores de NADPH (e algumas vezes NADH) e átomos de oxigênio atmosférico para oxigenação de substratos e (3) possuem em sua porção carboxi-terminal uma região de ligação ao ferro, por isso, também denominadas heme proteínas (Gonzalez, 1990). A sigla CYP (de *cytochrome* P450) normalmente é usada como prefixo da terminologia e a família, designada de acordo com a atividade hidroxilase na posição do carbono da molécula (Nebert et al, 1989; Nelson et al, 1993).

A enzima aromatase promove a perda do grupo metil presente no carbono 19 de seus substratos androgênicos, o que levou a sua designação de CYP19. Esta perda promove uma série de reações que resulta na aromatização do anel esteroide A, formando o anel fenólico característico das moléculas estrogênicas (Akhtar et al, 1982; Simpson et al, 1992; Simpson & Davis, 2001).

O gene *CYP19*, localizado no cromossomo 15 e 8 de humanos e ratos, respectivamente, é composto por 10 exons dos quais 9 são traduzidos (exons II a X) (Sebastian & Bulun, 2001). Este gene possui comprimento total de 123 kb, sendo que a região codificadora possui cerca de 30 kb. Os outros 93 kb restantes correspondem ao exon I, que possui 8 diferentes promotores (Fig. 4). Em cada tecido a tradução do gene inicia-se em um promotor específico do exon I, o que resulta em diferentes regiões 5'UTR (*untranslated region*). Este transcrito sofre *splicing* em uma região em comum, imediatamente antes do códon de iniciação, que resulta em um transcrito final que será traduzido em uma mesma proteína nos diversos tecidos (Sebastian & Bulun, 2001; Simpson et al, 2002). Neste sentido, a regulação da expressão de *CYP19* é tecido-específico pelo uso alternativo de múltiplos promotores, fazendo com que o mecanismo regulador da biossíntese de estrógenos em cada tecido seja única (Simpson et al, 2002) (Fig. 4). A proteína traduzida é composta de 503 aminoácidos de massa molecular de aproximadamente 55 kDa (Nitta et al, 1993; Levallet et al, 1998; Carreau et al, 2001), e possui localização citoplasmática, especificamente no retículo endoplasmático agranular, assim como a maioria das CYP.

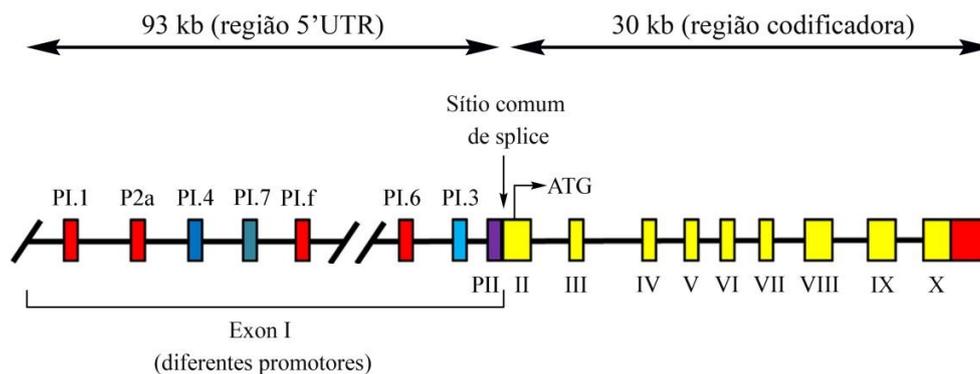


Figure 4: Representação esquemática do gene *CYP19*. Exon I representado com seus diferentes promotores (PI.I a PII) que possuem regulação tecido-específico. Região 5'UTG = região não codificadora. Modificado de To et al, 2014 e baseado de Simpson et al, 2002.

Diferentes compostos estrogênicos são produzidos no organismo, sendo que a formação de determinada molécula está relacionada com o substrato androgênico disponível no tecido para ação de aromatase. Nesse sentido, testosterona, androstenediona e 16 α -hidroxiandrostenediona são substratos de aromatase para formação de 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) (Fig. 2) e estriol (E3), respectivamente (Means et al, 1989; Simpson et al, 1997).

Aromatase já foi detectada em diversos tecidos como gônadas masculinas e femininas, cérebro, ossos, tecido adiposo, muscular e fígado fetal (Nitta et al, 1993; Nawata et al, 1995; Simpson et al, 1997; Wagner & Morrell, 1997; O'Donnell et al, 2001; Carreau et al, 2002). Os estrógenos nestes locais desempenham importante papel na diferenciação sexual durante o desenvolvimento, na reprodução, comportamento sexual e processos metabólicos minerais, tais como manutenção da mineralização dos ossos (Carani et al, 1997; Honda et al, 1998; Simpson et al, 1999; Carreau, 2001). O tecido adiposo, principalmente o abdominal, é também considerado uma importante fonte de estrógenos circulantes nos homens (Sundaram & Kumar, 1996) e a principal fonte em mulheres pós-menopausa (Simpson et al, 1997).

No sistema genital masculino, aromatase está presente principalmente nos testículos, sendo que em roedores sua localização celular é idade-dependente (Papadopoulos et al, 1986; Carreau et al, 1999). Nestes animais, a aromatase é detectada nas células de Sertoli de animais imaturos (Papadopoulos et al, 1986, Carreau et al, 1999, Carreau et al, 2002) e em células de Leydig e células espermatogênicas, incluindo os

espermatozoides que passam pelas vias espermáticas, em animais adultos (Nitta et al, 1993, Janulis et al, 1996 e 1998; Levallet et al, 1998, Lambard et al, 2004). Desta 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).

As informações sobre a enzima aromatase na próstata são bastante controversas. Tanto a proteína quanto o RNAm já foram detectados na hiperplasia prostática e no tecido maligno (Matzkin & Soloway 1992; Tsugaya et al, 1996; Hiramatsu et al, 1997; Ellem et al, 2004, Takase et al, 2006), assim como em linhagens de células tumorais prostáticas (Block et al, 1996; Ellem et al, 2004; Ho et al, 2008). Ademais, estudos mais antigos obtiveram sucesso em detectar atividade enzimática de aromatase em homogenatos prostáticos de tecido normal e hiperplásico (Stone et al, 1986; Kaburagi et al, 1987). Entretanto, outros estudos não foram capazes de detectar expressão e/ou atividade de aromatase no tecido (Smith et al, 1982; Voight et al, 1986; Brodie et al, 1989) e em linhagens benignas (Ellem et al, 2004) e tumorais de células prostáticas (Negri-Cesi et al, 1998, Machioka et al, 2015).

As diferenças sobre os dados relacionados à aromatase na próstata vão além de sua presença ou não no tecido. Outra disparidade acerca da expressão da enzima está relacionada com sua localização tecidual. Alguns estudos descrevem expressão proteica e de RNAm da enzima confinada ao estroma de tecido hiperplásico de humanos (Hiramatsu et al, 1997; Ellem et al, 2004; Ho et al, 2008) e estroma de morcegos (Begueline et al, 2015). Ainda, existem dados que indicam que a expressão de aromatase ocorre tanto no epitélio quanto no estroma em tecido normal e hiperplásico (Matzkin & Soloway 1992; Takase et al, 2006), enquanto que outros detectaram RNAm apenas no epitélio maligno (Ellem et al, 2004).

Os dados a respeito da expressão de aromatase na próstata de roedores são bastante escassos, sendo que já foi detectada atividade da enzima em homogenato (Marts et al, 1987) e expressão proteica e de RNAm especialmente no epitélio glandular (Castro et al, 2013).

4. A ENZIMA CYP7B1

A enzima CYP7B1 também pertence à superfamília do citocromo P450, sendo responsável pela hidroxilação principalmente do carbono 7 do anel B de esteroides e oxisteroides. O DNA complementar (DNAC) da enzima foi inicialmente isolado do hipocampo de ratos, sendo que seu gene *CYP7B1* está localizado no cromossomo 8 em humanos e no cromossomo 2 de ratos, e abrange seis exons separados por cinco introns (Stapleton et al, 1995). A tradução resulta em uma proteína com aproximadamente 506 aminoácidos, com peso molecular de cerca de 58 kDa e de localização citoplasmática (Wu et al, 1999; Lorbek et al, 2012).

A expressão de CYP7B1 é detectada no fígado, coração, cérebro, intestinos e rins, assim como em órgãos genitais como testículos, ovários e próstata (Rose et al, 1997; Wu et al, 1999; Tang et al, 2006). Devido sua abrangente expressão, CYP7B1 participa de vários processos fisiológicos, incluindo a homeostase do colesterol; regulação do sistema imune; regulação da memória, cognição e comportamento sexual; além da regulação da sinalização endócrina e crescimento celular (Rose et al, 1997; Wu et al, 1999; Weihua et al, 2002; Dulos et al, 2005; Tang & Norlin, 2006; Oyola et al, 2015). Dentre seus substratos estão a DHEA, a pregnenolona e o 3 β -diol, moléculas que após metabolização pela CYP7B1 são inativadas. O metabolismo destes hormônios mediado pela CYP7B1 promove regulação na sinalização esteroidogênica, indicando que esta enzima tem importante papel na regulação dos níveis e efeitos de andrógenos e estrógenos por todo organismo (Weihua et al, 2002; Omoto et al, 2005; Tang & Norlin, 2006; Pettersson et al, 2010; Lundqvist & Norlin, 2012).

Diferentemente de outras enzimas citocromo P450, a CYP7B1 possui maiores níveis de expressão no hipocampo e na próstata do que no fígado (Rose et al, 1997), indicando seu importante papel nestes órgãos. Antes mesmo de sua classificação como CYP7B1 e de sua clonagem a partir de DNAC de hipocampo, sua atividade hidroxilase já havia sido detectada na próstata de roedores (Sundin et al, 1987). Dentre os substratos de CYP7B1 está o 3 β -diol, presente em grande quantidade na próstata, sendo considerado o maior composto estrogênico no tecido (Weihua et al, 2002). A ação de CYP7B1 neste substrato resulta na formação de compostos hidrossolúveis que serão excretados da glândula (Sundin et al, 1987). Há ampla expressão de RNAm de CYP7B1 no epitélio prostático de roedores e humanos, enquanto que no estroma sua expressão é menos significativa (Martin et al, 2001 e 2004; Olsson et al, 2007).

Indícios apontam que CYP7B1 atua como um importante elemento regulador do crescimento prostático, fenômeno altamente regulado por fatores hormonais. Foi demonstrado que camundongos com inativação da enzima (*CYP7B1*^{-/-}) apresentaram próstata hipoproliferativa, resultante da elevação nos níveis de 3 β -diol indicando os efeitos pró-apoptóticos deste hormônio agindo via receptor de estrógeno β (ER β) (Weihua et al, 2002). Também, células prostáticas em atividade proliferativa co-expressam elevados níveis de CYP7B1 (Weihua et al, 2002), além de sua super-expressão estar associada com casos de adenocarcinoma (Olsson et al, 2007). Estes fatos reforçam o importante papel de CYP7B1 atuando como regulador das respostas mediadas pela via 3 β -diol/ER β , influenciando os níveis de 3 β -diol.

5. ESTEROIDES ESTROGÊNICOS NA PRÓSTATA

Embora a produção local de estrógenos via aromatase ainda seja controversa, a próstata é um alvo de estrógenos por via direta e indireta. As ações indiretas dos estrógenos na próstata ocorrem afetando o eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Os estrógenos exercem *feedback* negativo no hipotálamo, resultando na inibição da liberação de LH e consequentemente reduzindo os níveis de andrógenos (Jarred et al, 2000), o que afeta a histofisiologia prostática. Adicionalmente a esta ação indireta, vários trabalhos demonstram os efeitos diretos que os estrógenos podem promover na próstata, através da ativação de seus receptores específicos, os ER α (ESR1) e os ER β (ESR2). Os ER α se expressam em algumas células do estroma (Kuiper et al, 1996; Makela et al, 2000), enquanto os ER β se expressam intensamente no epitélio glandular, além de algumas células do estroma (Horvath et al, 2001; Pelletier, 2008), indicando que ambos compartimentos podem ser alvo desse esteroide.

Apesar dos baixos níveis de estrógenos circulantes durante a vida adulta, existem dois momentos onde os homens são expostos a altos níveis de estrógenos circulantes: durante o desenvolvimento embrionário e durante o envelhecimento (Prins & Korach, 2008), o que aumenta a proporção de estrógenos/andrógenos. Durante o desenvolvimento, ocorre uma natural exposição aos estrógenos de procedência materna, processo denominado de estrogenização. Esta exposição estimula proliferação celular, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas camadas de células epiteliais, conhecida como metaplasia escamosa. Esta proliferação aberrante regride imediatamente após o nascimento, concomitantemente com o declínio dos níveis de estrógenos (Prins &

Korach, 2008). Ainda não está claro se esta estrogênização fisiológica durante o desenvolvimento pode estar relacionada com o aparecimento das desordens prostáticas durante o envelhecimento. Porém, várias evidências indicam que a exposição excessiva a estrógenos exógenos durante este período promove um mecanismo denominado de “*imprinting*” hormonal, o que está relacionado mais tarde na vida com as patologias prostáticas, incluindo inflamação crônica, neoplasia intraepitelial e aumento da susceptibilidade a carcinogênese (Prins et al, 2001; Prins et al, 2007; Prins & Korach, 2008; Ellem & Risbridger, 2009).

Durante o envelhecimento, o cenário hormonal da próstata se modifica pela segunda vez devido à redução dos níveis androgênicos, enquanto que os níveis de estrógenos não se alteram ou aumentam (Krieg et al, 1993; Banerjee et al, 2001). Essa modificação hormonal promove um novo aumento da proporção estrógenos/andrógenos, o que pode predispor ao aparecimento das afecções prostáticas comuns na velhice, especialmente a hiperplasia prostática benigna e os adenocarcinomas.

A presença de altos níveis de ER β na próstata é intrigante, considerando que a concentração prostática de estradiol é baixa (0.1 pmol/g) (Voigt & Bartsch, 1986), o que levou à especulação de que o estradiol poderia não ser a principal molécula estrogênica a atuar no tecido (Weihua et al, 2001). Como mencionado anteriormente, na via metabólica dos andrógenos existe uma via alternativa de metabolização da DHT para 3 β -diol (Steckelbroeck et al, 2004) (Fig. 2). Diferente dos demais andrógenos, o 3 β -diol não se liga aos receptores de andrógenos, mas sim aos receptores de estrógenos, especialmente do subtipo ER β , que são abundantes na próstata (Kuiper et al, 1997; Pak et al, 2005). Ainda, a concentração prostática de 3 β -diol (10 pmol/g) é cerca de 100 vezes mais alta que a de estradiol (Voigt & Bartsch, 1986), reforçando a possibilidade de que esse metabólito da DHT seja o ligante alternativo de ER β no local.

O 3 β -diol possui capacidade de estimular a atividade de transcrição induzida por ER β de forma similar ou até maior que a do ligante clássico estradiol (Pak et al, 2005; Sneddon et al, 2005). Ainda, diversos estudos demonstram que 3 β -diol possui atividade estrogênica intrínseca, participando de várias funções biológicas (Morali et al, 1994; Weihua et al, 2002; Aspinall et al, 2004; Imamov et al, 2004; Sneddon et al, 2005; Picciarelli-Lima et al, 2006; Oliveira et al, 2007; Hiroi et al, 2013). Dentre estes papéis, nossa equipe mostrou que 3 β -diol é o mais potente indutor da expressão de ER β na próstata, enquanto DHT é mais efetivo na modulação de AR. Por outro lado, os efeitos

do estradiol na expressão de ER β e AR foram inexpressivos (Oliveira et al, 2007). Outras evidências também sugerem que a expressão de ER β na próstata não seja estrógeno-sensível (Prins et al, 2001). Outros papéis fisiológicos de 3 β -diol na próstata, agindo via ER β , destacam-se processos importantes como participação na modulação da proliferação, morte e diferenciação celular (Weihua et al, 2002; Imamov et al, 2004; Dondi et al, 2010; Mak et al, 2010; Dey et al, 2013; Colciago et al, 2014), bem como inibição da migração de células metastáticas (Guerini et al, 2005; Dondi et al, 2010), mantendo o fenótipo epitelial e reprimindo o caráter mesenquimal das mesmas (Mak et al, 2010). Ainda, um estudo comparativo entre agonistas sintéticos e 3 β -diol, mostrou que o ligante natural de ER β é o mais efetivo em promover atividade anti-proliferativa *in vitro*, com eficácia persistente ao longo do tempo de exposição (Colciago et al, 2014).

6. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Os estrógenos agem através de ligação aos receptores de estrógenos (ER), sendo que até o momento são descritos dois subtipos, os ER α (ESR1) e os ER β (ESR2) (Kuiper et al, 1996). Estes clássicos receptores estão relacionados com a via de resposta genômica, caracterizada por regulações na transcrição gênica que pode durar de horas a dias. Adicionalmente, vem aumentando o número de evidências que demonstram que os estrógenos também participam de eventos de sinalização rápida de estimulação celular que ocorre dentro de segundos a minutos, através de sua ligação a um receptor de estrógeno não genômico, pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G, denominado GPR30 ou GPER-1. GPR30 está localizado predominantemente no retículo endoplasmático e possui alta afinidade e baixa capacidade de se ligar aos estrógenos, sendo estruturalmente diferente dos ERs nucleares (Revankar et al, 2005; Prossnitz et al, 2008; Otto et al, 2008). No presente trabalho serão destacados apenas os receptores clássicos da via genômica (ER α e ER β), por serem alvos do estudo.

Os ER clássicos são fatores de transcrição dependentes de ligantes, que 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 quando ativados pelo hormônio específico, modulam a transcrição gênica, ao se ligarem em curtas sequências de DNA dos genes alvos, que no caso dos ER são denominadas elementos responsivos a estrógenos (ERE) (Parker et al, 1993; White & Parker, 1998).

Os ER foram clonados pela primeira vez em 1986, a partir de DNAc de células cancerígenas de mama (Green et al, 1986; Enmark & Gustafsson, 1999), mas sítios de ligação específicos para estrógenos já haviam sido identificados desde 1958. Dez anos mais tarde, em 1996, foi clonado de DNAc da próstata de rato um segundo tipo de ER, de forma que o primeiro receptor identificado foi renomeado ER α , e o segundo denominado ER β (Kuiper et al, 1996).

Apesar da homologia existente entre os ER, eles não são subtipos um do outro. O gene *ESR1*, codificador de ER α , está localizado no cromossomo 6 em humanos e no cromossomo 1 de ratos, enquanto que o gene *ESR2*, que codifica ER β , está localizado no cromossomo 14 e 6 de humanos e ratos, respectivamente (Enmark et al, 1997; Matthews & Gustafsson, 2003). A transcrição destes genes origina um RNAm composto por nove exons, que após tradução resulta em uma proteína com cerca de 595 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 66 kDa para ER α (Greene et al, 1986), enquanto que ER β 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).

A estrutura molecular proteica dos ER compreende 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. 5) (Weatherman et al, 1999; Beato & Klug, 2000).



Figura 5: Representação esquemática comparativa da estrutura proteica de ER α e ER β . Domínios funcionais: A/B (NTD), C (DBD), D (região de dobradiça), E (LBD) e F. Modificado de Matthews and Gustafsson, 2003.

O domínio amino-terminal NTD (regiões A/B) é a região menos conservada entre os receptores nucleares em geral, apresentando apenas cerca de 24% de homologia entre ER α e ER β (Fig. 5) (Pettersson & Gustafsson, 2001; Prins & Korach, 2008). Este domínio 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).

O domínio DBD é a região mais conservada entre os receptores nucleares, apresentando mais de 98% de homologia entre ER α e ER β (Fig. 5) (Pettersson & Gustafsson, 2001; Prins & Korach, 2008). Este domínio é responsável pelo reconhecimento de regiões específicas do DNA, chamadas de elementos responsivos a estrógenos (ERE), além de estar envolvido com a dimerização do receptor e da estabilização do complexo DNA/receptor (Weatherman et al, 1999; Beato & Klug, 2000).

A região de dobradiça, domínio D, confere flexibilidade ao receptor, essencial para os processos de dimerização e interação específica da região DBD ao DNA. Além disso, esta região possui o sinal de localização nuclear, juntamente com a região DBD, implicando na participação destes domínios na translocação do receptor para o núcleo (Beato & Klug, 2000).

O domínio LBD é responsável pela interação específica entre o receptor e seu ligante e com as chaperonas na ausência do ligante (Beato & Klug, 2000). Após o acoplamento do ligante, este domínio promove mudanças conformacionais do receptor, ocorrendo, dissociação do complexo de chaperonas, estabilização do complexo receptor/ligante, dimerização, e consequentemente, aumento da afinidade pelo DNA (Beato e Klug, 2000). Adicionalmente, a região também está envolvida no recrutamento de moléculas corre reguladores durante a ativação transcricional (Beato & Klug, 2000; Pettersson & Gustafsson, 2001). Apesar da homologia de apenas 54%, os estrógenos endógenos (estradiol, estrona, estriol) interagem com os dois receptores ER α e ER β , com similar afinidade, apesar de alguns fitoestrógenos como genisteína e cumestrol se ligarem aos ER β com maior afinidade comparado ao ER α (Kuiper et al, 1998; Morito et al, 2001; Mahmoud et al, 2015).

O domínio F, localizado na extremidade carboxi-terminal da molécula, é relativamente pequeno comparado aos outros domínios. A baixa homologia desta região entre ER α e ER β indica que este domínio esteja envolvido nas diferentes funções biológicas entre estes dois receptores. Estudos indicam sua participação na modulação da ligação do ligante, no recrutamento de proteínas correguladoras e na atividade transcricional do receptor (Prins & Korach, 2008; Skafar et al, 2008).

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). Quando não ativados pelos ligantes, os ER estão uniformemente distribuídos em fraca interação com a matriz nuclear, associados a um grande complexo multiproteico de chaperonas, impedindo sua ação (Knoblauch & Garabedian, 1999). Além de manter os receptores inativos, esse complexo auxilia o correto dobramento da molécula além de protegê-la da degradação por nucleases (Knoblauch & Garabedian, 1999). Quando ativados pelo ligante, ocorrem mudanças conformacionais da molécula promovendo dissociação das chaperonas, 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, ocorre dinâmica movimentação nucleocitoplasmática dos ER, por um processo dependente de energia (Guiochon-Mantel et al, 1991; Htun et al, 1999).

Após a descoberta de ER β , 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). Estas isoformas são denominadas cronologicamente de 1 a 5, para distinção do receptor clássico, também chamado de ER β 1, sendo que as descrições feitas anteriormente são referentes a ER β 1. Em roedores, ER β 2 foi identificado contendo inserção de 18 aminoácidos na região LBD, enquanto que em humano (também nomeado ER β cx) constatou-se a deleção de 61 aminoácidos na região carboxiterminal (Maruyama et al, 1998; Saunders et al, 2002; Scobie et al, 2002). ER β 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 β 4 e ER β 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 β 1). Há evidências de que essas variantes podem formar heterodímeros com ER β 1 e ER α , de forma a modular negativamente estes receptores (Maruyama et al, 1998; Scobie et al, 2002). Além disso, dados na literatura apontam que ER β 2 e 5 estão relacionados com mal prognóstico de câncer de próstata e também de ovário, uma vez que estas isoformas estão associadas com aumento da taxa de migração e invasão celular (Leung et al, 2010; Ciucci et al, 2014; Dey et al, 2012 e 2015). As descrições a seguir referem-se a ER β 1, que representaremos apenas como ER β .

7. DISTRIBUIÇÃO E FUNÇÕES DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS NA PRÓSTATA DE ROEDORES

Os dois subtipos de receptores de estrógenos estão presentes na próstata, porém com diferenças quanto à intensidade de expressão e distribuição dos mesmos (Makela et al, 2000; Imamov et al, 2004; Prins & Korach, 2008). ER α 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 α é reduzida, enquanto que ER β começa a se tornar o principal ER no órgão (Omoto et al, 2005). Na glândula sexualmente madura, o epitélio deixa de expressar ER α , que passa a se expressar apenas em algumas células do 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 β é baixa, porém aumenta progressivamente na medida em que as células epiteliais se diferenciam e atinge 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, incluindo os de *knockouts* para ER α (α ERKO) e para ER β (β ERKO), algumas funções mediadas por esses receptores estão sendo elucidadas e indicam 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 α , visto que ele é o mediador da indução de metaplasia escamosa em animais β ERKO (que só expressam ER α), mas não em animais α ERKO (que só expressam ER β) (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). Adicionalmente, um papel pró-inflamatório também está associado a este receptor, visto que animais α ERKO expostos a estrógeno sintético não desenvolvem prostatite ao passo que animais β ERKO apresentam inflamação na próstata de forma semelhante aos animais selvagens (Prins et al, 2001).

Já o ER β tem propriedades anti-proliferativa, pró-apoptótica e, ainda, promove a diferenciação celular (Weihua et al, 2001; Weihua et al, 2002; Cheng et al, 2004; Imamov et al, 2004; McPherson et al, 2007; Pravettoni et al, 2007; McPherson et al, 2010; Dey et al, 2013; Yun et al, 2015). O papel antiproliferativo de ER β na próstata fica evidenciado em camundongos β 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 β explicam o fato de que uma dieta rica em fitoestrógenos esta associada com a diminuição do risco de câncer de próstata. Os fitoestrógenos são compostos naturais que mimetizam a atividade biológica dos estrógenos, os quais possuem maior afinidade aos ER β do que aos ER α (Kuiper et al, 1997; Weihua et al, 2001; Mahmoud et al, 2015).

8. CÂNCER DE PRÓSTATA, ENVELHECIMENTO E ER β

Além de sua importância para a fertilidade, a próstata também é acometida por doenças proliferativas, se tornando um problema crescente na área médica, visto que provoca grande impacto em termos de morbidade, mortalidade, além de gerar gastos dispendiosos, uma vez que a taxa de envelhecimento da população vem aumentando significativamente. Tendo em vista este cenário, a próstata tem despertado grande interesse médico-científico, uma vez que a hiperplasia benigna prostática (HBP) e o câncer de próstata ocorrem com grande frequência em homens com idade acima de 50 anos, sendo a HBP muitas vezes considerada como um processo fisiológico relativo à idade (Laczko et al, 2005; Begley et al, 2008).

O câncer de próstata mais frequente é o que acomete as células secretoras glandulares, por isso também chamado de adenocarcinoma prostático. Este é o tipo de câncer não-cutâneo mais frequente na população masculina brasileira de todas as regiões do país, além de constituir a segunda maior causa de morte por câncer no país

(INCA, 2014). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014), para o biênio 2014/2015, o número de novos casos de câncer de próstata estimados para o Brasil é de 68.800, com risco de 70,42 novos casos a cada 100 mil homens, superando a estimativa para o câncer de mama, que é de 57.120 novos casos, neste mesmo período. No mundo, essa patologia configura igualmente o segundo tipo de câncer de maior incidência em homens (American Cancer Society, 2013). O câncer de próstata possui desenvolvimento lento, levando 25 anos ou mais para se desenvolver de uma lesão focal para um fenótipo maligno (Prezioso et al, 2007).

A idade é um fator de risco com significado especial para o câncer da próstata, uma vez que esta patologia é rara antes dos 40 anos, ao passo que a partir dos 50 anos as chances do surgimento da patologia aumentam rapidamente e por fim, aproximadamente 62% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem a partir dos 65 anos de idade (INCA, 2014; American Cancer Society, 2013). Adicionalmente, com o aumento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de casos novos de câncer de próstata aumente cerca de 60% até o ano de 2015. 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 manutenção ou aumento dos níveis de estrógenos aumentando a proporção de estrógeno/andrógeno séricos (Krieg et al, 1993; Banerjee et al, 1998; Ellem & Risbridger, 2010). Vale ressaltar que os níveis de estrógenos intraprostáticos, tanto absolutos quanto relativos à testosterona, também aumentam com a idade (Shibata et al, 2000).

Diversas evidências demonstram uma estreita relação entre o câncer de próstata e ER β , uma vez que foi percebida uma tendência de diminuição da expressão deste receptor com o desenvolvimento do adenocarcinoma prostático em humanos e cães (Horvarth et al, 2001; Leav et al, 2001; Pasquali et al, 2001; Grieco et al, 2006; Yang et al, 2007; Asgari & Morakabati, 2011; Muthusamy et al, 2011; Daniels et al, 2014; Grover et al, 2015). Mais impressionante ainda é o fato de que a reintrodução de ER β 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 β apresentam regressão mais rápida da doença e menor taxa de reincidência após a cura (Horvath et al, 2001).

É fato que os adenocarcinomas 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. Estudos 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 β (Kirschenbaum et al, 2006). Foi demonstrado que, nas células basais da próstata saudável a expressão de ER β é extremamente baixa na zona periférica e mais intensa na zona de transição (Kirschenbaum et al, 2006). Em contraste com ER β , 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 α 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 β 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 β 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 anticancerígeno atribuído aos ER β . Além disso, evidências obtidas a partir de transfecção viral de ER β 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 β pode agir como supressor de tumores na próstata.

II. JUSTIFICATIVA

II. JUSTIFICATIVA

Apesar das evidências de que ER β e 3 β -diol exercem importante papel tanto na fisiologia quanto nas patologias da próstata, e que existe íntima relação entre redução de ER β e crescimento anormal do tecido prostático comum na velhice, pouco se sabe sobre a ocorrência de variação idade-dependente na expressão de ER β e 3 β -diol na próstata. Este tem sido, portanto, foco de nossas investigações onde, inicialmente, detectamos que a expressão de ER β na próstata ventral de ratos em envelhecimento (3 a 24 meses) sofre alteração em regiões específicas, relacionadas com distúrbios proliferativos intraepiteliais e atrofia epitelial, enquanto que no tecido normal sua expressão não se altera (Morais-Santos, 2011). Essa redução seletiva de ER β é similar à redução associada ao desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais e adenocarcinomas em humanos e cães (Horvath et al, 2001; Pasquali et al, 2001; Grieco et al, 2006), apontando uma potencial desordem na via mediada por ER β .

É fato que a próstata ventral, apesar de ser afetada por alterações relacionadas ao envelhecimento, não possui homologia com nenhuma zona prostática humana. Diferentemente, considera-se que 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. Nesse contexto, fica clara a necessidade de se investigar a expressão de ER β nos demais lobos prostáticos de ratos em envelhecimento para um melhor entendimento do comportamento dessa importante proteína durante o envelhecimento. Ainda, uma investigação comparativa sobre os níveis de estradiol e 3 β -diol na próstata em envelhecimento seria importante para esclarecer se os efeitos observados na morfologia da glândula e nos níveis locais de ER β estão relacionados diretamente com o papel do ligante clássico estradiol, do ligante alternativo 3 β -diol ou de ambos.

Apesar da baixa expressão de ER α e de dados controversos sobre a expressão de aromatase na próstata sadia, evidências apontam participação destes componentes na carcinogênese prostática, onde os estrógenos, agindo via ER α , causam proliferação aberrante, inflamação e desenvolvimento de câncer (Risbridger et al, 2007; Ellem & Risbridger, 2010). Nesse sentido, avaliar o comportamento de aromatase e CYP7B1 no complexo prostático de ratos em diferentes idades, seria complementar às investigações sobre ER β , já que não existem dados na literatura que correlacionem componentes da

via metabólica de esteroides estrogênicos e os receptores de estrógenos ao longo do envelhecimento.

Por fim, devido aos possíveis efeitos benéficos de ER β e de seu ligante 3 β -diol, hipotetizamos que a exposição dos animais à esse esteroide em um período que antecede as drásticas alterações morfofuncionais da próstata em idosos (18 a 24 meses de idade), poderia ter efeito benéfico impedindo ou amenizando as alterações relacionadas ao envelhecimento. Dessa forma, seria pertinente correlacionar a histologia e a expressão de ER β no complexo prostático de ratos idosos, tratados ou não com 3 β -diol, a fim de esclarecer se este ligante alternativo seria capaz de reverter os processos patológicos encontrados no envelhecimento.

Nossa meta é elucidar o papel de estrógenos e 3 β -diol e seus receptores na regulação do sistema genital masculino, visando detectar potenciais alvos para o desenvolvimento de ferramentas para modulação de (in) fertilidade e controle de patologias relacionadas.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral elucidar se ocorrem alterações de componentes relacionados à via metabólica de esteroides estrogênicos e do receptor de estrógeno ER β no complexo prostático de ratos ao longo do envelhecimento, além de verificar se o tratamento com 3 β -diol poderia reverter as alterações prostáticas decorrentes da idade.

Os **objetivos específicos** incluem:

- a) Verificar possíveis alterações histopatológicas nos lobos dorsolaterais e anteriores da próstata de ratos em envelhecimento;
- b) Avaliar se a expressão proteica de ER β sofre alterações relacionadas com a idade nos lobos dorsolaterais e anteriores da próstata de ratos em envelhecimento;
- c) Caso sejam detectadas alterações na expressão proteica de ER β , possíveis diferenças nos níveis de RNAm de ER β serão avaliadas por RT-PCR;
- d) Avaliar o perfil de proliferação celular ao longo do envelhecimento, assim como realizar a dupla marcação de ER β e marcador de proliferação celular;
- e) Determinar se a expressão das enzimas aromatase e CYP7B1 sofrem alterações relacionadas com a idade no complexo prostático de ratos;
- f) Determinar a colocalização da enzima aromatase com marcador de células basais, citoqueratina de alto peso molecular (CKHMH);
- g) Determinar os níveis intraprostáticos e séricos de DHT e estradiol em ratos de diferentes idades;
- h) Investigar se o tratamento com 3 β -diol será capaz de reverter as alterações histopatológicas no complexo prostático que aparecem a partir de 12 meses de idade;
- i) Caso os resultados da reposição com 3 β -diol sejam positivos, será feita avaliação da expressão de ER β e o perfil de morte e proliferação celular comparando animais tratados e controle.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Aquisição dos Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos, com 3, 6, 12, 18 e 24 meses de idades (n = 10 por idade) ou de 14 e 17 meses de idade para tratamento de ratos senis com hormônio 3β -diol (n= 10 por grupo). Os ratos foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO) e mantidos em estantes ventiladas no biotério do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG. Os animais foram submetidos a ciclos de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro) e temperatura (22 °C) constantes e receberam água e ração peletizada *ad libitum*. Os procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (processo nº. 286/2008), seguiram o protocolo publicado pelo CETEA/UFMG (www.ufmg.br/coep/cetea.html).

2. Tratamento de ratos idosos com 3β -diol

Com objetivo de obter a dose ideal de 3β -diol para ratos senis por período prolongado de tratamento, foram realizados 3 tratamentos da seguinte maneira: (1) Ratos com idade inicial de 14 meses tratados com 3β -diol, dissolvido em óleo de milho, na dose de 1 e 3 mg/Kg/dia, durante 42 dias; (2) Ratos com idade inicial de 17 meses tratados com 3β -diol, dissolvido em DMSO, na dose de 5 mg/Kg/dia, durante 42 dias e (3) Ratos com idade de 17 meses tratados com 3β -diol, dissolvido em DMSO, na dose de 3 mg/Kg/dia, durante um período prolongado de 60 dias. O óleo de milho foi substituído pelo DMSO nos dois últimos tratamentos por solubilizar o hormônio de maneira mais efetiva. Para todos os tratamentos a via de administração foi subcutânea e os animais controles receberam apenas o respectivo veículo na dose calculada para o hormônio. As doses e períodos de tratamento basearam-se em estudos prévios que mostraram efeitos no sistema genital masculino (Weihua et al, 2001; Omoto et al, 2005; Picciarelli-Lima et al, 2006; Oliveira et al, 2007; McPherson et al, 2010). Após o último dia de tratamento os animais foram anestesiados e eutanasiados.

3. Preparação dos tecidos

Após atingirem as respectivas idades de interesse ou após o tratamento com 3 β -diol, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em concentração letal (pentobarbital sódico 50mg/Kg e cloridrato de quetamina 10mg/kg i.p.), precedido de heparinização. Imediatamente antes da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, para estudo dos níveis hormonais. Os animais destinados aos estudos morfológicos e imunohistoquímicos foram perfundidos por via intra-cardíaca, via ventrículo esquerdo, com solução de formalina neutra tamponada. Os lobos prostáticos foram devidamente dissecados, pesados e destinados à inclusão em parafina.

Para os ensaios de *Western blotting*, ELISA e RT-PCR, os animais foram perfundidos apenas com solução salina e em seguida, os órgãos de interesse dissecados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer (-80°C) até o processamento do tecido.

4. Histopatologia

As possíveis alterações morfológicas e/ou patológicas do complexo prostático de ratos de diferentes idades ou seguindo o tratamento com 3 β -diol foram investigadas a partir de preparados histológicos de rotina. Para essa finalidade, fragmentos dos diferentes lobos foram incluídos em resina glicolmetacrilato ou parafina para obtenção de secções de 3 ou 5 μ m de espessura, respectivamente. As lâminas resultantes foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio, PAS (ácido periódico-reativo de Schiff) contra-corado com hematoxilina, bem como com hematoxilina e eosina (HE).

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).

5. Imunohistoquímica

Foram investigadas por imunohistoquímica as seguintes proteínas nos respectivos lobos prostáticos em ratos de diferentes idades: ER β (VP, DP e AP), Aromatase (VP, DP, LP e AP), CYP7B1 (VP, DP, LP e AP), citoqueratina de alto peso molecular (CK HMW) (VP e DP) e marcador de proliferação celular MCM7 (*Minichromosome Maintenance 7*) (VP). Parte dos resultados de proliferação celular são provenientes da dissertação de Júnia D. M. Cordeiro, 2014. Para os animais senis submetidos a

diferentes regimes de tratamento com 3 β -diol foram investigados ER β (VP, DP e AP) e MCM7 (VP, DP, LP e AP).

Os fragmentos de tecido fixados em formalina e incluídos em parafina foram submetidos a protocolo previamente padronizado (Oliveira et al, 2007). Resumidamente, as secções obtidas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em séries decrescentes de etanol e incubadas em solução 0,6% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloqueio da peroxidase endógena. Os tecidos foram submetidos à recuperação antigênica, pelo aquecimento dos cortes em forno microondas, em solução de tampão citrato 0,1M pH 6,0. Em seguida, os cortes foram incubados em soro normal de cabra 10%, por 60 min, para bloqueio das ligações inespecíficas, seguido de incubação com anticorpos primários *overnight*, especificados na Tabela 1. Para os controles negativos, os cortes foram incubados em ausência dos anticorpos primários. Após lavagens, os cortes foram incubados com anticorpos secundários biotinizados (Tabela 1), durante 60 min, seguido de incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (*Horseradish Peroxidase Streptavidin - VectorLaboratories*, EUA) para ER β , ou complexo avidina-biotina-peroxidase (*Avidin/Biotin blocking kit, Vector Laboratories - EUA*) para os demais anticorpos, durante 45 min. A imunorreacção foi visualizada utilizando-se solução de diaminobenzidina 0,05%, contendo peróxido de hidrogênio 0,01% em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4 e interrompida por imersão em água destilada. Por fim, os cortes foram contracolorados em hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados para análise. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1: Relação dos anticorpos usados para os ensaios de imunohistoquímica.

Proteína Alvo	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
ER β	Mouse monoclonal anti-ER β (NCL-ER-beta) (Leica Biosystems, Alm) Diluição 1:25 em TBS	Polyclonal Goat anti-Mouse (Z0402) biotínulado (Dako, DK) Diluição 1:50 em TBS
Citoqueratina de alto peso molecular (CK HMW)	Mouse monoclonal Anti-CKHMW(34 β E12) (Dako, DK) Diluição 1:200 em PBS	Polyclonal Goat anti-Mouse (Z0402) biotínulado (Dako, DK) Diluição 1:100 em PBS
CYP7B1	Mouse monoclonal Anti-CYP7B1 (Sigma Aldrich, EUA) Diluição 1:300 em PBS	Polyclonal Goat anti-Mouse (Z0402) biotínulado (Dako, DK) Diluição 1:100 em PBS
Aromatase	Rabbit polyclonal Anti-Aromatase (A7981) (Sigma Aldrich, EUA) Diluição 1:1000 em PBS	Polyclonal Goat anti-Rabbit biotínulado (Dako, DK) Diluição 1:100 em PBS
MCM7	Mouse polyclonal Anti-MCM7 (Cell Signaling, EUA) Diluição 1:300 em PBS	Polyclonal Goat anti-Mouse biotínulado (Dako, DK) Diluição 1:100 em PBS

6. TUNEL

Foram realizados ensaios de TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*) para identificação de apoptose no complexo prostático de ratos Wistar senis submetidos a diferentes regimes de tratamento com 3 β -diol. Os ensaios foram conduzidos utilizando kit ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore Corporation, EUA) e os procedimentos técnicos realizados de acordo com as instruções do fabricante com pequenas modificações. Resumidamente, fragmentos de 5 μ m dos diferentes lobos prostáticos dos diferentes grupos experimentais (n = 3 por grupo), foram desparafinizados, hidratados e lavados em TBS. A reação imunohistoquímica foi precedida de recuperação antigênica dos tecidos, realizada pela incubação com Proteinase K (IHC SELECT® - Millipore Corporation, EUA), diluída 1:30 em Tris-HCl. Após lavagem, foi feito bloqueio da peroxidase endógena pela incubação dos fragmentos em solução de TBS/peróxido de hidrogênio 3%, em câmara escura. Em seguida os cortes foram incubados com enzima TdT diluída em 30% de tampão de reação, por uma hora, a 37°C. Os controles negativos foram incubados em tampão de equilíbrio em substituição a enzima TdT. Após incubação em tampão de parada, os tecidos foram lavados em TBS e incubados com anticorpo anti-digoxigenina conjugado

com peroxidase, seguido de revelação feita por adição do substrato contendo diaminobenzidina em tampão de diluição de DAB contendo peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 3 minutos por imersão em água destilada. Ao final os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados e montados para análise.

7. Análises quantitativas

Todos os valores obtidos das análises quantitativas foram plotados no programa GraphPad Prisma para construção dos gráficos.

a. Intensidade da expressão de ER β

A quantificação da imunomarcção de ER β na próstata ventral e dorsal foi feita segundo protocolo padronizado anteriormente (Oliveira et al, 2007). Para cada animal, foram adquiridas quatro fotografias de diferentes áreas da próstata no aumento de 40x. As imagens digitalizadas foram convertidas para escala de cinza e invertidas, e posteriormente exportadas para o programa Image J, para a quantificação. Em cada área de atrofia, hiperplasia, proliferação intraepitelial (PIN) ou epitélio normal, foi escolhido aleatoriamente um núcleo e dezenove núcleos consecutivos foram traçados e a intensidade média de pixels das áreas mensuradas, totalizando-se aproximadamente 480 núcleos mensurados por animal. Núcleos fora de foco não foram considerados. A área de *background* foi determinada traçando-se uma área não marcada adjacente. A intensidade de pixel final foi determinada subtraindo-se os valores de média de pixels detectados dos núcleos marcados da média de pixels da área de *background*. Os valores obtidos foram expressos em intensidade média de pixels por área nuclear.

b. Contagem de células MCM7 e TUNEL positivas

A quantificação da proliferação celular e apoptose dos animais tratados ou não com 3 β -diol, foi realizada através da contagem de células imunoreativas para MCM7 ou TUNEL. Com auxílio de uma gradícula acoplada ao microscópio (Nikon Eclipse E200), cinco áreas mais próximas à periferia do tecido foram escolhidas aleatoriamente na magnitude de 100x (totalizando 5 mm²). As células MCM7 e TUNEL positivas foram quantificadas, e os resultados representados como número de células positivas por mm².

c. Morfometria do diâmetro luminal e frequência de adenômeros atróficos e hiperplásico

As secções histológicas dos lobos prostáticos foram utilizadas para avaliar o diâmetro do lúmen dos adenômeros e a quantidade de adenômeros hiperplásicos ou atróficos nos animais tratados ou não com 3 β -diol. Estas análises foram realizadas utilizando-se microscópio de luz (Nikon Eclipse E200), na magnitude de 100x.

A medida de diâmetro foi realizada com auxílio de micrômetro acoplado à ocular do microscópio. Para cada animal, foi considerado o menor diâmetro de um adenômero em secção transversal, escolhido aleatoriamente na periferia do tecido, e outros 4 adenômeros consecutivos foram mensurados. Estes resultados foram expressos em micrômetros. A quantificação de adenômeros atróficos e hiperplásicos foi também realizada considerando-se um adenômero aleatório na periferia do tecido, e outros 4 adenômeros consecutivos foram verificados para determinar o aspecto dos mesmos. Estes resultados foram apresentados como número médio de adenômeros atróficos ou hiperplásicos por área.

8. Imunofluorescência e microscopia confocal

A fim de correlacionar a expressão de ER β com o perfil de proliferação celular foi realizada a técnica de imunofluorescência, com o objetivo de colocalizar ER β com marcador de proliferação celular Ki67. As secções da próstata ventral foram preparadas assim como descrito para imunohistoquímica. Após recuperação antigênica, os fragmentos foram permeabilizados com solução de TBS contendo triton X-100 0,5% (v/v) e lavadas em seguida com TBS. Os tecidos foram incubados com solução mix de bloqueio, contendo soro normal de cabra 5% e BSA/TBS 1% por 90 min, seguido de incubação *overnight* a 4 °C com solução mix de anticorpos primários anti-ER β e anti-Ki67, especificados na tabela 2. Após lavagens, as amostras foram incubadas com mix de anticorpos secundários (tabela 2), por 90 min, à temperatura ambiente.

Para a colocalização da enzima aromatase e marcador de células basais, amostras da próstata ventral, dorsal e lateral foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos anteriormente. Após bloqueio, os tecidos foram incubados *overnight* a 4 °C com solução mix de anticorpos primários anti-CKWMH e anti-Aromatase, seguido de incubação com mix de anticorpos secundários (tabela 2), por 90 min, à temperatura ambiente.

Para todos os ensaios, os controles negativos foram incubados na ausência de anticorpo primário e a marcação nuclear foi realizada com uso de 4,6-diamidino-2-phenylindole staining (DAPI - D1306, Life Technology, Carlsbad, EUA). As lâminas obtidas foram montadas em glicerol contendo Tris-HCl 0,1M na proporção (9:1) e seladas. Os fragmentos de tecidos foram analisados utilizando-se microscópio confocal C2 Eclipse Ti (Nikon, Japão) com filtros específicos para detecção da fluorescência para FITC (verde), Cy3 (vermelho) ou DAPI (azul). As imagens adquiridas foram sobrepostas utilizando-se software NIS Elements (Nikon, Japão) para observação da colocalização e exportadas para o programa ImageJ para processamento das imagens.

Tabela 2: Relação dos anticorpos usados para os ensaios de imunofluorescência.

Proteína Alvo	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
ER β	Monoclonal camundongo anti-ER β (NCL-ER-beta, Leica Biosystems) Diluição 1:25 TBS/BSA 1%	Policlonal cabra anti-camundongo conjugado CF555 (Sigma) Diluição 1:50 TBS/BSA 1%
Ki67	Policlonal coelho anti- Ki67 (ab15580, Abcam) Diluição 1:100 TBS/BSA 1%	Policlonal cabra anti-coelho conjugado FITC (F0382, Sigma) Diluição 1:100 TBS/BSA 1%
Citoqueratina de alto peso molecular (CKHMW)	Monoclonal camundongo Anti-CKHMW (34 β E12, Dako) Diluição 1:25 PBS/BSA 1%	Policlonal cabra anti-camundongo conjugado CF555 (Sigma) Diluição 1:100 PBS/BSA 1%
Aromatase	Policlonal coelho Anti-Aromatase (A7981, Sigma) Diluição 1:1000 PBS/BSA 1%	Policlonal cabra anti-coelho conjugado FITC (F0382, Sigma) Diluição 1:200 PBS/BSA 1%

9. Western blotting

Possíveis alterações nos níveis de expressão de ER β e aromatase nas próstatas de ratos em diferentes idades e tratados com 3 β -diol foram confirmadas por *Western blotting*. Amostras das próstatas congeladas (n= 5 por idade) foram maceradas em gelo seco e o tecido pulverizado (100 mg) foi homogeneizado em 300 μ L de tampão de ureia, contendo Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM pH 8,0 e inibidor de proteases (Sigma Aldrich, EUA). As proteínas extraídas foram dosadas pelo método de Bradford, utilizando-se albumina bovina fetal como padrão. Ao extrato total de proteínas (50 μ g)

foi adicionado tampão de amostra contendo sódio dodecil-sulfato 1%, Tris-HCl 30 mM pH 6,8, 2-mercaptoetanol (1x), glicerol 12% (v/v) e azul de bromofenol 0,1%. Após fervura por 5 min, as amostras foram submetidas à eletroforese contínua em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), juntamente com padrão de peso molecular de proteínas (PageRuler™, Thermo Scientific – EUA), seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com soro normal de cabra 10% durante 60 min, seguido de incubação com anticorpo primário anti-ER β (NCL - ER β , Leica Biosystems - Alm), diluído 1:500 em PBS e incubadas em câmara fria *overnight* sob agitação. Após lavagens em PBS-Tween 0,05%, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado cabra anti-camundongo (Dako - DK), diluído 1:1000 em PBS por 60 min, seguido de incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, EUA), por 30 min.

A detecção de aromatase foi feita apenas na próstata ventral de ratos em diferentes idades, onde foram obedecidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Após bloqueio da membrana de nitrocelulose com soro normal de cabra 10%, foi realizada incubação *overnight* com anticorpo primário policlonal coelho anti-aromatase (A7981, Sigma, EUA), diluído 1:1000, seguido de incubação com anticorpo secundário biotilado cabra anti-coelho (Dako - DK), diluído 1:1000 por 60 min, finalizando-se com incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, EUA) por 30 min.

Para todos os ensaios, a revelação das membranas adveio com adição de substrato contendo 0,1% de diaminobenzidina, 0,05% de cloronaftol e 0,04% de H₂O₂ em PBS e interrompida pela adição de água destilada após aparecimento das bandas. β -actina foi usada como controle interno. Para complementar os dados qualitativos, realizou-se estimativa quantitativa da intensidade das bandas obtidas através de imagem assistida por computador (Oliveira et al, 2007).

10. RT-PCR

Foi extraído da próstata ventral e dorsal (n = 5 por idade) o RNA total utilizando-se reagente TRIzol® (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à síntese de DNAc, utilizando-se o *kit* ThermoScript RT-PCR (Invitrogen, EUA). O RNA total (2,5 μ g) foi incubado com Oligos(dT) por 1 hora a 55°C para síntese de DNAc. As amostras foram submetidas à amplificação por PCR,

onde os DNAs resultantes foram adicionados a solução contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,4 mM, Taq-polimerase 2 U (Invitrogen, EUA) e 0,4 μM de cada *primer* senso e anti-senso para amplificação de ERβ e GAPDH. A sequência de nucleotídeos do *primer* para ER foi: senso: 5' CTC ACG TCA GGC ACA TCA GT 3'; anti-senso: 5' TGT GAG CAT TCA GCA TCT CC 3', (NCBA reference sequence: NM_012754.1). A sequência de nucleotídeos do *primer* para GAPDH foi: senso: 5' AGA CAG CCG CAT CTT CTT GT 3'; anti-senso: 5' CTT GCC GTA GGT AGA GTC AT 3', (NCBA reference sequence: NM_017008).

As amostras foram submetidas às seguintes condições de ciclos de PCR: ciclo inicial de 3 minutos a 95 °C, seguido de 21 a 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto e meio a 72 °C com extensão final de 3 minutos a 72 °C.

O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5 % - p/v) contendo brometo de etídio. Análise densiométrica das bandas resultantes da RT-PCR foi feita utilizando o software Scion Image Analysis (Scion Corporation, EUA).

11. ELISA

As concentrações teciduais e plasmáticas de estradiol e DHT foram mensuradas com o uso de *kits* comerciais (DRG Instruments, Alemanha), pela técnica de ELISA. Resumidamente, as amostras de plasma foram obtidas após centrifugação do sangue total (2146 g por 10 minutos) em tubos revestidos com heparina. Foram adicionados 25 e 50 μL de plasma por poço da placa para os ensaios de estradiol e DHT, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Para dosagem tecidual as amostras de próstata ventral foram submetidas ao procedimento de enriquecimento de esteroides, baseado na extração de lipídeos, com o uso de éter dietílico (Hany et al, 1999). Resumidamente, o tecido previamente pulverizado (150 mg) foi homogeneizado em 250 μL de PBS, e deste extrato retirado 150 μL para adição de 670 μL de éter dietílico. Após vigorosas homogeneizações, as amostras foram centrifugadas e brevemente congeladas em nitrogênio líquido para separação do *pellet* e sobrenadante de éter. O *pellet* foi novamente ressuspense em éter e a etapa de extração lipídica repetida. Todo o montante de sobrenadante de éter foi então evaporado para o enriquecimento de esteroides até o volume de 13 μL, seguido de reconstituição de 50 μL de PBS. Para a dosagem tecidual de DHT foi necessária a diluição das amostras (1:4) em 200 μL de PBS. O plasma destinado para dosagem de estradiol foi submetido

às mesmas condições de extração e enriquecimento de esteroides descritos para o tecido. A sensibilidade do ensaio para estradiol e DHT foi de 9,7 e 6,0 pg/mL, respectivamente. Todas as amostras foram mensuradas em quadruplicata em 2-3 ensaios independentes.

12. Análise estatísticas

Os dados referentes ao peso corporal e dos órgãos, expressão das proteínas investigadas e concentrações de estradiol e DHT foram analisados estatisticamente. Após teste de normalidade, os dados contendo mais de dois parâmetros foram submetidos ao teste de múltipla variância *One-Way ANOVA* e teste de Tukey para comparação *post-hoc* entre os grupos ou teste t para comparação entre dois parâmetros. Os dados que não obedeceram a uma distribuição normal foram analisados utilizando-se os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* Dunn para comparação entre dois ou mais parâmetros, respectivamente. Os dados foram expressos como média e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão divididos em 2 capítulos, apresentados da seguinte maneira:

CAPÍTULO I – Artigo publicado

Changes in Estrogen Receptor ER β (ESR2) Expression without Changes in the Estradiol Levels in the Prostate of Aging Rats (Anexo).

CAPÍTULO II – Resultados não publicados

1. Análise da expressão da enzima aromatase no complexo prostático de ratos em envelhecimento
2. Imunolocalização da enzima CYP7B1 no complexo prostático de ratos em envelhecimento
3. Tratamento de ratos senis com 3 β -diol

CAPÍTULO I – Artigo publicado

Esses resultados referem-se aos objetivos (a), (b), (c) e (e - parcial), os quais fazem parte do artigo publicado no periódico PlosOne - DOI:10.1371/journal.pone.0131901: **Changes in Estrogen Receptor ER β (ESR2) Expression without Changes in the Estradiol Levels in the Prostate of Aging Rats** (Anexo).

1. Histopatologia, expressão de ER β , perfil de proliferação celular e perfil hormonal no complexo prostático de ratos em envelhecimento

1.1 Peso corporal e do complexo prostático

O peso corporal dos animais aumentou dos 3 aos 6 meses de idade e estabilizou desta idade em diante (12 aos 24 meses) (Tabela 3). Não houve diferenças no peso relativo entre os lobos prostáticos frescos e na próstata dorsal e lateral fixadas nas diferentes idades. A próstata ventral mostrou aumento progressivo de seu peso relativo dos 3 aos 12 meses de idade, apresentando uma redução significativa aos 18 meses, considerando-se o órgão fixado (Tabela 3). De forma similar, ocorreu aumento significativo da próstata lateral aos 6 e 24 meses de idade.

Tablela 3: Peso corporal e relativo dos lobos prostáticos frescos e fixados.

Age (months)	Fresh tissue (n = 5)					Fixed tissue (n = 5)				
	3	6	12	18	24	3	6	12	18	24
BW (grams)	350.6 ±6.62	*555.8 ±14.11	*612.0 ±13.29	*516.2 ±26.84	*584.0 ±21.45	367.0 ±5.83	*512.8 ±19.44	*561.6 ±20.03	*520.2 ±18.14	*525.1 ±19.06
VP (grams)	0.162 ±0.028	0.142 ±0.006	0.161 ±0.13	0.168 ±0.025	0.119 ±0.011	0.170 ±0.006	0.198 ±0.009	*0.216 ±0.019	**0.144 ±0.007	0.185 ±0.006
DP (grams)	0.043 ±0.003	0.035 ±0.003	0.036 ±0.004	0.045 ±0.004	0.035 ±0.005	0.066 ±0.004	0.065 ±0.004	0.067 ±0.006	0.051 ±0.005	0.069 ±0.008
LP (grams)	0.034 ±0.002	0.040 ±0.006	0.037 ±0.003	0.041 ±0.006	0.031 ±0.003	0.044 ±0.002	*0.073 ±0.008	0.057 ±0.002	0.053 ±0.006	*0.063 ±0.003
AP (grams)	0.062 ±0.005	0.067 ±0.006	0.044 ±0.008	0.064 ±0.007	0.057 ±0.008	0.074 ±0.004	0.088 ±0.006	0.085 ±0.008	0.070 ±0.003	0.071 ±0.006

Resultados expressos como média \pm SEM. BW = peso corporal; VP = próstata ventral; DP = próstata dorsal; LP = próstata lateral e AP = próstata anterior. * = $p \leq 0,05$ comparado a 3 meses e ** = $p \leq 0,05$ comparado a 6 meses.

1.2 Histopatologia do complexo prostático

Foram detectadas alterações histológicas em todos os lobos prostáticos nas idades de 12 a 24 meses (Fig. 6). As alterações foram heterogêneas entre os animais de uma mesma idade e até mesmo na glândula de um mesmo animal, onde foi possível identificar ácinos histologicamente normais co-localizados com aqueles alterados. As alterações iniciais incluem pregueamento epitelial de intensidade leve a moderada, característico de hiperplasia. Adicionalmente, foram observadas concreções intraluminais e atipias celulares tais como vacuolização do citoplasma, hipertrofia nuclear e proeminência do nucléolo (Fig.6).

Dos 18 aos 24 meses as concreções prostáticas, áreas de hiperplasia e as atipias celulares foram mais frequentes e pronunciadas quando comparado aos 12 meses (Fig. 6 B, I, M and Q), exceto para a próstata anterior onde as concreções intraluminais não se alteraram com o envelhecimento. Especialmente no lobo ventral, as áreas de proliferações epiteliais apresentaram-se com arquitetura cribriforme, algumas vezes formando adenomas (Fig. 6 C), caracterizado pelo crescimento intraluminal sem obstrução do adenômero.

Na próstata ventral, a atrofia epitelial foi uma característica bastante comum nos animais idosos. Os ácinos atróficos são caracterizados por serem dilatados e apresentarem epitélio cúbico baixo a pavimentoso (Fig. 6 E). Em alguns adenômeros foi possível identificar áreas de transformação gradativa do epitélio prismático para cúbico, cúbico baixo a pavimentoso. Não raramente neste lobo, áreas de atrofia epitelial alternavam-se com regiões glandulares sem aparentes alterações ou com áreas de hiperplasias.

Nos lobos ventral e dorsal, foi possível identificar células com citoplasma repleto de material mucoide, que ocorriam de forma isolada ou formando pequenos grupos celulares, como visto na próstata ventral (Fig. 6 D), um indicativo de metaplasia mucoide.

Áreas de estratificação intraepitelial com o limite da membrana basal preservado, características de neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN), foram vistas nos lobos ventral, dorsal e lateral (Fig. 6 F, G, J, O, S e inserto em N). No lobo dorsal a proliferação foi principalmente no compartimento basal (Fig. 6 J) e a identidade destas células foi confirmada pela positividade para CK HMW (inserto na Fig. 7 I). Na próstata anterior as áreas proliferativas intraepiteliais foram mais raras.

Ademais, foram detectados focos inflamatórios no lobo lateral dos animais senis, no estroma bem como invadindo o epitélio e o lúmen, alterações essas indicativas de prostatite (Fig. 6 N e O). Esta alteração foi menos frequente nos outros lobos.

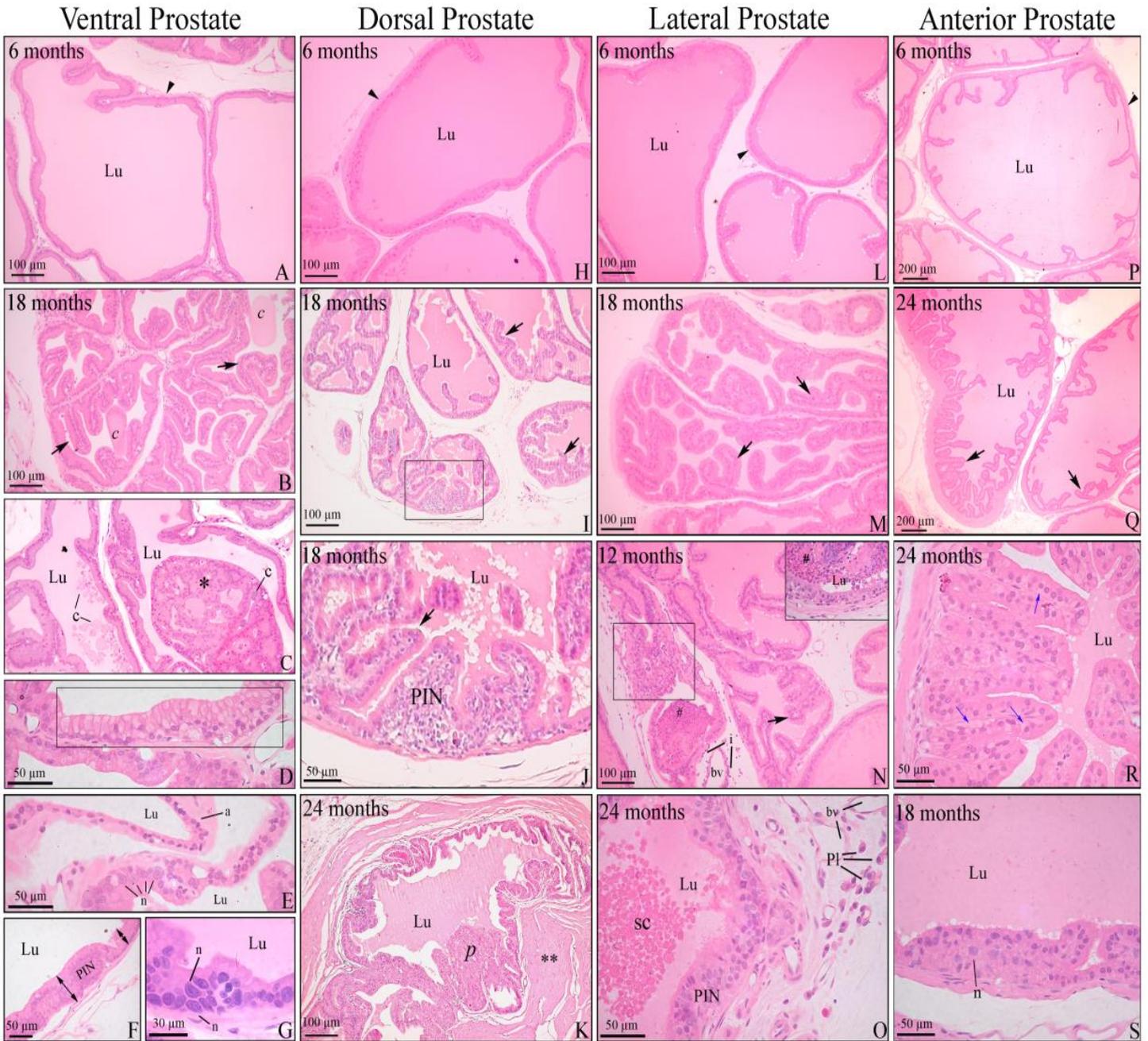


Figura 6: Histopatologia do complexo prostático de ratos em diferentes idades. Próstata ventral (A-G); dorsal (H-K); lateral (L-O) e anterior (P-S). **(A, H, L e P)** Animais jovens apresentando histologia normal das próstatas. **(B, I, M e Q)** Animais senis apresentando aumento do pregueamento epitelial (setas pretas) em todos os lobos prostáticos. Em B é possível observar concreções luminiais (c). **(C)** Proliferação epitelial de arquitetura cribriforme com crescimento intraluminal (*) na próstata ventral. **(D)** Metaplasia mucípara do epitélio (área delimitada). **(E)** Atrofia epitelial (a) e área contendo células com hipertrofia nuclear e nucléolos proeminentes (n). **(F e G)** Epitélio hiperproliferativo com característica de neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Em G, células com evidente hipertrofia nuclear (n) na área de PIN. **(J)** Detalhe de proliferação intraepitelial na próstata dorsal vista na área delimitada da figura I. **(K)** Hiperplasia com crescimento papilar. Adjacente à lesão ocorre espessamento do estroma (**). **(N)** Próstata lateral com hiperplasia epitelial (seta) bem como infiltrado de células inflamatórias no epitélio glandular (área delimitada), lúmen (#) e estroma (s). **(O)** Área de PIN próxima ao infiltrado de células inflamatórias contendo plasmócitos (Pl). Células descamadas dentro do lúmen (sc). **(R)** Intenso pregueamento e vacualização no epitélio da próstata anterior (setas azuis). **(S)** Área de PIN na próstata anterior contendo atípicas nucleares (n). Cabeça de seta = células musculares lisas periacinares; Pl = plasmócitos; bv = vaso sanguíneo; c = concreções luminiais; Lu = lúmen. Corado por H&E.

1.3 Imunolocalização de ER β no complexo prostático

Intensa positividade para ER β foi detectada no núcleo das células secretoras e basais do epitélio glandular dos lobos ventral, dorsal (Fig. 7A e G) e anterior (dado não mostrado), além de moderada positividade citoplasmática. As células musculares lisas periacinares apresentaram expressão intermitente desse receptor, enquanto algumas células do estroma e células endoteliais também se mostraram positivas para ER β . A próstata lateral, diferentemente dos demais lobos, apresenta intensa reatividade citoplasmática que dificulta a visualização do núcleo celular. Vários testes de neutralização para bloqueio desta reatividade foram testados, mas não foi obtido sucesso. Dessa forma, este lobo não possui análises imunohistoquímicas.

O padrão de expressão de ER β não se alterou com a idade considerando-se as áreas de epitélio normal e as áreas de hiperplasia (Fig. 7B e H e Fig. 8A e B). Por outro lado, a expressão do receptor foi reduzida nas áreas de proliferação intraepitelial. Nestas áreas específicas, houve um padrão heterogêneo de expressão, onde foi possível identificar células bem coradas e células coradas fracamente ou negativas (Fig. 7C, D, I e J e Fig. 8C e D). Adicionalmente, as células atípicas também apresentaram reduzida expressão de ER β (Fig. 7E e K).

Nas áreas de atrofia epitelial encontradas na próstata ventral, a expressão da proteína foi notavelmente reduzida, sendo esta redução gradativa de acordo com o grau de atrofia do epitélio (Fig. 7F e Fig. 8E).

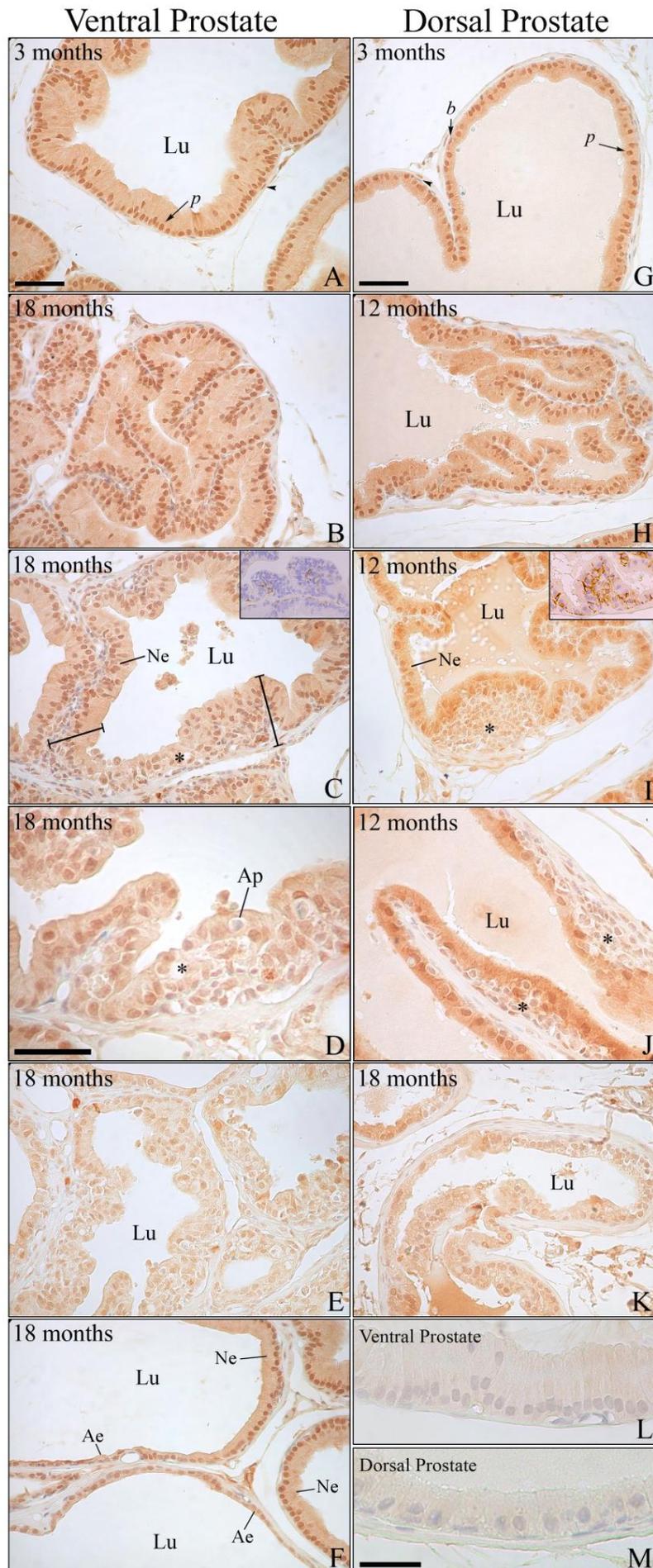


Figura 7: Imunomarcção para ER β na próstata ventral (A-F) e dorsal (G-K) de ratos em diferentes idades. **(A e G)** Animais jovens com intensa positividade para o receptor nas células epiteliais principais (p) e basais (b). Cabeça de seta preta = células musculares lisas periacinares. **(B e H)** Ratos senis apresentando pregueamento do epitélio com marcação normal para ER β . **(C e D)** Áreas de proliferação intraepitelial na próstata ventral **(I e J)** e dorsal com redução da positividade para ER β (*), em contraste com o epitélio normal (Ne). Ap = apoptose. Inseto em C e I: imunomarcção para CK HMW nas próstatas ventral e dorsal, respectivamente, indicando maior número de células basais nas áreas de PIN na próstata dorsal. **(E e K)** Intensa redução da imunomarcção de ER β em áreas de intensa atipia celular. **(F)** Transição do epitélio normal (Ne) com positividade padrão de ER β (setas pretas) e epitélio atrófico (Ae) com marcante redução da marcação para o receptor (setas azuis). **(L e M)** Controles negativos da imunomarcção para a próstata ventral e dorsal, respectivamente. Lu: lúmen; Barra em A e G (=B, C, E, F, H, I, J, K) = 50 μ m; Barra em D = 40 μ m; barra em M (=L) = 30 μ m.

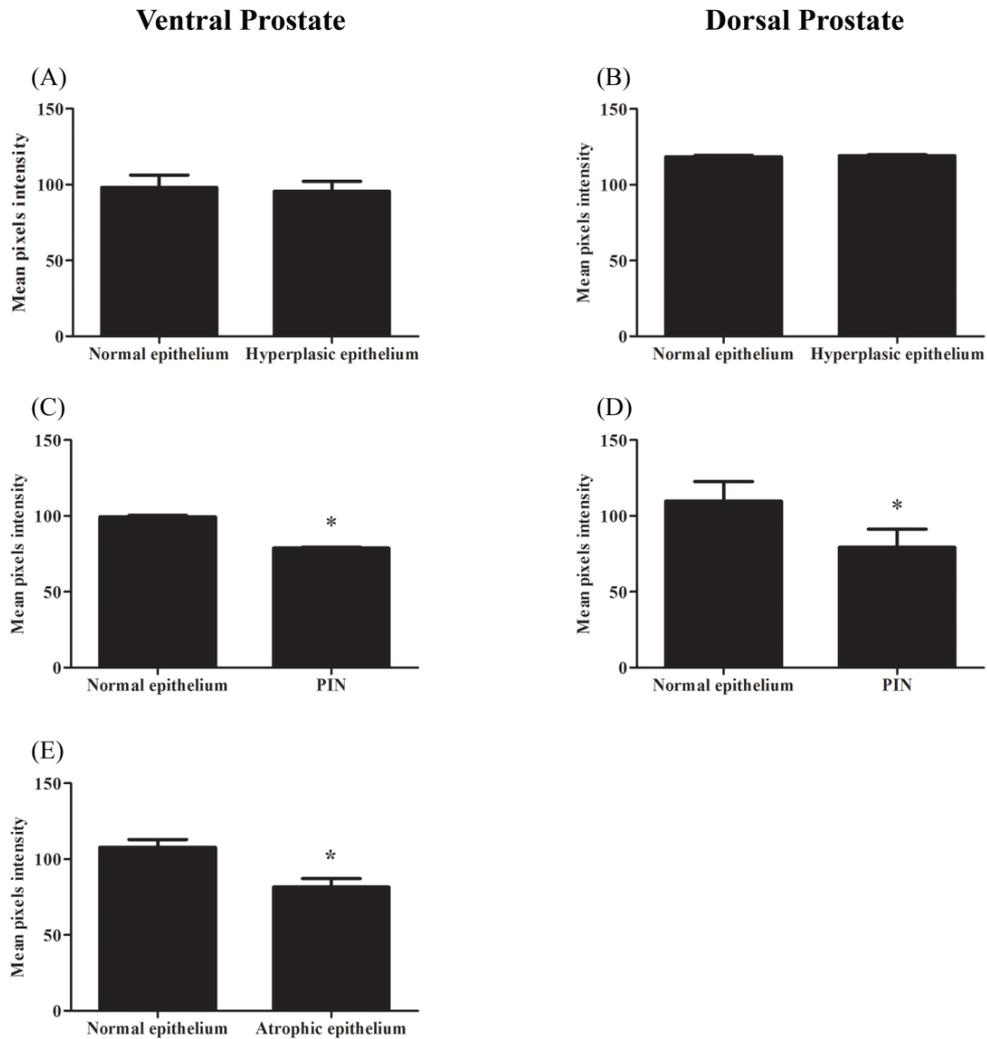


Figura 8: Quantificação da intensidade de imunorreação para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos em diferentes idades. **(A-B)** Comparado ao epitélio normal adjacente não houve alteração na intensidade de expressão de ER β nas áreas de hiperplasia, enquanto que nas áreas de PIN **(C-D)** e de atrofia **(E)** houve marcante redução da intensidade de expressão de ER β . * = $p \leq 0,05$; n = 4 por grupo.

1.4 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 β em roedores (Kuiper et al., 1996 e 1998). No entanto, foi detectada também uma segunda banda reativa de 49 kDa, que co-migrou com a banda principal (Fig. 9).

A intensidade média de pixels para ER β foi similar, em todos os lobos prostáticos (Fig. 9 A-H), em todas as idades, assim como comparativamente entre os diferentes lobos (Fig. 9 I-J).

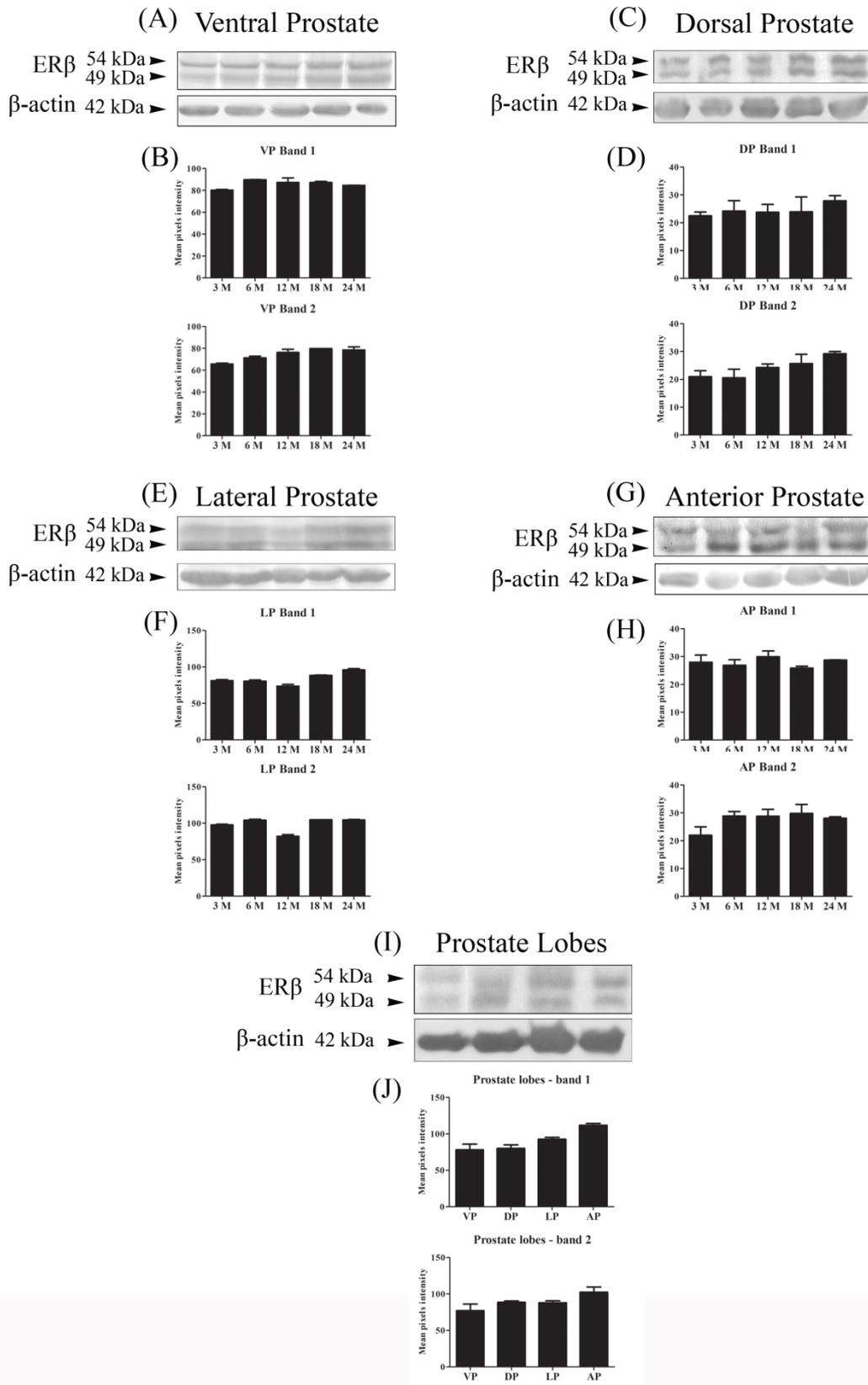


Figura 9: *Western blotting* para o receptor ER β na próstata de ratos em diferentes idades (A-H) e comparativo da expressão proteica entre os diferentes lobos prostáticos (I e J). (A, C, E e G) Próstata ventral, dorsal, lateral e anterior, respectivamente. (B, D, F e H) Representação gráfica da análise densitométrica das bandas obtidas. Os dados são representativos de 2-3 diferentes ensaios. (I) Comparação entre a diferença da expressão de ER β entre os diferentes lobos prostáticos e (J) representação gráfica da análise densitométrica das bandas obtidas. β -actina foi usada como controle interno em todos os ensaios. VP = próstata ventral; DP = próstata dorsal; LP = próstata lateral e AP = próstata anterior. n = 5 por grupo para análise entre as diferentes idades para cada lobo prostático e n = 3 para análise comparativa entre os diferentes lobos prostáticos.

1.5 RT-PCR

Não foram detectadas alterações nos níveis de RNAm de ER β nos lobos ventral e dorsal nas diferentes idades (Fig. 10).

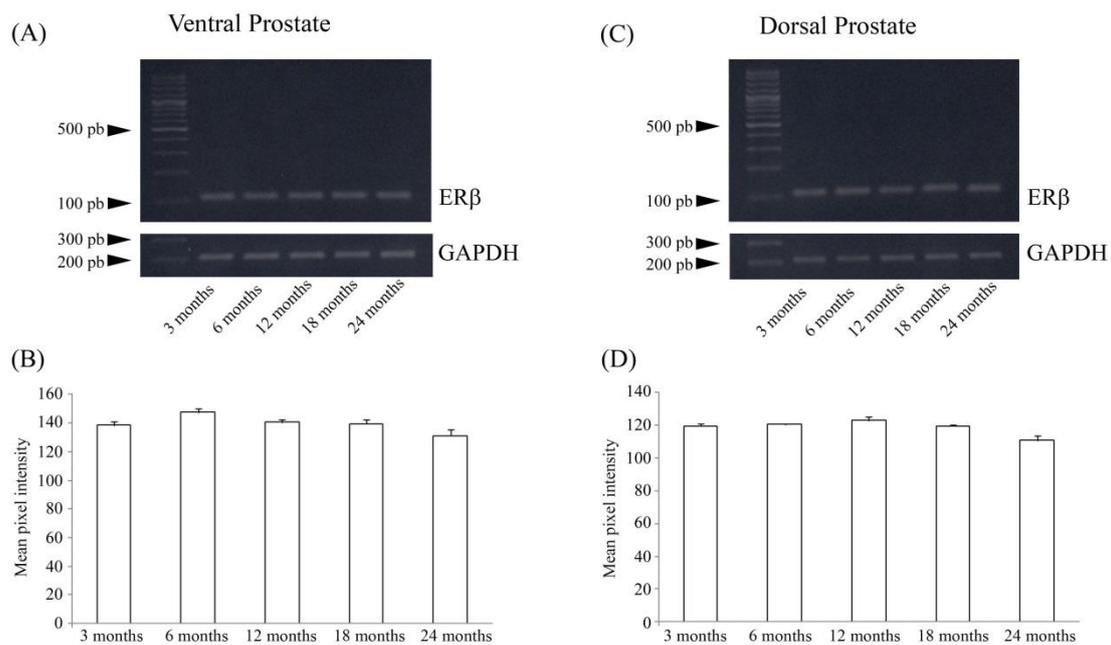


Figura 10: Níveis de RNAm de ER β na próstata de ratos em diferentes idades. (A e C) Próstatas ventral e dorsal. Gapdh foi usado como controle interno. (B e D) Representação gráfica da análise densitométrica das bandas obtidas. Os dados mostrados são representativos de 2 diferentes ensaios. n = 5 por grupo.

1.6 Proliferação celular

Considerando o possível papel antiproliferativo de ER β , foi investigado o perfil de proliferação celular na próstata ventral, visando obter um possível significado biológico da redução local de ER β em áreas específicas com o envelhecimento. O número de células MCM7 positivas foi baixo nas áreas de epitélio normal em todas as idades. Com o envelhecimento, houve redução significativa do número de células MCM7 positivas a partir dos 12 meses de idade (Fig. 11A e B). Por outro lado, nas áreas restritas de proliferação intraepitelial (PIN), a frequência de células MCM7 positivas aumentou significativamente a partir dos 12 meses de idade (Fig. 11C e D).

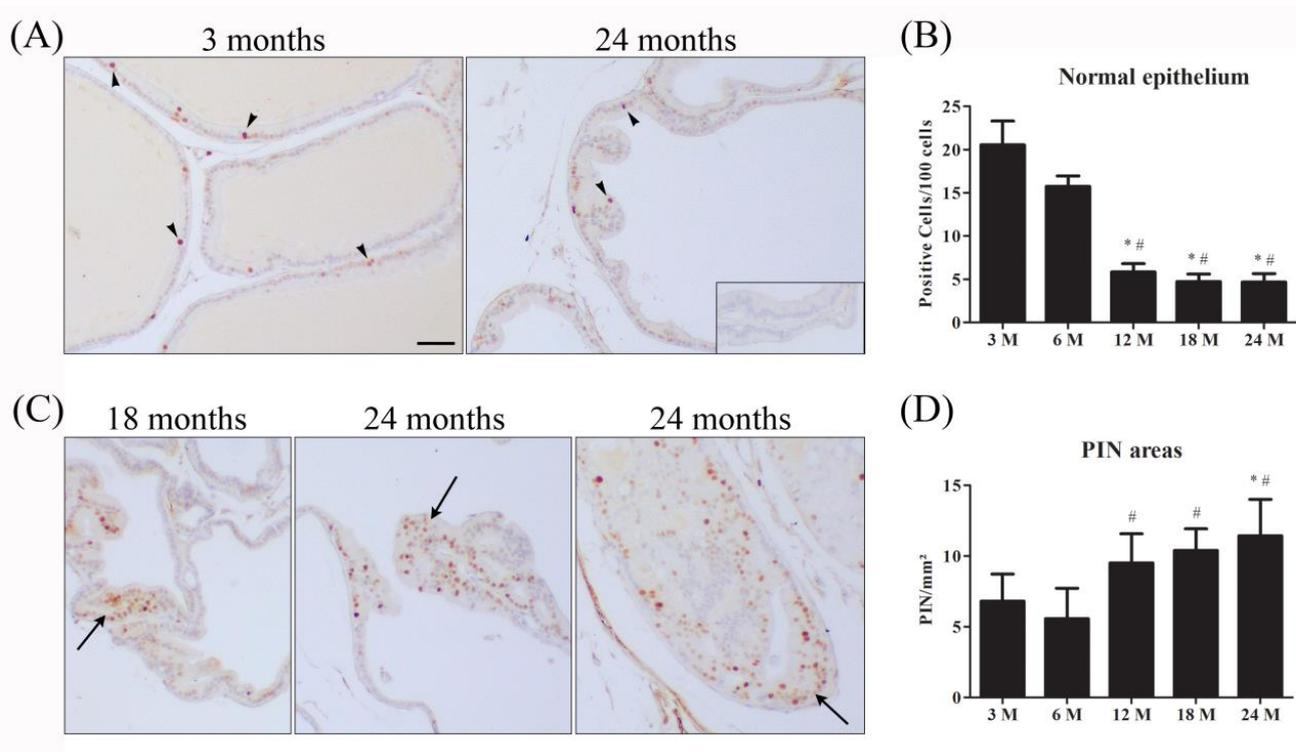


Figura 11: Imunohistoquímica e quantificação de células MCM7 positivas na próstata ventral de ratos em diferentes idades. **(A)** Imunopositividade de MCM7 no epitélio normal de ratos jovens e senis. **(B)** Representação gráfica da quantificação das células positivas no epitélio normal, mostrando redução da frequência de células positivas com o envelhecimento. **(C)** Imunopositividade de MCM7 nas áreas de PIN (setas) de animais idosos. **(D)** Representação gráfica de células MCM7 positivas mostrando aumento da frequência destas células nas áreas de PIN. * e # = $p \leq 0,05$ comparado a 3 e 6 meses, respectivamente. $n = 5$ por grupo. Cabeça de seta = células MCM7 positivas. Inserto: controle negativo da imunorreação. Barra = 50 μm .

Os dados de imunofluorescência corroboraram os achados da imunohistoquímica. Foram detectadas poucas células Ki67 positivas nas áreas de epitélio normal, enquanto que nas áreas de PIN a frequência de células positivas foi maior nos animais idosos. A fluorescência para ER β foi constante no epitélio normal e reduzida nas áreas de atrofia (Fig. 12). Nas áreas de PIN, a positividade para ER β foi heterogênea com células fluorescentes e não fluorescentes para o receptor. A colocalização de ER β com Ki67 revelou que as células proliferativas possuem baixa ou indetectável positividade para ER β , corroborando o papel antiproliferativo deste receptor. Adicionalmente, nas áreas de PIN com atipias nucleares predominantes (PIN 2), grande parte das células foram negativas para ER β , enquanto que as células Ki67 positivas foram mais frequentes (Fig. 12).

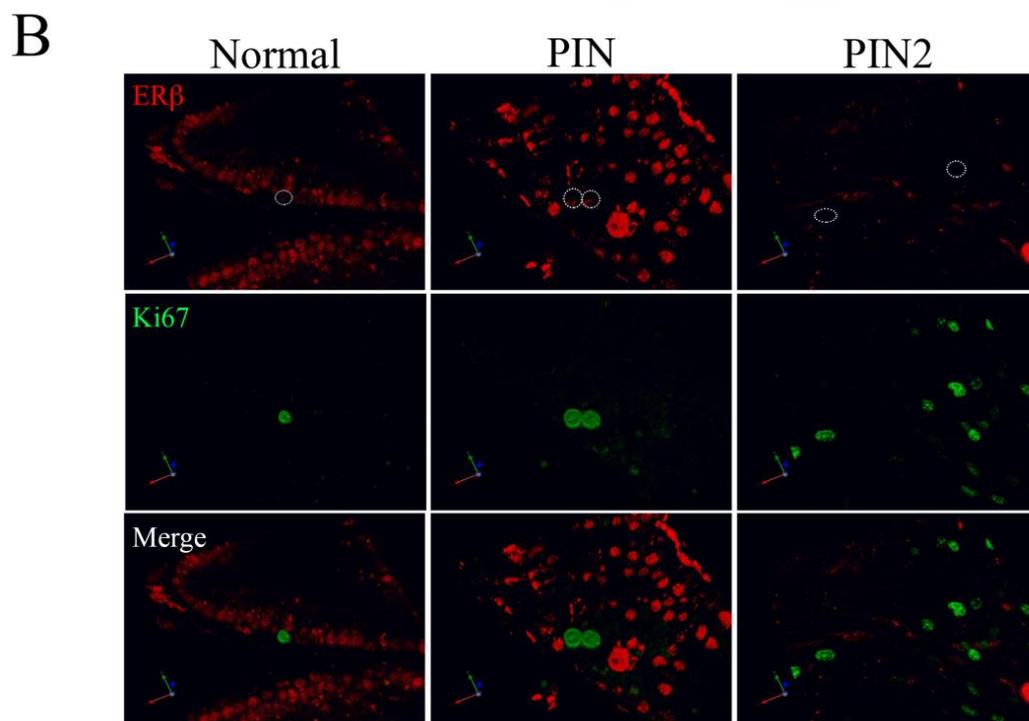
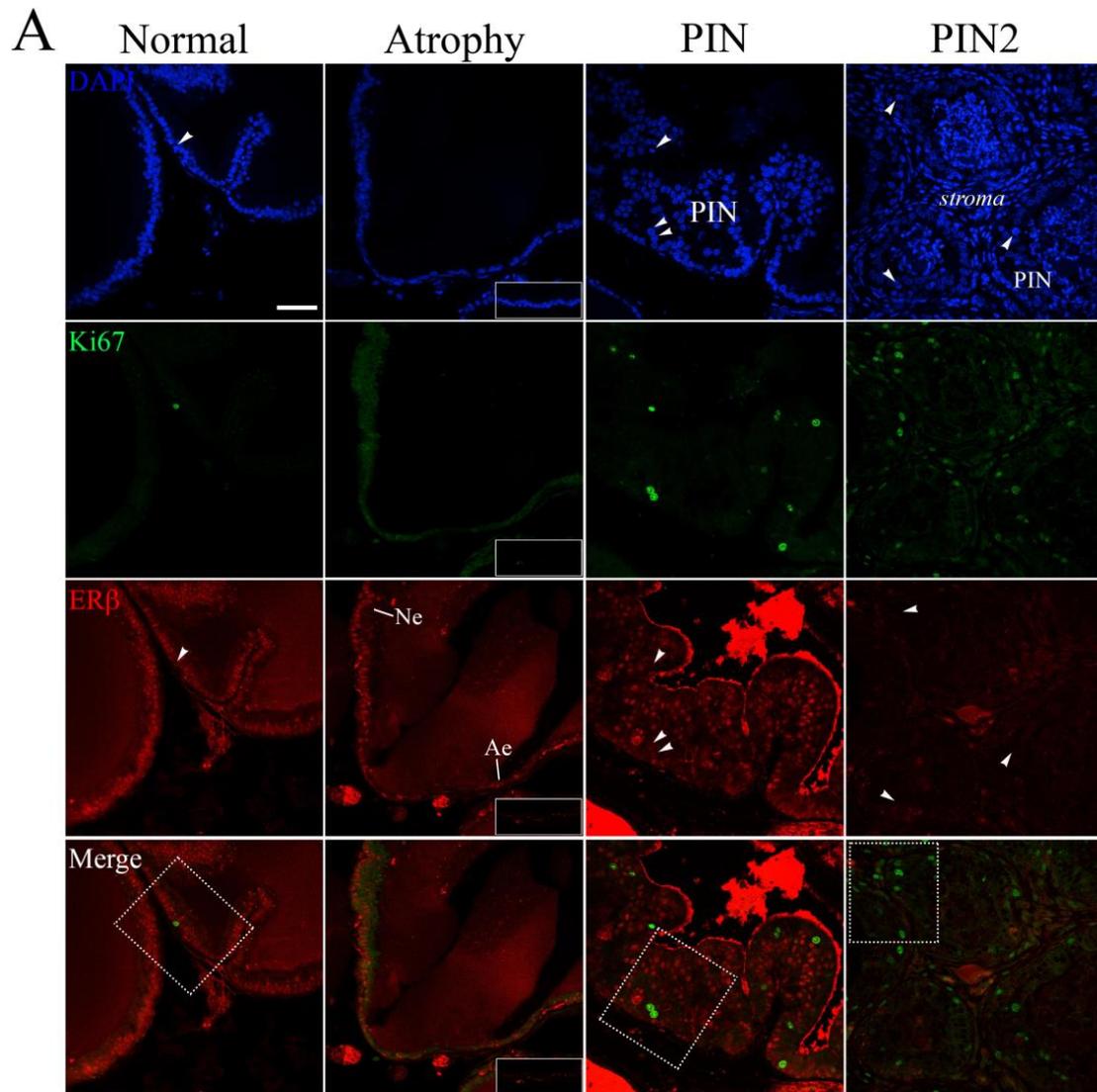


Figura 12: Colocalização de ER β e marcador de proliferação celular Ki67 na próstata ventral de ratos idosos. **(A)** Comparação entre epitélio normal (Ne) atrófico (Ae) e área de PIN. A fluorescência de ER β nas áreas de PIN apresenta-se reduzida, especialmente em áreas com intensa atipia nuclear (PIN2), onde células proliferativas (cabeça de seta) foram frequentemente detectadas. **(B)** Reconstrução 3D das áreas demarcadas em A. Os inserts correspondem aos controles negativos dos respectivos canais. Barra = 50 μ m. Verde (Fitc): Ki67; Vermelho (Cy3): ER β e Azul (DAPI): marcação nuclear.

1.7 Níveis hormonais

Os níveis séricos e teciduais de estradiol foram similares na próstata ventral em todas as idades analisadas (Fig. 13 A e B), enquanto que os níveis de DHT reduziram gradativamente com a idade, tanto no plasma quanto no tecido prostático (Fig. 13 C e D).

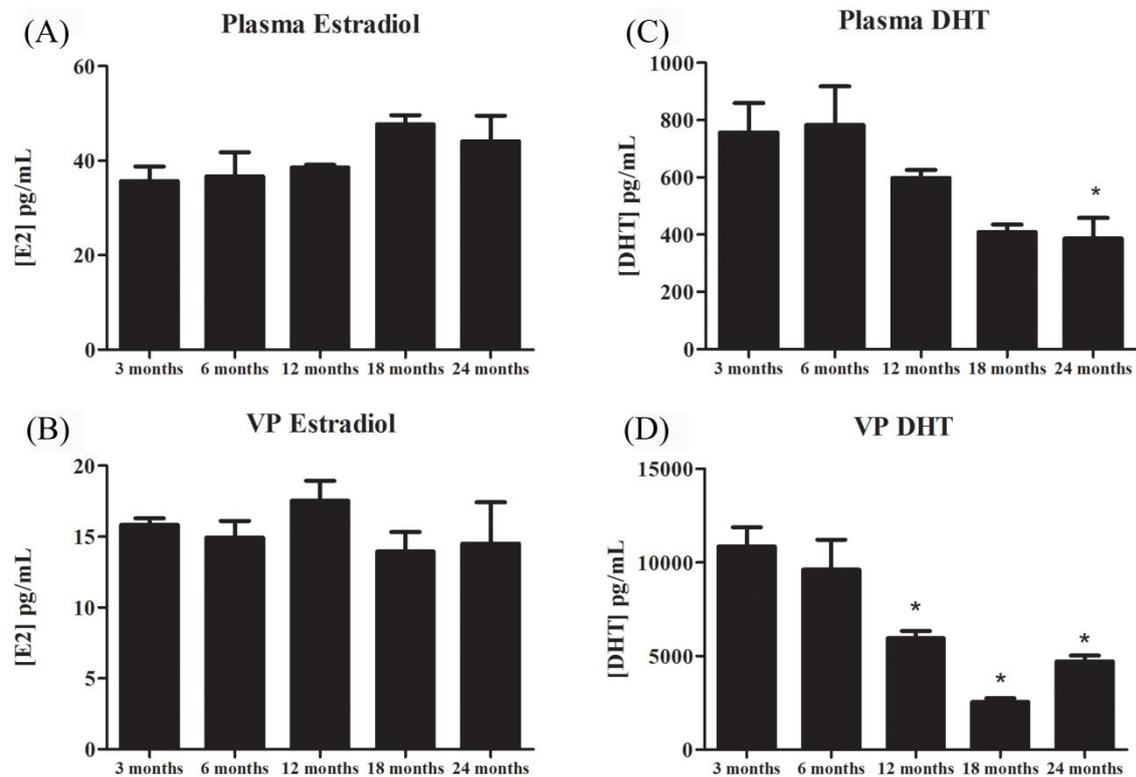


Figura 13: Níveis de 17 β -estradiol (E2) e diidrotestosterona (DHT) no plasma (A e C) e na próstata ventral (B e D) de ratos em diferentes idades. Os dados são representativos de 2-3 diferentes ensaios. VP = próstata ventral. * = $p \leq 0.05$ em relação à idade de 3 meses; # = $p \leq 0.05$ em relação a idade de 6 meses. $n = 3$ por grupo.

CAPÍTULO II – Resultados não publicados

Esses resultados referem-se aos objetivos (d), (f) e (g).

1 Análise da expressão da enzima aromatase no complexo prostático de ratos em envelhecimento

1.1 Imunolocalização de aromatase

Imunorreatividade citoplasmática moderada para a enzima aromatase foi detectada no epitélio glandular das próstatas ventral, dorsal, lateral e anterior, tanto nas células secretoras quanto basais (Fig. 14). Eventualmente, algumas células com localização e morfologia sugestivas de células basais apresentaram-se com positividade mais intensa para a enzima (inserto Fig. 14 A). As células musculares lisas periacinares e da parede dos vasos sanguíneos, assim como algumas células do estroma e as células endoteliais, também apresentaram-se positivas para aromatase.

Com o envelhecimento não foi observada alteração da expressão de aromatase em nenhum dos lobos prostáticos, considerando-se as áreas de epitélio normal, regiões de hiperplasia (Fig. 14 B, D, F e H) ou atrofia epitelial.

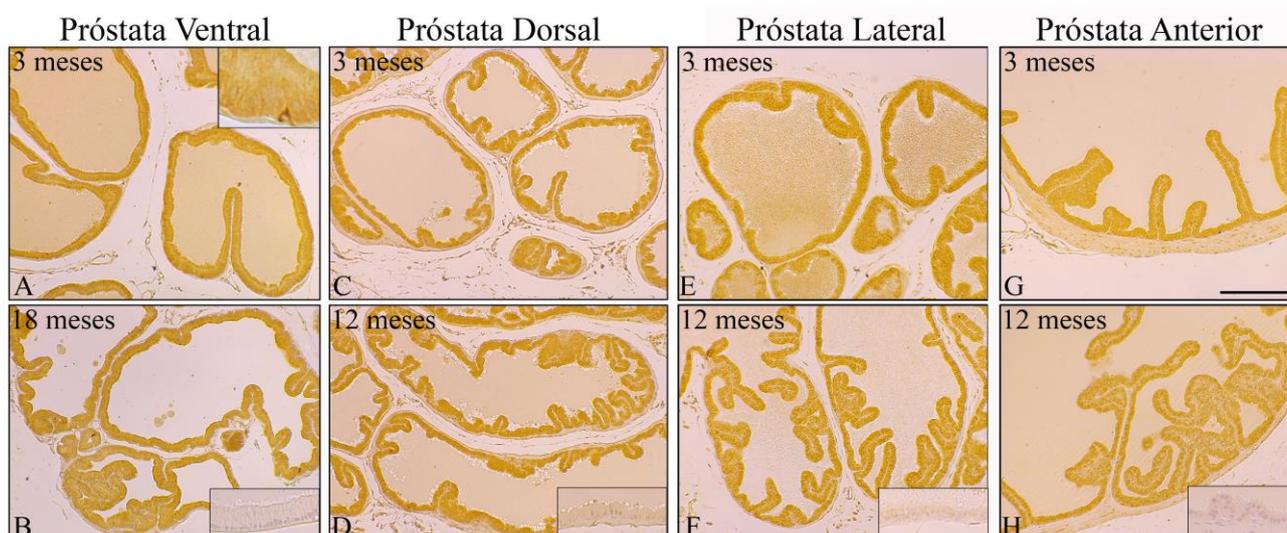


Figura 14: Imunolocalização da enzima aromatase na próstata ventral, dorsal, lateral e anterior de ratos em diferentes idades. (A, C, E e G) Animais jovens com intensa positividade do epitélio glandular. Inseto em A: representação de células basais que se coram mais intensamente para aromatase. (B, D, F e H) Áreas hiperplásicas em animais senis com mesmo padrão de imunorreatividade detectado nos animais jovens. Barra em G = 200 μ m. Insetos em B, D, F e H: Controle negativo da imunorreacção em cada lobo.

Na próstata ventral, uma das alterações detectada foi que nas áreas de proliferação epitelial com arquitetura cribriforme houve redução da expressão de aromatase, comparado ao epitélio normal adjacente, de forma proporcional à extensão da área alterada (Fig. 15 A e B). Além disto, uma ocorrência marcante nas próstatas ventral, dorsal e, especialmente na próstata lateral de animais em idades avançadas de 18-24 meses, foi o aparecimento de frequentes células supostamente basais, apresentando intensa positividade para aromatase, as quais foram observadas em áreas de alterações teciduais, tais como proliferações epiteliais de arquitetura cribriforme (Fig. 15 B), focos de PIN (Fig. 15 C-E) ou áreas associadas à inflamação (Fig. 15 F-H). Essas células basais foram observadas em pequenos grupos, ou mesmo formando uma camada contínua na base do epitélio, como visto nas próstatas dorsal e lateral. Não foi incomum o fato de que em áreas de PIN e inflamação ocorresse espessamento do estroma adjacente ao adenômero afetado. A próstata lateral foi o lobo que mais apresentou alterações teciduais associadas ao aparecimento deste grupo de células intensamente positivas para aromatase.

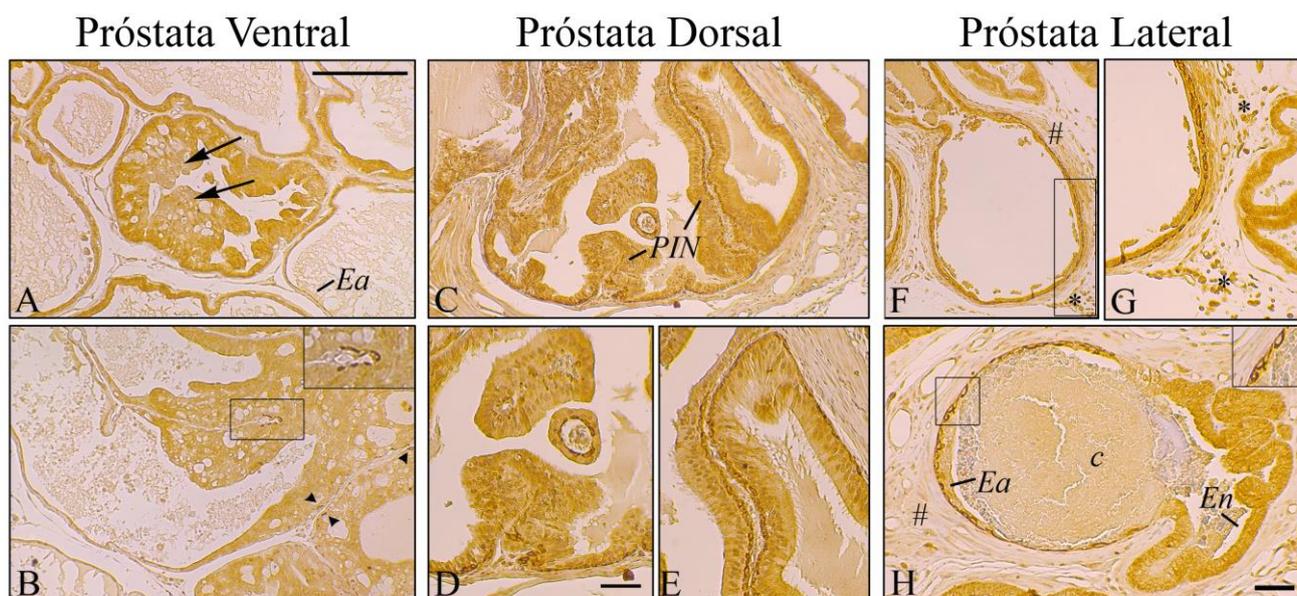


Figura 15: Imunolocalização da enzima aromatase na próstata ventral, dorsal e lateral de ratos senis. **(A)** Adenômero com proliferação intraepitelial com arquitetura cribriforme de pequena extensão com discreta redução de positividade para aromatase (setas). **(B)** Área de proliferação intraepitelial com arquitetura cribriforme de grande extensão com redução mais pronunciada da positividade para aromatase. Cabeça de seta: Células intensamente positivas com aspecto de células basais. Inserto em B: Detalhe da área delimitada contendo pequeno grupo de células intensamente positivas. **(C)** Área proliferativa contendo focos de PIN no epitélio glandular e presença de células intensamente positivas para aromatase, formando camada contínua, como detalhado em **D** e **E**, respectivamente. **(F)** Adenômero associado a infiltrado inflamatório (*), o qual apresenta arquitetura tecidual afetada com perda de células luminais e grande número de células intensamente positivas. Em **G**, ampliação de parte da região delimitada em **F**, detalhando infiltrado inflamatório (*) e contraste entre área de epitélio alterado e epitélio normal adjacente à direita. **(H)** Adenômero apresentando área de epitélio normal (En), com positividade padrão para a enzima, em transição com epitélio alterado (Ea) contendo maior densidade de células intensamente positivas. Inserto em H: detalhe da área delimitada. # = espessamento do estroma. Barra em A (= B, C e F) = 200 μ m. Barra em D (= E e H) = 50 μ m. Barra em G = 50 μ m.

1.2 Detecção de aromatase por *Western blotting*

A fim de quantificar a expressão da enzima aromatase nas diferentes idades, ensaio de *Western blotting* foi realizado na próstata ventral. A especificidade do anticorpo utilizado foi comprovada pela detecção de uma banda de aproximadamente 57 kDa, compatível com peso molecular previamente descrito para aromatase em tecido de ratos (Nitta et al, 1993; Levallet et al, 1998; Carreau et al, 2001). Juntamente com as amostras de próstata ventral, foi adicionado testículo de rato como controle da técnica, uma vez que a detecção de aromatase é bastante controversa na literatura sobre próstata. Como

esperado, a banda correspondente de aromatase no testículo apresentou-se mais intensa (Fig. 16 A).

A intensidade média de pixels para aromatase foi similar na próstata ventral em todas as idades analisadas, não apresentando diferença estatística entre os diferentes grupos (Fig. 16 B).

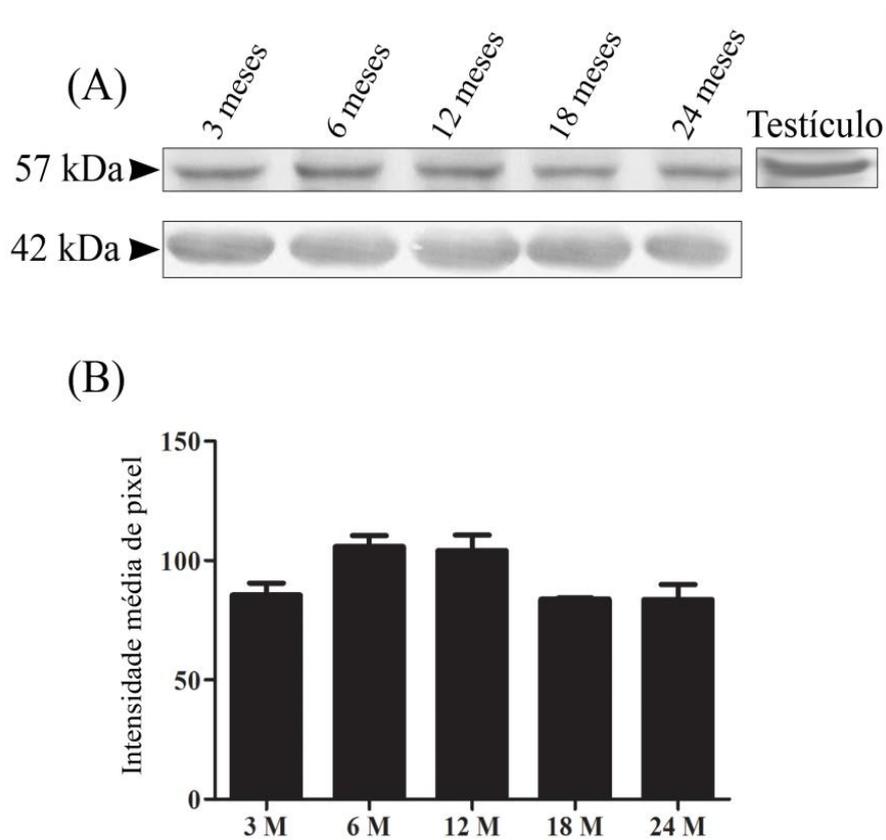


Figura 16: *Western blotting* para enzima Aromatase na próstata ventral de ratos em diferentes idades. (A) Bandas obtidas para aromatase (57 kDa) e β -actina (42 kDa) na próstata ventral de ratos e no testículo, usado como controle positivo do ensaio. (B) Representação gráfica da análise densitométrica das bandas obtidas para aromatase na próstata ventral. Os dados são representativos de 3 diferentes ensaios. $n = 3$ por grupo. M = meses.

1.3 Colocalização de células basais e aromatase

A fim de certificar a identidade das células que se coram intensamente para enzima aromatase pela imunohistoquímica, investigamos por microscopia confocal a colocalização desta enzima com um clássico marcador de células basais, que é a citoqueratina de alto peso molecular (CKWMH).

Moderada fluorescência para aromatase foi verificada no epitélio glandular dos lobos ventral, dorsal e lateral da próstata. Corroborando os dados de imunohistoquímica, foi possível identificar células com fluorescência mais intensa, em posição e morfologia características de células basais, em todos os lobos prostáticos (Fig. 17 A-C).

A imunofluorescência para o marcador CKHMW detectou células esparsas pelo epitélio, com intensa fluorescência citoplasmática. Morfologicamente estas células apresentavam-se menos volumosas, normalmente de formato triangular, onde muitas vezes foi possível observar delgadas projeções citoplasmáticas em direção ao lúmen. A próstata lateral foi o lobo que aparentemente apresentou menor proporção de células basais nas áreas de epitélio normal tanto dos animais jovens quanto nos animais senis. As projeções citoplasmáticas das células basais neste lobo foram também menos aparentes (Fig. 17 C).

A colocalização de aromatase com CKHMW revelou que as células intensamente fluorescentes para a enzima são de fato células basais, onde foi possível detectar a sobreposição dos marcadores em áreas de epitélio normal e áreas de epitélio alterado (Fig. 17 e 18). Mais raramente algumas células CKHMW positivas não foram tão intensamente fluorescentes para aromatase, especialmente na próstata lateral (Fig. 17 C). As células basais com intensa positividade para aromatase serão mencionadas ao longo do texto como células basais/Aro+.

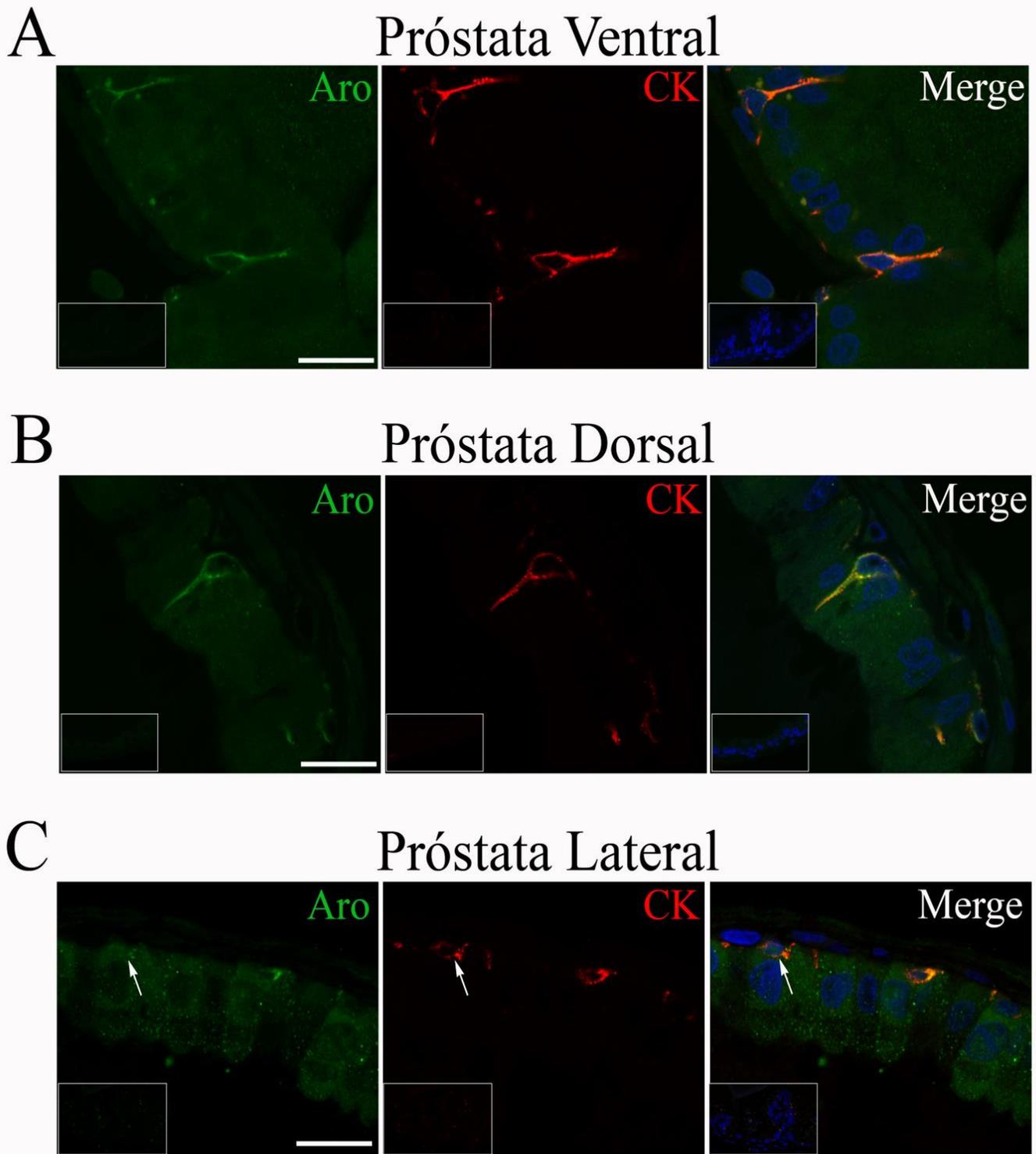


Figura 17: Colocalização de aromatase e células basais em áreas de epitélio normal na próstata ventral (A), dorsal (B) e lateral (C) de ratos Wistar. Aro: aromatase. CK: citoqueratina de alto peso molecular. Merge: sobreposição dos filtros verde, vermelho e azul (DAPI). Seta: célula basal com fluorescência para aromatase similar às células luminais. Insertos: controle negativo dos respectivos canais. Barra em A, B e C = 100 μ m. Verde (Fic): aromatase; Vermelho (Cy3): CKHMW e Azul (DAPI): marcação nuclear.

De forma recorrente, foi possível verificar maior densidade de células basais/Aro+ em áreas de alterações teciduais, tais como focos de proliferação de arquitetura cribriforme (Fig. 18 A), focos de PIN (Fig. 18 B) e áreas associadas a focos inflamatórios (Fig. 18 C). Apesar de ser o lobo que aparenta ter uma menor densidade de células basais nas áreas de epitélio normal, a próstata lateral chama a atenção por apresentar maior proporção de grandes grupos de células basais/Aro+ em áreas alteradas do tecido. Como descrito anteriormente, a próstata lateral é frequentemente acometida por prostatite com o envelhecimento. A concentração de células basais/Aro+ ocorreu principalmente em áreas relacionadas com focos peri-inflamatórios, que apresentavam lesões sugestivas de atrofia inflamatória proliferativa (PIA, do inglês: *proliferative inflammatory atrophy*) e/ou metaplasia escamosa (Fig. 18 C).

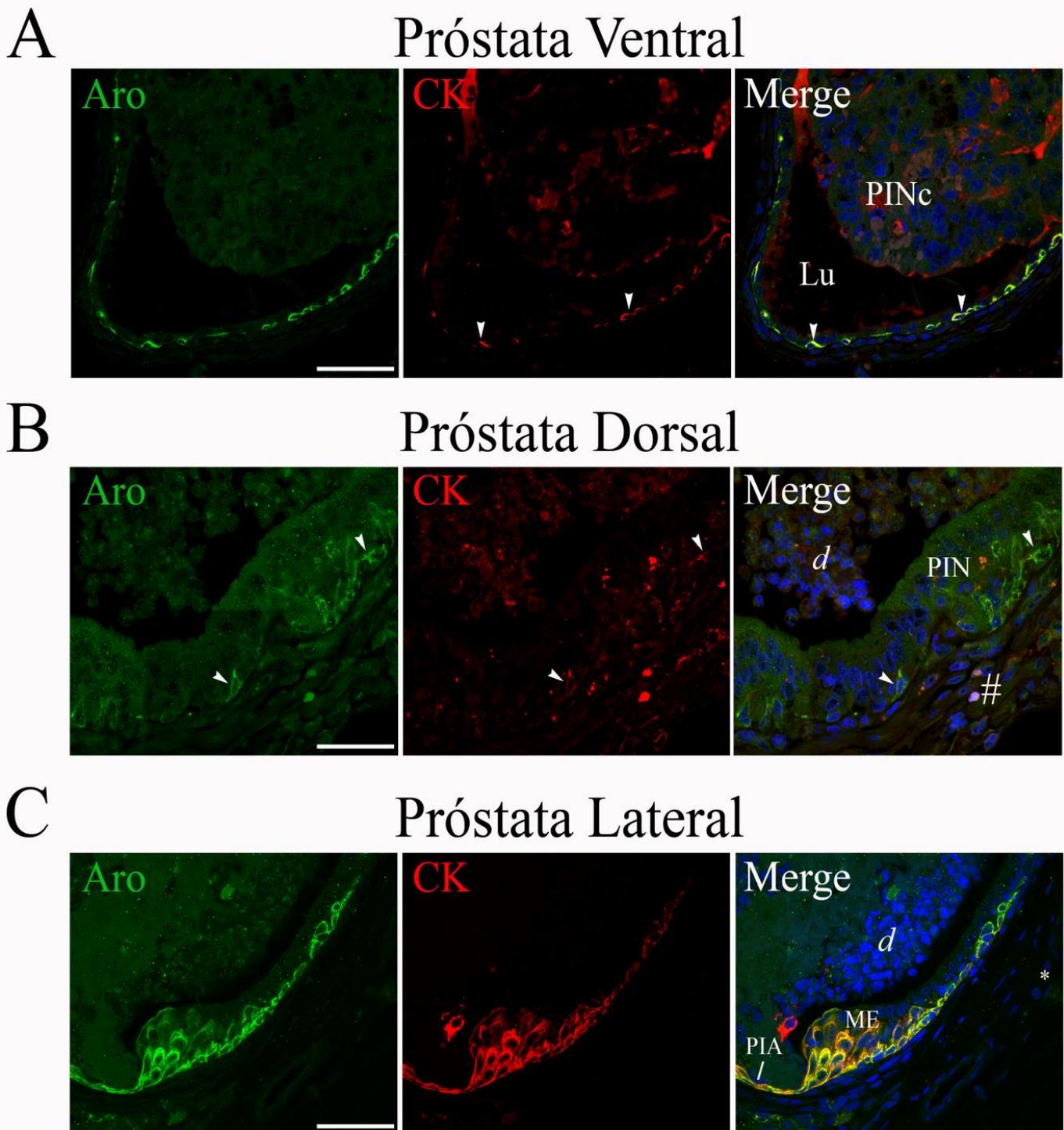


Figura 18: Colocalização de aromatase e células basais em áreas afetadas pelo envelhecimento na próstata ventral, dorsal e lateral de ratos Wistar entre 18 e 24 meses de idade. (A) Região de proliferação intraepitelial de arquitetura cribriforme (PINc) na próstata ventral. (B) Área de PIN na próstata dorsal. (C) Região peri-inflamatória (*) com concomitante foco de PIA e pequeno foco de metaplasia escamosa (ME) na próstata lateral. Aro: aromatase. CK: citoqueratina de alto peso molecular. Merge: sobreposição dos filtros verde, vermelho e azul (DAPI). Cabeças de setas: indicam células colocalizadas com os marcadores. d: debris celulares intraluminais. #: espessamento do estroma. Barra em A, B e C = 50 μ m. Verde (Fitc): aromatase; Vermelho (Cy3): CKHMW e Azul (DAPI): marcação nuclear.

2 Imunolocalização da enzima CYP7B1 no complexo prostático de ratos em envelhecimento

Intensa imunorreatividade citoplasmática foi detectada para a enzima CYP7B1 no epitélio glandular das próstatas ventral, dorsal, lateral e anterior (Fig. 19). As células musculares lisas periacinares e da parede dos vasos sanguíneos, além de algumas células do estroma e as células endoteliais também foram positivas para a CYP7B1, enquanto que as células basais foram intermitentes. Algumas células epiteliais cilíndricas, provavelmente as células neuroendócrinas, apresentaram-se negativas para essa proteína (Insero Fig. 19 A).

Com o envelhecimento não foi detectada alteração da expressão de CYP7B1 em nenhum dos lobos prostáticos, considerando-se as áreas de epitélio normal e regiões de hiperplasia (Fig. 19). No entanto, na próstata ventral, as áreas de proliferação epitelial com arquitetura cribriforme parcialmente (Fig. 19 C) ou completamente obstrutiva (Fig. 19 D), apresentaram perceptível redução da expressão de CYP7B1, quando comparado a áreas de epitélio normal adjacente. As áreas epiteliais contendo células com atípias nucleares e algumas áreas de atrofia epitelial também apresentaram marcante redução da positividade para a proteína (Fig. 19 C e inserto). Na próstata lateral redução de CYP7B1 foi detectada em áreas proliferativas intimamente associadas a focos de inflamação, onde também foi possível detectar espessamento do estroma adjacente (Fig. 19 K).

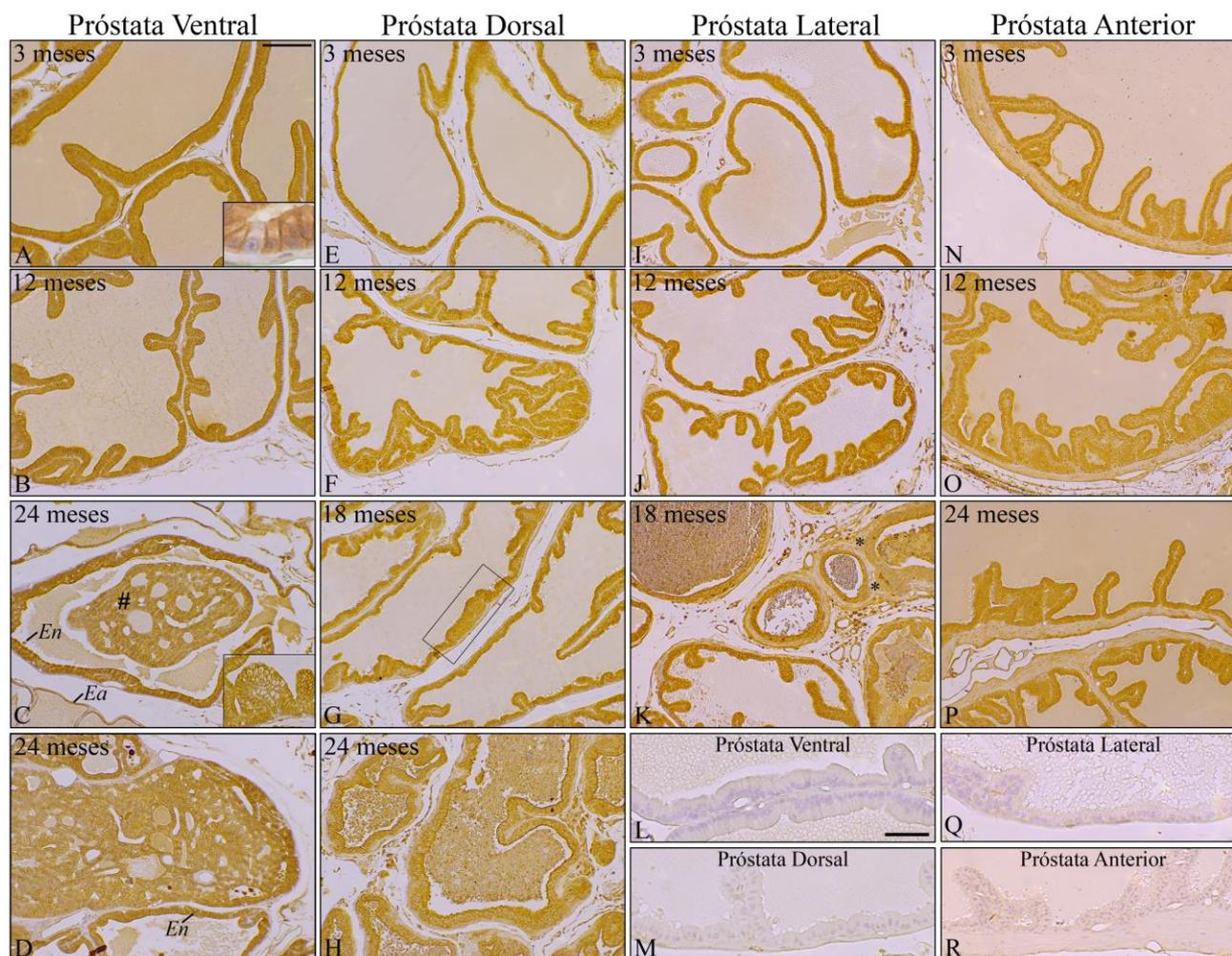


Figura 19: Imunolocalização da enzima CYP7B1 na próstata ventral (A-D), dorsal (E-H), lateral (I-K) e anterior (N-P) de ratos em diferentes idades. (A, E, I e N) Animais jovens com intensa positividade do epitélio glandular. Inseto em A: Detalhe de célula cilíndrica imunonegativa. (B, F, J, O e P) Áreas hiperplásicas em animais senis com mesmo padrão de imunorreatividade detectado nos animais jovens. (C) Proliferação intraluminal cribriforme parcialmente obstrutiva (#) e área de epitélio atrófico adjacente (Ea) com perceptível redução de marcação, comparado ao epitélio normal (En). Inseto representa proliferação intraepitelial contendo células atípicas com redução da positividade para a enzima. (D) Proliferação intraluminal cribriforme completamente obstrutiva com perceptível redução de marcação. (G) Adenômero contendo pequeno foco de estratificação epitelial (área delimitada) e em (H) Extensa área de estratificação sem alteração da intensidade de marcação para a proteína. (K) Redução da imunomarcagem em área intimamente associada à inflamação, exibindo espessamento do estroma adjacente (*). (L, M, Q e R) Controles negativos da imunorreacção da próstata ventral, dorsal, lateral e anterior, respectivamente. En = epitélio normal; Ea = epitélio atrófico. Barra em A (= B-P) = 150 μ m. Barra em L (= M, Q e R) = 50 μ m.

3 Tratamento de ratos senis com 3 β -diol

3.1 Peso corporal e do complexo prostático

- Tratamento de ratos senis nas doses de 1 e 3 mg de 3 β -diol durante 42 dias

Não houve alteração do peso corporal entre os grupos controles e tratados nas doses de 1 e 3 mg de 3 β -diol (Fig. 20 A). O tratamento com 3 β -diol na dose de 1 mg/Kg promoveu redução do peso da próstata ventral e dorsal, enquanto que na próstata anterior houve redução do peso nas duas doses administradas. A próstata lateral não apresentou alteração de seu peso em nenhum dos tratamentos (Fig. 20 B-E).

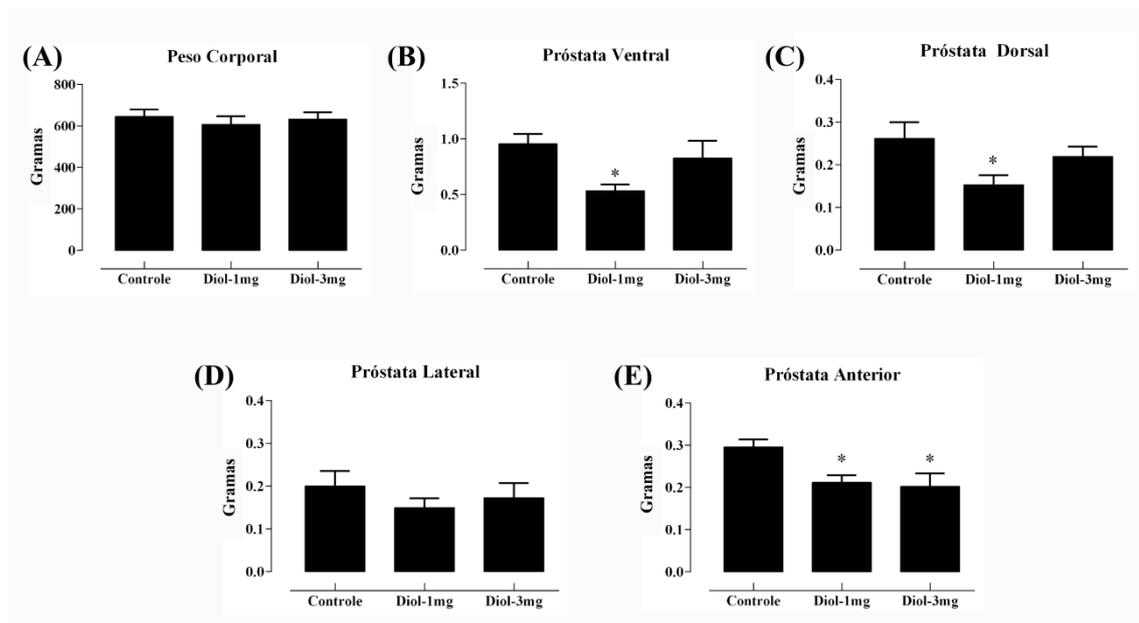


Figura 20: Análise do peso corporal (A) e do complexo prostático (B-E) de ratos senis controles e tratados com 3 β -diol nas doses de 1 e 3 mg. n = 5; * = p \leq 0,05 em relação ao grupo controle.

- Tratamento de ratos senis na dose de 5 mg de 3 β -diol durante 42 dias

Não houve alteração no peso corporal entre os grupos controles e tratados com dose de 5 mg de 3 β -diol (Fig. 21 A). Em todos os lobos prostáticos foi detectado aumento significativo do peso absoluto das glândulas nos animais tratados. (Fig. 21 B-E).

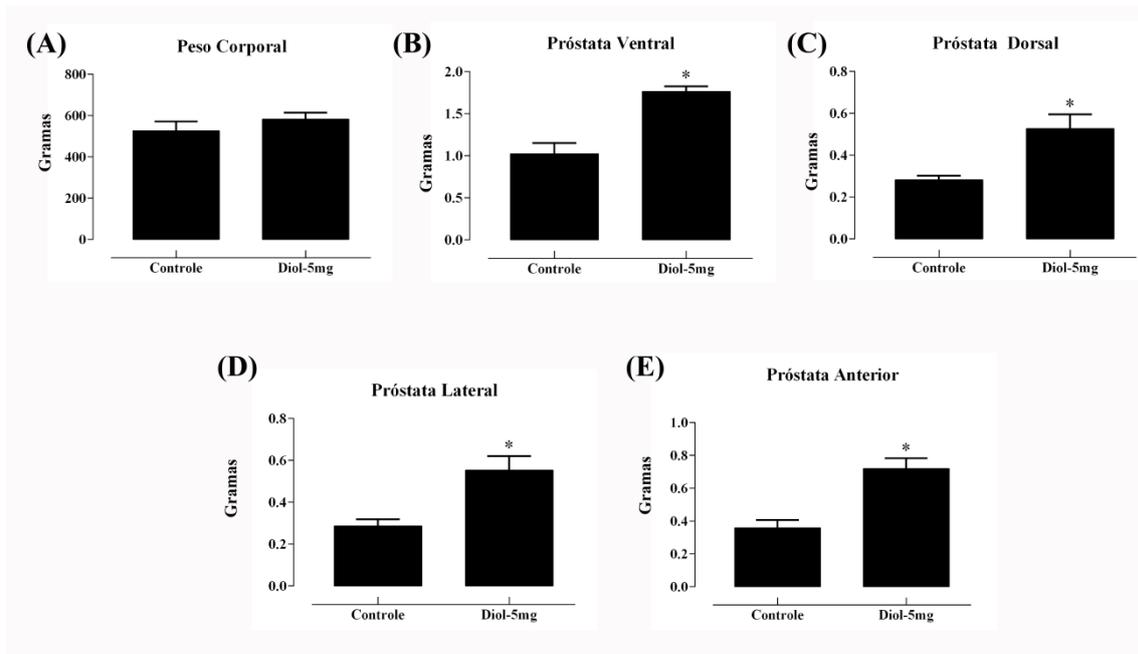


Figura 21: Análise do peso corporal (A) e do complexo prostático (B-E) de ratos senis controles e tratados na dose de 5 mg de 3β -diol. n = 5; * = $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle.

- Tratamento de ratos senis na dose de 3 mg de 3β -diol durante 60 dias

Assim como nos tratamentos descritos anteriormente, o peso corporal não se alterou com o tratamento de 3 mg de 3β -diol por um período prolongado (Fig. 22 A). Em todos os lobos prostáticos foi detectado aumento do peso absoluto das glândulas nos animais tratados (Fig. 22 B-E).

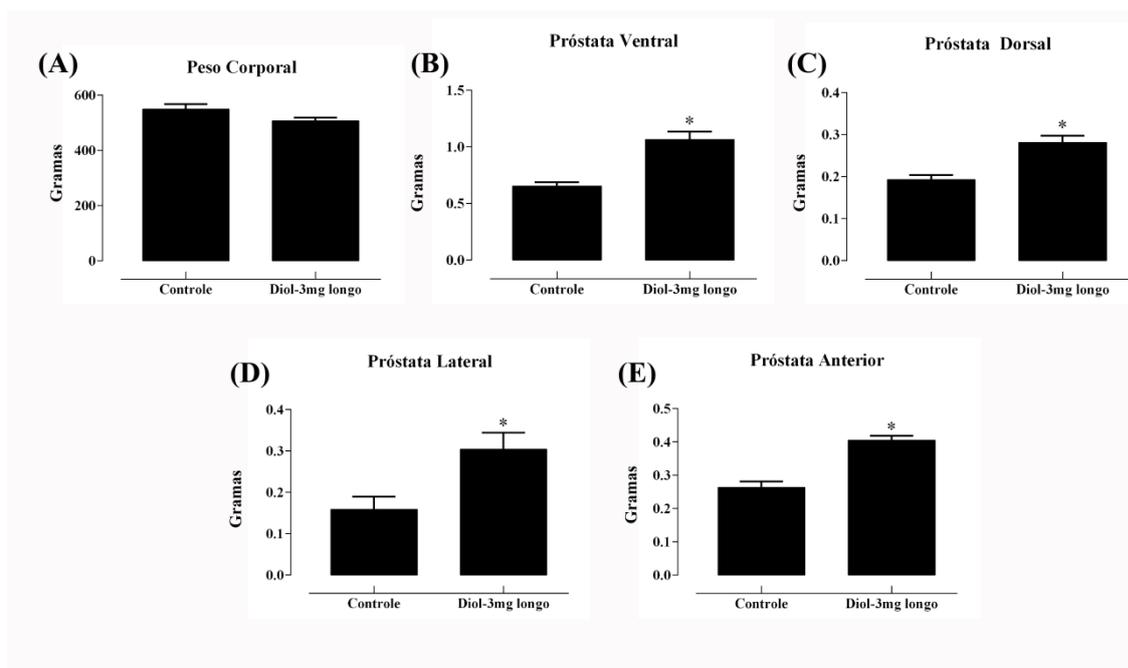


Figura 22: Análise do peso corporal (A) e do complexo prostático (B-E) de ratos senis controles e tratados na dose de 3 mg de 3β -diol por 60 dias. $n = 5$. * = $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle.

3.2 Histopatologia do complexo prostático

O efeito do tratamento com 3β -diol na histopatologia prostática foi mais evidente na próstata ventral, uma vez que as alterações relacionadas ao envelhecimento foram mais pronunciadas neste lobo nos animais controles. Estas alterações relacionadas à senilidade foram similares às alterações já descritas anteriormente (Morais-Santos et al, 2015), como a presença de concreções intraluminais, hiperplasias e atrofia epiteliais, atipias celulares intensas, proliferações intraepiteliais de arquitetura cibriforme intraluminais e adenômeros com menor e/ou ausência de secreção no interior do lúmen (Fig. 23 A, D e F). Todos os tratamentos realizados com 3β -diol promoveram melhora substancial na citoarquitetura da próstata ventral, que apresentou menor proporção de adenômeros com hiperplasias (redução variando de 43% a 78%) e atrofia (redução de 40%), aparente aumento da atividade secretora da glândula, perceptível pela presença de adenômeros com maior diâmetro luminal (aumento variando de 52% a 103%) e repletos de secreção homogênea eosinofílica, além de redução de concreções intraluminais (Fig. 23 B, C, E, G, J e L). Ressalta-se que a proporção de adenômeros atróficos não atingiu significância estatística devido ao amplo desvio padrão, considerando que alguns animais não apresentaram atrofia epitelial. Houve também menor ocorrência de atipias celulares, o que resultou em epitélios mais homogêneos (Fig. 24 H e I).

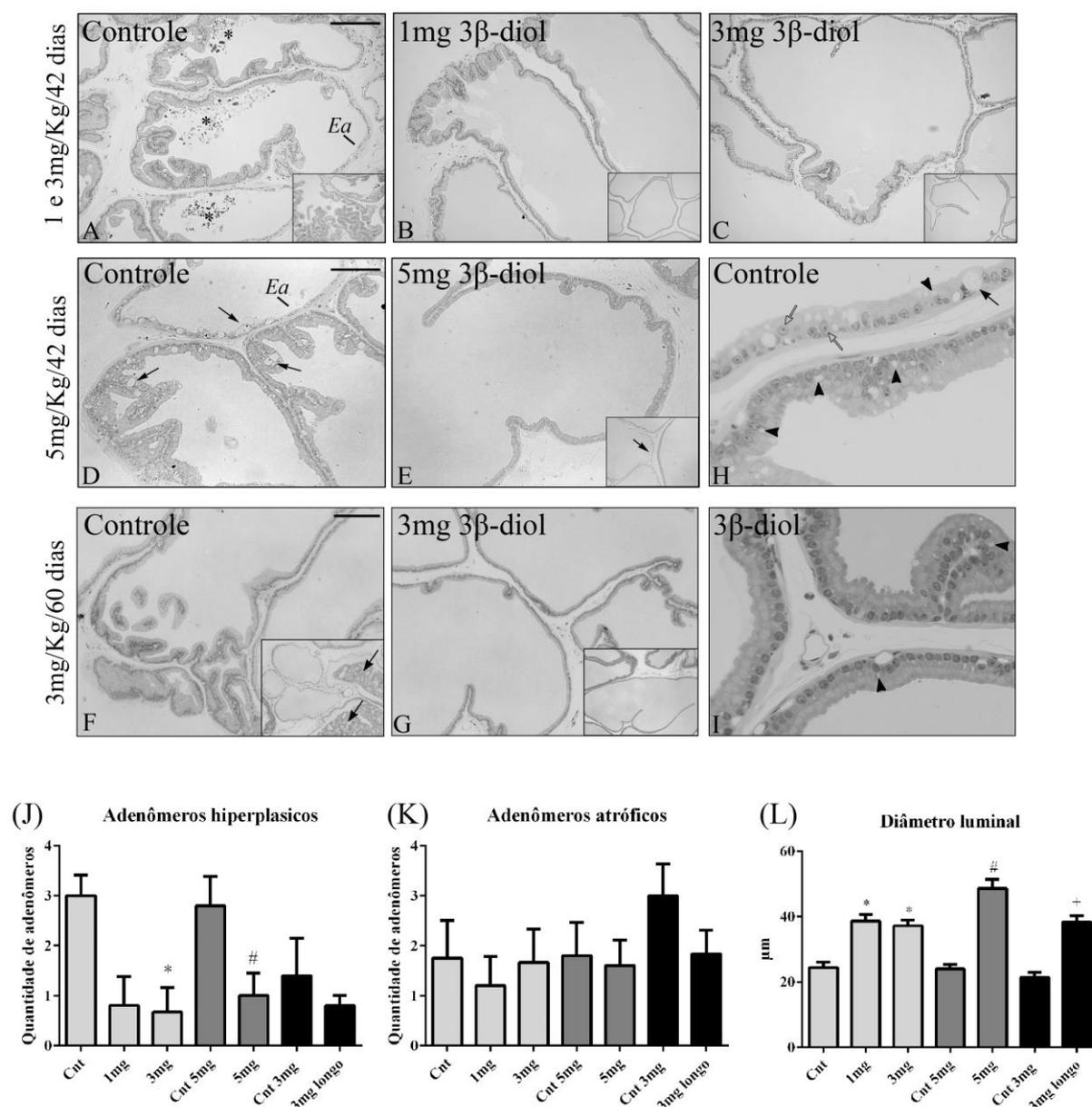


Figura 23: Histopatologia da próstata ventral de ratos senis submetidos a diferentes regimes de administração de 3β -diol. **(A, D e F)** Próstata ventral de animais controles apresentando áreas de hiperplasia, epitélio atrófico (Ea), concreções luminais (*) e secreção luminal escassa e/ou ausente. Inseto em A: área de intenso pregueamento epitelial. Inseto em F: adenômeros atróficos adjacentes às áreas de proliferação intraepitelial cribriforme intraluminal (setas). **(B, C, E e G)** Próstata ventral de animais tratados com 3β -diol, mostrando evidente melhora da histologia do tecido, tais como redução do pregueamento epitelial e conteúdo luminal abundante nos adenômeros. Os insetos representam áreas de adenômeros repletos de secreção com consequente compressão do epitélio. Barra em A (= B e C) = 200 μ m, barra em D (= E) = 150 μ m, barra em F (= G) = 200 μ m. Corado por H&E. **(H)** Detalhe do aspecto histológico do epitélio de um animal controle, contendo abundantes vacúolos citoplasmáticos (cabeças de seta), nucléolos proeminentes (setas vazadas) e células com acúmulo mucóide no citoplasma (seta preta). **(I)** Detalhe do aspecto histológico de animal tratado com 3β -diol com epitélio mais homogêneo, contendo poucas atipias celulares. **(J, K e L)** Morfometria das áreas de hiperplasia, atrofia e diâmetro luminal, respectivamente. *, # e + = $p \leq 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo controle. n (morfometria) = 4-6.

Na próstata dorsal, embora as alterações morfológicas relacionadas à idade sejam menos marcantes comparadas à próstata ventral, foi possível detectar significativa redução de 83% e 75% da frequência de adenômeros hiperplásicos nas doses de 3mg (42 dias) e 5mg, respectivamente, além de aparente aumento da atividade secretora da glândula pelo aumento do diâmetro luminal detectado em todas as doses administradas (aumento variando de 37% a 44%) (Fig. 24).

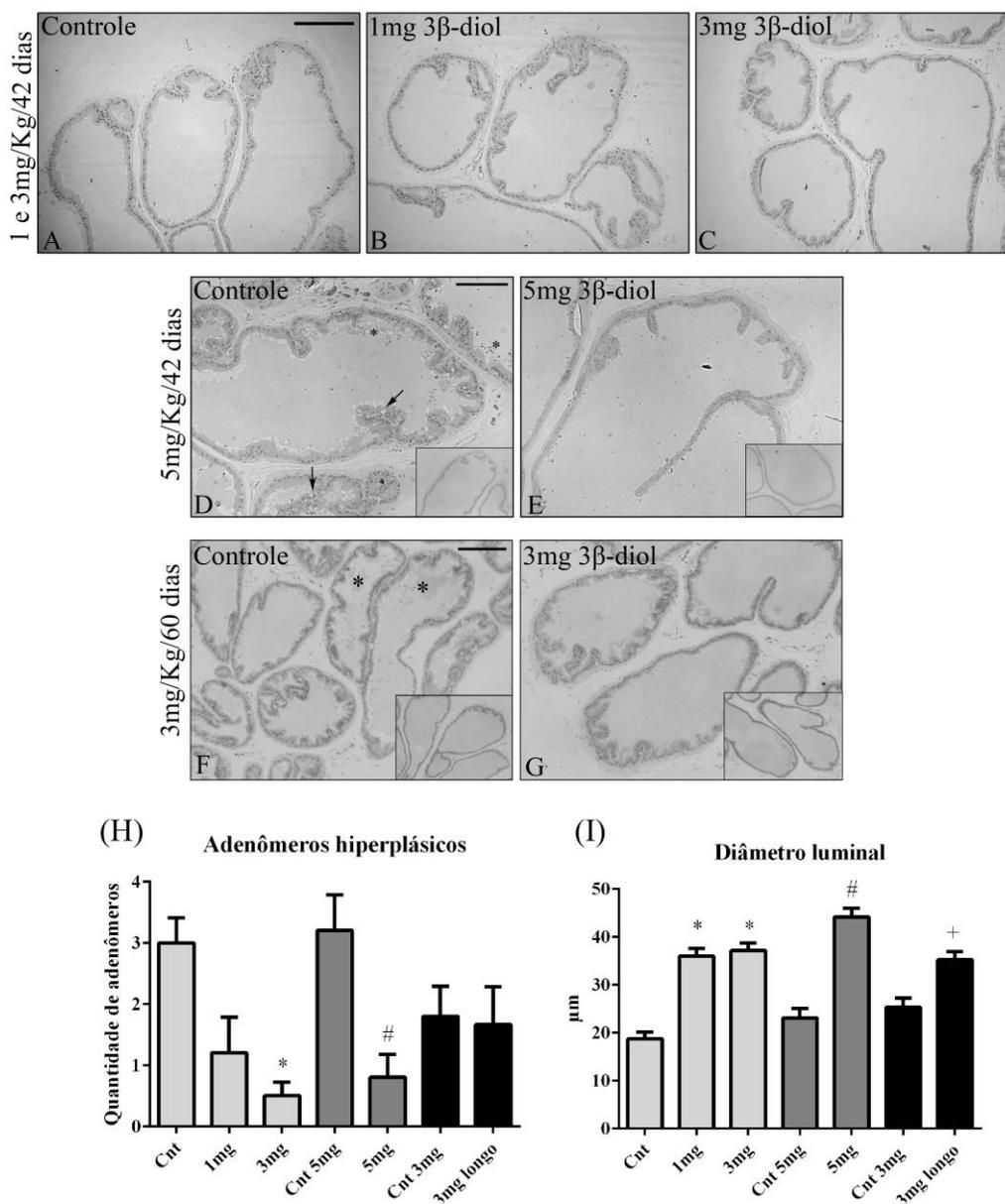


Figura 24: Histopatologia da próstata dorsal de ratos senis submetidos a diferentes regimes de administração de 3β -diol. **(A, D e F)** Próstata dorsal de animais controles apresentando discreta (A) e moderada hiperplasia (D e F). **(B, C, E e G)** Próstata dorsal de animais tratados com 3β -diol. Insertos representam áreas de adenômeros com pouca ou nenhuma hiperplasia. Barra em A (= B e C) = 200 μ m, barra em D (=E) = 150 μ m, barra em F (= G) = 200 μ m. Corado por H&E. **(H e I)** Morfometria das áreas de hiperplasia e diâmetro luminal, respectivamente. *, # e + = $p \leq 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo controle. n (morfometria) = 4-6.

Na próstata lateral, as alterações morfológicas relacionadas com idade também foram menos marcantes comparadas à próstata ventral, o que também não impediu de verificar os efeitos do tratamento neste lobo. O tratamento com 3β -diol promoveu significativa redução de 88% das áreas de hiperplasia na dose de 5mg e aumento do diâmetro luminal nas doses de 5mg e 3mg por período prolongado (aumento variando de 44% a 88%) (Fig. 25). A exposição à dose de 5 mg foi capaz de prevenir o aparecimento de focos inflamatórios o que não foi impedido com a dose de 3 mg por período prolongado (Fig. 25 E e G).

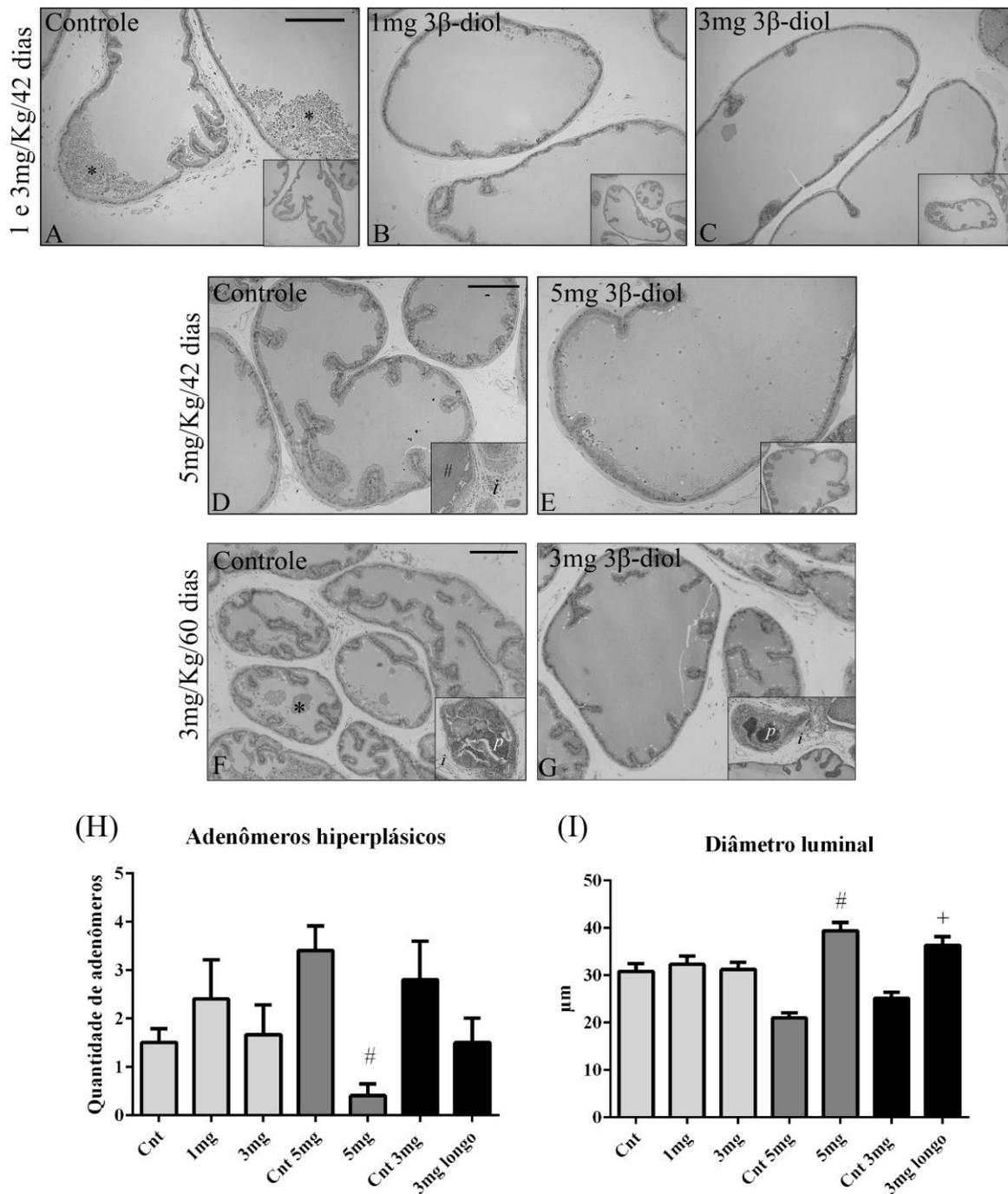


Figura 25: Histopatologia da próstata lateral de ratos senis submetidos a diferentes regimes de administração de 3β-diol. **(A, D e F)** Próstata lateral de animais controles com características relacionadas à senilidade, como presença de pregueamento epitelial e células descamadas (*). Inseto em D e F representa área com foco inflamatório (*i*), contendo abundante concreção (#) e prostatite intraluminal (*p*). **(B, C, E e G)** Próstata lateral de animais tratados com 3β-diol. Os demais insetos representam áreas de adenômeros repletos de secreção e com pouco pregueamento do epitélio. Barra em A (= B e C) = 200 µm, barra em D (=E) = 150 µm, barra em F (= G) = 200 µm. Corado por H&E. **(H e I)** Morfometria das áreas de hiperplasia e diâmetro luminal, respectivamente. # e + = $p \leq 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo controle. n (morfometria) = 4-6.

3.3 Expressão de ER β no complexo prostático

a. Imunohistoquímica

Foi detectada intensa positividade para ER β no epitélio glandular dos lobos ventral dorsal (Fig. 26, 27 e 28), e anterior (dados não mostrados), além de moderada positividade citoplasmática em todos os tratamentos. Corroborando dados anteriores (Morais-Santos et al, 2015), as áreas de atrofia epitelial, apresentaram reduzida positividade para ER β , quando comparado ao epitélio normal adjacente (Fig. 26 A, Fig. 27 A e Fig. 28 A). Tanto nas áreas de epitélio normal, quanto nas áreas de atrofia epitelial dos diferentes grupos, foi detectado aumento significativo na expressão de ER β após tratamento nas doses de 3 mg e 5 mg por 42 dias (Fig. 26A e Fig. 27 A).

Embora não tenha sido realizada análise morfométrica para a próstata dorsal, aparentemente não foi observada alteração na expressão do receptor entre os grupos tratados.

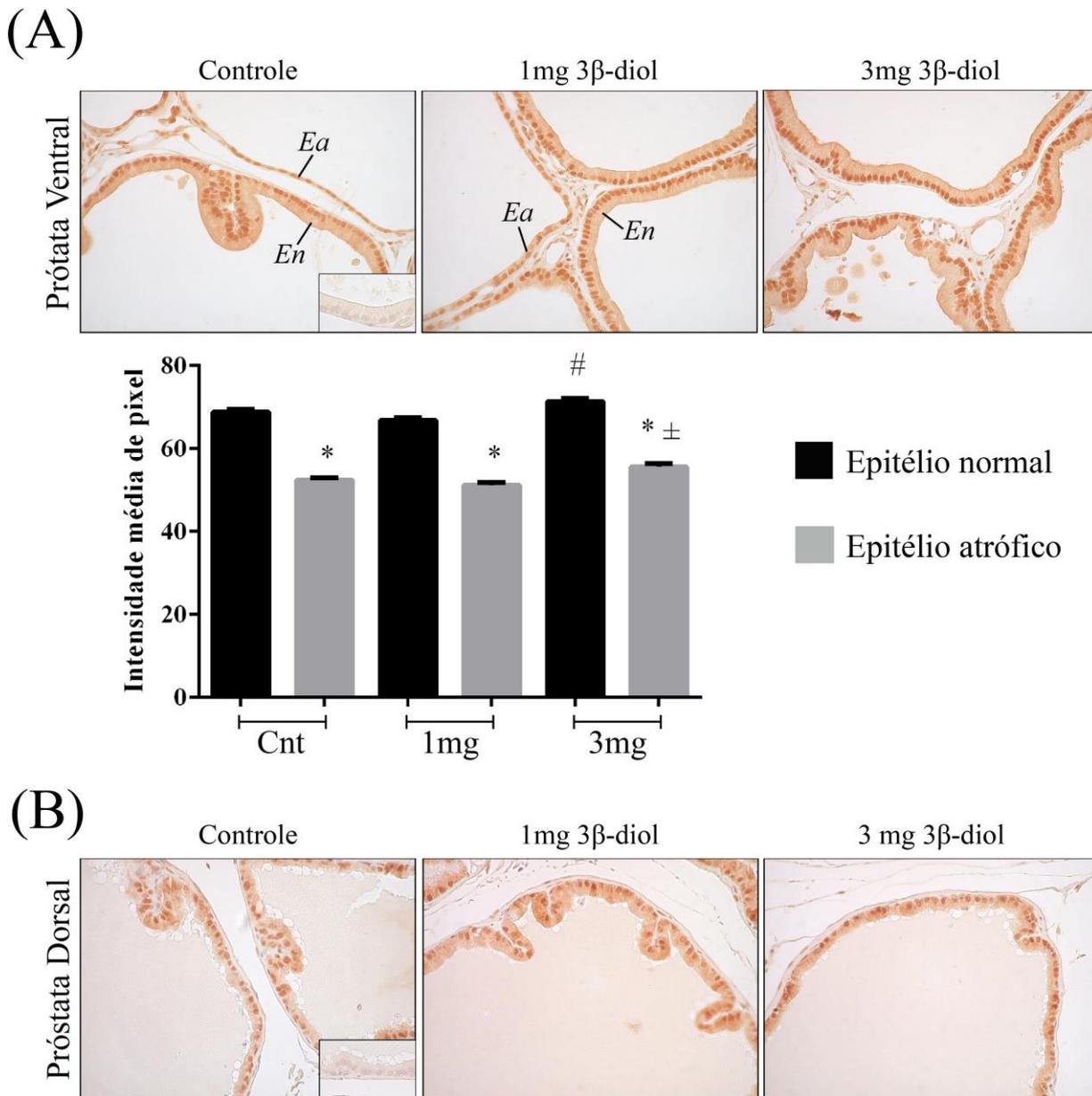


Figura 26: Imunomarcção para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos senis tratados ou não com 3 β -diol, nas doses de 1 e 3 mg por 42 dias. **(A)** Próstata ventral de animais controle e tratados com 3 β -diol apresentando imunoreatividade característica para o receptor, nas áreas de epitélio normal (En) e atrófico (Ea). Representação gráfica da análise morfométrica da intensidade média de pixel nas áreas de epitélio normal e atrófico. **(B)** Próstata dorsal de animais controle e tratados com 3 β -diol apresentando imunoreatividade semelhante para o receptor entre os grupos. Inseto: controle negativo da imunorreação. n = 4 a 5 por grupo. * = p \leq 0,05 em relação ao epitélio normal. # = p \leq 0,05 em relação ao epitélio normal de controles. \pm = p \leq 0,05 em relação ao epitélio atrófico de controles.

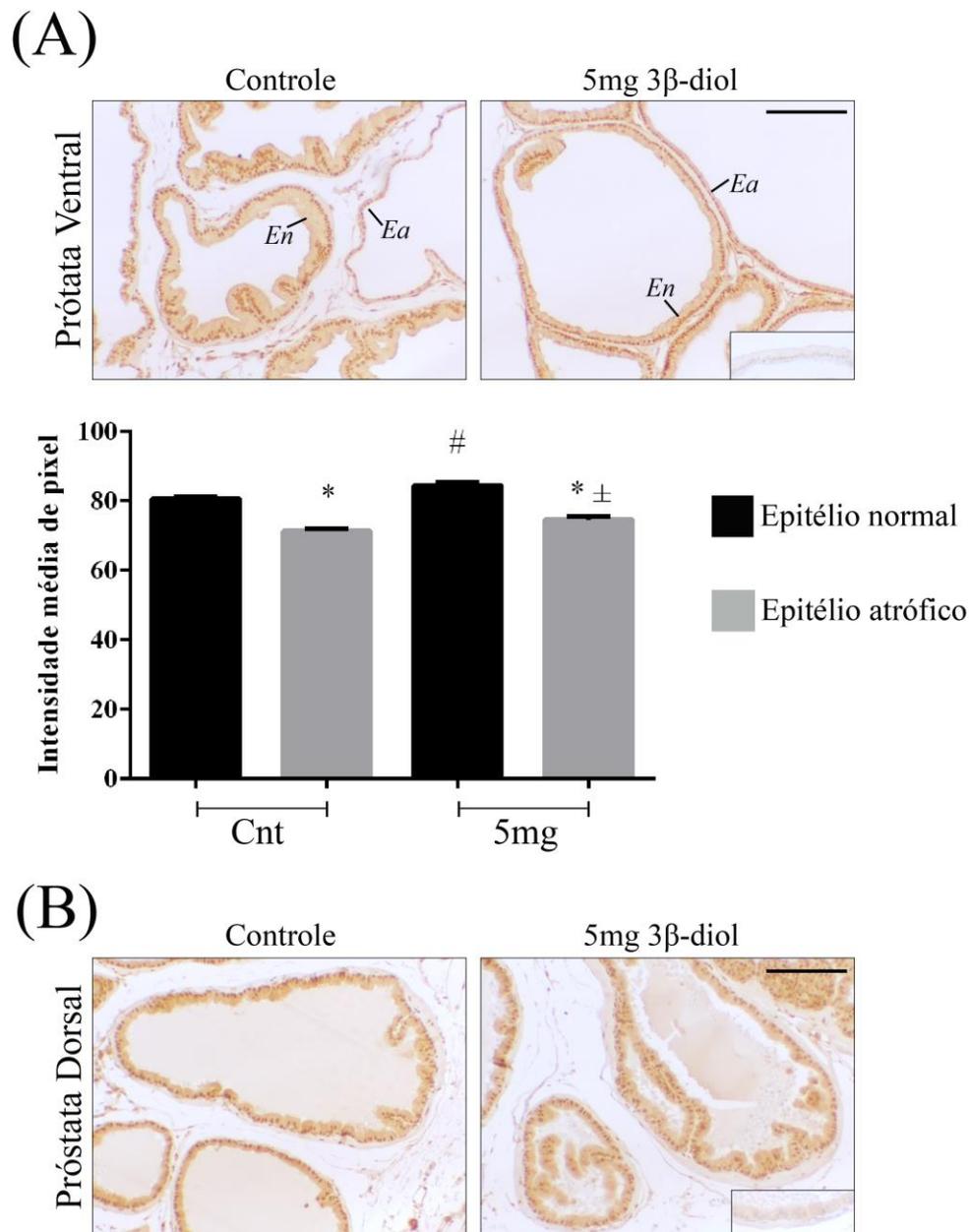


Figura 27: Imunomarcção para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos senis tratados ou não com 3 β -diol, na dose de 5 mg por 42 dias. (A) Próstata ventral de animais controle e tratados com 3 β -diol apresentando imunoreatividade característica para o receptor, nas áreas de epitélio normal (En) e atrófico (Ea). Representação gráfica da análise morfométrica da intensidade média de pixel nas áreas de epitélio normal e atrófico. (B) Próstata dorsal de animais controle e tratados com 3 β -diol apresentando imunoreatividade semelhante para o receptor ente os grupos. Inseto: controle negativo da imunorreação. n = 4 a 5 por grupo. * = p \leq 0,05 em relação ao epitélio normal. # = p \leq 0,05 em relação ao epitélio normal de controles. \pm = p \leq 0,05 em relação ao epitélio atrófico de controles. Barra em A e B = 150 μ m.

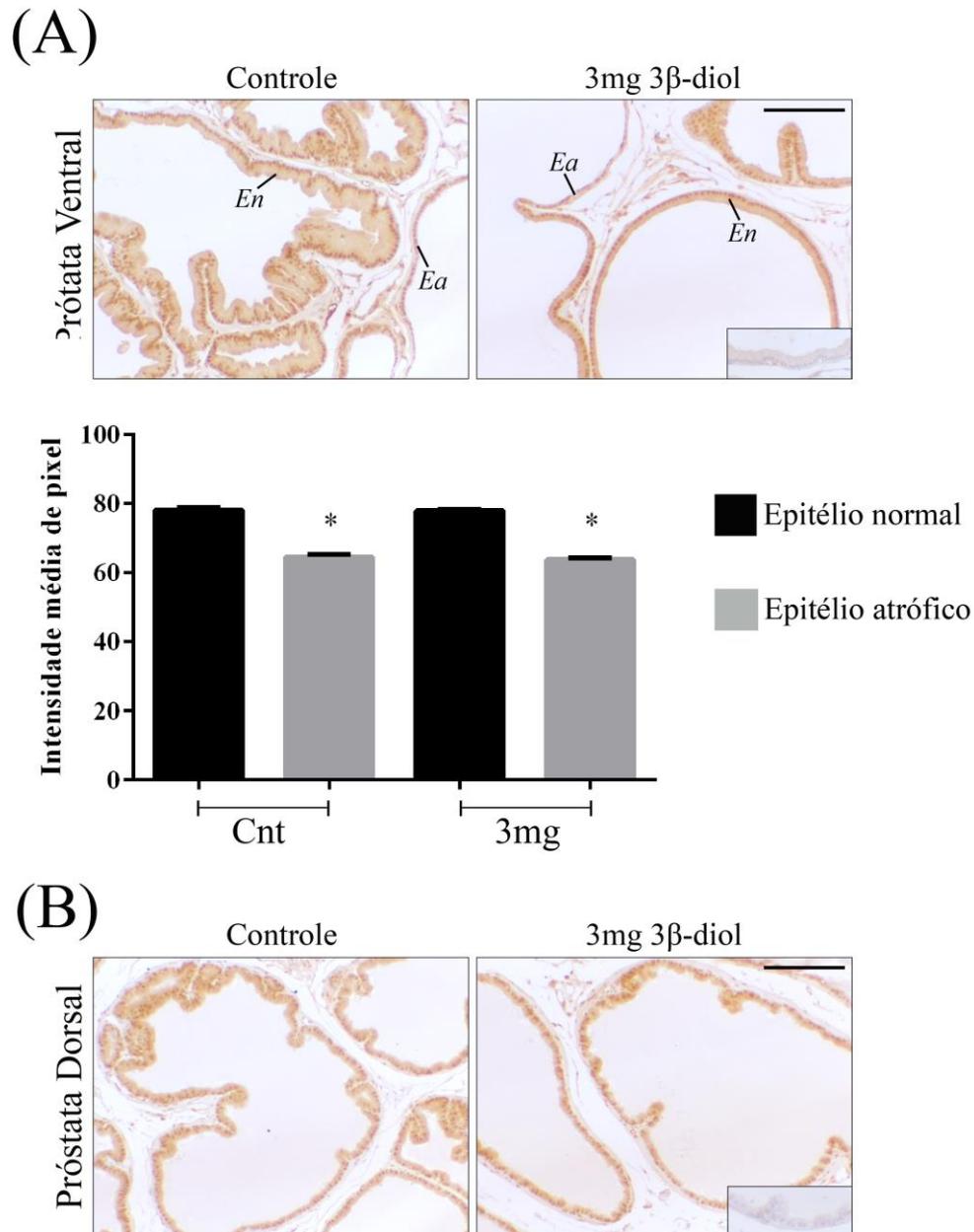


Figura 28: Imunomarcção para ER β na próstata ventral e dorsal de ratos senis tratados ou não com 3 β -diol, na dose de 3 mg por 60 dias. (A) Próstata ventral de animais controle e tratados com 3 β -diol apresentando imunoreatividade característica para o receptor, nas áreas de epitélio normal (En) e atrófico (Ea). Representação gráfica da análise morfométrica da intensidade média de pixel nas áreas de epitélio normal e atrófico. (B) Próstata dorsal de animais controle e tratados com 3 β -diol apresentando imunoreatividade semelhante para o receptor ente os grupos. Inseto: controle negativo da imunorreação. n = 4 a 5 por grupo. * = $p \leq 0,05$ em relação ao epitélio normal. Barra em A e B = 150 μ m.

b. Western blotting

De forma reprodutível aos dados anteriores (Morais-Santos et al 2015), foi detectada uma banda de 54 kDa compatível com o peso molecular descrito para ERβ de ratos e uma segunda banda de 50 kDa, que co-migrou com a banda principal (Fig. 29). Na próstata ventral, a análise estatística da intensidade média de pixels das bandas detectou diferença significativa em ambos os tratamentos de 3 mg e também no tratamento de 5mg comparado aos seus controles (Fig. 29 B). Na próstata dorsal, as bandas apresentaram-se mais homogêneas entre os grupos, não havendo diferença significativa entre os animais tratados e seus respectivos controles (Fig. 29 D).

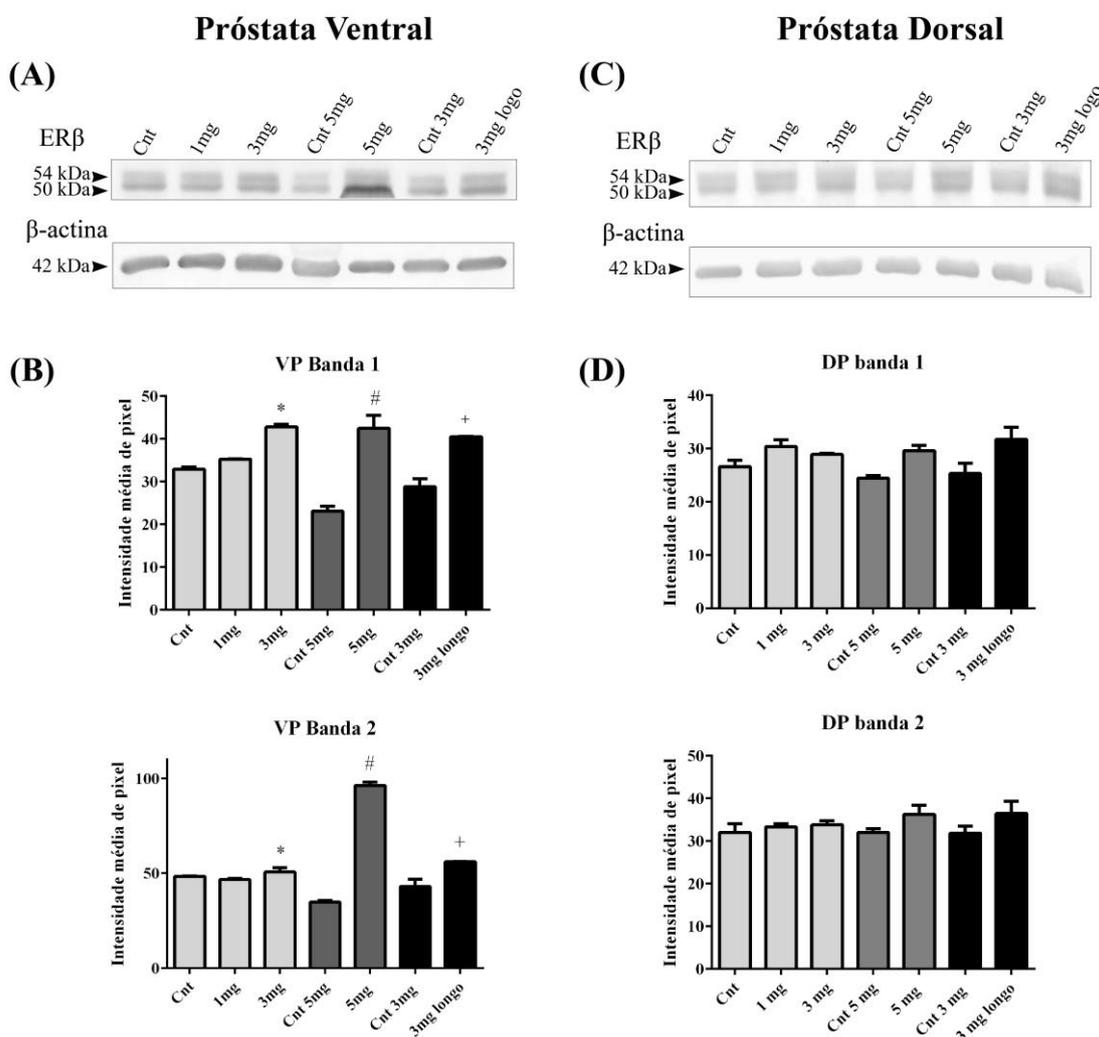


Figura 29: Western blotting para o receptor de estrógenos ERβ extraído da próstata ventral e dorsal de ratos Wistar senis de todos os tratamentos realizados com 3β-diól. (A e B) Banda dupla obtida no ensaio da próstata ventral e dorsal, respectivamente. (B e D) Representação gráfica das análises densitométricas das bandas de 54 (banda 1) e 50 (banda 2) kDa, obtidas para próstata ventral e dorsal, respectivamente. β-actina foi usada como controle interno em todos os ensaios. As bandas obtidas são representativas de 3 diferentes ensaios. # = p < 0.05 em relação ao grupo controle. n = 3 por grupo.

3.4 Proliferação celular e apoptose

Poucas células MCM7 positivas foram detectadas no epitélio prostático dos animais controles. As células positivas apresentaram-se distribuídas de forma esparsa pelo epitélio ou concentradas em pequenos grupos em focos de PIN, comumente detectadas em animais acima de 12 meses de idade, como anteriormente descrito (Morais-Santos et al, 2015). A taxa de proliferação foi significativamente reduzida após exposição ao 3β -diol nas doses de 1 e 3 mg (42 dias) em praticamente todos os lobos prostáticos, exceto na próstata dorsal na dose de 1mg, onde a redução não alcançou significância estatística. O tratamento por período prolongado promoveu redução da proliferação apenas na próstata ventral e anterior, enquanto que a exposição ao 3β -diol em doses elevadas promoveu aumento na taxa de proliferação na próstata dorsal (Fig. 30).

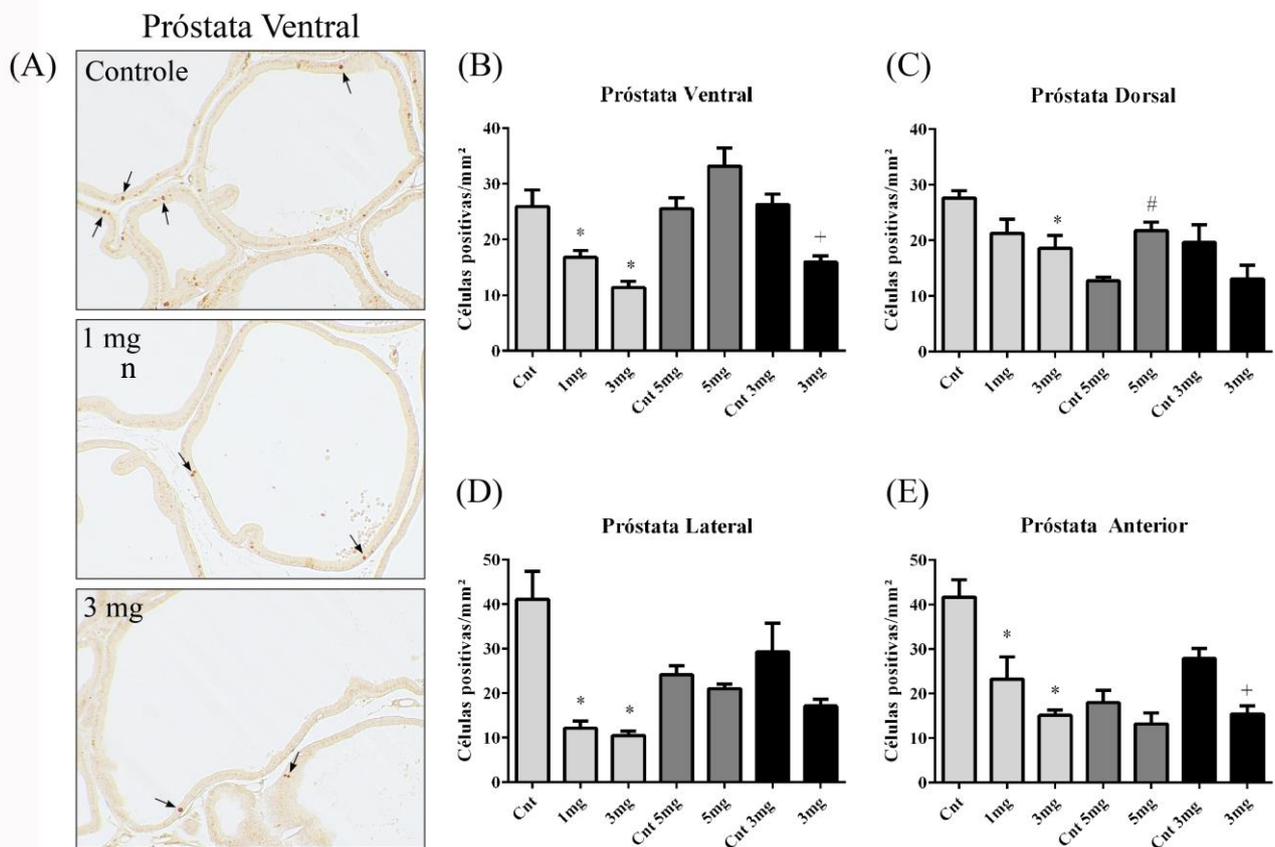


Figura 30: Taxas de proliferação celular no complexo prostático de ratos senis submetidos a diferentes regimes de tratamento com 3β -diol. (A) Imagens da imunoreatividade para MCM7 (setas) representado pela próstata ventral de animais submetidos às doses de 1 e 3 mg/Kg/42 dias. (B-E) Quantificação das células MCM7 positivas na próstata ventral, dorsal, lateral e anterior, respectivamente. *, # e + = $p < 0.05$ em relação ao seu respectivo grupo controle. n = 4-5 por grupo.

Em relação às taxas de apoptose, poucas células TUNEL positivas foram encontradas no epitélio prostático dos animais controles e tratados com 3-diol. Entretanto, houve aumento significativo no número de células TUNEL positivas em todos os lobos prostáticos dos animais tratados com 3β-diol na dose de 3 mg/Kg por 42 e 60 dias. A exposição à dose mais alta do esteroide (5 mg) não promoveu alterações significativas de morte celular em nenhum dos lobos prostáticos. Adicionalmente, o tratamento na dose de 1 mg promoveu aumento significativo da taxa de apoptose na próstata ventral e dorsal, porém foi inefetivo em alterar estas taxas na próstata anterior e lateral (Fig. 31).

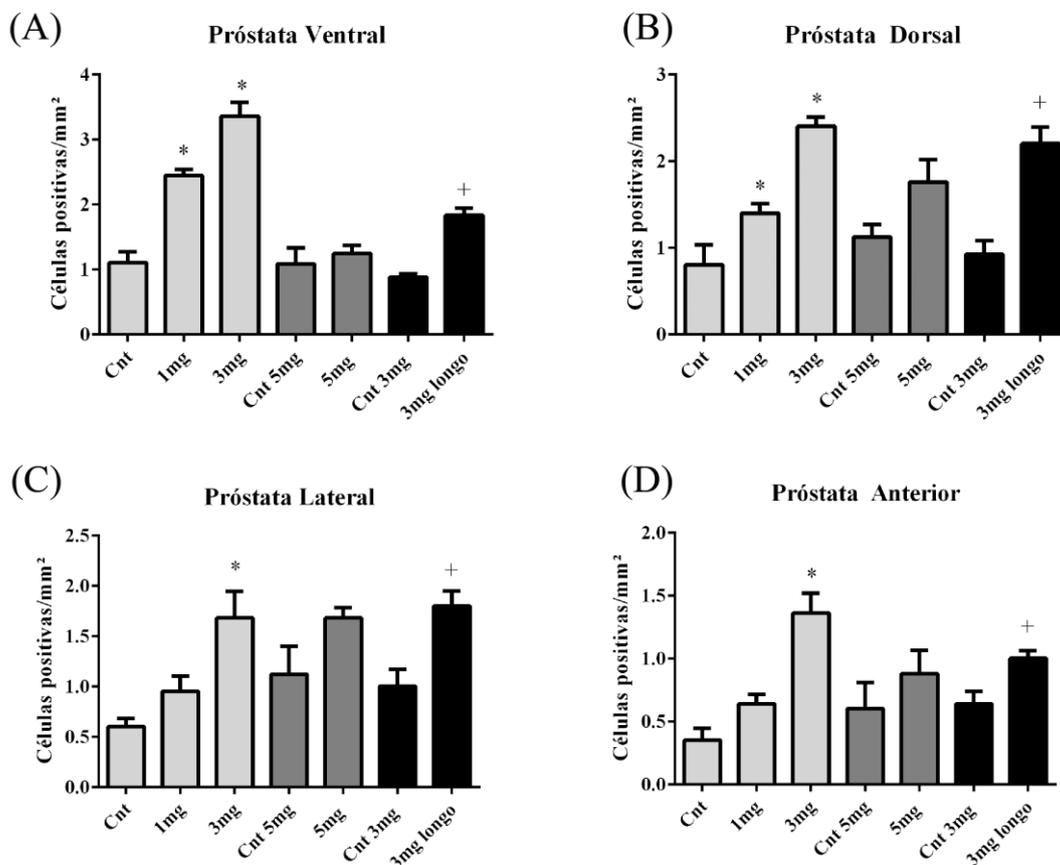


Figura 31: Taxas de morte celular no complexo prostático de ratos senis submetidos a diferentes regimes de tratamento com 3β-diol. (A-D) Quantificação dos números de células TUNEL positivas na próstata ventral, dorsal, lateral e anterior, respectivamente. *, # e + = $p < 0.05$ em relação ao seu respectivo grupo controle. n = 4-5 por grupo.

3.5 Níveis de DHT no plasma e na próstata ventral

Foi realizada dosagem de DHT a fim de verificar se os efeitos observados do tratamento são de fato devido ao 3β -diol ou de uma possível retro-conversão deste hormônio para DHT.

Os níveis plasmáticos de DHT aumentaram nos animais tratados com 3β -diol nas doses de 5 mg e 3 mg por um período prolongado (Fig. 32 A). Por outro lado, os níveis teciduais se mantiveram constantes nos diferentes tratamentos (Fig. 32 B).

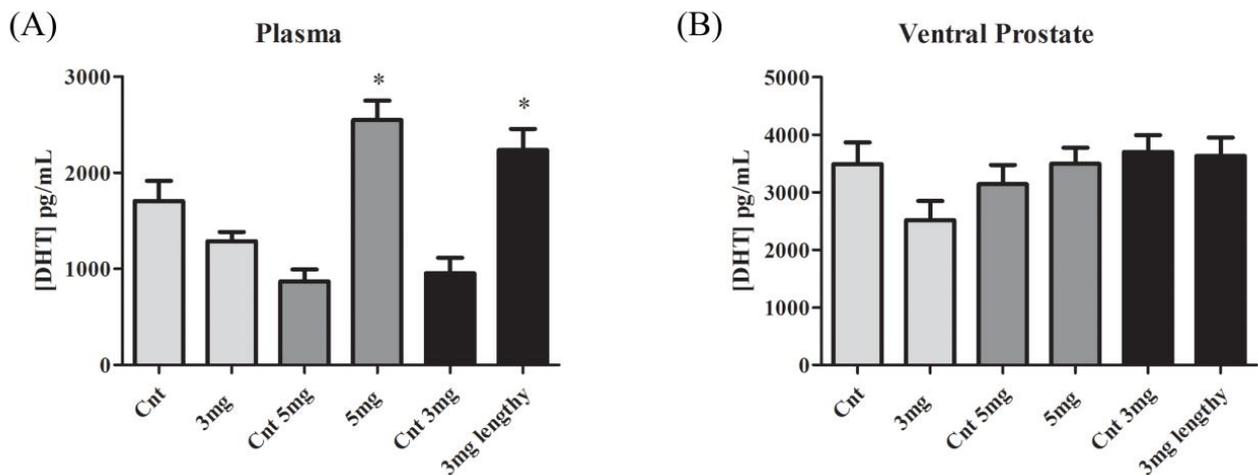


Figura 32: Níveis hormonais de diidrotestosterona (DHT) no plasma (A) e na próstata ventral (B) de ratos idosos tratados ou não com 3β -diol. Os dados são representativos de 3 diferentes ensaios. * = $p \leq 0.05$ em relação ao respectivo grupo controle de tratamento. $n = 3$ por grupo.

VI. DISCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO

CAPÍTULO I – Artigo publicado

Alterações na expressão do Receptor de Estrógeno ER β (ESR2) sem alterações nos níveis de estradiol na próstata de ratos em envelhecimento

Ratos Wistar em diferentes idades (3, 6, 12, 18 e 24 meses) foram utilizados para estudo do envelhecimento na histologia do complexo prostático, assim como no padrão de expressão do receptor de estrógeno ER β , perfil de proliferação celular e expressão de enzimas esteroideogênicas como aromatase e CYP7B1. A partir dos 12 meses de idade foram observadas marcantes alterações histológicas no complexo prostático, tais como hiperplasia, focos de proliferação intraepitelial e atipias nucleares em todos os lobos prostáticos, além de atrofia do epitélio exclusivamente na próstata ventral e focos inflamatórios especialmente na próstata lateral. Em relação a expressão de ER β , foi detectada redução de sua expressão em áreas específicas, como nos focos de proliferação intraepitelial, atipias celulares e atrofia do epitélio. Estes resultados corroboram dados acerca da redução da expressão de ER β em áreas focais de lesões pré-malignas e malignas em humanos e cães, sugerindo que o silenciamento deste receptor pode estar diretamente relacionado com as patologias que acometem a próstata.

Foi possível detectar alterações na estrutura glandular em todos os lobos analisados. Concreções intraluminais, hiperplasia do epitélio, atipias nucleares e neoplasias intraepiteliais foram alterações morfológicas comumente detectadas em todos os lobos. A próstata ventral foi o lobo mais afetado com a idade, que em adição com as alterações já descritas, também apresentou frequente atrofia do epitélio com concomitante dilatação do adenômero, o que caracteriza adenômeros císticos (Prins et al, 1998). Em contrapartida, a próstata anterior foi o lobo menos afetado com o envelhecimento. Estas alterações espontâneas com o envelhecimento vão de encontro com dados anteriores relativos ao envelhecimento prostático em varias linhagens de roedores 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). Juntos, estes dados apontam que o roedor pode ser um modelo eficaz para distúrbios espontâneos relacionados com o envelhecimento da próstata.

A imunorreatividade de ER β vai de encontro aos dados da literatura, onde núcleos de células luminais e basais coram-se intensamente (Makela et al., 2000; Sar & Welsch, 2000; Oliveira et al., 2007). Considerando as áreas de epitélio normal ou de hiperplasia, nenhuma diferença na intensidade de expressão do receptor foi detectada. Entretanto, especialmente em áreas de atipias celulares e proliferação intraepitelial, significativa redução de ER β foi detectada, sobretudo nas próstatas ventral e dorsal. Adicionalmente, nas áreas de atrofia relativas à próstata ventral também foi possível verificar redução da expressão do receptor. Esses resultados se revestem de extrema importância desde que resultados similares são descritos em lesões prostáticas pré-malignas e malignas humanas e caninas (Horvath et al, 2001; Leav et al, 2001; Pasquali et al, 2001A; Asgari & Morakabati, 2011; Hetzl et al, 2012 e 2013; Daniels et al, 2014; Grover et al; Pasquali et al, 2001B; Grieco et al, 2006; Gallardo et al, 2007) . Em humanos e cães, a redução da expressão de ER β esta diretamente relacionada com o grau de diferenciação do tumor, onde tumores em estágios menos diferenciados são mais propensos à redução e/ou ausência deste receptor (Leav et al., 2001; Yang et al, 2007; Asgari & Morakabati, 2011; Hetzl et al., 2012 e 2013; Gallardo et al., 2007; Muthusamy et al, 2014). A ausência de ER β em camundongos β ERKO promove mais tarde na vida destes animais aumento de áreas de PIN (Prezioso et al, 2007). PIN representa uma lesão pré-maligna que pode progredir para um câncer latente e em última análise para um câncer maligno (Prezioso et al, 2007). Embora o câncer de próstata seja uma patologia comum em homens idosos, focos microscópicos de câncer e áreas de PIN podem ser detectados tão cedo quanto 25-30 anos de idade em homens de todos os grupos étnicos (Prezioso et al, 2007). A semelhança do modelo de rato pode ser importante para futuras investigações experimentais em possíveis condutas terapêuticas para o controle do câncer de próstata.

ER β tem sido associado a papéis pró-apoptóticos, anti-proliferativos e pró-diferenciação (Weihua et al, 2001 e 2002; Cheng et al, 2004; Imamov et al., 2004; McPherson et al, 2007 e 2010; Mak el al, 2013; Hussain et al, 2012; Colciago et al, 2014; Yun et al, 2015). Corroborando o envolvimento do receptor com sua atividade anti-proliferativa, nos detectamos redução pontual de ER β paralelo com o aumento de células proliferativas nas áreas de PIN e atipias nucleares. De maneira similar, outro trabalho verificou níveis indetectáveis de ER β em células proliferativas na próstata ventral (Weihua et al, 2002). Estes dados se revestem de importância uma vez que alterações semelhantes tem sido descritas na próstata humana, onde ocorre marcante redução de expressão de ER β em áreas de PIN e adenocarcinoma, atingindo níveis

indetectáveis com a progressão do tumor, embora nas áreas de hiperplasia não haja alteração de sua expressão (Horvath et al, 2001; Tsurusaki et al, 2003; Leav et al, 2001; Pasquali et al, 2001; Yang et al, 2007; Asgari & Morakabati, 2011; Pasquali et al, 2001B). Há evidências de que PIN e microfocos de câncer latente podem ser detectados em homens de 20-30 anos de idade, embora lesões cancerígenas clinicamente relevantes serem detectadas geralmente após os 50 anos de idade (Prezioso et al, 2007; Sakr et al, 1993). Neste sentido, estes dados reforçam a importância de ER β como alvo potencial para prevenção das desordens proliferativas em fases pré-malignas.

A redução de ER β na próstata ocorreu em um ambiente hormonal onde os níveis de estradiol se mantiveram constantes no plasma e no tecido, enquanto que os níveis séricos e teciduais de DHT reduziram progressivamente com o envelhecimento. Este cenário hormonal tem sido postulado como fator de risco para alterações patológicas na próstata (Banerjee et al, 1998 e 2001; Ellem et al, 2010), corroborando nossos achados. A redução de ER β sem alterações nos níveis locais de estradiol indica que este receptor não é regulado por este hormônio em questão. Adicionalmente, dados na literatura indicam que os estrógenos não são capazes de autorregular ER β na próstata de ratos (Prins et al, 1998; Oliveira et al, 2007). Por outro lado, evidências sugerem que estradiol não é o único estrógeno atuante na próstata. De fato, o esteroide estrogênico mais abundante na próstata é 5 α -androstane, 3 β ,17 β -diol (3 β -diol), um metabolito da DHT que atua por mecanismos parácrinos e autócrinos (Oliveira et al, 2007). Em contraste com 3 β -diol, estradiol possui efeitos inexpressivos nos níveis de ER β (Oliveira et al, 2007). Adicionalmente, a autorregulação de ER β pelo 3 β -diol tem sido descrito em outros órgãos (Picciarelli-Lima et al, 2006). Considerando estes fatos, é necessária investigação dos níveis de 3 β -diol na próstata durante o envelhecimento para melhores esclarecimentos do ambiente hormonal que leva à alterações locais na glândula.

As análises proteicas feitas através da técnica de Western blotting detectaram ocorrência de duas bandas de pesos moleculares de 54 e 49 kDa, sendo a banda de 54 kDa compatível para o peso molecular descrito de ER β de roedores (Kuiper et al, 1996 e 1998; Zhou et al, 2002; Tirado et al, 2004). A detecção de dupla banda para ER também é descrito em outros trabalhos para outras espécies como humanos, primatas, camundongo, suínos e tartaruga (Leav et al, 2001; Saunders et al., 2001; Zhou et al., 2002; Rago et al, 2007; Gist et al, 2007). O surgimento de dupla banda indica ser resultado da tradução de ER β a partir de sítios de iniciação alternativos do RNAm, que resultam em proteínas de tamanhos diferentes, denominadas ER β longo e curto (Leav et

al, 2001; Scobie et al, 2002; Gaskell et al, 2003). Enquanto ER β longo representa a proteína traduzida do primeiro códon de iniciação do transcrito, ER β curto resulta de tradução a partir do segundo códon de iniciação (Leav et al, 2001), promovendo assim banda dupla de peso molecular aproximado. Essas proteínas são funcionalmente similares (Leav et al, 2001; Scobie et al, 2002) e não equivalem aos diversos *splices* variantes de ER β , que em geral possuem deleções ou inserções de aminoácidos na molécula final, resultando em alteração da função do receptor (Maruyama et al, 1998; Petersen et al, 1998; Saunders et al, 2002). Notavelmente, o perfil de expressão de banda dupla foi semelhante em todo o complexo prostático.

Estes dados são inéditos e revelam alterações focais na expressão de ER β no complexo prostático de ratos idosos. A redução de ER β associada a áreas de neoplasia intraepitelial, atipia celular e atrofia, indica uma potencial desordem mediada via ER β , corroborando dados anteriores referentes a patologias prostáticas em humanos e cães, onde o silenciamento deste receptor passa estar relacionado com condições pré-malignas ou malignas na próstata. Adicionalmente, estes resultados reforçam a importância do estudo tecidual minucioso da expressão de ER β na próstata para melhor entendimento das alterações relacionadas as patologias prostáticas.

CAPÍTULO II – Resultados não publicados

1 Expressão de Aromatase

Aromatase foi detectada no epitélio, bem como no estroma do complexo prostático de ratos adultos jovens a idosos, corroborando a escassa literatura sobre o tema, que relata atividade aromatase (Marts et al, 1987), bem como imunoexpressão citoplasmática no epitélio da próstata ventral (Castro et al, 2013). Em camundongos, baixos níveis de RNAm de aromatase foram detectados na próstata ventral (Ellen et al, 2009), embora sem referência sobre a ocorrência de proteína. No entanto, evidências obtidas em camundongos geneticamente modificados pela remoção ou superexpressão de aromatase indicam importante participação da enzima na histofisiologia da glândula (McPherson et al, 2001; Ellem & Risbridger 2010). Baixa atividade aromatase foi também detectada em próstatas de macacos Rhesus (West et al, 1988). Comparativamente, a expressão desta enzima na próstata humana tem sido mais amplamente investigada, mas os resultados são bastante controversos, sendo que ausência (Smith et al, 1982; Voight et al, 1986; Brodie et al, 1989; Negri-Cesi et al, 1998) e presença (Stone, 1986; Kaburagi, 1987; Matzkin e Soloway 1992; Block et al, 1996; Hiramatsu et al, 1997; Tsugaya et al, 1996; Ellem et al, 2004; Takase et al, 2006; Ho et al, 2008; Gianfrilli et al, 2014; Machioka et al, 2015) de atividade ou expressão de aromatase são igualmente descritas. Estes dados divergentes têm sido atribuídos à heterogeneidade do tecido utilizado para estudo (saudável, hiperplásico ou maligno), assim como a sensibilidade da técnica empregada, sensibilidade de anticorpos e também o estado de conservação do tecido. Vale ressaltar que dentre os relatos de positividade para aromatase, raros descrevem sua presença em tecido normal (Matzkin & Soloway, 1992), sugerindo uma correlação entre aromatase e patologias prostáticas, as quais são menos pronunciadas em animais experimentais.

Embora não tenha sido detectada alteração da expressão de aromatase com o envelhecimento no tecido prostático normal, foram observadas mudanças pontuais na expressão da enzima considerando-se áreas específicas de alterações de arquitetura tecidual. Dessa forma, na próstata ventral, foi detectada redução da expressão de aromatase nas células secretoras nas áreas relacionadas com proliferação cribriforme. Por outro lado, o padrão de expressão de aromatase em células basais e a distribuição dessas células foram drasticamente alterados em áreas de crescimento cribriforme, PIN

e inflamação nos diferentes lobos da próstata. Nestas áreas específicas, ocorreram células basais intensamente positivas para aromatase, dispostas em grupos ou formando uma camada contínua na base do epitélio. A ocorrência de maior densidade de células basais no epitélio prostático é descrito em animais estrogenizados (Putz et al, 2001; Risbridger et al, 2001; Bianco et al, 2002), enquanto que em humanos, há relatos sobre hiperplasia de células basais associada à processos inflamatórios (Thorson et al, 2003). Porém, a positividade destas células para aromatase não é descrita em nenhum dos relatos. Embora o mecanismo ainda não seja claro, há evidências sobre a ação dos estrógenos no desenvolvimento de lesões pré-malignas e/ou malignas na próstata (Ellem & Risbridger, 2007; Prins et al, 2007; Hu et al, 2011). A maior frequência de células basais/Aro+ detectada em áreas proliferativas no presente estudo pode estimular um microambiente hormonal favorável para a progressão da lesão. Corroborando essa hipótese, foi demonstrado que animais *knockout* para aromatase não desenvolvem inflamação nem câncer de próstata, embora possam desenvolver hiperplasia e hipertrofia (McPherson et al, 2001; Ellem & Risbridger, 2007; Ricke et al, 2008).

Os efeitos promovidos pelos estrógenos de forma a ocasionar alterações aberrantes e inflamação na próstata são mediados pelos receptores ER α e não ER β , como demonstrado em animais *knockouts* para estes receptores. Animais β ERKO após administração de estrógenos não desenvolvem alterações prostáticas, enquanto que os animais α ERKO sim (Prins et al, 2001; Risbridger et al, 2001). Não foi possível determinar a expressão de ER α no presente estudo, entretanto, demonstramos previamente que a expressão de ER β está reduzida em áreas de distúrbios proliferativos e atípicas celulares (Morais-Santos et al, 2015). Dessa forma é possível que o aumento local de aromatase e conseqüentemente da produção de estradiol, aliado à redução de ER β , possa favorecer a proliferação celular e alterações metaplásicas via ER α , como já demonstrado em outras circunstâncias (Nelson et al, 2014).

Na próstata lateral chamou atenção que as alterações teciduais ocorreram especialmente em proximidades de infiltrados inflamatórios. Lesões sugestivas de atrofia proliferativa inflamatória (PIA) e metaplasia escamosa foram áreas que apresentaram células basais/Aro+ com maior frequência e densidade. Metaplasia escamosa é caracterizada pela proliferação de células basais, sendo uma resposta proliferativa induzida por estrógenos bem conhecida na próstata (Ellem & Risbridger, 2010). Outras informações sobre os estrógenos na próstata é que eles podem

desempenhar papel crítico na predisposição à inflamação (Ellem & Risbridge, 2007; Ellem et al, 2009). Diversos trabalhos demonstram alterações no balanço hormonal que modificam a proporção andrógenos/estrógenos plasmático e intraprostático com o envelhecimento (Krieg et al, 1993; Banerjee et al, 1998; Shibata et al, 2000;). Esta mudança do cenário hormonal local comum na velhice, favorecendo a influência de estrógenos, pode justificar o aparecimento de inflamação na próstata, uma vez que andrógenos e estrógenos possuem papéis distintos, sendo os andrógenos mediadores de ação anti-inflamatória, enquanto que os estrógenos possuem efeitos pró-inflamatórios na próstata (Naslund et al, 1988). Sabe-se que a expressão de aromatase na próstata pode ser mediada pelo promotor PII, que é regulado por citocinas pró-inflamatórias, as quais possuem níveis elevados com o envelhecimento (Maggio et al, 2005; Ellem & Risbridger, 2009). Esses dados são indicativos de um ciclo vicioso local de inflamação, produção de citocinas pró-inflamatórias, superexpressão de aromatase e aumento local de estrógenos estimulando ainda mais o processo inflamatório.

É bem estabelecido que a resposta hormonal seja particular em cada lobo, e a recorrente presença de focos inflamatórios na próstata lateral corrobora o fato deste lobo possuir maior sensibilidade aos estrógenos comparado aos demais (Lee et al, 1981; Prins & Birch, 1997; Harris et al, 2000). Estas evidências em conjunto podem justificar o fato da próstata lateral ter sido o lobo mais afetado por inflamação e aparecimento de áreas de PIA contendo células basais/Aro+, corroborando os efeitos adversos que os estrógenos podem ocasionar na próstata e indicando que estes efeitos podem ser exacerbados pelo microambiente hormonal que estas células produzem.

2 Expressão de CYP7B1

Intensa imunorreatividade para CYP7B1 foi detectada no epitélio glandular, assim como em algumas células do estroma, corroborando dados na literatura sobre a expressão desta enzima na próstata (Martin et al, 2001 e 2004; Olsson et al, 2007). A expressão de CYP7B1 não se alterou com o envelhecimento, exceto em áreas de proliferação cribriforme, atipias celulares e atrofia epitelial de ocorrência na próstata ventral e áreas peri-inflamatórias de ocorrência na próstata lateral. Essas mesmas regiões apresentaram-se menos reativas para ER β , enquanto a expressão de aromatase foi aumentada em células basais locais, revelando um possível desequilíbrio hormonal local, uma vez que a disponibilidade de DHT para conversão em 3 β -diol está reduzida.

Há relatos que apontam CYP7B1 como um importante elemento regulador do crescimento prostático, sendo que camundongos *knockout* para essa enzima apresentaram próstatas hipoproliferativas, resultante do aumento local de 3β -diol (Weihua et al, 2002), enquanto que sua superexpressão foi relacionada com o desenvolvimento de câncer (Olsson et al, 2007). Esses dados em conjunto tornam a interpretação dos presentes resultados mais complicada, uma vez que redução de CYP7B1 não era esperada em áreas de proliferação celular. É importante ressaltar que nas áreas de redução de CYP7B1 ocorreu também redução da expressão de aromatase nas células luminais, porém, houve maior frequência de células basais/Aro+. Embora pouco se saiba sobre a regulação hormonal dessa enzima na próstata, em linhagens de células prostáticas humanas LNCaP foi evidenciada supressão da enzima por DHT, estradiol e 3β -diol, revelando que seu mecanismo de regulação não seja simples (Tang & Norlin, 2006). Dessa forma, a redução de CYP7B1 nestas áreas pode ser justificada pelo aumento local de estradiol que as células basais/Aro+ promovem, uma vez que os níveis intraprostáticos de DHT estão reduzidos no envelhecimento.

3 Tratamento de ratos senis com 3β -diol

O tratamento com 3β -diol reverteu grandemente a histopatologia da próstata de animais senis, assim como também foi capaz de induzir maior expressão de ER β , reduzir as taxas de proliferação e aumentar as taxas de apoptose na próstata. Esses dados corroboram a hipótese de que esse esteroide estrogênico pode ter efeitos benéficos para circunscrever as alterações prostáticas comuns na velhice.

O peso corporal dos animais não foi afetado após tratamento com 3β -diol nas diferentes doses, assim como verificado em outros trabalhos que utilizaram o hormônio em reposição hormonal após castração (Picciarelli-Lima et al, 2006; Oliveira et al, 2007). Por outro lado, os tratamentos com dose mais alta (5mg/Kg/42 dias) ou por intervalo de tempo maior (3mg/Kg/60 dias) promoveram aumento significativo do peso da próstata, enquanto os demais regimes de tratamento não alteraram ou até mesmo reduziram o peso da próstata. Outros trabalhos também demonstram que a administração de 3β -diol é capaz de influenciar o peso da próstata em animais castrados, fazendo com que haja recuperação do peso da glândula para níveis de seus controles não castrados (Ahmad et al, 1978; Picciarelli-Lima et al, 2006; Oliveira et al, 2007). Apesar de nosso modelo ser de animais intactos, é bem estabelecido que com o envelhecimento ocorra

redução dos níveis intraprostáticos de DHT, principal andrógeno atuante no tecido, importante para a manutenção da histofisiologia da glândula. Apesar desta queda natural de DHT não afetar efetivamente o peso dos lobos prostáticos (Morais-Santos et al, 2015), é evidente uma aparente perda da atividade secretora da glândula em animais senis, possivelmente pela redução dos níveis intratecduais de DHT e conseqüentemente dos níveis de 3β -diol, o qual é considerado um fator pró-diferenciação na próstata (Weihua et al, 2002; Imamov et al, 2004).

Compatível com o efeito observado no peso glandular, a administração de 3β -diol foi capaz de promover efeitos positivos na citoarquitetura da próstata de ratos senis, especialmente no lobo ventral, que é mais afetado pelo envelhecimento (Morais-Santos et al, 2015). Nesse sentido foi observada redução de atipias celulares e de focos de hiperplasia epitelial e recuperação da atividade secretora da glândula pela constante presença de adenômeros dilatados repletos de secreção intraluminal. Estes dados confirmam outros trabalhos que demonstram que a administração de 3β -diol após castração é capaz de recuperar a histologia da próstata (Ahmad et al, 1978; Oliveira et al, 2007). Estes efeitos podem ser justificados pela ação observada de 3β -diol em estudo *in vivo* e *in vitro*, que o apontam como estimulador da diferenciação celular (Imamov et al, 2004), compatível o aumento da atividade secretora da glândula observada no presente trabalho. A estimulação da atividade secretora justifica o aumento do peso glandular detectado nos animais tratados, reforçando o papel pró-diferenciação de 3β -diol.

Os níveis prostáticos de DHT não se alteraram nas diferentes doses de 3β -diol, enquanto aumento significativo de DHT no plasma foi observado após tratamento com alta dose de 3β -diol (5mg/Kg/42 dias) ou por intervalo de tempo maior (3mg/Kg/60 dias). Divergências quanto aos níveis circulantes e teciduais de esteroides sexuais são comumente descritos em relação à próstata, considerando sua potente maquinaria enzimática, que favorece independência dos clássicos órgãos esteroideogênicos, em um mecanismo conhecido como intracrinologia (Labrie et al, 2000). Nesse sentido, devido à rápida e irreversível metabolização de 3β -diol em trióis pela elevada concentração de CYP7B1, há relatos que afirmam que não ocorra retroconversão local de 3β -diol para DHT (Sundin et al, 1987; Omoto et al, 2005; Bauman et al, 2006). Nossos resultados corroboram esta condição, indicando que os efeitos benéficos observados na próstata após tratamento com 3β -diol sejam devido sua ação direta no tecido. Apesar de não ocorrer retroconversão de 3β -diol em DHT na próstata, alguns trabalhos descrevem que

ela possa ocorrer *in vitro*, porém em velocidade e níveis mais baixos comparado a retroconversão de 3 α -diol, outro metabólito de DHT (Krieg et al, 1975; Horst et al, 1975; Foster & Cunha, 1999). Dessa forma, o aumento de DHT detectado no plasma pode estar relacionado com uma maior biodisponibilidade de 3 β -diol no sangue periférico, e conseqüentemente maior possibilidade de retroconversão periférica, uma vez que sua rápida metabolização é efetiva apenas em tecidos com alta expressão de CYP7B1, como a próstata e o cérebro.

Houve efeito discreto, mas significativo, na imunoexpressão de ER β na próstata ventral de ratos tratados com 3 β -diol em dose superior a 1 mg, que foi corroborado pelos dados de *Western blotting*. Sabe-se que 3 β -diol é capaz de estimular a atividade transcricional de ER β (Pak et al, 2005; Sneddon et al, 2005), além de ser um potente indutor da expressão de ER β na próstata (Oliveira et al, 2007). Os níveis intraprostáticos inalterados de DHT e o aumento dos níveis de ER β detectados após tratamento com 3 β -diol reforçam seus efeitos na regulação de seu próprio receptor.

Concomitante ao aumento da expressão de ER β , houve de maneira geral, uma menor taxa de proliferação celular paralela ao aumento significativo das taxas de apoptose, exceto para o tratamento na dose mais elevada de 3 β -diol. Efeitos semelhantes de 3 β -diol na proliferação e morte celular é demonstrado em modelos *in vivo* e *in vitro*. A administração deste esteroide em camundongos recém-nascidos foi eficaz em reduzir a proliferação celular em animais selvagens, mas não em *knockout* para ER β (Weihua et al, 2002). Dados similares são descritos em culturas de células de câncer de próstata, que após incubação com 3 β -diol apresentaram maiores taxas de apoptose, o que não se repetiu em células com ER β silenciado (Dey et al, 2013). Ainda, estudo comparativo entre agonistas sintéticos (DPN e 8 β -VE2) e o ligante natural de ER β , demonstrou que 3 β -diol é mais efetivo em reduzir as taxas de proliferação *in vitro*, com eficácia persistente por longo período de exposição (Colciago et al, 2014). Estes dados em conjunto com os presentes resultados corroboram os efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos de 3 β -diol agindo via ER β .

Sabe-se que os andrógenos são capazes de estimular a proliferação celular na próstata, o que é facilmente demonstrado por castração seguida de reposição hormonal com DHT (Wright, et al, 1999). Neste contexto, a redução das taxas de proliferação detectada vai de encontro aos dados hormonais intraprostáticos de DHT, reforçando que não ocorra no tecido, retroconversão de 3 β -diol para DHT. Por outro lado, o aumento da taxa de proliferação detectado com o tratamento de 5mg na próstata dorsal pode estar

relacionado com excesso de 3β -diol disponível no tecido, que desta forma, poderia ser retroconvertido para DHT, o que presume que esta dose seja elevada.

Embora ocorra na literatura relatos sobre os importantes efeitos de 3β -diol via ER β na próstata, é a primeira vez que se descreve os efeitos deste esteroide estrogênico em modelo de envelhecimento natural, sem qualquer indução de patologia prostática. Os presentes dados reforçam as evidências acerca do papel de ER β / 3β -diol na próstata, indicando que a reposição hormonal em animais senis com esse esteroide pode ser uma alternativa de prevenção de patologias prostáticas.

VII. CONCLUSÕES

VII. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi elucidar se ocorrem alterações na expressão do receptor de estrógeno ER β de componentes relacionados à via metabólica de esteroides estrogênicos no complexo prostático de ratos ao longo do envelhecimento, além de verificar se o tratamento com 3 β -diol poderia reverter as alterações prostáticas decorrentes da idade.

Observamos que com o envelhecimento a expressão de ER β foi reduzida em áreas restritas de alterações morfológicas, incluindo atrofia epitelial, atipias celulares e áreas de proliferação intraepitelial, incluindo PIN, nessas últimas com concomitante aumento das taxas de proliferação celular, corroborando o papel anti-proliferativo de ER β . Estes achados ocorreram em um ambiente hormonal onde os níveis de DHT estão reduzidos, enquanto que os níveis de estradiol se mantem constantes. Ainda em áreas de proliferação intraepitelial e prostatite houve aumento de células basais intensamente positivas para a enzima aromatase corroborando que os estrógenos possam ocasionar efeitos adversos na próstata com o envelhecimento. Essas mesmas regiões apresentaram-se menos reativas para CYP7B1, indicando um possível desequilíbrio hormonal local, uma vez que a disponibilidade de DHT para conversão em 3 β -diol está reduzida.

A administração de 3 β -diol em animais senis promoveu efeitos benéficos na próstata, como aumento da atividade secretora, menor frequência de adenômeros hiperplásicos, redução das áreas de atrofia e de atipias celulares, além de redução da proliferação celular, paralela ao aumento das taxas de apoptose e aumento da expressão de ER β . Esses efeitos ocorreram sem que houvesse alterações nos níveis intraprostáticos de DHT, exceto quando foi usada dose alta do esteroide. Os resultados *in vivo* corroboram os efeitos anti-proliferativo, pró-apotótico e pró-diferenciação de 3 β -diol/ER β , apontando que a exposição de animais senis a 3 β -diol pode ser uma alternativa na prevenção de patologias prostáticas.

Considerando o conjunto de resultados obtidos, podemos concluir que os estrógenos, 3 β -diol e seus receptores, possuem importância significativa para o desenvolvimento e progressão de patologias prostáticas. Adicionalmente, as alterações pontuais aqui detectadas reforçam a importância do estudo tecidual minucioso na próstata para melhor entendimento das alterações relacionadas às patologias prostáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- P.A. Abrahamsson, Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate, *Endocr Relat Cancer*. 6 (1999) 503-519.
- P.A. Abrahamsson, P.A. di Sant'Agnese, Neuroendocrine cells in the human prostate gland, *J Androl*. 14 (1993) 307-309.
- N. Ahmad, D.W. Warren, G.C. Haltmeyer, The effects of 5 α -reduced androgens on maintenance and regeneration of prostate glands and seminal vesicles in castrated and hypophysectomized rats, *Anat Rec*. 192 (1978) 543-554.
- M. Akhtar, M.R. Calder, D.L. Corina, J.N. Wright. Mechanistic studies on C-19 demethylation in oestrogen biosynthesis. *Biochem J* 201 (1982) 569-580.
- A. Angelsen, U. Syversen, O.A. Haugen, M. Stridsberg, O.K. Mjølnerod, H.L. Waldum, Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the prostate: do neuroendocrine serum markers reflect immunohistochemical findings?, *Prostate*. 30 (1997) 1-6.
- M. Asgari, A. Morakabati. Estrogen receptor beta expression in prostate adenocarcinoma. *Diagn Pathol*. 6 (2011) 61.
- S.R. Aspinall, S. Stamp, A. Davison, B.K. Shenton, T.W. Lennard, 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 (2004) 37-51.
- G. Aumüller. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anatomy and embryology*. 1989;179:519-31.
- P.P. Banerjee, S. Banerjee, T.R. Brown, Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate, *Endocrinology*. 142 (2001) 4066-4075.
- P.P. Banerjee, S. Banerjee, J.M. Lai, J.D. Strandberg, B.R. Zirkin, T.R. Brown, Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the brown Norway rat prostate, *Biol Reprod*. 59 (1998) 1163-1170.
- D.R. Bauman, S. Steckelbroeck, D.M. Peehl, T.M. Penning, Transcript profiling of the androgen signal in normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer, *Endocrinology*. 147 (2006) 5806-5816.
- M. Beato, J. Klug, Steroid hormone receptors: an update, *Hum Reprod Update*. 6 (2000) 225-236.
- L.A. Begley, S. Kasina, J. MacDonald, J.A. Macoska, The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy, *Cytokine*. 43 (2008) 194-199.
- M.R. Beguelini, R.M. Goes, P. Rahal, E. Morielle-Versute, S.R. Taboga, Impact of the processes of testicular regression and recrudescence in the prostatic complex of the bat *Myotis nigricans* (Chiroptera: Vespertilionidae), *J Morphol*. 276 (2015) 721-732.
- I.M. Berquin, Y. Min, R. Wu, H. Wu, Y.Q. Chen, Expression signature of the mouse prostate, *J Biol Chem*. 280 (2005) 36442-36451.
- D. Bianchi-Frias, F. Vakar-Lopez, I.M. Coleman, S.R. Plymate, M.J. Reed, P.S. Nelson, The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment, *PLoS One*. 5 (2010)
- J.J. Bianco, D.J. Handelsman, J.S. Pedersen, G.P. Risbridger, Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol, *Endocrinology*. 143 (2002) 4922-4933.

- J.L. Block, N.L. Block, B.L. Lokeshwar, Inhibition of aromatase activity and growth suppression by 4-methoxy-4-androstene-3,17-dione in an androgen sensitive human prostatic carcinoma cell line, *Cancer Lett.* 101 (1996) 143-148.
- A.M. Brodie, C. Son, D.A. King, K.M. Meyer, S.E. Inkster, Lack of evidence for aromatase in human prostatic tissues: effects of 4-hydroxyandrostenedione and other inhibitors on androgen metabolism, *Cancer Res.* 49 (1989) 6551-6555.
- S.G. Campos, C. Zanetoni, W.R. Scarano, P.S. Vilamaior, S.R. Taboga. 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 (2008) 13-24.
- C. Carani, K. Qin, M. Simoniet al., Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency, *N Engl J Med.* 337 (1997) 91-95.
- S. Carreau, Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad, *Mol Cell Endocrinol.* 178 (2001) 65-72.
- S. Carreau, C. Genissel, B. Bilinska, J. Levallet, Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male, *Int J Androl.* 22 (1999) 211-223.
- S. Carreau, S. Bourguiba, S. Lambard, I. Galeraud-Denis, C. Genissel, J. Levallet. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol.* 193 (2002) 137-143.
- S. Carreau, R.A. Hess, Oestrogens and spermatogenesis, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365 (2010) 1517-1535.
- B. Castro, P. Sanchez, J.M. Torres, O. Preda, R.G. del Moral, E. Ortega, Bisphenol A exposure during adulthood alters expression of aromatase and 5alpha-reductase isozymes in rat prostate, *PLoS One.* 8 (2013) e55905.
- M. Chen, J. Ni, Y. Zhang, M. Muyan, S. Yeh, ERAP75 functions as a coactivator to enhance estrogen receptor alpha transactivation in prostate stromal cells, *Prostate.* 68 (2008) 1273-1282.
- J. Cheng, E.J. Lee, L.D. Madison, G. Lazennec, Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis, *FEBS Lett.* 566 (2004) 169-172.
- A. Ciucci, G.F. Zannoni, D. Travaglia, M. Petrillo, G. Scambia, D. Gallo, Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ERbeta) isoforms ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 in advanced serous ovarian cancer, *Gynecol Oncol.* 132 (2014) 351-359.
- A. Colciago, M. Ruscica, O. Mornatiet al., In vitro chronic administration of ERbeta selective ligands and prostate cancer cell growth: hypotheses on the selective role of 3beta-adiol in AR-positive RV1 cells, *Biomed Res Int.* 2014 (2014) 801473.
- G.R. Cunha, E.T. Alarid, T. Turner, A.A. Donjacour, E.L. Boutin, B.A. Foster, Normal and abnormal development of the male urogenital tract. Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors, *J Androl.* 13 (1992) 465-475.
- S. Daneshmand, T.B. Dorff, M.L. Queket al., Ethnic differences in neuroendocrine cell expression in normal human prostatic tissue, *Urology.* 65 (2005) 1008-1012.
- G. Daniels, L.L. Gellert, J. Melamed, D. Hatcher, Y. Li, J. Wei, J. Wang, P. Lee. Decreased expression of stromal estrogen receptor alpha and beta in prostate cancer. *Am J Transl Res.* 6 (2014) 140-146.
- P. Dey, P. Jonsson, J. Hartman, C. Williams, A. Strom, J.A. Gustafsson, Estrogen receptors beta1 and beta2 have opposing roles in regulating proliferation and bone metastasis genes in the prostate cancer cell line PC3, *Mol Endocrinol.* 26 (2012) 1991-2003.

- P. Dey, A. Strom, J.A. Gustafsson, Estrogen receptor beta upregulates FOXO3a and causes induction of apoptosis through PUMA in prostate cancer, *Oncogene*. (2013)
- P. Dey, L.A. Velazquez-Villegas, M. Faria et al., Estrogen Receptor beta2 Induces Hypoxia Signature of Gene Expression by Stabilizing HIF-1alpha in Prostate Cancer, *PLoS One*. 10 (2015) e0128239.
- P.A. di Sant'Agnes, Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma, *Hum Pathol*. 23 (1992) 287-296.
- D. Dondi, M. Piccolella, A. Biserniet al., Estrogen receptor beta and the progression of prostate cancer: role of 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, *Endocr Relat Cancer*. 17 (2010) 731-742.
- J. Dulos, M.A. van der Vleuten, A. Kavelaars, C.J. Heijnen, A.M. Boots, CYP7B expression and activity in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis: regulation by proinflammatory cytokines, *Arthritis Rheum*. 52 (2005) 770-778.
- S. Dupont, A. Krust, A. Gansmuller, A. Dierich, P. Chambon, M. Mark, Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes, *Development*. 127 (2000) 4277-4291.
- M. El-Alfy, V. Luu-The, X.F. Huang, L. Berger, F. Labrie, G. Pelletier, Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry, *Endocrinology*. 140 (1999) 1481-1491.
- M. El-Alfy, G. Pelletier, L.S. Hermo, F. Labrie, Unique features of the basal cells of human prostate epithelium, *Microsc Res Tech*. 51 (2000) 436-446.
- S.J. Ellem, G.P. Risbridger, Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens, *Nat Rev Cancer*. 7 (2007) 621-627.
- S.J. Ellem, G.P. Risbridger, The dual, opposing roles of estrogen in the prostate, *Ann N Y Acad Sci*. 1155 (2009) 174-186.
- S.J. Ellem, G.P. Risbridger, Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland, *J Steroid Biochem Mol Biol*. 118 (2010) 246-251.
- S.J. Ellem, J.F. Schmitt, J.S. Pedersen, M. Frydenberg, G.P. Risbridger, Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy, *J Clin Endocrinol Metab*. 89 (2004) 2434-2441.
- E. Enmark, J.A. Gustafsson, Oestrogen receptors - an overview, *J Intern Med*. 246 (1999) 133-138.
- E. Enmark, M. Peltö-Huikko, K. Grandien et al., Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern, *J Clin Endocrinol Metab*. 82 (1997) 4258-4265.
- B.A. Foster, G.R. Cunha, Efficacy of various natural and synthetic androgens to induce ductal branching morphogenesis in the developing anterior rat prostate, *Endocrinology*. 140 (1999) 318-328.
- F. Gallardo, T. Mogas, T. Baroet al., 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 (2007) 1-8.
- T.L. Gaskell, L.L. Robinson, N.P. Groome, R.A. Anderson, P.T. Saunders, Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy, *J Clin Endocrinol Metab*. 88 (2003) 424-432.
- D. Gianfrilli, S. Pierotti, R. Pofi, C. Leonardo, M. Ciccariello, F. Barbagallo, Sex steroid metabolism in benign and malignant intact prostate biopsies: individual profiling of prostate intracrinology, *Biomed Res Int*. 2014 (2014) 464869.

- D.H. Gist, S. Bradshaw, C.M. Morrow, J.D. Congdon, R.A. Hess, Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: an immunocytochemical study, *Gen Comp Endocrinol.* 151 (2007) 27-33.
- F.J. Gonzalez, Molecular genetics of the P-450 superfamily, *Pharmacol Ther.* 45 (1990) 1-38.
- S. Green, V. Kumar, A. Krust, P. Walter, P. Chambon, Structural and functional domains of the estrogen receptor, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 2 (1986) 751-758.
- G.L. Greene, P. Gilna, M. Waterfield, A. Baker, Y. Hort, J. Shine. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 231 (1986) 1150-4.
- V. Grieco, E. Riccardi, M. Rondena, S. Romussi, D. Stefanello, M. Finazzi, The distribution of oestrogen receptors in normal, hyperplastic and neoplastic canine prostate, as demonstrated immunohistochemically, *J Comp Pathol.* 135 (2006) 11-16.
- M.E. Grossmann, H. Huang, D.J. Tindall, Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer, *J Natl Cancer Inst.* 93 (2001) 1687-1697.
- S.K. Grover, S. Agarwal, S. Gupta, N. Wadhwa, N. Sharma, Expression of estrogen receptor beta and Ki 67 in benign & malignant human prostate lesions by immunohistochemistry, *Pathol Oncol Res.* 21 (2015) 651-657.
- V. Guerini, D. Sau, E. Scaccianoce et al., The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype, *Cancer Res.* 65 (2005) 5445-5453.
- A. Guiochon-Mantel, P. Lescop, S. Christin-Maitre, H. Loosfelt, M. Perrot-Appianat, E. Milgrom, Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor, *EMBO J.* 10 (1991) 3851-3859.
- G.L. Hager, C.S. Lim, C. Elbi, C.T. Baumann, Trafficking of nuclear receptors in living cells, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74 (2000) 249-254.
- M.T. Harris, R.S. Feldberg, K.M. Lau, N.H. Lazarus, D.E. Cochrane, Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate, *Prostate.* 44 (2000) 19-25.
- N. Hayashi, Y. Sugimura, J. Kawamura, A.A. Donjacour, G.R. Cunha, Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland, *Biol Reprod.* 45 (1991) 308-321.
- S.W. Hayward, L.S. Baskin, P.C. Haughney et al., Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle, *Acta Anat (Basel).* 155 (1996) 81-93.
- S.W. Hayward, L.S. Baskin, P.C. Haughney et al., Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat, *Acta Anat (Basel).* 155 (1996) 94-103.
- R.A. Hess, Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract, *Rev Reprod.* 5 (2000) 84-92.
- R.A. Hess, Estrogen in the adult male reproductive tract: a review, *Reprod Biol Endocrinol.* 1 (2003) 52.
- A.C. Hetzl, W.J. Favaro, A. Billis, U. Ferreira, V.H. Cagnon. Steroid hormone receptors, matrix metalloproteinases, insulin-like growth factor, and dystroglycans interactions in prostatic diseases in the elderly men. *Microsc Res Tech.* 75 (2012) 1197-1205.
- A.C. Hetzl, F. Montico, R.M. Lorencini, L. Kido, E. Candido, A. Billis, U. Ferreira, V.H. Cagnon. Fibroblast growth factor, estrogen, and prolactin receptor features in different grades of prostatic adenocarcinoma in elderly men. *Microsc Res Tech.* 76 (2013) 321-330.

- M. Hiramatsu, I. Maehara, M. Ozaki, N. Harada, S. Orikasa, H. Sasano, Aromatase in hyperplasia and carcinoma of the human prostate, *Prostate*. 31 (1997) 118-124.
- R. Hiroi, A.F. Lacagnina, L.R. Hinds, D.G. Carbone, R.M. Uht, R.J. Handa, The androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol), activates the oxytocin promoter through an estrogen receptor-beta pathway, *Endocrinology*. 154 (2013) 1802-1812.
- C.K. Ho, F.K. Habib, Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH, *Nat Rev Urol*. 8 (2011) 29-41.
- C.K. Ho, J. Nanda, K.E. Chapman, F.K. Habib, Oestrogen and benign prostatic hyperplasia: effects on stromal cell proliferation and local formation from androgen, *J Endocrinol*. 197 (2008) 483-491.
- S. Honda, N. Harada, S. Ito, Y. Takagi, S. Maeda, Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene, *Biochem Biophys Res Commun*. 252 (1998) 445-449.
- H.J. Horst, M. Dennis, J. Kaufmann, K.D. Voigt, In vivo uptake and metabolism of 3-h-5 α -androstane-3 α ,17 β -diol and of 3-h-5 α -androstane-3 β ,17 β -diol by human prostatic hypertrophy, *Acta Endocrinol (Copenh)*. 79 (1975) 394-402.
- L.G. Horvath, S.M. Henshall, C.S. Leet al., Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer, *Cancer Res*. 61 (2001) 5331-5335.
- H. Htun, L.T. Holth, D. Walker, J.R. Davie, G.L. Hager, Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor, *Mol Biol Cell*. 10 (1999) 471-486.
- W.Y. Hu, G.B. Shi, H.M. Lamet al., Estrogen-initiated transformation of prostate epithelium derived from normal human prostate stem-progenitor cells, *Endocrinology*. 152 (2011) 2150-2163.
- S. Hussain, M.G. Lawrence, R.A. Tayloret al., Estrogen receptor beta activation impairs prostatic regeneration by inducing apoptosis in murine and human stem/progenitor enriched cell populations, *PLoS One*. 7 (2012) e40732.
- I. Ichihara, M. Kallio, L.J. Pelliniemi, Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate, *Cell Tissue Res*. 192 (1978) 381-390.
- O. Imamov, A. Morani, G.J. Shimet al., Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (2004) 9375-9380.
- J. Imperato-McGinley, R.S. Sanchez, J.R. Spencer, B. Yee, E.D. Vaughan, Comparison of the effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies, *Endocrinology*. 131 (1992) 1149-1156.
- J.T. Isaacs, The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis, *Cancer Res*. 44 (1984) 5785-5796.
- L. Janulis, J.M. Bahr, R.A. Hess, S. Janssen, Y. Osawa, D. Bunick, Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase, *J Androl*. 19 (1998) 65-71.
- L. Janulis, R.A. Hess, D. Bunicket al. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis, *J Androl*. 17 (1996) 111-116.
- R.A. Jarred, B. Cancilla, G.S. Prins, K.A. Thayer, G.R. Cunha, G.P. Risbridger, Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development, *Endocrinology*. 141 (2000) 3471-3477.
- E.M. John, G.G. Schwartz, J. Koo, D. Van Den Berg, S.A. Ingles. Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer. *Cancer Res* 65(2005) 5470-5479.

- J. D. M. Cordeiro. Perfil de proliferação celular na próstata dorsal de ratos Wistar em envelhecimento. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. (2014).
- Y. Kaburagi, M.B. Marino, R.Y. Kirdani, J.P. Greco, J.P. Karr, A.A. Sandberg, The possibility of aromatization of androgen in human prostate, *J Steroid Biochem.* 26 (1987) 739-742.
- B. Kim, J. Roy, W.W. Shum, N. Da Silva, S. Breton, Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis, *Biol Reprod.* 92 (2015) 9.
- K.M. Kiplesund, J. Halgunset, H.E. Fjosne, A. Sunde, Light microscopic morphometric analysis of castration effects in the different lobes of the rat prostate, *Prostate.* 13 (1988) 221-232.
- A. Kirschenbaum, X.H. Liu, S. Yao, G. Narla, S.L. Friedman, J.A. Martignetti, A.C. Levine. 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 (2006) 216-224.
- R. Knoblauch, M.J. Garabedian, Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction, *Mol Cell Biol.* 19 (1999) 3748-3759.
- A. Komiya, H. Suzuki, T. Imamoto et al., Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer, *Int J Urol.* 16 (2009) 37-44.
- J.H. Kregel, J.B. Hodgins, J.F. Couset et al., Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (1998) 15677-15682.
- M. Krieg, H.J. Horst, M.L. Sterba, Binding and metabolism of 5alpha-androstane-3alpha, 17 beta-diol and of 5alpha-androstane-3beta, 17 beta-diol in the prostate, seminal vesicles and plasma of male rats: studies in vivo and in vitro, *J Endocrinol.* 64 (1975) 529-538.
- M. Krieg, H. Weisser, S. Tunn, [Androgen and estrogen metabolism in human benign prostatic hyperplasia (BPH)], *Verh Dtsch Ges Pathol.* 77 (1993) 19-24.
- G.G. Kuiper, B. Carlsson, K. Grandien et al., Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology.* 138 (1997) 863-870.
- G.G. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, J.A. Gustafsson, Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (1996) 5925-5930.
- G.G. Kuiper, J.G. Lemmen, B. Carlsson et al., Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology.* 139 (1998) 4252-4263.
- V.L. Kumar, P.K. Majumder, Prostate gland: structure, functions and regulation, *Int Urol Nephrol.* 27 (1995) 231-243.
- F. Labrie, Endocrine therapy for prostate cancer, *Endocrinol Metab Clin North Am.* 20 (1991) 845-872.
- F. Labrie, V. Luu-The, S.X. Lin et al., Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease, *J Mol Endocrinol.* 25 (2000) 1-16.
- I. Laczko, D.L. Hudson, A. Freeman, M.R. Feneley, J.R. Masters, Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics, *Prostate.* 62 (2005) 260-266.
- S. Lambard, I. Galeraud-Denis, P.T. Saunders, S. Carreau. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *J Mol Endocrinol.* 32 (2004) 279-289.

- K.M. Lau, N.N. Tam, C. Thompson, R.Y. Cheng, Y.K. Leung, S.M. Ho, Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate, *Lab Invest.* 83 (2003) 743-757.
- I. Leav, K.M. Lau, J.Y. Adamset al., 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 (2001) 79-92.
- C. Lee, G. Prins, M. Henneberry, J. Grayhack. Effect of Estadiol on the Rat Prostate in the Presence and Absence of Testosterone and Pituitary. *J Androl.* 2 (1981) 293-299.
- Y.K. Leung, H.M. Lam, S. Wuet al., Estrogen receptor beta2 and beta5 are associated with poor prognosis in prostate cancer, and promote cancer cell migration and invasion, *Endocr Relat Cancer.* 17 (2010) 675-689.
- J. Levallet, B. Bilinska, H. Mittre, C. Genissel, J. Fresnel, S. Carreau, Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells, *Biol Reprod.* 58 (1998) 919-926.
- G. Lorbek, M. Lewinska, D. Rozman, Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids--from mouse models to human diseases, *FEBS J.* 279 (2012) 1516-1533.
- J. Lundqvist, M. Norlin, Effects of CYP7B1-related steroids on androgen receptor activation in different cell lines, *Biochim Biophys Acta.* 1821 (2012) 973-979.
- K. Machioka, A. Mizokami, Y. Yamaguchi, K. Izumi, S. Hayashi, M. Namiki, Active estrogen synthesis and its function in prostate cancer-derived stromal cells, *Anticancer Res.* 35 (2015) 221-227.
- A.M. Mahmoud, U. Al-Alem, M.M. Ali, M.C. Bosland, Genistein increases estrogen receptor beta expression in prostate cancer via reducing its promoter methylation, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 152 (2015) 62-75.
- P. Mak, C. Chang, B. Pursell, A.M. Mercurio, Estrogen receptor beta sustains epithelial differentiation by regulating prolyl hydroxylase 2 transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 (2013) 4708-4713.
- P. Mak, I. Leav, B. Pursellet al., ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading, *Cancer Cell.* 17 (2010) 319-332.
- S. Makela, L. Strauss, G. Kuiperet al., Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract, *Mol Cell Endocrinol.* 170 (2000) 219-229.
- C. Martin, R. Bean, K. Rose, F. Habib, J. Seckl, CYP7B1 catalyses the 7alpha-hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate, *Biochem J.* 355 (2001) 509-515.
- C. Martin, M. Ross, K.E. Chapmanet al., CYP7B generates a selective estrogen receptor beta agonist in human prostate, *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (2004) 2928-2935.
- S.A. Marts, G.M. Padilla, V. Petrow, Aromatase activity in microsomes from rat ventral prostate and Dunning R3327H rat prostatic adenocarcinoma, *J Steroid Biochem.* 26 (1987) 25-29.
- K. Maruyama, H. Endoh, H. Sasaki-Iwaokaet al., 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 (1998) 142-147.
- J. Matthews, J.A. Gustafsson, Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta, *Mol Interv.* 3 (2003) 281-292.

- H. Matzkin, M.S. Soloway, Immunohistochemical evidence of the existence and localization of aromatase in human prostatic tissues, *Prostate*. 21 (1992) 309-314.
- J.E. McNeal, Normal histology of the prostate, *Am J Surg Pathol*. 12 (1988) 619-633.
- S.J. McPherson, H. Wang, M.E. Jones, J. Pedersen, T.P. Iismaa, et al. Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology*. 142 (2001) 2458-2467.
- S.J. McPherson, S.J. Ellem, E.R. Simpson, V. Patchev, K.H. Fritzemeier, G.P. Risbridger, Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia, *Endocrinology*. 148 (2007) 566-574.
- S.J. McPherson, S. Hussain, P. Balanathan et al., 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 (2010) 3123-3128.
- S.J. McPherson, H. Wang, M.E. Jones, J. Pedersen, T.P. Iismaa, et al. Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology*. 142 (2001) 2458-2467.
- S.J. McPherson, H. Wang, M.E. Jones et al., Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland, *Endocrinology*. 142 (2001) 2458-2467.
- G.D. Means, M.S. Mahendroo, C.J. Corbin et al., Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, *J Biol Chem*. 264 (1989) 19385-19391.
- M. Morais-Santos, A.E. Nunes, A.G. Oliveira, J.D. Moura-Cordeiro, G.A. Mahecha, et al. Changes in Estrogen Receptor ERbeta (ESR2) Expression without Changes in the Estradiol Levels in the Prostate of Aging Rats. *PLoS One*. 10 (2015) e0131901.
- M. Morais-Santos. Investigação de alterações relacionadas com envelhecimento na expressão dos receptores de estrógenos ER-beta na próstata de ratos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. (2011).
- G. Morali, M.V. Oropeza, A.E. Lemus, G. Perez-Palacios, Mechanisms regulating male sexual behavior in the rat: role of 3 alpha- and 3 beta-androstane diols, *Biol Reprod*. 51 (1994) 562-571.
- K. Morito, T. Hirose, J. Kinjo et al., Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta, *Biol Pharm Bull*. 24 (2001) 351-356.
- S. Mosselman, J. Polman, R. Dijkema, ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor, *FEBS Lett*. 392 (1996) 49-53.
- S. Muthusamy, S. Andersson, H.J. Kim, R. Butler, L. Waage, U. Bergerheim, J.A. Gustafsson. Estrogen receptor beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6, a growth regulatory pathway that is lost in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (2011) 20090-20094.
- M.J. Naslund, J.D. Strandberg, D.S. Coffey, The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis, *J Urol*. 140 (1988) 1049-1053.
- H. Nawata, S. Tanaka, R. Takayanagi et al., Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women, *J Steroid Biochem Mol Biol*. 53 (1995) 165-174.
- D.W. Nebert, D.R. Nelson, M. Adesnik, M.J. Coon, R.W. Estabrook, et al. The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* 8 (1989) 1-13.
- P. Negri-Cesi, A. Poletti, A. Colciago, P. Magni, P. Martini, M. Motta, Presence of 5alpha-reductase isozymes and aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue, *Prostate*. 34 (1998) 283-291.

- A.W. Nelson, W.D. Tilley, D.E. Neal, J.S. Carroll, Estrogen receptor beta in prostate cancer: friend or foe? *Endocr Relat Cancer*. 21 (2014) T219-234.
- D.R. Nelson, T. Kamataki, D.J. Waxman et al., The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature, *DNA Cell Biol*. 12 (1993) 1-51.
- H. Nitta, D. Bunick, R.A. Hess et al., Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase, *Endocrinology*. 132 (1993) 1396-1401.
- M. Norlin, Expression of key enzymes in bile acid biosynthesis during development: CYP7B1-mediated activities show tissue-specific differences, *J Lipid Res*. 43 (2002) 721-731.
- L. O'Donnell, K.M. Robertson, M.E. Jones, E.R. Simpson. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22 (2001) 289-318.
- A.G. Oliveira, P.H. Coelho, F.D. Guedes, G.A. Mahecha, R.A. Hess, C.A. Oliveira, 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 (2007) 914-922.
- M. Olsson, O. Gustafsson, C. Skogastierna et al., Regulation and expression of human CYP7B1 in prostate: overexpression of CYP7B1 during progression of prostatic adenocarcinoma, *Prostate*. 67 (2007) 1439-1446.
- Y. Omoto, O. Imamov, M. Warner, J.A. Gustafsson, Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (2005) 1484-1489.
- C. Otto, B. Rohde-Schulz, G. Schwarz et al., G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol, *Endocrinology*. 149 (2008) 4846-4856.
- M.G. Oyola, D.G. Zuloaga, D. Carbone et al., CYP7B1 Enzyme Deletion Impairs Reproductive Behaviors in Male Mice, *Endocrinology*. 156 (2015) 2150-2161.
- T.R. Pak, W.C. Chung, T.D. Lund, L.R. Hinds, C.M. Clay, R.J. Handa, The androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells, *Endocrinology*. 146 (2005) 147-155.
- V. Papadopoulos, M.A. Drosowsky, S. Carreau, In vitro effects of prolactin and dexamethasone on rat Leydig cell aromatase activity, *Andrologia*. 18 (1986) 79-83.
- M.G. Parker, N. Arbuckle, S. Dauvois, P. Danielian, R. White, Structure and function of the estrogen receptor, *Ann N Y Acad Sci*. 684 (1993) 119-126.
- D. Pasquali, V. Rossi, D. Esposito et al., Loss of estrogen receptor beta expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues, *J Clin Endocrinol Metab*. 86 (2001) 2051-2055. (A)
- D. Pasquali, S. Staibano, D. Prezioso et al., Estrogen receptor beta expression in human prostate tissue, *Mol Cell Endocrinol*. 178 (2001) 47-50. (B)
- A.H. Payne, G.L. Youngblood, Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells, *Biol Reprod*. 52 (1995) 217-225.
- G. Pelletier, Expression of steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in human prostate, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 22 (2008) 223-228.
- G. Pelletier, C. Labrie, F. Labrie, Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs, *J Endocrinol*. 165 (2000) 359-370.
- G. Pelletier, V. Luu-The, M. El-Alfy, S. Li, F. Labrie, Immunoelectron microscopic localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland, *J Mol Endocrinol*. 26 (2001) 11-19.

- T.M. Penning, D.R. Bauman, Y. Jin, T.L. Rizner, Identification of the molecular switch that regulates access of 5alpha-DHT to the androgen receptor, *Mol Cell Endocrinol.* 265-266 (2007) 77-82.
- D.N. Petersen, G.T. Tkalcevic, P.H. Koza-Taylor, T.G. Turi, T.A. Brown, Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues, *Endocrinology.* 139 (1998) 1082-1092.
- H. Pettersson, J. Lundqvist, M. Norlin, Effects of CYP7B1-mediated catalysis on estrogen receptor activation, *Biochim Biophys Acta.* 1801 (2010) 1090-1097.
- K. Pettersson, J.A. Gustafsson, Role of estrogen receptor beta in estrogen action, *Annu Rev Physiol.* 63 (2001) 165-192.
- P. Picciarelli-Lima, A.G. Oliveira, A.M. Reiset al., 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 (2006) 51.
- A. Pravettoni, O. Mornati, P.G. Martiniet al., Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU145 cells, *Mol Cell Endocrinol.* 263 (2007) 46-54.
- D. Prezioso, L.J. Denis, H. Klocker et al., Estrogens and aspects of prostate disease, *Int J Urol.* 14 (2007) 1-16.
- G.S. Prins, Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression, *Endocrinology.* 130 (1992) 3703-3714.
- G.S. Prins, L. Birch, Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement, *Endocrinology.* 132 (1993) 169-178.
- G.S. Prins, L. Birch. Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology.* 138 (1997) 1801-1809.
- G.S. Prins, L. Birch, H. Habermann et al., Influence of neonatal estrogens on rat prostate development, *Reprod Fertil Dev.* 13 (2001) 241-252.
- G.S. Prins, L. Birch, W.Y. Tang, S.M. Ho, Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging, *Reprod Toxicol.* 23 (2007) 374-382.
- G.S. Prins, K.S. Korach, The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease, *Steroids.* 73 (2008) 233-244.
- G.S. Prins, M. Marmer, C. Woodham et al., Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats, *Endocrinology.* 139 (1998) 874-883.
- E.R. Prossnitz, J.B. Arterburn, H.O. Smith, T.I. Oprea, L.A. Sklar, H.J. Hathaway, Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30, *Annu Rev Physiol.* 70 (2008) 165-190.
- O. Putz, C.B. Schwartz, S. Kim, G.A. LeBlanc, R.L. Cooper, G.S. Prins, Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland, *Biol Reprod.* 65 (2001) 1496-1505.
- V. Rago, S. Aquila, R. Panza, A. Carpino, Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm, *Reprod Biol Endocrinol.* 5 (2007) 23.
- C.M. Revankar, D.F. Cimino, L.A. Sklar, J.B. Arterburn, E.R. Prossnitz, A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling, *Science.* 307 (2005) 1625-1630.

- W.A. Ricke, S.J. McPherson, J.J. Bianco, G.R. Cunha, Y. Wang, G.P. Risbridger, Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling, *FASEB J.* 22 (2008) 1512-1520.
- G. Risbridger, H. Wang, P. Young et al., Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium, *Dev Biol.* 229 (2001) 432-442.
- G.P. Risbridger, R.A. Taylor. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: Elsevier, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. New York (2006) 1149 – 1172.
- G.P. Risbridger, S.J. Ellem, S.J. McPherson. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol.* 39 (2007) 183-188.
- K. Rose, A. Allan, S. Gaudie et al., Neurosteroid hydroxylase CYP7B: vivid reporter activity in dentate gyrus of gene-targeted mice and abolition of a widespread pathway of steroid and oxysterol hydroxylation, *J Biol Chem.* 276 (2001) 23937-23944.
- K.A. Rose, G. Stapleton, K. Dottet et al., Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7alpha-hydroxy dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy pregnenolone, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997) 4925-4930.
- D.W. Russell, J.D. Wilson, Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes, *Annu Rev Biochem.* 63 (1994) 25-61.
- M. Sar, F. Welsch, Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis, *Andrologia.* 32 (2000) 295-301.
- A. Sasaki, K. Yoshinaga, Immunoreactive somatostatin in male reproductive system in humans, *J Clin Endocrinol Metab.* 68 (1989) 996-999.
- W.A. Sakr, G.P. Haas, B.F. Cassin, J.E. Pontes, J.D. Crissman. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol.* 150 (1993) 379-385.
- G. Stapleton, M. Steel, M. Richardson, J.O. Mason, K.A. Rose, R.G. Morris, R. Lathe. A novel cytochrome P450 expressed primarily in brain. *J Biol Chem.* 270 (1995) 29739-29745.
- P.T. Saunders, Oestrogen receptor beta (ER beta), *Rev Reprod.* 3 (1998) 164-171.
- P.T. Saunders, M.R. Millar, S. Macpherson et al., ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis, *J Clin Endocrinol Metab.* 87 (2002) 2706-2715.
- P.T. Saunders, R.M. Sharpe, K. Williamset et al., 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 (2001) 227-236.
- G.A. Scobie, S. Macpherson, M.R. Millar, N.P. Groome, P.G. Romana, P.T. Saunders, Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants, *Steroids.* 67 (2002) 985-992.
- S. Sebastian, S.E. Bulun, A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project, *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (2001) 4600-4602.
- S.B. Shappell, G.V. Thomas, R.L. Robertset et al., 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 (2004) 2270-2305.

- Y. Shibata, K. Ito, K. Suzuki et al., 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 (2000) 45-55.
- D. Shum, H. Djaballah, Plasmid-Based shRNA Lentiviral Particle Production for RNAi Applications, *J Biomol Screen*. (2014)
- W.W. Shum, N. Da Silva, M. McKee, P.J. Smith, D. Brown, S. Breton, Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia, *Cell*. 135 (2008) 1108-1117.
- E. Simpson, G. Rubin, C. Clyne et al., Local estrogen biosynthesis in males and females, *Endocr Relat Cancer*. 6 (1999) 131-137.
- E.R. Simpson, C. Clyne, G. Rubinet et al., Aromatase--a brief overview, *Annu Rev Physiol*. 64 (2002) 93-127.
- E.R. Simpson, S.R. Davis, Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives, *Endocrinology*. 142 (2001) 4589-4594.
- E.R. Simpson, M.W. Kilgore, M.S. Mahendroo, G.D. Means, C.J. Corbin, C.R. Mendelson, Regulation of human aromatase cytochrome P450 gene expression, *J Steroid Biochem Mol Biol*. 43 (1992) 923-930.
- E.R. Simpson, M.S. Mahendroo, G.D. Means et al., Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, *Endocr Rev*. 15 (1994) 342-355.
- E.R. Simpson, M.D. Michael, V.R. Agarwal, M.M. Hinshelwood, S.E. Bulun, Y. Zhao, Cytochromes P450 11: expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage, *FASEB J*. 11 (1997) 29-36.
- H.E. Sjoberg, S. Arver, E. Bucht, High concentration of immunoreactive calcitonin of prostatic origin in human semen, *Acta Physiol Scand*. 110 (1980) 101-102.
- D.F. Skafar, C. Zhao, The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain, *Endocrine*. 33 (2008) 1-8.
- T. Smith, G.D. Chisholm, F.K. Habib, Failure of human benign prostatic hyperplasia to aromatise testosterone, *J Steroid Biochem*. 17 (1982) 119-120.
- S.F. Sneddon, N. Walther, P.T. Saunders, Expression of androgen and estrogen receptors in sertoli cells: studies using the mouse SK11 cell line, *Endocrinology*. 146 (2005) 5304-5312.
- S. Steckelbroeck, Y. Jin, B. Oyesanmi, H.J. Kloosterboer, T.M. Penning, 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 (2004) 1702-1711.
- D.L. Stenoien, M.G. Mancini, K. Patel, E.A. Allegretto, C.L. Smith, M.A. Mancini, Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1, *Mol Endocrinol*. 14 (2000) 518-534.
- D.M. Stocco, M. J. McPhaul. *Physiology of Testicular Steroidogenesis*. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* New York (2006) 977-1016.
- N.N. Stone, W.R. Fair, J. Fishman, Estrogen formation in human prostatic tissue from patients with and without benign prostatic hyperplasia, *Prostate*. 9 (1986) 311-318.
- Y. Sun, J. Niu, J. Huang, Neuroendocrine differentiation in prostate cancer, *Am J Transl Res*. 1 (2009) 148-162.
- K. Sundaram, N. Kumar. *Metabolism of testosterone in Leydig cells and peripheral tissues*. The *Leydig Cell*. Viena: Cache River Press (1996) 287-306.

- M. Sundin, M. Warner, T. Haaparanta, J.A. Gustafsson, Isolation and catalytic activity of cytochrome P-450 from ventral prostate of control rats, *J Biol Chem.* 262 (1987) 12293-12297.
- Y. Takase, M.H. Levesque, V. Luu-The, M. El-Alfy, F. Labrie, G. Pelletier, Expression of enzymes involved in estrogen metabolism in human prostate, *J Histochem Cytochem.* 54 (2006) 911-921.
- Y. Takase, M.H. Levesque, V. Luu-The, M. El-Alfy, F. Labrie, G. Pelletier, Expression of enzymes involved in estrogen metabolism in human prostate, *J Histochem Cytochem.* 54 (2006) 911-921.
- H. Takeda, N. Suematsu, T. Mizuno, Transcription of prostatic steroid binding protein (PSBP) gene is induced by epithelial-mesenchymal interaction, *Development.* 110 (1990) 273-281.
- W. Tang, M. Norlin, Regulation of steroid hydroxylase CYP7B1 by androgens and estrogens in prostate cancer LNCaP cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 344 (2006) 540-546.
- R.A. Taylor, G.P. Risbridger, The path toward identifying prostatic stem cells, *Differentiation.* 76 (2008) 671-681.
- P. Thorson, P.E. Swanson, R.T. Vollmer, P.A. Humphrey. Basal cell hyperplasia in the peripheral zone of the prostate. *Mod Pathol.* 16 (2003) 598-606.
- O.M. Tirado, D.M. Selva, N. Toranet al., Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration, *J Androl.* 25 (2004) 84-94.
- G.B. Tremblay, A. Tremblay, N.G. Copeland et al., Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta, *Mol Endocrinol.* 11 (1997) 353-365.
- M. Tsugaya, F.K. Habib, G.D. Chisholm et al., Testosterone metabolism in primary cultures of epithelial cells and stroma from benign prostatic hyperplasia, *Urol Res.* 24 (1996) 265-271.
- T. Tsurusaki, D. Aoki, H. Kanetake et al., Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia, *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (2003) 1333-1340.
- A.P. Verhagen, F.C. Ramaekers, T.W. Aalders, H.E. Schaafsma, F.M. Debruyne et al., Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. *Cancer Res* 52 (1992) 6182-6187.
- K.D. Voigt, W. Bartsch, Intratissular androgens in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer, *J Steroid Biochem.* 25 (1986) 749-757.
- C.K. Wagner, J.I. Morrell, Neuroanatomical distribution of aromatase mRNA in the rat brain: indications of regional regulation, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61 (1997) 307-314.
- C. Wang, E.R. Prossnitz, S.K. Roy, G protein-coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary, *Endocrinology.* 149 (2008) 4452-4461.
- J.M. Ward, G. Reznik, S.F. Stinson, C.P. Lattuada, D.G. Longfellow, T.P. Cameron, Histogenesis and morphology of naturally occurring prostatic carcinoma in the ACI/segHapBR rat, *Lab Invest.* 43 (1980) 517-522.
- R.V. Weatherman, R.J. Fletterick, T.S. Scanlan, Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains, *Annu Rev Biochem.* 68 (1999) 559-581.
- Z. Weihua, R. Lathe, M. Warner, J.A. Gustafsson, 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 (2002) 13589-13594.
- Z. Weihua, S. Makela, L.C. Andersson et al., A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 6330-6335.

- N.B. West, C.E. Roselli, J.A. Resko, G.L. Greene, R.M. Brenner, Estrogen and progesterin receptors and aromatase activity in rhesus monkey prostate, *Endocrinology*. 123 (1988) 2312-2322.
- R. White, M.G. Parker, Molecular mechanisms of steroid hormone action, *Endocrine-Related Cancer*. 5 (1998) 1-14.
- A.S. Wright, R.C. Douglas, L.N. Thomas, C.B. Lazier, R.S. Rittmaster, Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase, *Endocrinology*. 140 (1999) 4509-4515.
- Z. Wu, K.O. Martin, N.B. Javitt, J.Y. Chiang, Structure and functions of human oxysterol 7alpha-hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1, *J Lipid Res*. 40 (1999) 2195-2203.
- Q. Zhou, R. Nie, G.S. Prins, P.T. Saunders, B.S. Katzenellenbogen, R.A. Hess, Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract, *J Androl*. 23 (2002) 870-881.
- W. Xie, Y.C. Wong, S.W. Tsao. Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *Prostate*. 44 (2000) 31-39.
- G.S. Yang, Y. Wang, P. Wang, Z.D. Chen. Expression of oestrogen receptor-alpha and oestrogen receptor-beta in prostate cancer. *Chin Med J (Engl)*. 120 (2007) 1611-1615.
- H. Yun, J. Xie, A.F. Olumi, R. Ghosh, A.P. Kumar. Activation of AKR1C1/ERbeta induces apoptosis by downregulation of c-FLIP in prostate cancer cells: A prospective therapeutic opportunity. *Oncotarget*. 6 (2015) 11600-11613.

Anexo

ANEXO – ARTIGO PUBLICADO