

AMANDA CRISTINA REIS GONZAGA

**Estudo comparativo do perfil apoptótico ativado pelas vias  
intrínseca e extrínseca na próstata ventral de ratos Wistar durante o  
envelhecimento**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro de 2013

AMANDA CRISTINA REIS GONZAGA

**Estudo comparativo do perfil apoptótico ativado pelas vias  
intrínseca e extrínseca na próstata ventral de ratos Wistar durante o  
envelhecimento**

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

Área de concentração: Biologia Celular.  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cleida Aparecida de Oliveira.

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro de 2013

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

*“Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência.”*  
*Chico Xavier*

*Dedico essa dissertação a minha família. Que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me incentivando, nos momentos de dificuldades e nos momentos de alegrias e conquistas. O apoio e o amor incondicional que sempre me deram, foram fundamentais para que eu alcançasse todos os meus objetivos. Em especial, ao meu pai e minha mãe, que nunca mediram esforços para me ajudar a vencer os obstáculos, sempre me incentivando e me aconselhando. Amo vocês imensamente.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu mestre, que guiou meus passos e me deu a força e a perseverança necessárias para chegar até aqui.

A minha orientadora Dra. Cleida Aparecida de Oliveira, pela grande oportunidade e pelos inúmeros ensinamentos, que me ajudaram a crescer profissionalmente, e que foram fundamentais para a minha formação, e que irei levar por toda minha caminhada.

Ao Prof. Germán Arturo Bohórquez Mahecha pelos ensinamentos, pela disposição em ajudar e pela companhia no laboratório às 7 horas da manhã.

Aos grandes amigos do LABRE, por toda ajuda, companheirismo e amizade. Foi maravilhoso dividir esses dois anos com vocês. Momentos, alegrias, histórias, gargalhadas, choros, frustrações, dúvidas, decisões, obrigada por participarem de tudo isso comigo. Mônica Morais – Munica obrigada por tudo que me ensinou, pelo quanto me ajudou no meu crescimento, por toda amizade, pelos conselhos e pelos desabafos, que não foram poucos. Regiana Lúcia – Rê, mãezona, obrigada por toda paciência, carinho e disponibilidade ao me ajudar e ao me ensinar diversas coisas. Júnia Dayrell – Xúnia obrigada pela imensa amizade, pelos choros, segredos, confissões, conselhos, gargalhadas, dancinhas da sexta-feira, everything, vou levar sua amizade pra sempre e até tomorrow. Pollyana Campos – Xêmia muito obrigada pelo companheirismo e por todos os momentos de alegria que dividimos nesse tempo. Cristiano Guimarães – obrigada pelos momentos de descontração e por me fazer rir com toda sua rabugice. Gabriel Henrique – por tantas palhaçadas e pela ótima companhia. André Gustavo – por todos os ensinamentos e por toda alegria. Lílian Praes – pela companhia, amizade e pelos origamis. Elisângela Martins – pela ajuda nos momentos necessários. As meninas, Pamela Carolina, Aryane Evelyn, Fernanda Aranha, Luane Fagundes, Roberta Araujo – pela disposição e disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

A todos os amigos que fiz na UFMG, com os quais partilhei sonhos, conquistas, preocupações, soluções e alegrias. Em especial à Laís Quintão, Diego Aquino, Marcos Damasio e Carina Horta.

A minha família pela paciência, incentivo, carinho e confiança. Por muitas vezes entenderem a minha ausência e por sempre torcerem pela minha vitória. Obrigada, pai, mãe, meus irmãos, Flávia, Ana, Jonathan e Rodrigo e meus sobrinhos Ester, Bia e Tiago. Amo vocês.

Ao Wellerson, meu grande amigo e companheiro, que com toda paciência e compreensão me apoiou nas minhas escolhas, me aconselhou e me incentivou. E soube entender e lidar com muito amor e carinho todos os meus momentos de estresse, sensibilidade e mau humor. Amor, te amo!

Ao professor José Carlos, pela alegria contagiante e pelo grande exemplo de profissional e pesquisador.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular por contribuírem para minha formação.

## RESUMO

O crescimento e diferenciação da próstata, bem como a manutenção de seus componentes e sua função são dependentes da ação de andrógenos. Porém, os estrógenos também apresentam papel importante na sua diferenciação e crescimento, além de participar de desordens patológicas como a hiperplasia benigna (HPB) e o adenocarcinoma, comuns na velhice em humanos e outros mamíferos. Os estrógenos desempenham seus efeitos biológicos através da ligação a receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ , destacando a intensa expressão de ER $\beta$  no epitélio prostático, relacionado com função pró-apoptótica, anti-proliferativa e pró-diferenciação. Tanto o adenocarcinoma como HPB estão relacionados com distúrbios no balanço entre proliferação e morte celular. Essa homeostase das células epiteliais é dependente de andrógenos, mas há evidências de que estrógenos participam no processo. Confirmando tal fato, existe marcante redução na expressão de ER $\beta$  em tecidos malignos ou pré-malignos de próstata humana e de roedores. Considerando as funções já conhecidas para ER $\beta$ , é possível que o silenciamento desses receptores possa estar relacionado com o desequilíbrio entre proliferação e morte celular nessas condições patológicas. A apoptose é um tipo de morte celular programada, cuja sinalização pode ser iniciada pela via intrínseca (dependente de caspase-9) ou extrínseca (dependente de caspase-8). Evidências apontam que a apoptose no órgão pode ser ativada pela via intrínseca quando privada de testosterona e pela via extrínseca quando tratados com agonista de ER $\beta$ . No entanto, não está esclarecido se há variação nos diferentes componentes das vias de ativação de apoptose na próstata dependendo da idade. Dessa forma, nosso objetivo foi determinar se ocorre variação nos mecanismos de apoptose na próstata de ratos Wistar em diferentes idades (3, 6, 12, 18 e 24 meses). As análises morfológicas e imunohistoquímicas para caspase-3, caspase-9 e TUNEL revelaram que apoptose é escassa no epitélio glandular nas diferentes idades. Já as análises para caspase-8 mostraram aumento progressivo da positividade no epitélio com o envelhecimento, preferencialmente em locais de atrofia e em células sem características morfológicas de apoptose, os quais apresentam também reduzida expressão de ER $\beta$  e TNF $\alpha$  que são fatores pró-apoptóticos. Dessa forma, é possível que os baixos níveis de ER $\beta$  e TNF $\alpha$  estejam direcionando a ativação de caspase-8 para sua ação alternativa pró-sobrevivência. Esses dados são inéditos e de importância para a área, indicando mais um possível alvo na profilaxia e manejo de patologias envolvendo a homeostase tecidual da próstata em humanos e outros mamíferos.

## ABSTRACT

The growth and differentiation of the prostate gland, as well as maintenance of its components and its roles are dependent on androgens. However, estrogens also play important role in prostate growth and differentiation and participate in pathological disorders such as benign hyperplasia and adenocarcinoma, common in aging animals. Estrogens play their biological effects by binding to ER $\alpha$  and ER $\beta$  receptors. ER $\beta$  is highly expressed in the glandular epithelium, playing important pro-apoptotic, anti-proliferative and pro-differentiation roles. Both adenocarcinoma and benign hyperplasia are related to disturbances in the balance between proliferation and cell death. The homeostasis of epithelial cells is dependent of androgens, but there is evidence that estrogens participate in this process. Confirming this fact, it is known that there is marked reduction in the expression of ER $\beta$  in malignant tissues or pre-malignant prostate in human and rodents. Given the known functions of ER $\beta$ , it is possible that silencing of these receptors may be related to the unbalance between proliferation and cell death in pathological conditions. Apoptosis is a type of programmed cell death, which can be initiated by the intrinsic (dependent of caspase-9) or extrinsic (dependent of caspase-8) pathways. Evidence supports that apoptosis in the prostate can be activated by the intrinsic pathway when there is testosterone withdrawal and by extrinsic pathway when treated with ER $\beta$  agonist, being androgen independent and mediated by TNF $\alpha$ . However, it is unclear if there is variation in the various components of the activation pathways of apoptosis in the prostate depending on age. Thus, our aim was to determine if there is variation in mechanisms of apoptosis in the prostate of Wistar rats in different ages (3, 6, 12, 18 and 24 months). The morphological and immunohistochemical analysis for caspase-3, caspase-9 and TUNEL showed that apoptosis is scarce in the glandular epithelium at different ages. Nevertheless, analyzes for caspase-8 showed a progressive increase in positivity with aging, preferentially at sites with atrophy or cells without morphological characteristics of apoptosis, which also have reduced expression of ER $\beta$  and TNF $\alpha$ , which are pro-apoptotic factors. Thus, it is possible that low levels of TNF $\alpha$  and ER $\beta$  are directing the activation of caspase-8 to its alternative pro-survival action. These data are novel and important, indicating another potential target for the prophylaxis and management of disorders involving the prostate tissue homeostasis.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Localização preferencial dos receptores de estrógeno, ER $\alpha$ e ER $\beta$ na próstata, e suas principais funções.	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Alterações morfológicas da célula e nas diferentes etapas da apoptose.	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b> Estrutura geral das caspases e classificação de acordo com o tamanho do pró-domínio.	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Vias de ativação para apoptose.	<b>13</b>
<b>Figura 5.</b> Organização estrutural e funcional das proteínas da família Bcl-2.	<b>14</b>
<b>Figura 6.</b> Peso corporal de ratos Wistar (gramas) em diferentes idades (meses).	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Peso relativo do complexo prostático de ratos Wistar em diferentes idades.	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b> Histopatologia da próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> Índice de células morfológicamente em apoptose no epitélio da próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>33</b>
<b>Figura 10.</b> Figuras de apoptose na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>34</b>
<b>Figura 11.</b> Índice de células imunorreativas para caspase-8 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>35</b>
<b>Figura 12.</b> Imunohistoquímica para caspase-8 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>36</b>
<b>Figura 13.</b> Índice de células imunorreativas para caspase-9 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>37</b>
<b>Figura 14.</b> Imunohistoquímica para caspase-9 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>38</b>
<b>Figura 15.</b> Índice de células imunorreativas para Caspase-3 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>39</b>

<b>Figura 16.</b> Imunohistoquímica para caspase-3 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>40</b>
<b>Figura 17.</b> Índice de células TUNEL positivas na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>41</b>
<b>Figura 18.</b> Células TUNEL positivas na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.	<b>42</b>
<b>Figura 19.</b> <i>Western blotting</i> para caspase-3 ativada.	<b>43</b>

## LISTA DE TABELAS

**Página**

**Tabela 1.** Classificação funcional das caspases.

**10**

# SUMÁRIO

<b>I. REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>1</b>
1. PRÓSTATA .....	1
1.1 Histologia da Próstata .....	2
2. REGULAÇÃO HORMONAL DA PRÓSTATA .....	3
2.1 Andrógenos .....	3
2.2 Estrógenos .....	4
3. PATOLOGIAS DA PRÓSTATA.....	6
3. APOPTOSE .....	7
3.1 Caspases .....	9
3.2 Vias de Sinalização para Apoptose .....	12
3.3 Proteínas Reguladoras da Apoptose .....	14
4. APOPTOSE E PRÓSTATA VENTRAL .....	15
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
1. OBJETIVO GERAL .....	19
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>III. METODOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
1. ANIMAIS .....	21
2. PREPARO DOS TECIDOS .....	21
3. HISTOPATOLOGIA.....	22
4. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	22

5. MÉTODO DE TUNEL .....	23
6. ESTUDO QUANTITATIVO DO NÚMERO DE CÉLULAS EM APOPTOSE .....	25
7. WESTERN BLOTTING.....	25
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
1. PESO CORPORAL E DO COMPLEXO PROSTÁTICO .....	28
2. HISTOLOGIA DA PRÓSTATA VENTRAL E ALTERAÇÕES COM O ENVELHECIMENTO .....	29
3. APOPTOSE NA PRÓSTATA VENTRAL .....	32
4. IMUNOHISTOQUÍMICA .....	35
4.1 Caspase - 8.....	35
4.2 Caspase - 9.....	37
4.3 Caspase - 3.....	39
5. MÉTODO DE TUNEL .....	41
6. WESTERN BLOTTING .....	42
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>VII. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

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

---

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

### ***1. PRÓSTATA***

A próstata é uma das maiores glândulas anexas do sistema genital masculino de mamíferos, sendo classificada como glândula exócrina composta, constituída por um complexo arranjo de adenômeros túbulo-alveolares ramificados, sustentados pelo estroma conjuntivo-muscular liso (Mehta *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2009). A próstata está localizada abaixo da bexiga, envolvendo a porção inicial da uretra, sendo em humanos dividida em zonas concêntricas, denominadas zona central, zona de transição ou periuretral e zona periférica, compostas por tecido glandular, além da zona anterior, composta por estroma fibromuscular (McNeal, 1981; Risbridger & Taylor, 2006). Em ratos, o complexo prostático é composto por quatro pares de lobos denominados: próstata ventral, próstata lateral, próstata dorsal e próstata anterior, também chamada de glândula de coagulação (Hayashi *et al.*, 1991).

A próstata é responsável pela produção e secreção do líquido prostático, um fluido homogêneo, leitoso e ligeiramente ácido, que corresponde a aproximadamente 30% do sêmen (Kumar & Majumder, 1995; Mehta *et al.*, 2000). O líquido prostático é constituído por diversas enzimas como a fosfatase ácida, fibrinolisina, coagulase, antígeno prostático específico (PSA), além de lípidos, íons zinco, citrato de cálcio, frutose, entre outros (Aümuller, 1979; Kumar & Majumder, 1995). Funcionalmente a fibrinolisina, juntamente com a coagulase e o PSA, além de outras enzimas, participam da liquefação do sêmen e do muco cervical, facilitando a veiculação dos espermatozoides (Aümuller, 1979; Kumar & Majumder, 1995). Assim como os lípidos, a fosfatase ácida está diretamente relacionada com a nutrição dos espermatozoides, atuando através da conversão da fosforilcolina em colina (Aümuller, 1979; Kumar & Majumder, 1995). O citrato de cálcio tampona o pH do líquido prostático que é alcalino, sendo fundamental para neutralizar o pH ácido da vagina e assim garantir a sobrevivência dos espermatozoides nas vias genitais femininas (Aümuller, 1979; Kumar & Majumder, 1995). Por sua vez, o zinco, que é encontrado em abundância na secreção prostática, apresenta papel protetor, sendo antioxidante e antibacteriano (Aümuller, 1979; Kumar & Majumder, 1995).

### ***1.1 Histologia da Próstata***

O epitélio dos adenômeros prostáticos é classificado como colunar pseudoestratificado e composto por três tipos celulares distintos, sendo as células luminais ou secretoras, as células basais e as células neuroendócrinas (El-Alfy *et al.*, 2000; Signoretti *et al.*, 2000). Em homens, as células basais são cuboides e formam uma camada contínua de células em contato com a lâmina basal, sendo, logo acima destas encontradas as células luminais, colunares, dando ao epitélio um aspecto biestratificado. Em roedores, o epitélio colunar é formado por uma camada de células luminais prismáticas e células basais escassas, confinadas a porção basal do epitélio e dispostas de forma mais dispersa (El-Alfy *et al.*, 2000; Pelletier, 2008). As células basais do epitélio prostático podem ser achatadas, triangulares ou cuboidais (Aümuller, 1979). Elas encontram-se em estado mais indiferenciado, apresentando função de célula-tronco no tecido (Aümuller, 1979; Signoretti *et al.*, 2000). No entanto, na próstata humana algumas células basais apresentam-se diferenciadas e são positivas para as enzimas 3 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), 17 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase (17 $\beta$ -HSD) tipo 5 e 5 $\alpha$ -reductase tipo 2, indicando participação na esteroidogênese local (Pelletier, 2008).

As células luminais são colunares, apresentando núcleo arredondado ou oval, localizado no terço inferior da célula (Aümuller, 1979). Essas células são as mais abundantes do epitélio, sendo responsáveis pela produção e secreção dos constituintes do líquido prostático, o que justifica a presença de desenvolvido retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e abundantes grânulos de secreção na região apical das células (Aümuller, 1979; Pelletier, 2008).

As células neuroendócrinas prostáticas encontram-se distribuídas irregularmente pelo epitélio glandular, estando em maior número nos ductos principais. Podem ser classificadas como células neuroendócrinas abertas ou fechadas, sendo que, as abertas se alongam e chegam ao lúmen, enquanto as fechadas não se estendem até o lúmen, permanecendo entre a camada de células luminais e a lâmina basal (Abrahamsson, 1999). Estas células apresentam funções regulatórias intraepiteliais, participando no crescimento e diferenciação da próstata e regulando processos secretórios na glândula madura (Abrahamsson & di Sant'Agnese, 1993). Secretam, dentre outros, neurofisina, cromogranina A, sinaptofisina e calcitonina (Taylor & Risbridger, 2008).

O estroma de sustentação é constituído por fibras de tecido conjuntivo, fibroblastos, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, células do sistema imune, como os mastócitos, além de

fibras musculares lisas (Beckman *et al.*, 1987; Hayward *et al.*, 1996). A próstata humana e de roedores apresentam os mesmos tipos celulares, sendo a principal diferença, a presença de abundantes fibras musculares lisas no estroma da próstata humana, o que não é observado em roedores (Hayward *et al.*, 1996). Em roedores as fibras musculares lisas formam uma delgada camada de três a cinco células, envolvendo os adenômeros, enquanto que em humanos são encontradas em abundância e distribuídas por todo o estroma (Hayward *et al.*, 1996).

## **2. REGULAÇÃO HORMONAL DA PRÓSTATA**

O crescimento e diferenciação da próstata, bem como a manutenção de seus componentes e sua função são dependentes da ação de andrógenos (Kirschenbaum *et al.*, 2006; McPherson *et al.*, 2008). Porém, os estrógenos também apresentam papel importante, sendo que diversos estudos têm demonstrado sua participação na diferenciação e crescimento da próstata, além do seu papel em suas desordens patológicas (Jarred *et al.*, 2000; Kirschenbaum *et al.*, 2006; McPherson *et al.*, 2007).

### **2.1 Andrógenos**

Os andrógenos, testosterona e a diidrotestosterona (DHT), são considerados os principais hormônios sexuais que modulam o crescimento normal e desenvolvimento da próstata (Adams *et al.*, 2002). Os andrógenos que atingem a próstata têm duas possíveis origens: testículos e adrenais. Nos testículos, a célula de Leydig produz testosterona em resposta ao estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido e liberado por neurônios secretores do hipotálamo (Grossmann *et al.*, 2001). A ação desse hormônio induz a produção de hormônio luteinizante (LH) pelas células gonadotróficas da parte distal da adenohipófise (Grossmann *et al.*, 2001). O LH produzido irá atuar nas células de Leydig induzindo a produção de testosterona (Grossmann *et al.*, 2001). O aumento dos níveis de testosterona geram um *feedback* negativo para a produção de GnRH e LH.

Outra via de produção de andrógenos é a adrenal, sendo que a partir da adolescência existe um aumento na produção de andrógenos por esse órgão (Marshall, 1976). Os andrógenos são sintetizados no córtex da adrenal, a partir do colesterol, sendo a androstenediona e a

dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu metabólito, o sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA), os principais andrógenos liberados (Marshall, 1976; Hanukoglu, 1992). A produção desses sexoesteroides é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que induz, dentre outros processos, a translocação de colesterol livre para o interior das mitocôndrias, onde ele então será utilizado como substrato para a síntese dos precursores de andrógenos (Papadopoulos & Miller, 2012). Na mitocôndria, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima P450<sub>scc</sub>, que posteriormente é convertida em progesterona pela enzima 3 $\beta$ -HSD ou em DHEA pela enzima P450<sub>c17</sub> (Hanukoglu, 1992). A progesterona e a DHEA, por sua vez, são convertidas em androstenediona, através da ação das enzimas P450<sub>c17</sub> e 3 $\beta$ -HSD, respectivamente (Hanukoglu, 1992). A DHEA e a androstenediona são levadas pela corrente sanguínea até os órgãos periféricos, incluindo a próstata, onde serão convertidas em andrógenos potentes, como a testosterona e a DHT (Labrie, 1993). Sabe-se que aproximadamente 40% de DHT ainda permanecem na próstata após eliminação da fonte de testosterona testicular, o que confirma a importância da adrenal em gerar andrógenos que atingem a próstata (Labrie, 1993).

Na próstata, a testosterona é convertida, através da ação da enzima 5 $\alpha$ -reductase tipo 1 e 2 no andrógeno mais potente, a DHT (Risbridger *et al.*, 2007; McPherson *et al.*, 2008). Tanto testosterona como DHT irão atuar através da ligação a receptores de andrógenos (AR), sendo que DHT apresenta maior afinidade ao AR (Grossmann *et al.*, 2001; Pelletier, 2008). Os ARs são altamente expressos em células luminiais, além de serem expressos no estroma em núcleos de fibroblastos e não são expressos em células neuroendócrinas (Pelletier, 2008; Taylor & Risbridger, 2008). Existem controvérsias quanto à positividade de células basais e células endoteliais para AR, sendo que alguns autores consideram as células basais negativas e as células endoteliais positivas (Prins *et al.*, 1991), enquanto outros consideram células basais positivas e endoteliais negativas (Pelletier, 2008).

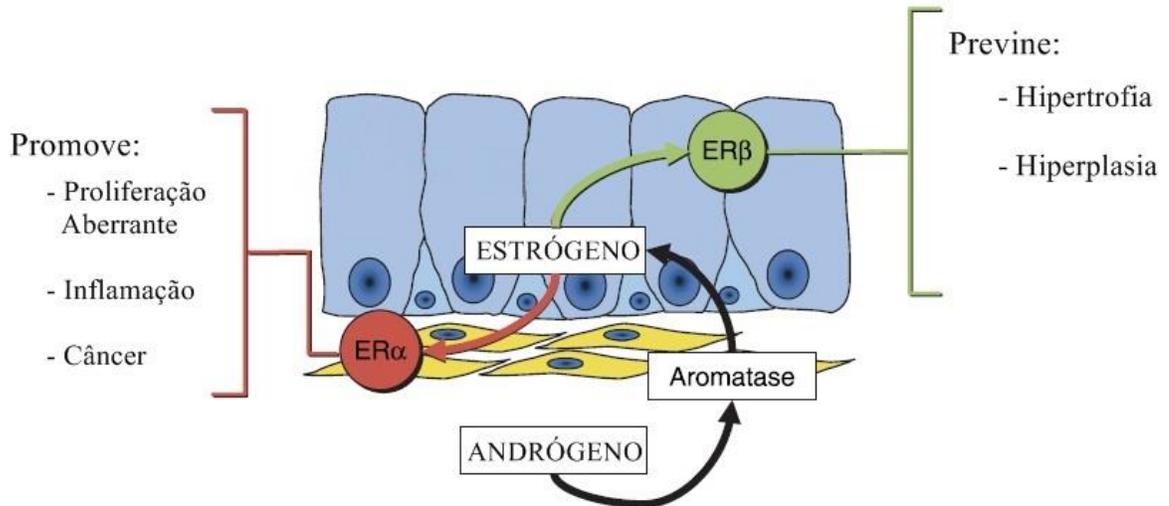
## **2.2 Estrógenos**

A testosterona também pode ser localmente convertida em estrógenos, sendo essa conversão irreversível e mediada pela enzima citocromo P450 aromatase (Carreau *et al.*, 2003). A aromatase é normalmente expressa no retículo endoplasmático liso de diversos tecidos, sendo encontrada no testículo, nas células de Leydig, células de Sertoli e em algumas células

germinativas (Carreau *et al.*, 2003; Ellem & Risbridger, 2009). Estudos mostram ainda, a expressão de aromatase no estroma da próstata humana normal e em células epiteliais prostáticas tumorais, não apresentando expressão em epitélio normal (Risbridger *et al.*, 2003; Ellem *et al.*, 2004).

Os estrógenos desempenham seus efeitos biológicos através da ligação com receptores nucleares específicos, denominados receptores de estrógenos (ER), sendo descritos dois subtipos destes receptores, os receptores de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e os receptores de estrógeno  $\beta$  (ER $\beta$ ) (Kuiper *et al.*, 1996; Kirschenbaum *et al.*, 2006). Assim como os AR, os ERs pertencem à superfamília de receptores nucleares e são fatores de transcrição regulados por ligantes (Matthews & Gustafsson, 2003). ER $\alpha$  e ER $\beta$  estão presentes na próstata, porém com marcantes diferenças quanto à intensidade de expressão e distribuição de tais receptores, tanto em humanos quanto em roedores, sendo os ER $\beta$  mais intensamente expressos no epitélio glandular, enquanto os ER $\alpha$  se limitam a algumas células do estroma (Makela *et al.*, 2000; Sar & Welsch, 2000; Tsurusaki *et al.*, 2003).

Através de modelos experimentais com camundongos *knockout* para o receptor ER $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) e/ou ER $\beta$  ( $\beta$ ERKO), foi identificado um papel proliferativo para ER $\alpha$  na próstata (Prins *et al.*, 2001; Risbridger *et al.*, 2001). Já os receptores ER $\beta$  estão relacionados com funções variadas na próstata, incluindo a regulação da apoptose, proliferação e diferenciação celular, reveladas por suas propriedades pró-apoptótica, anti-proliferativa e pró-diferenciação (Fig. 1) (Weihua *et al.*, 2001; Weihua *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004; Imamov *et al.*, 2004; McPherson *et al.*, 2007; Pravettoni *et al.*, 2007). Os estrógenos, ainda podem participar diretamente da proliferação aberrante de células basais do epitélio prostático, induzindo a metaplasia escamosa, processos inflamatórios e câncer (Risbridger *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Localização preferencial dos receptores de estrógeno, ER $\alpha$  e ER $\beta$  no epitélio e estroma da próstata, e suas principais funções. Esquema adaptado de Risbridger e colaboradores (2007).

### 3. PATOLOGIAS DA PRÓSTATA

A próstata é um órgão afetado por duas patologias frequentes em humanos idosos, a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (Laczko et al., 2005). Em homens a HPB ocorre quase que exclusivamente na zona de transição da próstata, enquanto que o câncer de próstata se desenvolve principalmente na zona periférica (Laczko et al., 2005).

O desenvolvimento de doenças andrógeno-dependentes como o câncer de próstata e a HPB pode ser efetivamente favorecido pelo desequilíbrio hormonal, que ocorre durante o envelhecimento, e é caracterizado pela diminuição dos níveis de testosterona sérica em relação ao estradiol (Banerjee et al., 2001; Bauman et al., 2006; Ellem & Risbridger, 2009).

O câncer de próstata é o tipo de câncer não-cutâneo mais prevalente em homens, além de constituir a segunda maior causa de morte por câncer no Brasil e no mundo. Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA-Ministério da Saúde, 2012; <http://www.inca.gov.br>), o número de novos casos de câncer de próstata estimados para o Brasil em 2012/2013 é de 60.180, o que corresponde a um risco de 62 novos casos a cada 100 mil homens, superando a estimativa para o câncer de mama, que é de 52.680 novos casos, no mesmo período. Entre as causas e os fatores de risco para o câncer de próstata, a idade tem papel de destaque, uma vez que tanto sua incidência quanto a mortalidade aumentam exponencialmente após os 50 anos de idade (Begley et al., 2008; Patel & Klein, 2009).

A hiperplasia prostática benigna é caracterizada pelo crescimento não neoplásico do epitélio glandular (Shappell *et al.*, 2004). A HPB é identificada pelo aumento do órgão, que se dá devido ao aumento do número e do volume de células epiteliais, levando ao intenso pregueamento do epitélio glandular (Shappell *et al.*, 2004).

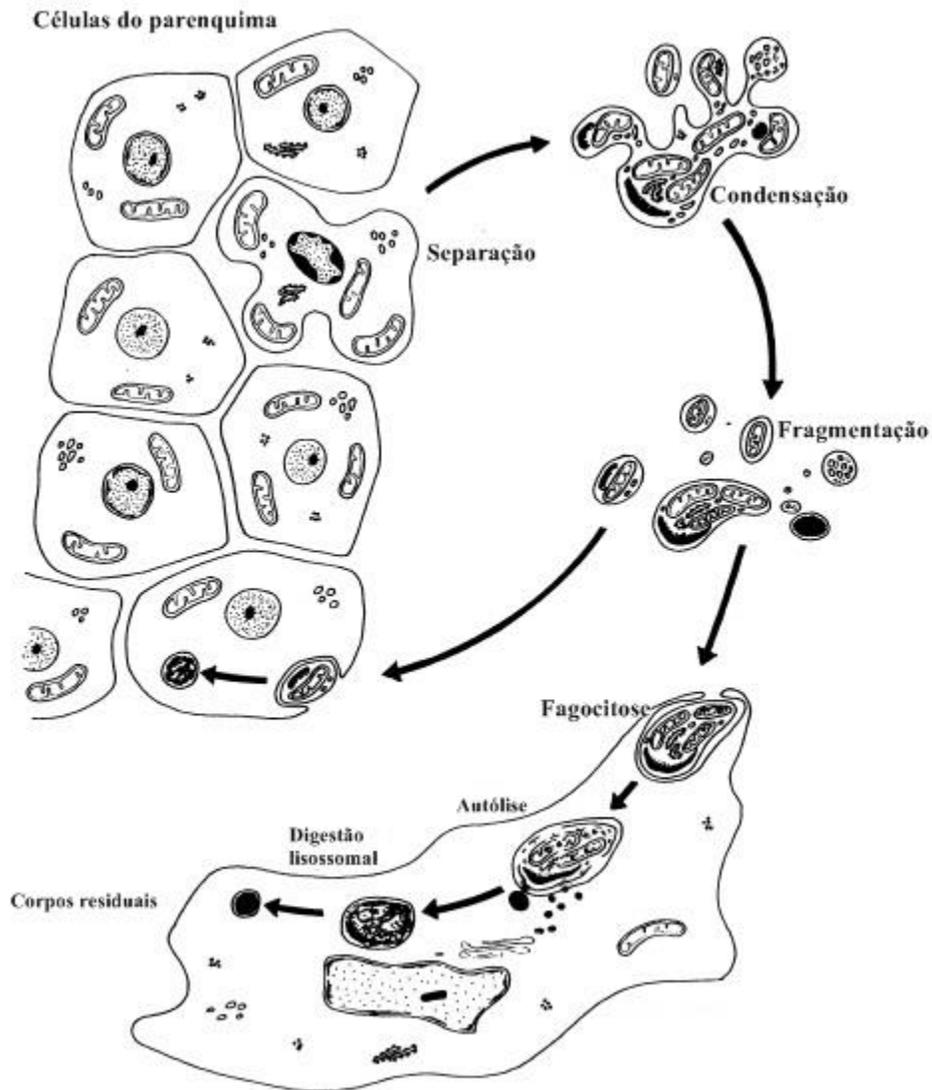
Tanto a HPB quanto os adenocarcinomas prostáticos estão relacionados com distúrbios na homeostase tecidual, que é dependente de um delicado equilíbrio entre proliferação e morte celular (Kusljic & Exintaris, 2010). Na próstata, a homeostase das células epiteliais é dependente de andrógenos, mas há inúmeras evidências de que outros esteroides, como estrógenos, participam de forma importante nesse processo (Ricke *et al.*, 2008; Ellem & Risbridger). Sendo assim, o desequilíbrio nos níveis de andrógeno e estrógenos comuns na velhice, são críticos para a malignidade do epitélio prostático (Ricke *et al.*, 2008; Ellem & Risbridger, 2009). Esse desbalanço hormonal aponta para um possível efeito também no equilíbrio entre morte e proliferação celular (Banerjee *et al.*, 2001; Bauman *et al.*, 2006; Ellem & Risbridger, 2009).

Confirmando tal fato, estudos recentes realizados pela nossa equipe mostraram que existe marcante redução na expressão de ER $\beta$  em regiões específicas da próstata de ratos Wistar em envelhecimento, especialmente em locais com atrofia epitelial ou indícios de distúrbios da proliferação, como neoplasia intraepitelial prostática (PIN – *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*), sugerindo uma forte relação entre o silenciamento desse receptor com condições malignas ou pré-malignas da próstata (Morais-Santos, 2011). Fato similar tem sido descrito por diversos autores em tecidos malignos de próstata humana (Horvath *et al.*, 2001; Pasquali *et al.*, 2001; McPherson *et al.*, 2008), indicando que o silenciamento desses receptores pode estar relacionado com o desbalanço entre proliferação e morte celular nessas condições patológicas.

### **3. APOPTOSE**

A apoptose é um tipo de morte celular programada, que tem como principal função manter a homeostase tecidual, juntamente com outros importantes processos como a proliferação e a diferenciação celular (Degterev *et al.*, 2003; Kavathia *et al.*, 2009). A célula em apoptose apresenta alterações morfológicas e bioquímicas específicas (Kerr *et al.*, 1972). Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela perda do contato célula-célula e célula-matriz, diminuição do volume celular devido à condensação do citoplasma e da cromatina, formando

massas densas aderidas ao envoltório nuclear. A superfície celular se torna irregular devido à formação de numerosas protrusões (*blebs*). Com o progresso do processo ocorre fragmentação nuclear e citoplasmática, formando os chamados corpos apoptóticos, limitados por membrana plasmática e contendo parte das organelas citoplasmáticas condensadas e/ou fragmentos nucleares. Os corpos apoptóticos posteriormente são reconhecidos e fagocitados por outras células circunvizinhas (Fig. 2).



**Figura 2.** Alterações morfológicas da célula e nas diferentes etapas da apoptose. Desenho esquemático baseado em Kerr *et al* (1972).

Além das alterações morfológicas sofridas pela célula em apoptose, alterações bioquímicas também são marcantes. A modificação na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular apresenta importante influencia na sinalização para a morte celular por apoptose (Smaili *et al.*, 2009).

Quando o estímulo de morte é gerado a concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta, devido à abertura de canais na membrana plasmática (Norberg *et al.*, 2010). A mitocôndria é uma organela chave no processo apoptótico, sendo que o desequilíbrio na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  atua induzindo aumento da permeabilidade da sua membrana externa (Scorrano *et al.*, 2003; Grivicich *et al.*, 2007; Smaili *et al.*, 2009). Essa permeabilização ocorre devido à atividade formadora de poros de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bak e Bax). A formação de poros leva a consequências letais como: perda do potencial de membrana da mitocôndria, desacoplamento da cadeia respiratória e liberação de proteínas tóxicas para o citoplasma, como citocromo c, SMAC/Diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with a Low isoelectric point*), fator indutor de apoptose (AIF - *Apoptosis Inducing Factor*) e endonuclease G (Amarante-Mendes, 2003).

Uma das modificações encontradas em células apoptóticas, e que é responsável pelo seu reconhecimento e fagocitose, é a externalização de resíduos de fosfatidilserina na membrana plasmática, resíduos esses que em condições normais se encontram voltados para o citoplasma celular (Amarante-Mendes, 2003). Esse processo ocorre através da oxidação da fosfatidilserina pelo citocromo c, liberado pela mitocôndria, que então, se torna passível de translocação para a face externa da membrana plasmática (Wu *et al.*, 2006). Outra importante característica das células em apoptose é a fragmentação intranucleossômica do DNA por endonucleases, como a endonuclease G e AIF liberadas da mitocôndria, que geram um padrão característico de fragmentos de DNA de tamanhos que variam sempre em múltiplos de 200 pares de bases (Grivicich *et al.*, 2007).

O principal processo para a morte celular por apoptose se dá pela ação em cascata de membros da família cisteína-aspartato proteases, denominadas Caspases, estando a ativação dessa cascata diretamente ligada ao fenótipo resultante da célula em apoptose (Amarante-Mendes, 2003).

### **3.1 Caspases**

As principais moléculas para a sinalização e execução de apoptose nas células são as caspases (*cysteine-dependent aspartyl-specific protease*), enzimas pertencentes à família das cisteína-proteases que reconhecem e clivam substratos que possuem resíduos de aspartato (Green

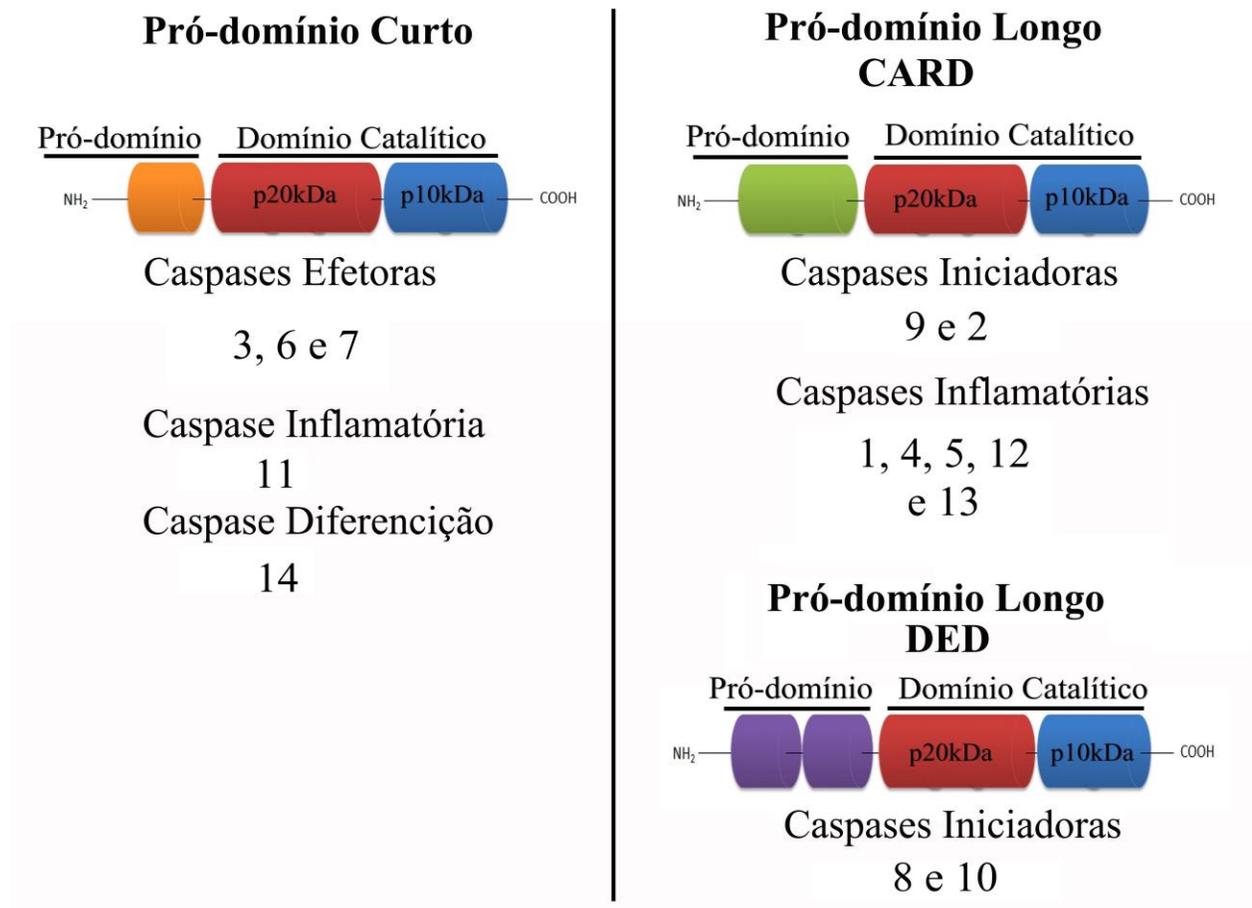
& Reed, 1998; Sakamaki & Satou, 2009). Em humanos são descritas 11 caspases, denominadas de 1 a 10, além da caspase-14, enquanto que em roedores e bovinos existem ainda as caspases-11 a -13 (Sakamaki & Satou, 2009). As caspases exercem diversas funções, além de participarem no processo de apoptose (Tabela 1). Elas podem atuar nas vias de sinalização para a apoptose como iniciadoras do processo, sendo estas as caspase-2, -8, -9 e -10, ou efetoras da apoptose, como as caspases-3, -6 e -7 (Degterev *et al.*, 2003; Sakamaki & Satou, 2009). A caspase-3 é a principal caspase efetora, sendo responsável, entre outras funções, pelo reconhecimento e clivagem da subunidade que inibe o fator de fragmentação do DNA (DFF- *DNA fragmentation factor*), liberando sua subunidade ativa, denominada CAD (*Caspase-Activated DNase*) que irá migrar para o núcleo fragmentando o DNA em segmentos de tamanhos característicos da apoptose (Amarante-Mendes, 2003). Além da fragmentação do DNA, as caspases efetoras atuam em substratos importantes como as proteínas do citoesqueleto, fodrina, gelsolina, plectina e citoqueratina, que quando clivadas contribuem para as modificações morfológicas características da apoptose (Amarante-Mendes, 2003).

Outras caspases participam de processos inflamatórios, como as caspases-1, -4, -5, -11, -12 e -13 (Degterev *et al.*, 2003; Sakamaki & Satou, 2009), bem como na diferenciação celular, como a caspase-14 (Kim *et al.*, 2010).

**Tabela 1.** Classificação funcional das caspases.

<b>Caspases iniciadoras da apoptose</b>	<b>Caspases efetoras da apoptose</b>	<b>Caspases envolvidas na inflamação</b>	<b>Caspases envolvidas na diferenciação</b>
2	3	1	14
8	6	4	
9	7	5	
10		11	
		12	
		13	

Todas as caspases são sintetizadas como zimogênios inativos, contendo um pró-domínio e um domínio catalítico, onde existe uma cisteína no sítio ativo da enzima (Amarante-Mendes, 2003). O domínio catalítico apresenta duas subunidades, uma subunidade maior de 20kDa e outra menor de 10kDa (Fig. 3) (Degterev *et al.*, 2003). As caspases efetoras são caracterizadas por pró-domínios curtos ou inexistentes, já as caspases iniciadoras são caracterizadas por pró-domínios longos, que podem ser divididos em dois tipos, sendo eles, pró-domínio de recrutamento e ativação de caspase (CARD – *Caspase Recruitment Domain*) e pró-domínio efetor de morte (DED – *Death Effector Domain*) (Fig. 3) (Degterev *et al.*, 2003; Sakamaki & Satou, 2009).



**Figura 3.** Estrutura geral das caspases e classificação de acordo com o tamanho do pró-domínio. (CARD) = Domínio de recrutamento e ativação de caspases. (DED) = Domínio efetor de morte.

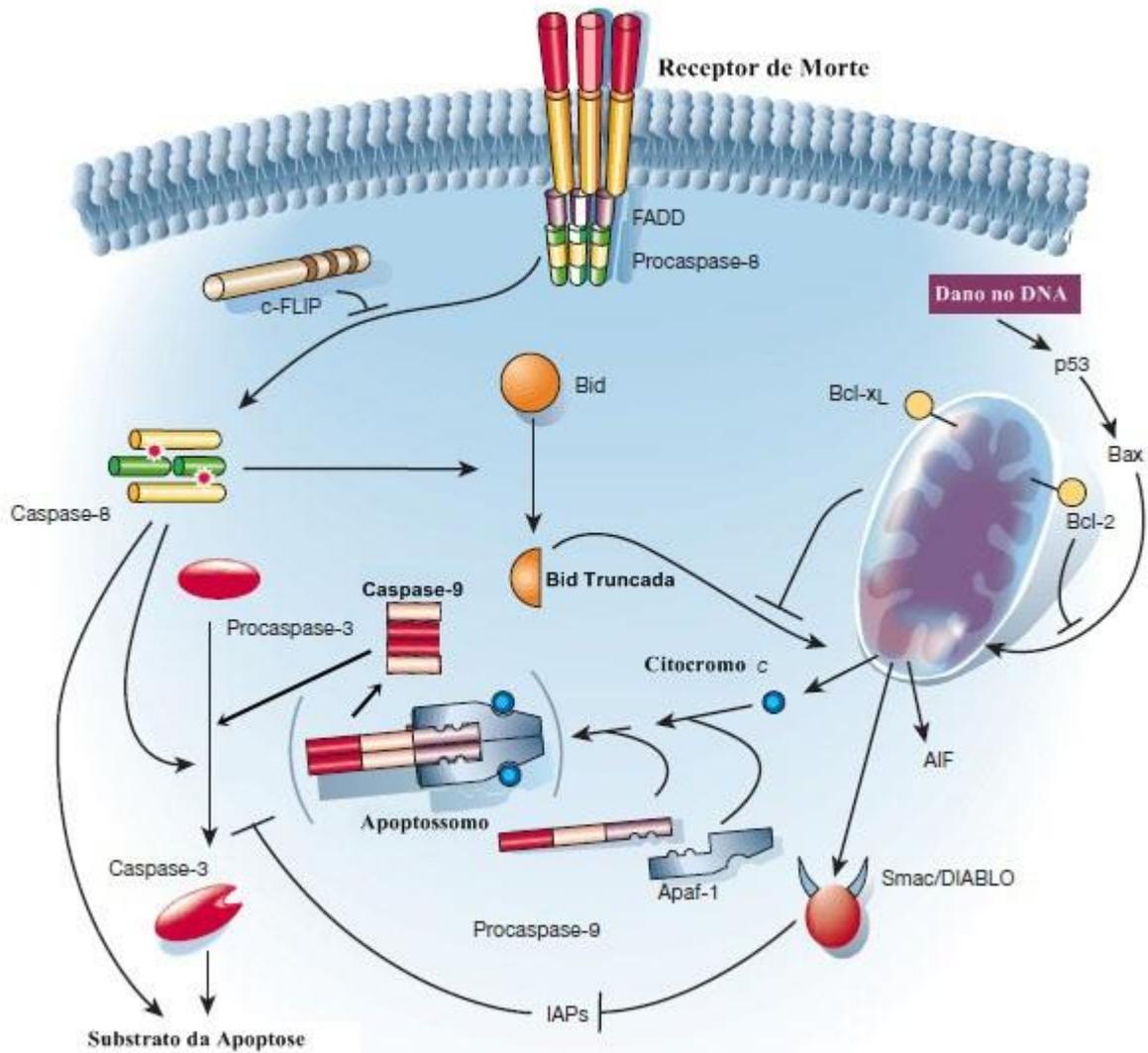
### **3.2 Vias de Sinalização para Apoptose**

A sinalização para apoptose pode ser iniciada por duas vias principais, a via intrínseca ou a via extrínseca (Kim *et al.*, 2010).

A apoptose é ativada pela via intrínseca quando um sinal é originado dentro da própria célula como consequência de estresse celular ou dano do DNA, induzido por fatores tais como radiação ultra violeta, esteroides, quimioterápicos, drogas ou ausência de fatores de crescimento (Green & Reed, 1998; Spierings *et al.*, 2005; Sakamaki & Satou, 2009). Esses fatores induzem ao aumento da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, permitindo a passagem de citocromo c, SMAC/diablo e AIF para o citoplasma da célula, além de outros processos, como a interrupção do transporte de elétrons, da fosforilação oxidativa e da produção de ATP e alteração do potencial de redução e oxidação (Green & Reed, 1998; Spierings *et al.*, 2005; Sakamaki & Satou, 2009). O citocromo c livre no citoplasma irá induzir a formação de um complexo proteico, formado por citocromo c, pró-caspase-9, Apaf-1 (Fator-1 de ativação da protease apoptótica) e ATP, chamado apoptossomo (Degterev *et al.*, 2003; Spierings *et al.*, 2005; Grivicich *et al.*, 2007; Sakamaki & Satou, 2009). O apoptossomo por sua vez irá reconhecer e ativar pró-caspases-9, que então irão ativar caspases efetoras que desencadeiam a apoptose (Fig. 4) (Degterev *et al.*, 2003; Spierings *et al.*, 2005; Grivicich *et al.*, 2007; Sakamaki & Satou, 2009). As proteínas AIFs que também são liberadas pela mitocôndria, quando livres no citoplasma são translocadas para o núcleo, onde participarão ativamente da fragmentação do DNA e condensação da cromatina, sendo que o mecanismo pelo qual exercem essa função ainda não foi esclarecido (Norberg *et al.*, 2010).

A via extrínseca de apoptose é induzida por um sinal originado fora da célula, sendo esse um ligante específico que interage com receptores de membrana, pertencentes à família dos receptores de morte (DR- *Death Receptors*) da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNF), entre eles o Fas/CD95, Apo1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK2/Killer e DR6 (Degterev *et al.*, 2003; Grivicich *et al.*, 2007; Sakamaki & Satou, 2009). Esses receptores de morte celular são caracterizados pela presença de repetições ricas em cisteínas na sua porção extracelular e um domínio de morte (DD – *Death Domain*) na porção citoplasmática, que modula as interações proteína-proteína (Degterev *et al.*, 2003; Sakamaki & Satou, 2009). A ativação desses receptores induz a formação de um complexo de sinalização indutor de morte, conhecido como DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*),

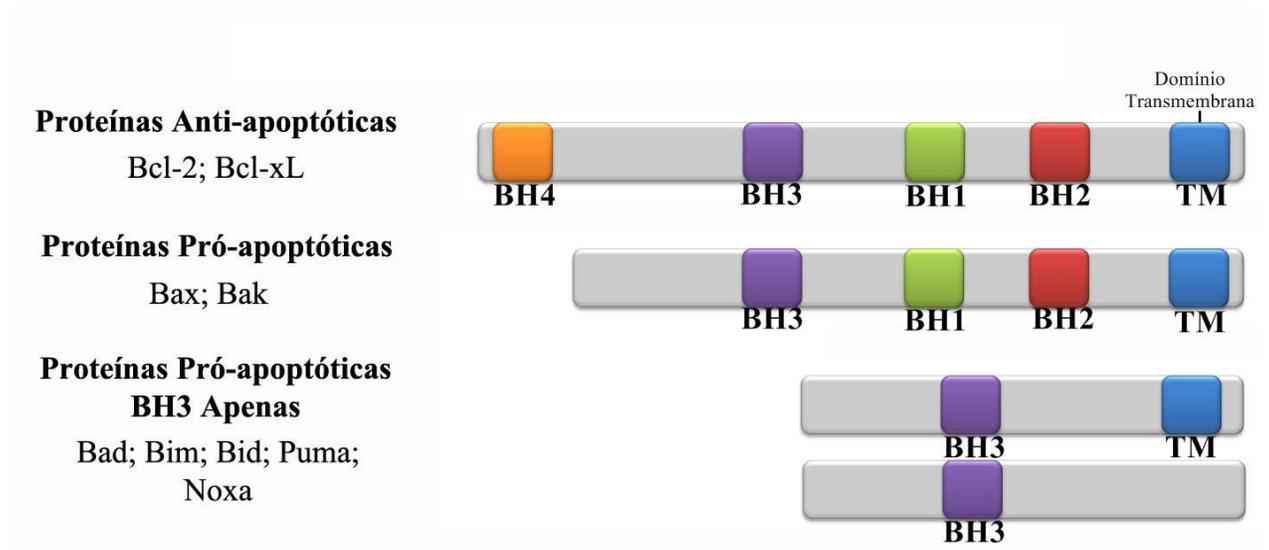
contendo diversas moléculas adaptadoras, entre elas, FADD (proteína associada ao DD de Fas), TRADD (proteína associada ao DD do receptor de TNF), RIPK (proteína quinase serina-treonina que interage com receptores de morte), RAIDD (RIP associada à proteína contendo DD) e DAXX (*Death-Domain Associated Protein*) (Degterev *et al.*, 2003; Sakamaki & Satou, 2009; Kim *et al.*, 2010). Todo esse complexo recruta e promove a clivagem e ativação de pró-caspases iniciadoras -8 ou -10, que por sua vez irão igualmente ativar caspases efetoras da apoptose (Fig. 4) (Degterev *et al.*, 2003; Sakamaki & Satou, 2009; Kim *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Vias de ativação para apoptose. Adaptado de Hengartner (2000).

### 3.3 Proteínas Reguladoras da Apoptose

A regulação da ativação de ambas as vias apoptóticas requer a interação de inúmeras proteínas (Grivicich *et al.*, 2007). Proteínas da família Bcl-2 podem atuar induzindo a apoptose (Bax, Bid e Bak) ou inibindo-a (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), por impedir a liberação de citocromo c (Spierings *et al.*, 2005; Grivicich *et al.*, 2007). As proteínas da família Bcl-2 tem como função primária regular a integridade da membrana mitocondrial externa (Green *et al.*, 2011). Elas podem ser divididas em três grupos de acordo com suas características estruturais e funcionais (Hengartner, 2000). Sendo o primeiro grupo, composto pelas proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub>, caracterizado pela presença de quatro domínios BH (*Bcl-2 Homology*), BH1 – BH4, além de apresentarem um domínio transmembrana na porção C-terminal, que permite sua localização na membrana externa da mitocôndria e no retículo endoplasmático (Hengartner, 2000). O segundo grupo inclui proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bak, e apresenta estrutura similar à encontrada no primeiro grupo, não apresentando apenas o domínio BH4 (Hengartner, 2000; Adams & Cory, 2007). Já o terceiro grupo é composto por diversas proteínas pró-apoptóticas, como Bad, Bim, Bid, Puma e Noxa, sendo que todos os membros do grupo são BH3 apenas (Fig. 5) (Hengartner, 2000; Adams & Cory, 2007).



**Figura 5.** Organização estrutural e funcional das proteínas da família Bcl-2. BH = Domínio *Bcl-2 homology*. TM = Domínio Transmembrana.

As proteínas da família Bcl-2 que apresentam atividade anti-apoptótica, atuam principalmente através da ligação a proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas inativas, impedindo sua

ativação e consequente liberação de citocromo c (Adams & Cory, 2007). Já as proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas podem apresentar diversos mecanismos de ação, sendo que, as proteínas que apresentam os domínios BH1 – BH4 atuam principalmente pela formação de poros na membrana externa da mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo c e outras proteínas (Hengartner, 2000). As proteínas BH3 apenas atuam principalmente através da ligação a outras proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, bloqueando sua ação supressora e permitindo a formação de poros na membrana externa da mitocôndria (Hengartner, 2000; Adams & Cory, 2007).

Ainda como reguladores da apoptose existem as proteínas inibidoras da apoptose (IAP – *Inhibitors of apoptosis proteins*), que possuem função anti-apoptótica e atuam se ligando e inibindo a ação de caspases efetoras -3 e -7, participando assim da modulação tanto da via intrínseca quanto extrínseca da apoptose (Grivicich *et al.*, 2007). As IAPs ainda inibem a ativação da caspase iniciadora -9 (Grivicich *et al.*, 2007). Quando existe a necessidade da célula entrar em apoptose a ação das IAPs pode também ser modulada através da ligação das SMACs (Spierings *et al.*, 2005). As SMACs liberadas pela mitocôndria tem ação de neutralizar o controle negativo gerado pelas IAPs na apoptose (Amarante-Mendes, 2003).

Outra proteína que pode atuar regulando a ativação da apoptose é a proteína p53, que apresenta função de checagem da fase G1 do ciclo celular, sendo extremamente importante por permitir a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células com danos irreversíveis do DNA pela indução da apoptose (Grivicich *et al.*, 2007).

Em alguns momentos a proteína bloqueadora FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) pode ser produzida pela célula para inibir a apoptose, isso se dá devido à sua homologia estrutural com as caspases, porém apresentando domínio catalítico inativo. Desse modo, as FLIPs irão competir pelo sítio de ligação das caspases, bloqueando a sinalização dos receptores (Amarante-Mendes, 2003).

#### **4. APOPTOSE E PRÓSTATA VENTRAL**

O *turnover* normal de um tecido envolve proliferação, migração, diferenciação e morte celular, que juntos mantêm a homeostase tecidual. O distúrbio no balanço entre proliferação e morte celular pode resultar em transformações neoplásicas, como ocorre comumente na próstata. A próstata adulta tem baixo *turnover* de células, indicando a existência de processo basal de

proliferação e morte celular no órgão intacto (Banerjee *et al.*, 1995). De fato, raras células apoptóticas são detectadas na próstata ventral de ratos adultos (Banerjee *et al.*, 1995; Banerjee *et al.*, 1998; Omezzine *et al.*, 2003), sendo que em animais da linhagem Sprague-Dawley, as células TUNEL positivas representam apenas 0,25% das células epiteliais (Banerjee *et al.*, 1995), enquanto outros autores sequer detectam positividade no órgão de ratos da mesma linhagem (Omezzine *et al.*, 2003). Em ratos Nobel, a próstata ventral pode expressar cerca de 1% de suas células epiteliais em apoptose (Xie *et al.*, 2000). Há consenso de que o número de células apoptóticas aumenta consideravelmente após castração e é reduzida após a reposição com testosterona, indicando que andrógenos são fatores inibidores de apoptose (Banerjee *et al.*, 2000; Omezzine *et al.*, 2003).

Em adição a essas evidências de controle androgênico de apoptose na próstata, um recente estudo evidenciou que, na próstata humana e de ratos, a apoptose pode ser ativada pela via intrínseca, quando privada de testosterona, mas pela via extrínseca, quando tratados com um agonista de receptores de estrógenos ER $\beta$  (McPherson *et al.*, 2010). Esses dados incluem assim os metabolitos estrogênicos como fatores adicionais na regulação de apoptose na próstata. Na via extrínseca, o mecanismo de apoptose é independente de andrógenos e mediado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (McPherson *et al.*, 2010). De fato, sabe-se que membros da família de citocinas TNF $\alpha$  estão presentes na próstata ventral (Vindrieux *et al.*, 2002; Vindrieux *et al.*, 2006), mas não foram encontradas informações sobre a relação desses componentes com distúrbios da homeostase tecidual comuns na velhice.

Ainda, ao comparar animais adultos jovens (4 meses) e idosos (24 meses), detectou-se uma redução de cerca de 50% nas células em apoptose nos animais idosos, indicando que a resposta apoptótica sensível a andrógeno é idade dependente (Banerjee *et al.*, 2000). Apesar das evidências de que o processo de morte celular na próstata em envelhecimento é regulado por andrógenos, pouco ainda se sabe sobre os componentes chave que são alvos dessa regulação. Dessa forma, não está também esclarecido se há variação nas vias de ativação da apoptose dependendo da idade. Sabendo que com o envelhecimento ocorre desbalanço entre os níveis de andrógenos/estrógenos e aumento de processos inflamatórios na próstata, com liberação de diversas citocinas, incluindo TNF $\alpha$ , hipotetizamos que poderia existir envolvimento diferencial da via intrínseca e extrínseca da apoptose, sendo que o desbalanço hormonal em idosos poderia deixar as células mais vulneráveis a apoptose pela via extrínseca. Dessa forma, nosso presente

objetivo foi determinar se ocorre variação nos mecanismos de apoptose na próstata ventral de ratos Wistar em função da idade.

A próstata ventral foi escolhida como alvo dos nossos estudos, por ser o lobo prostático com maior volume de informações encontradas na literatura e a qual é mais responsiva a depleção androgênica. A compreensão dos mecanismos de apoptose na próstata de ratos Wistar em envelhecimento pode representar um passo importante no sentido de esclarecer os mecanismos que levam a alterações patológicas do tecido e, possivelmente, no desenvolvimento de novas estratégias no tratamento e/ou prevenção dos adenocarcinomas prostáticos que ocorrem com frequência em humanos e algumas espécies de mamíferos.

## **II. OBJETIVOS**

---

## **II. OBJETIVOS**

### ***1. OBJETIVO GERAL***

- Avaliar a existência de um padrão de ativação diferencial da via intrínseca e extrínseca da apoptose na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento.

### ***2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

- Determinar o peso corporal e o peso da próstata ventral de ratos Wistar adultos jovens a idosos;
- Investigar alterações morfológicas características de apoptose nas células epiteliais da próstata ventral de ratos Wistar jovens a idosos;
- Analisar o padrão de expressão de marcadores de apoptose pela via extrínseca (caspase tipo 8) na próstata ventral de ratos Wistar jovens a idosos;
- Analisar o padrão de expressão de marcadores de apoptose pela via intrínseca (caspase tipo 9) na próstata ventral de ratos Wistar jovens a idosos;
- Verificar o padrão de expressão de Caspase tipo 3 ativada (efetora em ambas as vias de apoptose) e positividade pela técnica de TUNEL, para determinar o conjunto de células em processo apoptótico independente da via de ativação na próstata ventral de ratos Wistar jovens a idosos;
- Realizar estudo quantitativo do número de células em apoptose, utilizando análise de imagem assistida por computador.

### **III. METODOLOGIA**

---

### **III. METODOLOGIA**

#### ***1. ANIMAIS***

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos de 3, 6, 12, 18 e 24 meses de idades, sendo, os animais de 18 e 24 meses subdivididos em dois grupos, saudáveis e caquéticos. Diferindo dos animais considerados saudáveis, os caquéticos, apresentavam-se com evidente queda no peso corporal, geralmente debilitados e apáticos, sendo muitas vezes observada a presença de metástases cancerosas de origem não determinada, além de comprometimento pulmonar e testículo geralmente atrófico. Os ratos foram adquiridos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos em estante climatizada (Alesco, Austrália), no biotério do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, sob ciclo de luz (12 horas de luz e 12 horas no escuro) e temperatura (22 °C) constantes e recebendo água e ração peletizada *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo no. 286/2008 - CETEA/UFMG) e seguiram o protocolo publicado pela Universidade Federal de Minas Gerais ([www.ufmg.br/coep/cetea.html](http://www.ufmg.br/coep/cetea.html)).

#### ***2. PREPARO DOS TECIDOS***

Os animais foram pesados, heparinizados e, posteriormente, sacrificado pela administração de anestésico em concentração letal (pentobarbital sódico 50mg/Kg associado com cloridrato de quetamina 10mg/kg). Em seguida, os animais destinados aos estudos morfológicos e imunohistoquímicos foram submetidos a perfusão transcardíaca via aorta com solução de Ringer bicarbonato, seguido por perfusão com formalina neutra tamponada a 10%. Após fixação, os lobos prostáticos foram dissecados, pesados e seccionados. Os fragmentos obtidos foram então lavados em salina tampão fosfato (PBS), desidratados em série crescente de etanol e incluídos em resina glicolmetacrilato (Technovit 7100 – Heraeus Kulzer, Alemanha), ou desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Histotec<sup>®</sup> Pastilles – Merck, Alemanha). Após inclusão dos tecidos, foram obtidos cortes de 3 e 5µm de espessura, respectivamente, utilizando micrótomo semi-automático (Microm HM335E, EUA).

Para os ensaios de Western Blotting, os animais foram perfundidos apenas com solução Ringer bicarbonato e os lobos prostáticos foram dissecados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até o processamento.

### **3. HISTOPATOLOGIA**

Para investigação das alterações histopatológicas e das figuras de apoptose presentes na próstata ventral dos ratos em envelhecimento, os fragmentos de tecidos incluídos em glicolmetacrilato foram seccionados em 3µm de espessura. Os cortes foram hidratados em água destilada, precedente às colorações com azul de toluidina-borato de sódio, hematoxilina e eosina (HE) ou ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS – *periodic acid-Schiff*). Para HE, os tecidos foram corados com hematoxilina de Ehrlich seguido de eosina aquosa. Para coloração por PAS, as lâminas foram incubadas em ácido periódico, seguido de incubação com reagente de Schiff, lavagem em água sulfurosa e contracoloração com hematoxilina de Ehrlich. Posteriormente os cortes foram desidratados, diafanizados e as lâminas montadas para análise.

Para tecidos incluídos em parafina foram realizadas secções de 5 µm de espessura, sendo os cortes colocados em lâminas histológicas silanizadas. Os cortes foram então desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. Os mesmos foram hidratados em água deionizada e corados com Metil-Green Pironina (MGP) por 5 minutos. Posteriormente os tecidos foram lavados com água deionizada e desidratados utilizando acetona, acetona/xilol (1:1) e xilol e as lâminas montadas para análise.

As investigações histopatológicas na próstata ventral foram realizadas de acordo com as análises detalhadas feitas anteriormente por Morais-Santos (2011). Tais análises foram realizadas pelas colorações de HE, PAS e azul de toluidina-borato de sódio. Já as investigações das figuras de apoptose presentes na próstata ventral foram utilizadas as colorações de HE e MGP.

### **4. IMUNOHISTOQUÍMICA**

O padrão de expressão dos marcadores de apoptose (Caspase-8, -9 e -3) na próstata ventral foi investigado por ensaios imunohistoquímicos. Para tal, fragmentos da próstata ventral

de ratos Wistar nas diferentes idades (n = 5 por grupo) e incluídos em parafina foram seccionados (5µm) e colocados em lâminas polarizadas (Superfrost®Plus – VWR Micro Slides, EUA).

Os tecidos foram desparafinizados em xilol, hidratados em série crescente de etanol, lavados em água corrente e solução PBS e, posteriormente, incubados em solução 0,6% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloqueio da peroxidase endógena. A reação imunohistoquímica foi precedida de recuperação antigênica dos tecidos, realizada pelo aquecimento dos cortes, mergulhados em solução de tampão citrato 0,1M pH 6,0, em forno micro-ondas. Após resfriamento dos cortes em temperatura ambiente, os mesmos foram lavados em PBS e incubados com soluções de bloqueio de avidina e biotina endógena (Avidin/biotin blocking kit – Vector Laboratories, EUA). Em seguida, os cortes foram incubados em soro normal de cabra 10% por uma hora para bloqueio de ligações inespecíficas, antes de serem expostos a anticorpos primários. Foram utilizados, anticorpo monoclonal de coelho anti Caspase-3 ativada (Asp175 – Cell Signaling Technology®), anticorpo policlonal de coelho anti Caspase-8 ativada (Asp387 – Cell Signaling Technology®) e anticorpo policlonal de coelho anti Caspase-9 ativada (Asp353 – Cell Signaling Technology®), diluídos 1:1000, 1:2000 e 1:500, respectivamente, em 1% de albumina de soro bovino e PBS, *overnight* a 4°C. Para os controles negativos, os cortes foram incubados em PBS em substituição aos anticorpos primários. Os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpos secundários biotinizados cabra anti-coelho (Dako, EUA), diluído 1:100 em PBS, por uma hora. Seguiu-se lavagem com PBS e incubação com solução do complexo avidina-biotina conjugados com peroxidase (Vectastain Ellite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), para amplificação da imunomarcação, por 30 minutos, seguido de lavagem com PBS. A revelação foi feita por adição do substrato contendo diaminobenzidina a 0.05% (p/v) contendo 0.01% (v/v) de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl, 0,05M, pH 7.6. A reação foi interrompida, após 20 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.

## **5. MÉTODO DE TUNEL**

Como foram observadas figuras de apoptose não coradas pelos ensaios imunohistoquímicos para Caspase-3 na próstata ventral, foi realizado adicionalmente ensaios de

TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*). O TUNEL identifica células em apoptose baseado na fragmentação do DNA. A técnica consiste no reconhecimento enzimático das extremidades 3'OH livres que são geradas e expostas pela fragmentação do DNA (Dang & Kim, 2009). Para tal, foi utilizado kit ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore Corporation, EUA), com pequenas modificações do protocolo fornecido pela empresa.

Os fragmentos da próstata ventral de ratos Wistar nas diferentes idades (n = 3 por grupo), incluídos em parafina e seccionados a 5µm, foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol, lavados em água corrente e solução tampão salina Tris-HCl (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 0.1% pH 8.0, por 10 minutos. Posteriormente foi realizada a lavagem em TBS e incubação em solução de TBS/peróxido de hidrogênio 3%, para bloqueio da peroxidase endógena, por 30 minutos, no escuro. Em seguida os cortes foram lavados em TBS e incubados em tampão de equilíbrio por 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados com enzima TdT diluídos em 30% de tampão de reação, por uma hora, a 37°C. A enzima TdT reconhece as extremidades 3'OH livres e acrescenta nucleotídeos marcados com uma molécula de digoxigenina. Para os controles negativos, as lâminas foram incubados em tampão de equilíbrio em substituição a enzima TdT. Em seguida, os cortes foram incubados em tampão de parada e lavagem, sendo 3 ml de tampão de parada e lavagem em 102 ml de água destilada, por 10 minutos. Após incubação, os tecidos foram lavados em TBS e incubados com anticorpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidase, por 30 minutos, para o reconhecimento das moléculas de digoxigenina. Após lavagem em TBS, a revelação foi feita por adição do substrato contendo diaminobenzidina diluído 1:70 em tampão de diluição de DAB a 0.05% (p/v) contendo 0.01% (v/v) de peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl, 0,05M, pH 7.6. A reação foi interrompida após 3 minutos por imersão em água destilada. Ao final os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados e montados para análise.

## **6. ESTUDO QUANTITATIVO DO NÚMERO DE CÉLULAS EM APOPTOSE**

Para a quantificação das marcações imunohistoquímicas de apoptose (Caspase-3, -8, -9 e TUNEL) no epitélio dos adenômeros da próstata ventral dos ratos Wistar em envelhecimento foi realizada a captura de imagens digitais utilizando câmera digital (Nikon Coolpix 995, Japão), acoplada a fotomicroscópio (Nikon Eclipse E600, Japão). Para cada secção de tecido foram previamente selecionadas, em aumento de 10x, cinco regiões, sendo quatro regiões localizadas próximas à periferia do tecido e uma região ao centro, onde foram capturadas quatro imagens, em aumento de 40x, por região, totalizando vinte imagens do epitélio prostático por animal.

As imagens foram processadas utilizando os programas Adobe Photoshop e ImageJ. As células epiteliais positivas e negativas foram registradas em aumento de 40x, e os resultados expressos em porcentagem de células imunopositivas (McPherson *et al.*, 2010).

Tanto HE quanto metil-green pironina apresentaram o mesmo padrão de células em apoptoses entre as diferentes idades, e pela melhor preservação da estrutura epitelial, os cortes histológicos obtidos de tecidos incluídos em glicolmetacrilato e corados com HE foram escolhidos para as análises quantitativas das figuras apoptóticas. Para tal, foi utilizado fotomicroscópio (Nikon Eclipse E600, Japão). Para cada secção de tecido foram previamente selecionadas, em aumento de 10x, cinco regiões, sendo quatro regiões localizadas próximas à periferia do tecido e uma região ao centro, onde as apoptoses e as células normais foram computadas em aumento de 40x com o auxílio de gradícula (área = 0,06 mm<sup>2</sup>). Os resultados foram expressos em porcentagem de células imunopositivas.

## **7. WESTERN BLOTTING**

Foram realizados ensaios de *Western blotting*, para confirmar os dados obtidos com ensaios imunohistoquímicos. Para tal, amostras da próstata ventral dos ratos Wistar em diferentes idades (n = 3 animais por grupo), congeladas em nitrogênio líquido, foram maceradas em gelo seco. Os tecidos macerados foram pesados (~100mg) e homogeneizados em 400µL de tampão de sacarose pH 7.4, contendo 0.01 M EDTA e inibidores de proteases (Protease Inhibitor Cocktail – Sigma, EUA), com auxílio de aparelho homogeneizador (IKA T10 Basic, Alemanha). Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 14000 r.p.m. à temperatura de 4°C, para extração de proteínas totais, as quais se encontravam na fração sobrenadante. Em

seguida, adicionou-se às amostras, na proporção de 1:1, tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, Tris-HCl 30 mM pH 6,8,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol 12% e azul de bromofenol, seguido de fervura por 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese contínua usando SDS-PAGE 10% em gel de poliacrilamida, para separação das proteínas, seguida de transferência rápida (uma hora, 100V) para membrana de nitrocelulose. Em seguida foi realizado bloqueio das membranas com soro normal de cabra 10 %. Após lavagem da membrana com PBS-tween 0,05% (PBST), realizou-se a incubação das membranas com anticorpo primário monoclonal de coelho anti Caspase-3 ativada (Asp175 – Cell Signaling Technology®) e anticorpo primário policlonal de coelho anti Caspase-8 ativada (Asp387 – Cell Signaling Technology®), diluídos 1:500 em PBS *overnight*. Após lavagem da membrana em PBST foi feita incubação com anticorpo secundário biotilado, cabra-anti-coelho (Dako, EUA), diluído 1:2000 em PBS por uma hora. Seguidas as lavagens em PBST, as membranas foram incubadas por 30 minutos com solução de complexo avidina-biotina conjugados com peroxidase (Vectastain Standard ABC kit – Vector Laboratories, EUA). Após várias lavagens em PBST, a revelação foi feita pela adição de substrato contendo 0,1% de 3,3'diaminobenzidina em PBS contendo 0,05% cloronaftol, 16,6% metanol e 0,04% peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida pela adição de água destilada à membrana.

## **8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente através do teste de múltipla variância *One-Way ANOVA* e o teste de Newman-Keuls para comparação *post-hoc* entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P \leq 0,05$ .

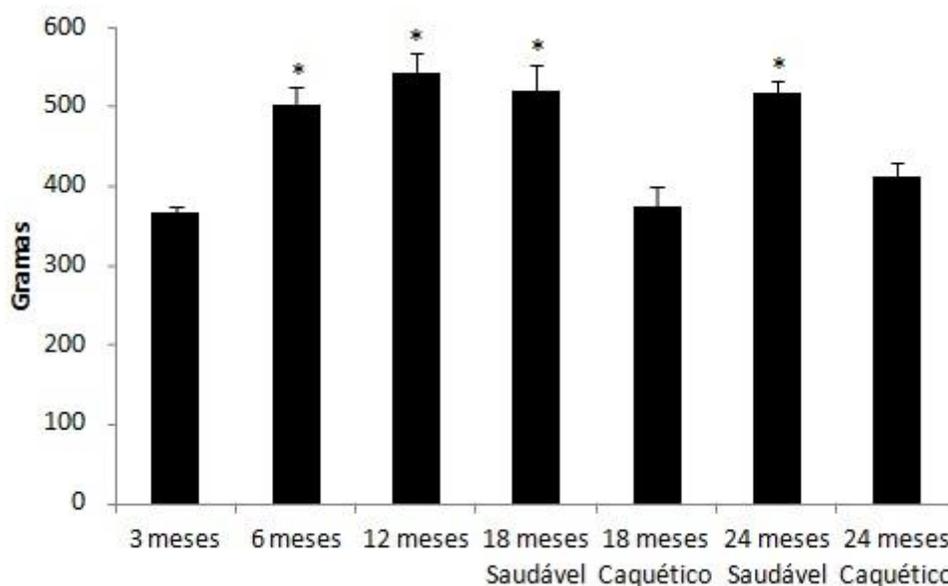
## **IV. RESULTADOS**

---

## IV. RESULTADOS

### 1. PESO CORPORAL E DO COMPLEXO PROSTÁTICO

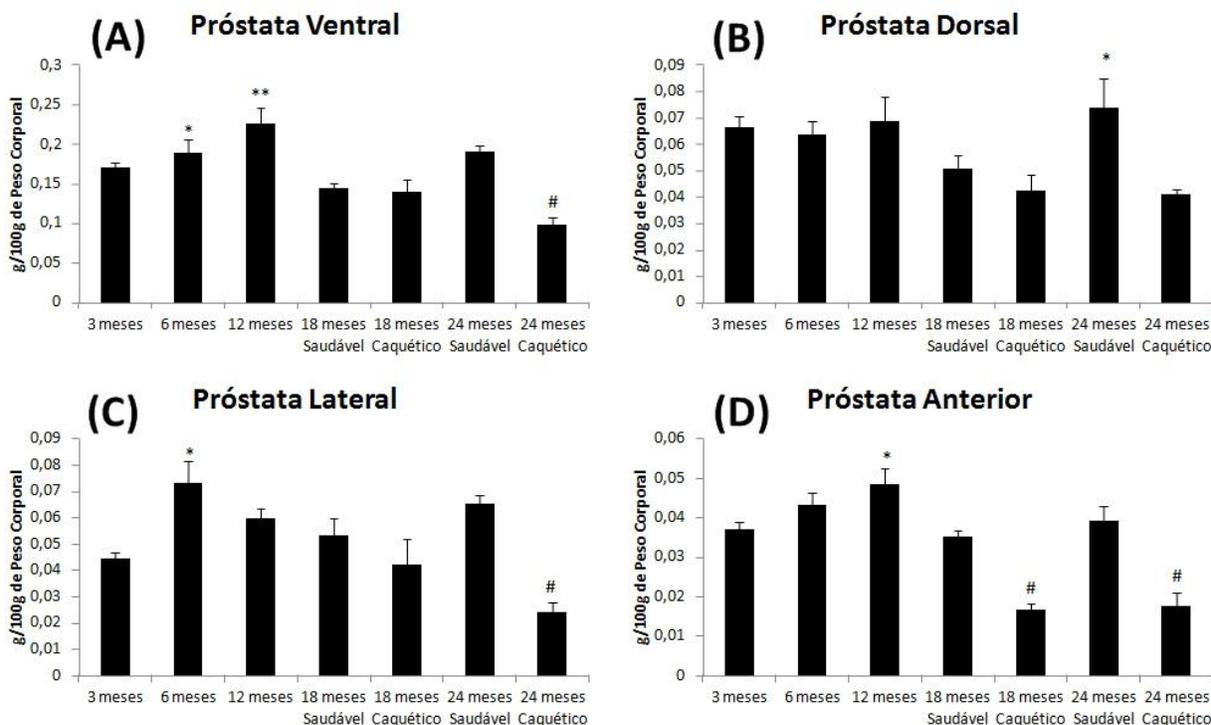
Os resultados referentes ao peso corporal, indicaram um aumento significativo dos 3 meses aos 6 meses de idade, permanecendo similar e significativamente maior até os 24 meses de idade nos animais saudáveis (Fig. 6). Nos animais caquéticos de 18 e 24 meses de idade, o peso corporal mostrou-se significativamente menor que seus pares saudáveis, atingindo valores similares aos animais de 3 meses.



**Figura 6.** Peso corporal de ratos Wistar (gramas) em diferentes idades (meses). (\*) =  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo de 3 meses.  $n = 5$  animais.

A análise do peso relativo do complexo prostático mostrou grande variação individual no peso de todos os lobos. No conjunto, a próstata ventral mostrou um aumento progressivo de peso dos 3 aos 12 meses de idade, sendo essa diferença significativa (Fig. 7 A). Dos 18 aos 24 meses ocorreu redução acentuada do peso da glândula tanto nos animais saudáveis quanto caquéticos. Nos ratos caquéticos o peso da próstata ventral atingiu valores similares aos animais de 3 meses de idade, exceto nos caquéticos de 24 meses, que apresentaram próstata ventral significativamente mais leve que todos os demais.

Exceto pelos animais caquéticos de 24 meses que apresentaram próstatas lateral e anterior significativamente menores que todos os demais grupos, a variação de peso dos demais lobos prostáticos não apresentou evidente padrão idade-dependente (Fig. 7 B-D).



**Figura 7.** Peso relativo do complexo prostático de ratos Wistar em diferentes idades. (A) Próstata ventral. (\*) =  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo de 18 meses saudável e 18 e 24 meses caquéticos. (\*\*) =  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos de 3 e 18 meses saudáveis e 18 e 24 meses caquéticos. (#) =  $p \leq 0,05$  em relação a todos os demais grupos. (B) Próstata dorsal. (\*) =  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos de 18 e 24 meses caquéticos (C) Próstata lateral. (\*) =  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos de 3 meses, 18 e 24 meses caquéticos. (#) =  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos de 6, 12, 18 e 24 meses saudáveis e 18 e 24 meses caquéticos. (D) Próstata anterior. (\*) =  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos de 3, 18 meses saudáveis, 18 e 24 meses caquéticos. (#) =  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos de 3, 6, 12, 18 e 24 meses saudáveis  $n = 5$  animais.

## 2. HISTOLOGIA DA PRÓSTATA VENTRAL E ALTERAÇÕES COM O ENVELHECIMENTO

Uma descrição detalhada das alterações morfológicas da próstata ventral de ratos Wistar em envelhecimento foi realizada anteriormente, sendo que nossas observações, em um grupo diferente de animais, confirmam as alterações, que são aqui sumarizadas visando facilitar as descrições subsequentes.

A próstata ventral de ratos é formada por glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujo epitélio glandular é pseudoestratificado, sendo constituído de células luminais ou secretoras, células basais e células neuroendócrinas, sendo essas últimas escassas e de difícil observação pelas colorações histológicas de rotina. O epitélio glandular se apoia em um delgado estroma. Envolvendo a parede do adenômero encontram-se duas a três camadas de células musculares lisas. O estroma de sustentação intraglandular é constituído de tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos. Ainda no tecido conjuntivo é possível observar abundantes mastócitos, facilmente identificados pelo citoplasma contendo grânulos PAS-positivos e metacromáticos, quando corados com azul de toluidina – borato de sódio (Fig. 8).

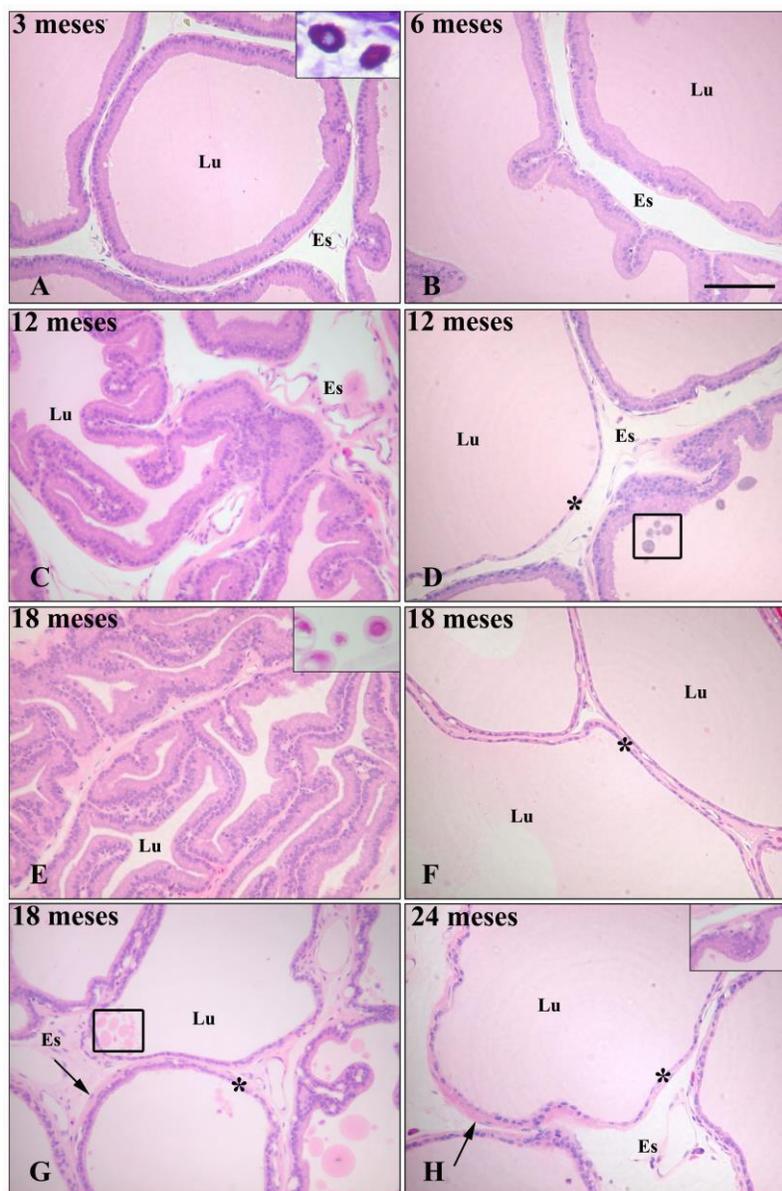
Aos 3 e 6 meses de idade, os adenômeros da próstata ventral apresentam discreto pregueamento da parede e grande quantidade de secreção intraluminal homogênea, eosinofílica e PAS-positiva (Fig. 8 A e B). Aos seis meses de idade, no entanto, já é possível observar algumas células descamadas no lúmen dos adenômeros.

A partir dos 12 meses de idade, a parede epitelial da próstata ventral apresenta áreas pleomórficas, relacionadas ao envelhecimento. Em alguns adenômeros ocorre aumento do pregueamento epitelial, sugerindo hiperplasia (Fig. 8 C). Em algumas regiões, o lúmen dos adenômeros apresenta-se dilatado e o epitélio se torna cúbico a pavimentoso, indicando atrofia cística (Fig. 8 D). São encontradas, com maior frequência, células descamadas, além de corpos amiláceos intraluminais, eosinofílicos e intensamente PAS-positivos (Fig. 8 D). Alguns corpos amiláceos podem apresentar basofilia central, indicativo de calcificação, passando a ser chamados de concreções prostáticas.

Dos 18 aos 24 meses de idade, os animais saudáveis apresentam características morfológicas similares na próstata ventral, sendo observada, porém, grande heterogeneidade dentre os animais do mesmo grupo. É possível observar aumento da quantidade e do tamanho dos corpos amiláceos e concreções intraluminais (Fig. 8 E e G). A secreção intraluminal se torna heterogênea, em menor quantidade e se cora com menor intensidade com PAS. A alteração epitelial mais frequente dos animais é a atrofia epitelial, podendo existir regiões de transição entre epitélio prismático, cúbico, cúbico baixo e pavimentoso. Também são observados locais com intensa hiperplasia e ainda focos hiperproliferativos intraepiteliais, onde o epitélio torna-se estratificado, sugerindo a presença de neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Também foi

observado espessamento da camada muscular lisa, envolvendo os adenômeros desses animais (Fig. 8 E-H).

No grupo de animais caquéticos as alterações observadas são similares às encontradas nos animais saudáveis, sendo a principal diferença a predominância de epitélio atrófico e menor frequência de epitélio normal e hiperplásico.

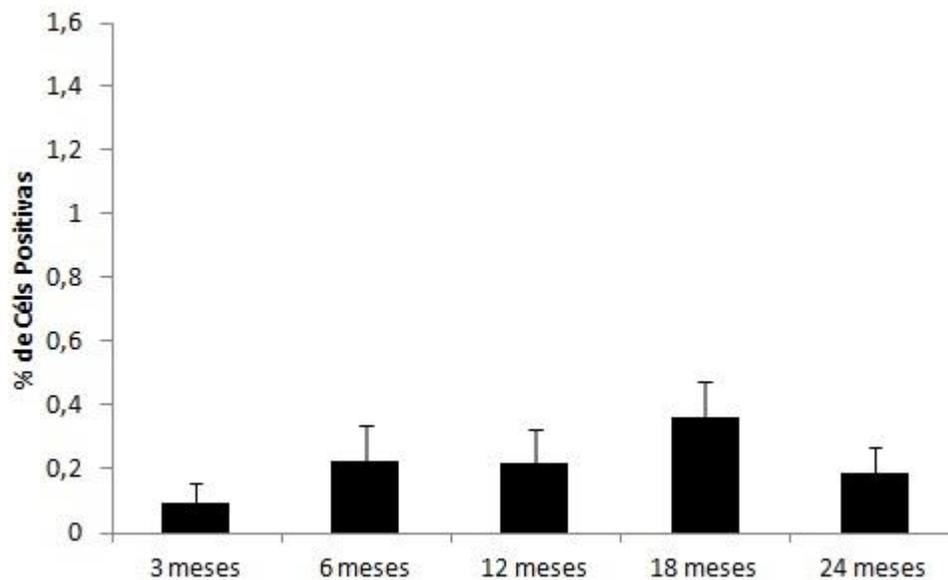


**Figura 8.** Histopatologia da próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. **A** e **B** indicam aspecto de adenômeros da próstata ventral de animal jovem. Em **C** e **E** destaca-se o intenso pregueamento da parede do adenômero. Em **D** observa-se epitélio heterogêneo com alguns locais de atrofia, enquanto em **F**, **G** e **H** destaca-se intensa atrofia epitelial (\*). Inseto em **A** = mastócitos metacromáticos corados com azul de toluidina-borato de sódio. Inseto em **E** = concreções luminiais PAS-positivas. Inseto em **H** = local de neoplasia intraepitelial (PIN). Quadrado em **D** e **G** destacando a presença de corpos amiláceos e concreções luminiais. Seta preta = Espessamento da camada muscular. Lu = Lúmen. Es = Estroma; Barra em **B** = 100 µm, referente a A-H. Coloração HE.

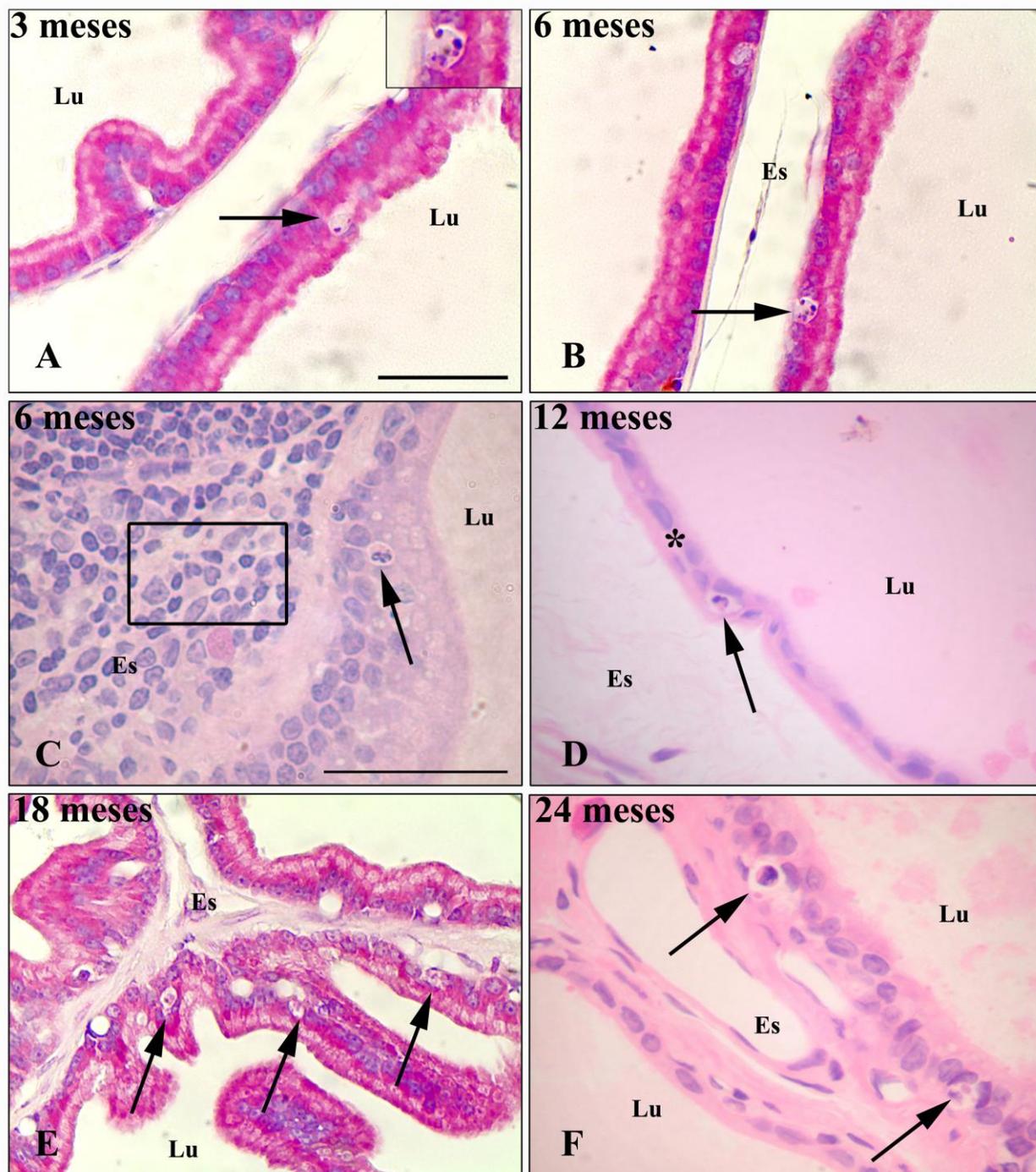
### ***3. APOPTOSE NA PRÓSTATA VENTRAL***

As figuras de apoptose foram investigadas em lâminas coradas com HE e metil-green pironina, de acordo com as características morfológicas, previamente conhecidas, onde se destacam a retração citoplasmática, perda de aderência com as células vizinhas, condensação e agregação da cromatina ao redor do envoltório nuclear, além da fragmentação celular formando corpos apoptóticos. As análises histológicas, realizadas pelas colorações de HE e metil-green pironina, mostraram que a morte celular por apoptose é escassa no epitélio glandular da próstata ventral nas diferentes idades (Fig. 9 e 10). Aos 18 meses foi observado maior número de células em apoptose, mas essa diferença não alcançou significância estatística (Fig. 9). Em animais com focos inflamatórios na próstata, as células apoptóticas tendem a se concentrarem em locais do epitélio próximos aos infiltrados (Fig. 10 C).

Nas análises dos cortes histológicos corados com metil-green pironina, observam-se células epiteliais intensamente coradas em magenta e seus núcleos corados em púrpura nos animais jovens. Já nos animais de 18 e 24 meses de idade, foi possível observar perda na intensidade da coloração em locais de atrofia epitelial. Quando observadas, as figuras de apoptose apresentaram-se coradas em róseo e o núcleo condensado, enquanto os corpos apoptóticos eram corados em púrpura (Fig. 10 A, B e E). As observações feitas em HE mostraram figuras de apoptose com citoplasma eosinofílico e núcleo intensamente basofílico, devido à condensação do DNA (Fig. 10 C, D e F). Os grupos cauéticos não foram quantificados.



**Figura 9.** Índice de células morfológicamente em apoptose no epitélio da próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. n = 5 animais.



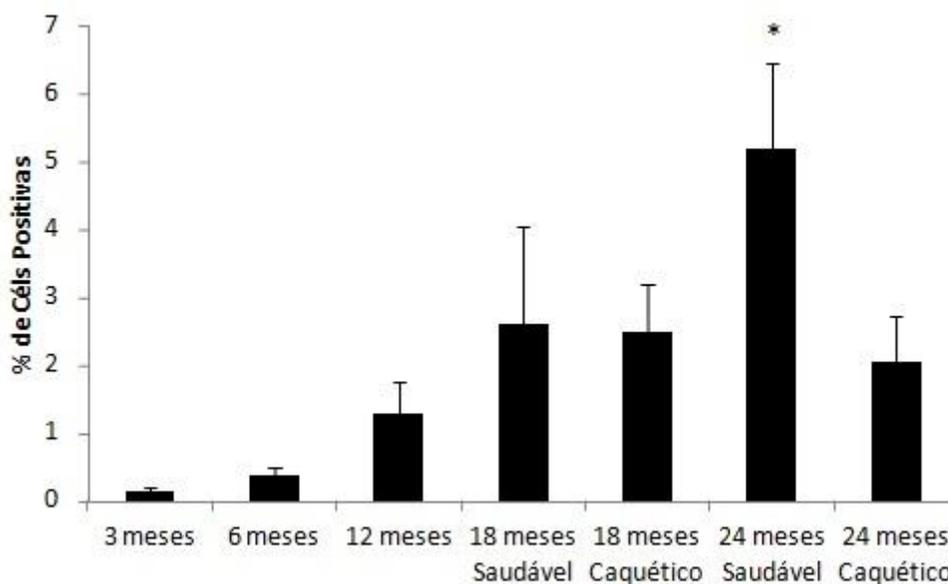
**Figura 10.** Figuras de apoptose na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. As figuras de apoptose encontram-se indicadas por setas. Em C destaca-se o aparecimento de figuras de apoptose no epitélio próximo a local com infiltrado inflamatório (destaque). Em D e F destaca-se apoptose em áreas de atrofia epitelial (\*). Inseto em A mostrando detalhe de célula em apoptose. Lu = Lúmen; Es = Estroma. A, B e E = secções coradas por metil-green pironina; C, D e F = secções coradas por hematoxilina-eosina; Barra em A = 50  $\mu$ m, referente a A, B e E. Barra em C = 50  $\mu$ m, referente a C, D e F.

#### 4. IMUNOHISTOQUÍMICA

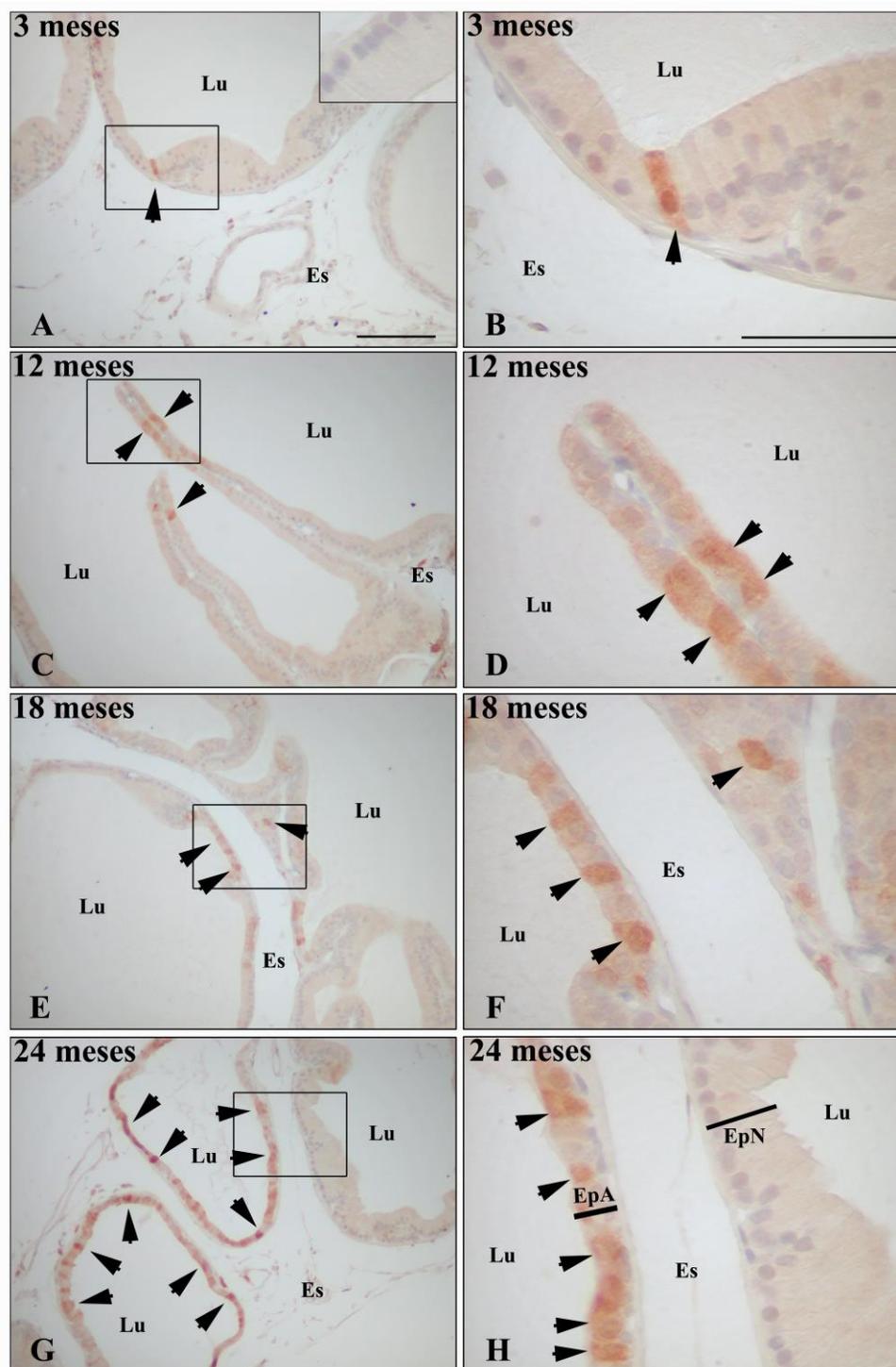
##### 4.1 Caspase - 8

As análises imunohistoquímicas do marcador de apoptose ativada pela via extrínseca, mediada por caspase-8, mostraram aumento da imunoreatividade com o envelhecimento, sendo esse aumento significativo nos animais de 24 meses saudáveis, quando comparados aos animais de 3, 6, 12 e 18 meses de idade saudáveis (Fig. 11 e 12). Os grupos de animais caquéticos mantiveram positividade similar à encontrada para os animais de 18 meses saudáveis. A falta de significância estatística pode ser atribuída a grande variação individual observada em todos os grupos.

Nos animais senis (18 e 24 meses), saudáveis e caquéticos, as células imunopositivas encontraram-se preferencialmente localizadas em regiões de epitélio atrófico (Fig. 12 G e H). Nem todas as células que apresentaram imunoreatividade para caspase-8, apresentavam-se morfológicamente em apoptose (Fig. 12).



**Figura 11.** Índice de células imunorreativas para caspase-8 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. (\*) =  $p \leq 0,05$ . n = 5 animais.

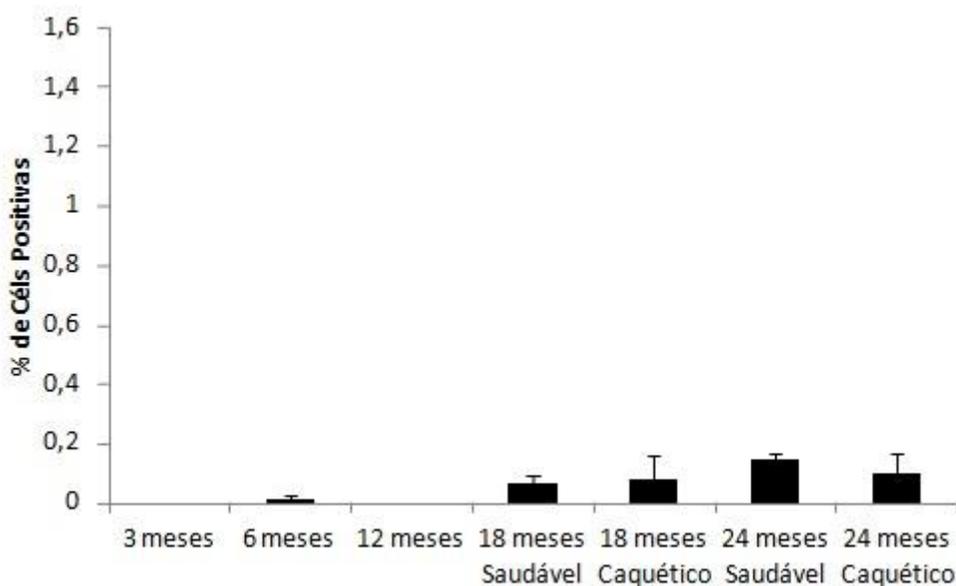


**Figura 12.** Imunohistoquímica para caspase-8 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. **B, D, F e H** são as respectivas ampliações das áreas marcadas em **A, C, E e G**. De **A à H** observa-se aumento da imunopositividade (cabeças de seta) com o envelhecimento. Em **G e H** destaca-se imunopositividade preferencial em locais de atrofia epitelial (EpA), comparado com epitélio normal (EpN). Lu: Lúmen. Es: Estroma. Barra em **A** = 100 μm, referente a **A, C, E, G**. Barra em **B** = 50 μm, referente a **B, D, F e H**.

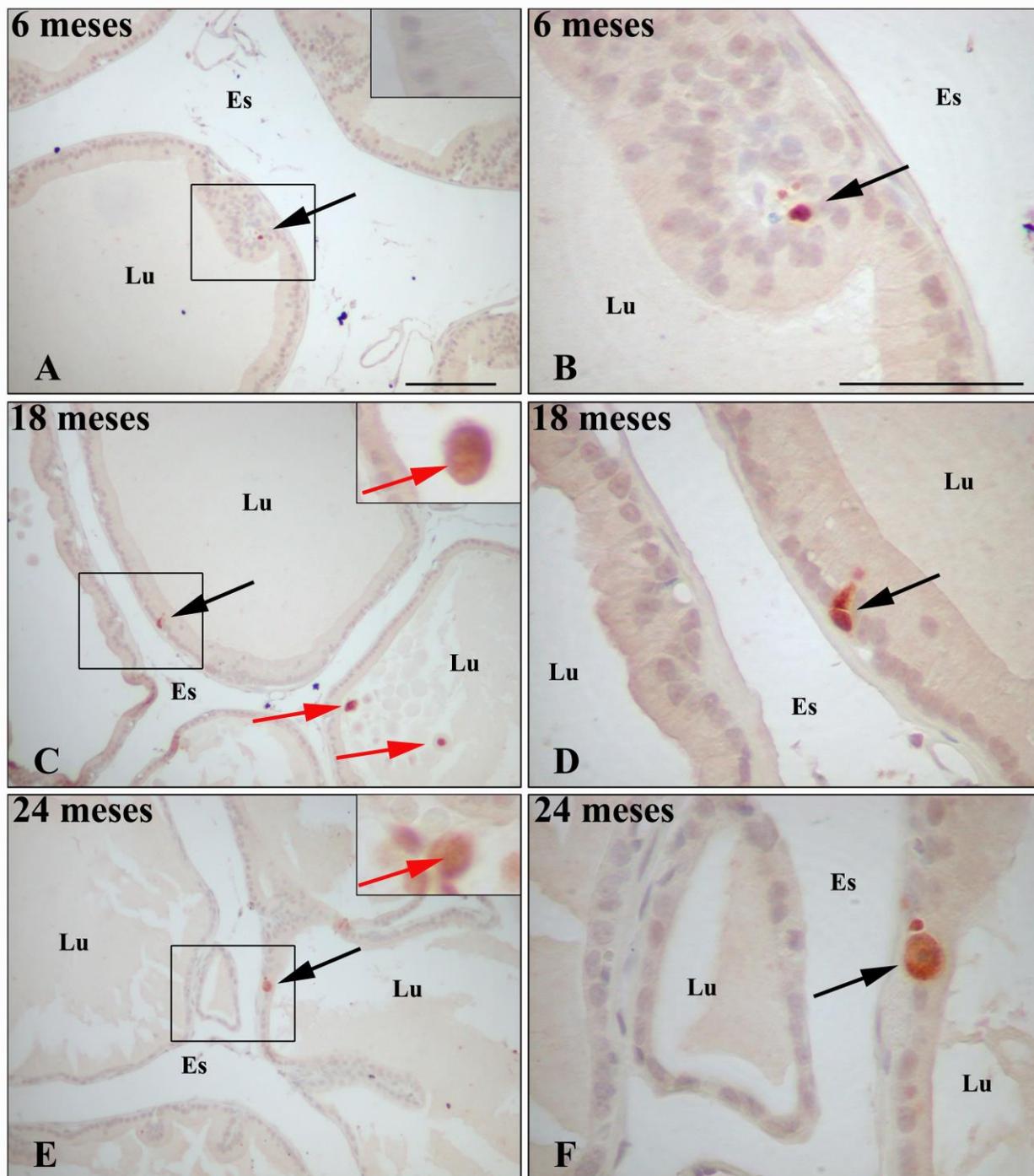
**4.2 Caspase - 9**

As análises imunohistoquímicas do marcador de apoptose ativada pela via intrínseca, mediada por caspase-9, mostraram poucas células imunorreativas no epitélio da próstata ventral, em todos os grupos analisados (Fig. 13 e 14). No entanto, no lúmen dos adenômeros foi possível observar um aumento de células descamadas, caspase-9 positivas, em função da idade (Fig. 14 C e E).

Todas as células imunorreativas para caspase-9 apresentavam-se morfologicamente em apoptose (Fig. 14).



**Figura 13.** Índice de células imunorreativas para caspase-9 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. n = 5 animais.

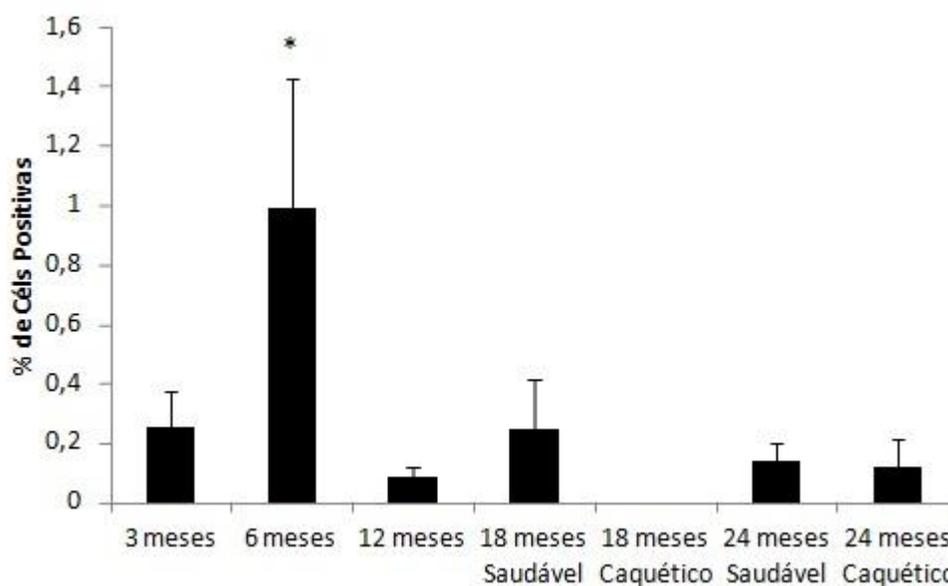


**Figura 14.** Imunohistoquímica para caspase-9 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. **B, D e F** são as respectivas ampliações das áreas marcadas em **A, C e E**. Observa-se imunopositividade para caspase-9 (setas pretas) similar no epitélio em diferentes idades. No lúmen dos adenômeros há presença de células descamadas caspase-9 positivas (Seta vermelha), as quais aumentam com a idade (Insero em C). Inseto em A = controle negativo. Lu = Lúmen. Es = Estroma. Barra em A = 100  $\mu$ m, referente a A, C, E. Barra em B = 50  $\mu$ m, referente a B, D, F.

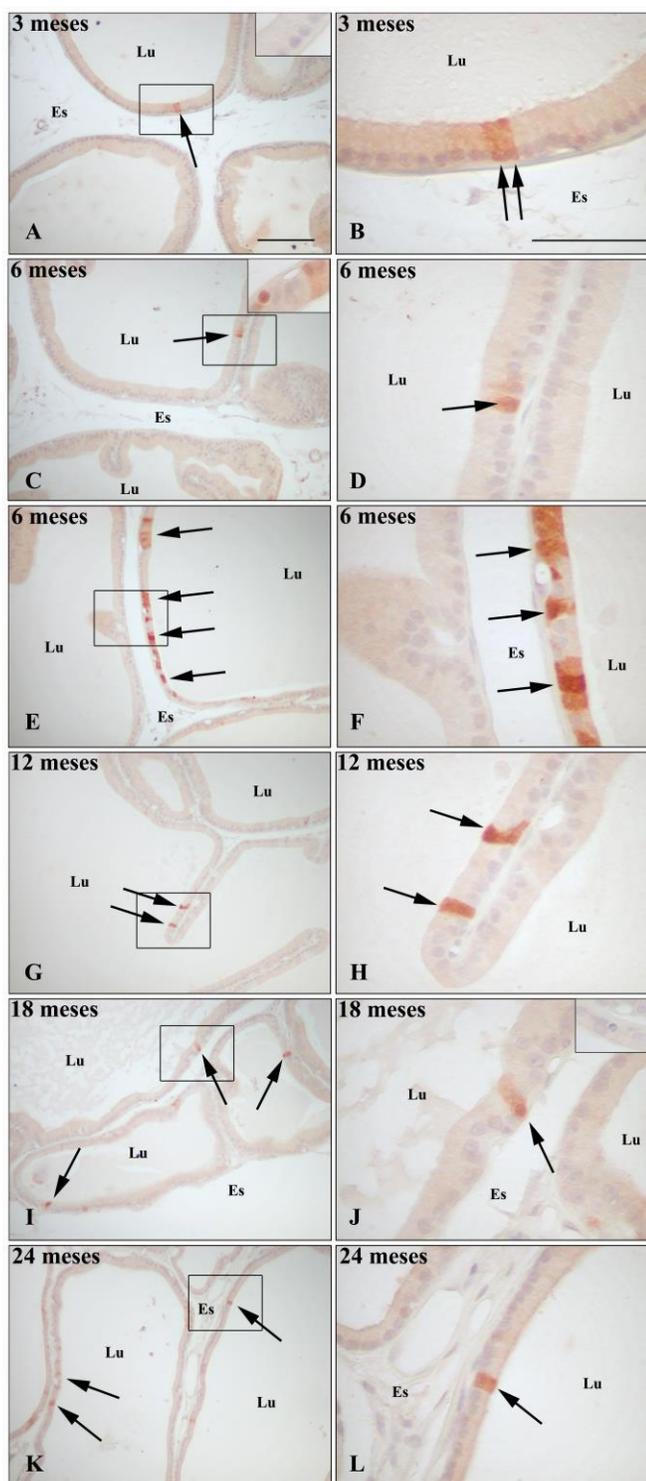
### 4.3 Caspase - 3

As análises imunohistoquímicas do marcador da fase efetora da apoptose, caspase-3, mostraram uma baixa imunoreatividade na próstata ventral, em todos os grupos analisados (Fig. 15 e 16). A imunopositividade para caspase-3 foi mais frequentemente observada em células com morfologia normal, e mais raramente em células com morfologia característica de célula em apoptose (Fig. 16 C). Foram encontradas células morfologicamente em apoptose, porém, caspase-3 negativas (Fig. 16 J).

Aos 6 meses de idade foi observado um aumento significativo de células epiteliais caspase-3 positivas, quando comparados com os demais grupos (Fig. 15 e 16 C-F).



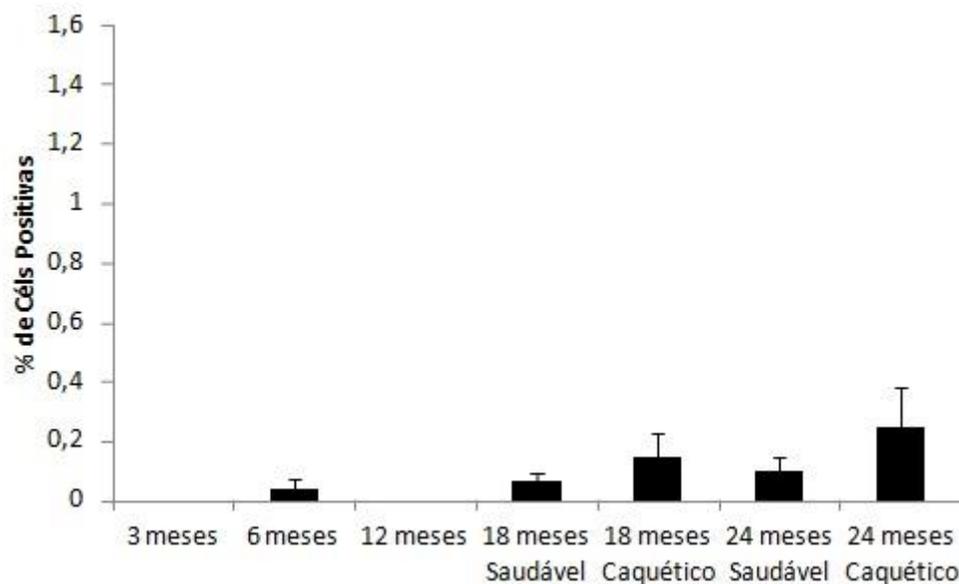
**Figura 15.** Índice de células imunorreativas para Caspase-3 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. (\*) =  $p \leq 0,05$ .  $n = 5$  animais.



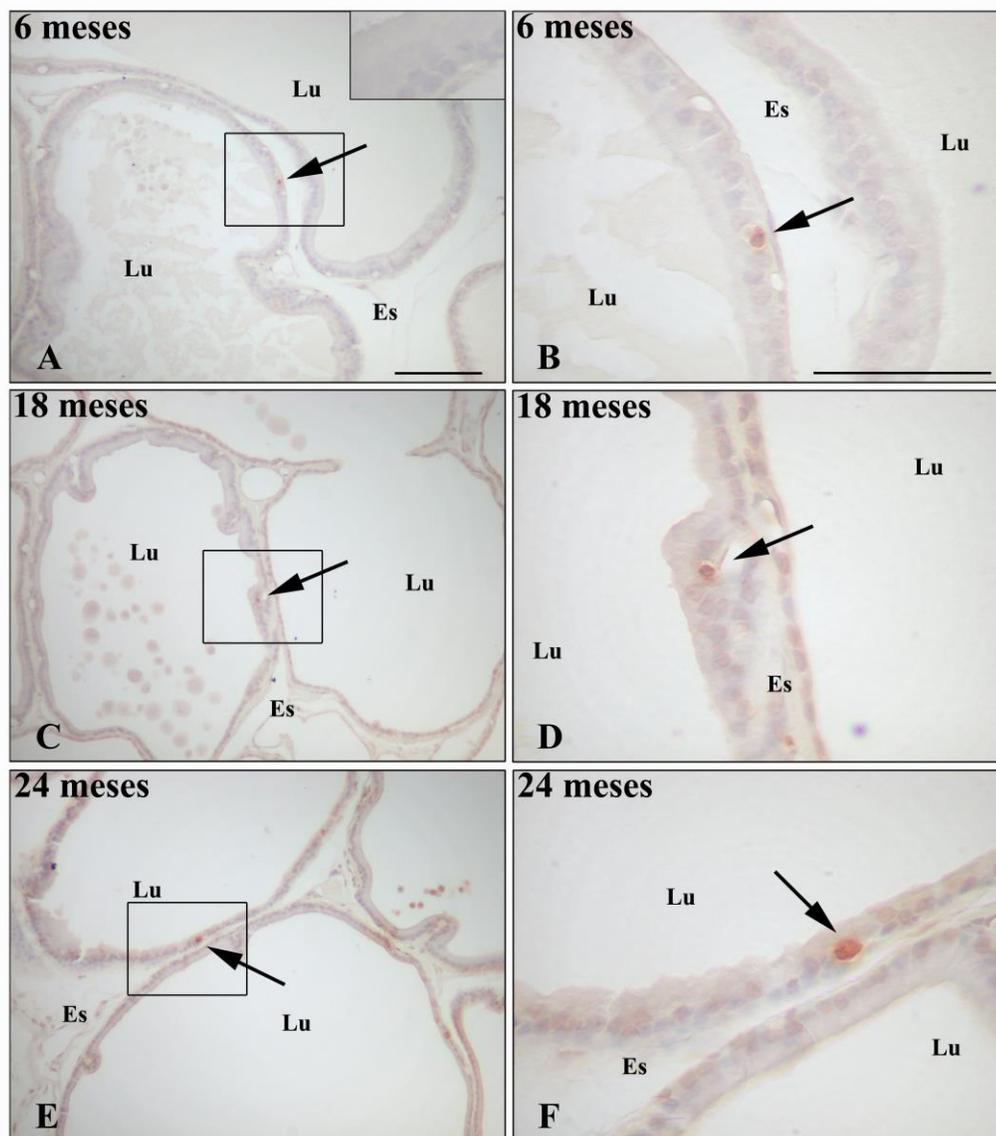
**Figura 16.** Imunohistoquímica para caspase-3 ativada na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. **B, D, F, H, J e L** são as respectivas ampliações das áreas marcadas em **A, C, E, G, I e K**. As células imunopositivas para caspase-3 estão indicadas por setas. Aos 6 meses de idade foram encontrados alguns animais com aumentada imunopositividade (**E e F**), comparado com animais da mesma idade (**C e D**) ou em envelhecimento. Inseto em **A** = controle negativo. Inseto em **C** = positividade em célula morfologicamente em apoptose e célula normal. Inseto em **J** = célula apoptótica caspase-3 negativa. Lu = Lúmen. Es = Estroma. Barra em **A** = 100  $\mu$ m, referente a **A, C, E, G, I e K**. Barra em **B** = 50  $\mu$ m, referente a **B, D, F, H, J e L**.

**5. MÉTODO DE TUNEL**

Devido a observação de células morfologicamente em apoptose, porém, caspase-3 negativas, na próstata ventral, foram realizados ensaios de TUNEL, visando corroborar com os dados encontrados nos ensaios imunohistoquímicos para caspase-3. Confirmou-se que há reduzida positividade para TUNEL na próstata ventral de animais de diferentes idades (Fig. 17 e 18).



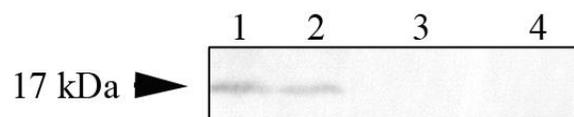
**Figura 17.** Índice de células TUNEL positivas na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. n = 3 animais.



**Figura 18.** Células TUNEL positivas na próstata ventral de ratos Wistar durante o envelhecimento. **B, D e F** são as respectivas ampliações das áreas marcadas em **A, C e E**. Raras células TUNEL positivas (setas) são observadas no epitélio em diferentes idades. Inseto em **A** = controle negativo. Lu = Lúmen. Es = Estroma. Barra em **A** = 100  $\mu$ m, referente a **A, C, E**. Barra em **B** = 50  $\mu$ m, referente a **B, D, F**.

## 6. WESTERN BLOTING

Não houve nível detectável de caspase-3 e caspase-8 nos ensaios de *Western blotting* utilizando proteínas totais da próstata ventral de ratos Wistar. Para efeito de comparação, foram realizados ensaios simultâneos de tecidos diversos, como o epidídimo de morcego *Artibeus lituratus*, que serviu como controle positivo (Fig. 19).



**Figura 19.** Western blotting para caspase-3 ativada. **1 e 2** = cabeça e cauda do epidídimo de morcego, respectivamente. **3 e 4** = próstata ventral de ratos Wistar de 3 e 24 meses, respectivamente. O peso molecular da proteína está indicado à esquerda.

Os níveis de caspase-9 não foram analisados, porque não houve alteração na imunomarcção tecidual com o envelhecimento.

## **V. DISCUSSÃO**

---

## V. DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro em fazer análise comparativa da expressão de marcadores de apoptose ativada pelas vias intrínseca (caspase-9) e extrínseca (caspase-8), na próstata ventral de ratos Wistar em envelhecimento. Os resultados mostraram que existe diferença no padrão de expressão de caspase-9 e caspase-8, sendo a caspase-8 mais estimulada em tecido prostático de animais idosos. Esses dados são inéditos e de importância para a área, uma vez que mediadores de sinais apoptóticos podem ser alvos na profilaxia e manejo de patologias envolvendo a homeostase tecidual, tais como adenocarcinomas e hiperplasia benigna da próstata.

O peso corporal mostrou aumento significativo dos 3 aos 6 meses de idade, mantendo-se estável nos animais saudáveis de até 24 meses, mas apresentando redução significativa nos animais caquéticos. O peso relativo da próstata ventral acompanhou esse mesmo perfil até os 12 meses de idade, atingindo, porém, valores mais baixos em animais idosos, especialmente os caquéticos. As alterações do peso da próstata foram coincidentes com a presença de atrofia epitelial e redução da secreção luminal dos adenômeros. É conhecido que com o envelhecimento, ocorrem alterações hormonais nos machos, dentre as quais destaca-se a redução progressiva dos níveis de andrógenos circulantes, além de sua redução no tecido prostático (Banerjee *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 2000). Juntamente com a queda nos níveis de andrógenos circulantes e teciduais a próstata ventral sofre queda na expressão de receptores de andrógeno com o envelhecimento (Banerjee *et al.*, 2001). Sabendo que a próstata é um órgão andrógeno-dependente, essa redução hormonal pode facilmente justificar a redução de peso da glândula com o envelhecimento. Da mesma forma, como os andrógenos são importantes anabolizantes fisiológicos, sua redução pode também estar envolvida com a perda de peso dos animais caquéticos, que paralelamente apresentaram testículos atrofiados.

As observações histológicas para as figuras de apoptose na próstata ventral, juntamente com as investigações imunohistoquímicas para caspase-9, caspase-3 e TUNEL, mostraram número reduzido de apoptoses no epitélio, em todas as idades analisadas, exceto por um aumento pontual de caspase-3 aos 6 meses de idade. Esses dados obtidos para ratos Wistar adultos são condizentes com prévias informações sobre as baixas taxas de morte celular na próstata ventral de ratos adultos de diferentes linhagens, detectadas por TUNEL (Banerjee *et al.*, 1995 - Sprague Dawley; Banerjee *et al.*, 1998 – Brown Norway; Xie *et al.*, 2000 – Noble; Omezzine *et al.*, 2003

– Sprague Dawley). No entanto, dados sobre morte celular em idosos são escassos, sendo que apenas o grupo de Banerjee e colaboradores (2000; 2002) tem se dedicado a essas investigações. Divergindo de nossos resultados, de acordo com Banerjee e colaboradores (2000), ratos Brown Norway idosos (24 meses) apresentam uma redução de cerca de 50% nas células TUNEL positivas quando comparados com jovens (4 meses). Essa divergência pode ser atribuída à diversidade de linhagem de ratos, uma vez que é conhecido que existe diferença no padrão de homeostase tecidual da próstata dependendo da linhagem, sendo, por exemplo, ratos Noble e Copenhagen menos susceptíveis a desenvolverem alterações proliferativas espontâneas na próstata, quando comparados a ratos Brown-Norway, Fisher 344 e ACI (Isaacs, 1984).

Corroborando os dados obtidos pela técnica de TUNEL no presente trabalho, existem os dados imunohistoquímicos para caspase-9 e caspase-3, que também evidenciaram baixa detecção de células positivas tanto para a molécula iniciadora quanto efetora da via intrínseca de apoptose. Não foram encontradas informações sobre variação de caspase-9 ou caspase-3 com a idade em outros animais ou linhagens de ratos, mas há indícios de que tanto as caspases quanto outras moléculas relacionadas com a cascata de apoptose pela via intrínseca, tais como Bcl2 e Bax, sejam moduladas por andrógenos na próstata ventral de ratos (Banerjee *et al.*, 2002; Omezzine *et al.*, 2003). Nesse sentido, similar aos nossos resultados, Omezzine e colaboradores (2003) também não detectaram caspase-3 ativada nem pró-caspase-3 na próstata ventral de ratos adultos intactos, utilizando ensaios de *Western blotting*. No entanto, a pró-enzima e enzima ativada foram detectadas após redução dos níveis de testosterona induzido por castração, indicando que a presença de andrógeno é um fator inibidor de apoptose. Como não detectamos caspase-3 na próstata ventral de ratos Wistar em nenhuma idade analisada, quando considerado as proteínas totais do tecido analisado por *Western blotting*, nem variação imunohistoquímica, quando avaliada a expressão celular dessa enzima, é possível que a redução local de testosterona nos idosos não tenha sido suficiente para afetar os níveis da proteína.

Com relação ao aumento pontual de caspase-3 aos 6 meses de idade, esse não se confirmou quando associado com outros marcadores de apoptose, como TUNEL, caspase 9 e, especialmente, as características morfológicas, consideradas padrão-ouro para detecção de células em apoptose. Sabe-se que resultados falso-negativos e falso-positivos são comuns na detecção imunohistoquímica de apoptose (Cummings *et al.*, 2004). Considerando que a maioria dos animais analisados (60%) apresentou níveis médios de apoptose similares aos demais grupos, é

possível que o índice elevado de positividade detectado em dois animais experimentais e que afetaram os resultados estatísticos, sejam reflexo apenas de uma reação falso-positiva.

As investigações para caspase-8, com o objetivo de evidenciar apoptose ativada pela via extrínseca no epitélio da próstata ventral, mostraram aumento progressivo do número de células imunopositivas no epitélio com o envelhecimento, diferindo, portanto, da via intrínseca. Esses dados corroboram os resultados de McPherson e colaboradores (2010), mostrando regulação diferencial da via intrínseca (ativada por caspase-9) e via extrínseca (ativada por caspase-8) da apoptose, respectivamente, por andrógenos e agonista de ER $\beta$ , na próstata. Outros pesquisadores também oferecem evidências de que não há clivagem e ativação de caspase-8 na próstata ventral após castração, seguida ou não de suplementação com testosterona, indicando que a mesma não é modulada por andrógenos (Omezzine *et al.*, 2003). Dessa forma, uma possibilidade é que essa proteína seja alternativamente modulada por outros fatores, tais como estrógenos, que em contraste com andrógenos, em geral tem seus níveis proporcionalmente elevados (Fujita *et al.*, 1990; Herath *et al.*, 2001; Luine *et al.*, 2007) ou invariáveis (Goya *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2009) na próstata de animais idosos. Evidências de modulação de outras proteínas chave no processo de apoptose, tais como Bax, por estradiol (Luo *et al.*, 2008), corroboram essa hipótese.

No entanto, um fato intrigante foi que as células caspase-8 positivas foram preferencialmente identificadas em locais de atrofia epitelial e, em sua maioria, essas células não apresentavam características morfológicas típicas de células em apoptose. Nessas regiões de atrofia há evidências de redução marcante de expressão de ER $\beta$  (Morais-Santos, 2011) e de TNF $\alpha$  (dados não publicados), que são fatores pró-apoptóticos, envolvidos na modulação da via extrínseca de apoptose. Esses dados, aparentemente contraditórios, levantam então a questão se o aumento de caspase-8 poderia ter outros propósitos que não a indução de apoptose. De fato, já está bem estabelecido que caspase-8 pode desempenhar funções opostas, promovendo morte celular ou induzindo sobrevivência celular. Acredita-se que quando ativadas por forte sinal essas caspases causam apoptose, enquanto ativação local ou restrita pode estar envolvida nos eventos não apoptóticos (Sakamaki & Satou, 2009). Caspase-8 participa na determinação de sobrevivência celular, ativando a via de sinalização NF-kB ou inibindo a morte por necrose programada, também denominada necroptose (O'Donnell *et al.*, 2011; Oberst & Green, 2011; Dillon *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível que os baixos níveis de ER $\beta$  e TNF $\alpha$  estejam

direcionando a ativação de caspase-8 para sua ação anti-apoptótica e pró-sobrevivência, o que justificaria sua ocorrência em células sem características morfológicas de apoptose.

Considerando a homeostase tecidual, cogita-se que não só o aumento da taxa de proliferação seja responsável pelo desenvolvimento de patologias prostáticas, mas igualmente importante seria a redução de apoptose. Dessa forma, a possibilidade de que o aumento de caspase-8 na próstata ventral esteja relacionado mais com proteção contra morte que com apoptose, merece atenção. Nesse sentido, sabe-se que a necroptose é inibida através da formação de heterodímeros de caspase-8 com cFLIP, que irão impedir o recrutamento de quinases (RIPK1 e RIPK3) que promovem a necrose programada, de forma que essa heterodimerização impeça a morte da célula (O'Donnell *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 2012). Há evidências de que cFLIP seja superexpresso em câncer de próstata, indicando que essa pode ser uma via para permitir o escape das células malignas da morte e sua progressão para o estágio resistente a andrógeno (O'Kane *et al.*, 2006; Safa *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Não temos dados suficientes para corroborar essa hipótese, mas o padrão de distribuição de caspase-8 oferece indícios de que sua elevada expressão em locais de atrofia epitelial possa estar relacionada com um papel protetor do epitélio, como tentativa de resgatar essas células da morte.

Outra função recentemente atribuída a caspase-8 é seu envolvimento na regulação da função de transcrição dos receptores de andrógenos (AR). Nesse caso, a enzima interage diretamente com AR evitando a interação dos domínios amino terminal e de ligação ao ligante, bem como a localização nuclear de AR, etapas essenciais para que o receptor desempenhe sua função de transcrição induzida por andrógenos (Qi *et al.*, 2007). Ainda, o co-ativador de AR, Par-4 (*prostate apoptosis response fator 4*) age sobre o promotor de cFLIP na presença de andrógeno, aumentando a expressão desse inibidor de apoptose, o que pode levar ao estágio resistente a andrógeno do adenocarcinoma de próstata (Gao *et al.*, 2006). Todas essas evidências de um complexo papel da caspase-8 na fisiopatologia da próstata são indicativos de que esse é um tema que merece investigações mais profundas.

## **VI. CONCLUSÕES**

---

## **VI. CONCLUSÕES**

Os resultados indicam baixa taxa de apoptose na próstata ventral de ratos Wistar adultos jovens e senis, no entanto, em contraste com dados morfológicos e marcação para caspase-3 e -9 e TUNEL, houve estimulação de caspase-8 no tecido prostático de animais idosos, principalmente em locais de atrofia epitelial, indicando possível papel alternativo dessa proteína como fator anti-apoptótico e pró-sobrevivência.

## **VII. PERSPECTIVAS**

---

## **VII. PERSPECTIVAS**

Considerando que o aumento da imunopositividade para caspase-8 na próstata ventral de ratos Wistar em envelhecimento possa estar relacionado com a sobrevivência celular, por exemplo, impedindo a morte por necroptose, se faz necessário confirmar qual dos dois eventos, morte ou sobrevivência, estão de fato atuando no epitélio. Dessa forma seria relevante investigar a expressão da proteína cFLIP e sua colocalização com caspase-8, uma vez que a formação do heterodímero de cFLIP-caspase-8 leva a inibição da via de morte por necroptose, garantindo a sobrevivência celular. Paralelamente, investigações das quinases RIPK1 e RIPK3 também poderiam complementar as informações sobre a via de ação da caspase-8 no local: morte ou sobrevivência celular.

Considerando a aparente redução na expressão de TNF- $\alpha$  em locais de epitélio atrófico na próstata ventral, obtidos em ensaios preliminares, se torna importante investigar também outros ligantes mediadores da via extrínseca, tais como Fas ou TRAIL. Estudos recentes mostraram queda de 43,9% da imunopositividade para Fas em locais de adenocarcinoma prostático humano, com relação ao epitélio normal (Kim *et al.*, 2009), indicando que esse fator pode estar relacionado com as desordens na homeostase tecidual da próstata.

Como não foram obtidos níveis detectáveis para as caspases analisadas em ensaios de *Western blotting*, a análise de RNAm das mesmas poderia ser uma alternativa de estudo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSON, P. A. 1999. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer*, 6, 503-19.
- ABRAHAMSSON, P. A. & DI SANT'AGNESE, P. A. 1993. Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *J Androl*, 14, 307-9.
- ADAMS, J. M. & CORY, S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*, 19, 488-96.
- ADAMS, J. Y., LEAV, I., LAU, K. M., HO, S. M. & PFLUEGER, S. M. 2002. Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate*, 52, 69-81.
- AMARANTE-MENDES, G. P. 2003. Apoptose: Programa molecular de morte celular. *Einstein*.
- AÜMULLER, G. 1979. *Prostate Gland and Seminal Vesicles*, Berlin, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- BANERJEE, P. P., BANERJEE, S. & BROWN, T. R. 2001. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate. *Endocrinology*, 142, 4066-75.
- BANERJEE, P. P., BANERJEE, S. & BROWN, T. R. 2002. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobes. *Endocrinology*, 143, 1825-32.
- BANERJEE, P. P., BANERJEE, S., LAI, J. M., STRANDBERG, J. D., ZIRKIN, B. R. & BROWN, T. R. 1998. Age-dependent and lobe-specific spontaneous hyperplasia in the brown Norway rat prostate. *Biol Reprod*, 59, 1163-70.
- BANERJEE, P. P., BANERJEE, S., TILLY, K. I., TILLY, J. L., BROWN, T. R. & ZIRKIN, B. R. 1995. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology*, 136, 4368-76.
- BANERJEE, S., BANERJEE, P. P. & BROWN, T. R. 2000. Castration-induced apoptotic cell death in the Brown Norway rat prostate decreases as a function of age. *Endocrinology*, 141, 821-32.
- BAUMAN, D. R., STECKELBROECK, S., WILLIAMS, M. V., PEEHL, D. M. & PENNING, T. M. 2006. Identification of the major oxidative 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in human prostate that converts 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol to 5alpha-dihydrotestosterone: a potential therapeutic target for androgen-dependent disease. *Mol Endocrinol*, 20, 444-58.

- BECKMAN, W. C., JR., CAMPS, J. L., JR., WEISSMAN, R. M., KAUFMAN, S. L., SANOFSKY, S. J., REDDICK, R. L. & SIEGAL, G. P. 1987. The epithelial origin of a stromal cell population in adenocarcinoma of the rat prostate. *Am J Pathol*, 128, 555-65.
- BEGLEY, L. A., KASINA, S., MACDONALD, J. & MACOSKA, J. A. 2008. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine*, 43, 194-9.
- CARREAU, S., LAMBARD, S., DELALANDE, C., DENIS-GALERAUD, I., BILINSKA, B. & BOURGUIBA, S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 35.
- CHENG, J., LEE, E. J., MADISON, L. D. & LAZENNEC, G. 2004. Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Lett*, 566, 169-72.
- CUMMINGS, J., WARD, T. H., RANSON, M. & DIVE, C. 2004. Apoptosis pathway-targeted drugs--from the bench to the clinic. *Biochim Biophys Acta*, 1705, 53-66.
- DANG, A. C. & KIM, H. T. 2009. Chondrocyte apoptosis after simulated intraarticular fracture: a comparison of histologic detection methods. *Clin Orthop Relat Res*, 467, 1877-84.
- DEGTEREV, A., BOYCE, M. & YUAN, J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-67.
- DILLON, C. P., OBERST, A., WEINLICH, R., JANKE, L. J., KANG, T. B., BEN-MOSHE, T., MAK, T. W., WALLACH, D. & GREEN, D. R. 2012. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex. *Cell Rep*, 1, 401-7.
- EL-ALFY, M., PELLETIER, G., HERMO, L. S. & LABRIE, F. 2000. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microsc Res Tech*, 51, 436-46.
- ELLEM, S. J. & RISBRIDGER, G. P. 2009. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci*, 1155, 174-86.
- ELLEM, S. J., SCHMITT, J. F., PEDERSEN, J. S., FRYDENBERG, M. & RISBRIDGER, G. P. 2004. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2434-41.
- FUJITA, S., CHIBA, M., OHTA, M., KITANI, K. & SUZUKI, T. 1990. Alteration of plasma sex hormone levels associated with old age and its effect on hepatic drug metabolism in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 253, 369-74.
- GAO, S., WANG, H., LEE, P., MELAMED, J., LI, C. X., ZHANG, F., WU, H., ZHOU, L. & WANG, Z. 2006. Androgen receptor and prostate apoptosis response factor-4 target the c-FLIP gene to determine survival and apoptosis in the prostate gland. *J Mol Endocrinol*, 36, 463-83.

- GOYA, R. G., LU, J. K. & MEITES, J. 1990. Gonadal function in aging rats and its relation to pituitary and mammary pathology. *Mech Ageing Dev*, 56, 77-88.
- GREEN, D. R., GALLUZZI, L. & KROEMER, G. 2011. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 333, 1109-12.
- GREEN, D. R. & REED, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-12.
- GRIVICICH, I., REGNER, A. & ROCHA, A. B. 2007. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53, 335-343.
- GROSSMANN, M. E., HUANG, H. & TINDALL, D. J. 2001. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93, 1687-97.
- HANUKOGLU, I. 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43, 779-804.
- HAYASHI, N., SUGIMURA, Y., KAWAMURA, J., DONJACOUR, A. A. & CUNHA, G. R. 1991. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod*, 45, 308-21.
- HAYWARD, S. W., BASKIN, L. S., HAUGHNEY, P. C., FOSTER, B. A., CUNHA, A. R., DAHIYA, R., PRINS, G. S. & CUNHA, G. R. 1996. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 155, 94-103.
- HENGARTNER, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- HERATH, C. B., WATANABE, G., WANZHU, J., NOGUCHI, J., AKIYAMA, K., KURAMOTO, K., GROOME, N. P. & TAYA, K. 2001. Elevated levels of inhibin-A and immunoreactive inhibin in aged male Wistar rats with testicular Leydig cell tumor. *J Androl*, 22, 838-46.
- HORVATH, L. G., HENSHALL, S. M., LEE, C. S., HEAD, D. R., QUINN, D. I., MAKELA, S., DELPRADO, W., GOLOVSKY, D., BRENNER, P. C., O'NEILL, G., KOONER, R., STRICKER, P. D., GRYGIEL, J. J., GUSTAFSSON, J. A. & SUTHERLAND, R. L. 2001. Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer Res*, 61, 5331-5.
- HUANG, L., PU, Y., HU, W. Y., BIRCH, L., LUCCIO-CAMELO, D., YAMAGUCHI, T. & PRINS, G. S. 2009. The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol*, 328, 188-99.
- IMAMOV, O., MORANI, A., SHIM, G. J., OMOTO, Y., THULIN-ANDERSSON, C., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. 2004. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9375-80.

- INCA - Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, <http://www.inca.gov.br>; Câncer de próstata; 2010.
- ISAACS, J. T. 1984. The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis. *Cancer Res*, 44, 5785-96.
- JARRED, R. A., CANCELLA, B., PRINS, G. S., THAYER, K. A., CUNHA, G. R. & RISBRIDGER, G. P. 2000. Evidence that estrogens directly alter androgen-regulated prostate development. *Endocrinology*, 141, 3471-7.
- KAVATHIA, N., JAIN, A., WALSTON, J., BEAMER, B. A. & FEDARKO, N. S. 2009. Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. *Aging (Albany NY)*, 1, 652-63.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KIM, M. S., PARK, S. W., KIM, Y. R., LEE, J. Y., LIM, H. W., SONG, S. Y., YOO, N. J. & LEE, S. H. 2010. Mutational analysis of caspase genes in prostate carcinomas. *APMIS*, 118, 308-12.
- KIM, S. Y., SONG, S. Y., KIM, M. S., LEE, J. Y., LEE, H. M., CHOI, H. Y., YOO, N. J. & LEE, S. H. 2009. Immunohistochemical analysis of Fas and FLIP in prostate cancers. *APMIS*, 117, 28-33.
- KIRSCHENBAUM, A., LIU, X. H., YAO, S., NARLA, G., FRIEDMAN, S. L., MARTIGNETTI, J. A. & LEVINE, A. C. 2006. Sex steroids have differential effects on growth and gene expression in primary human prostatic epithelial cell cultures derived from the peripheral versus transition zones. *Carcinogenesis*, 27, 216-24.
- KUIPER, G. G., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5925-30.
- KUMAR, V. L. & MAJUMDER, P. K. 1995. Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*, 27, 231-43.
- KUSLJIC, S. & EXINTARIS, B. 2010. The effect of estrogen supplementation on cell proliferation and expression of c-kit positive cells in the rat prostate. *Prostate*, 70, 1555-62.
- LABRIE, F. 1993. Intracrinology: its impact on prostate cancer. *Curr Opin Urol*, 3, 381-387.
- LACZKO, I., HUDSON, D. L., FREEMAN, A., FENELEY, M. R. & MASTERS, J. R. 2005. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate*, 62, 260-6.

- LUINE, V. N., BECK, K. D., BOWMAN, R. E., FRANKFURT, M. & MACCLUSKY, N. J. 2007. Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. *J Neuroendocrinol*, 19, 743-51.
- LUO, Y., WALADALI, W., LI, S., ZHENG, X., HU, L., ZHENG, H., HU, W. & CHEN, C. 2008. 17beta-estradiol affects proliferation and apoptosis of rat prostatic smooth muscle cells by modulating cell cycle transition and related proteins. *Cell Biol Int*, 32, 899-905.
- MAKELA, S., STRAUSS, L., KUIPER, G., VALVE, E., SALMI, S., SANTTI, R. & GUSTAFSSON, J. A. 2000. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. *Mol Cell Endocrinol*, 170, 219-29.
- MARSHALL, W. A. 1976. Steroids after birth-puberty. *Postgrad Med J*, 52, 620-4.
- MATTHEWS, J. & GUSTAFSSON, J. A. 2003. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, 3, 281-92.
- MCNEAL, J. E. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2, 35-49.
- MCPHERSON, S. J., ELLEM, S. J. & RISBRIDGER, G. P. 2008. Estrogen-regulated development and differentiation of the prostate. *Differentiation*, 76, 660-70.
- MCPHERSON, S. J., ELLEM, S. J., SIMPSON, E. R., PATCHEV, V., FRITZEMEIER, K. H. & RISBRIDGER, G. P. 2007. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*, 148, 566-74.
- MCPHERSON, S. J., HUSSAIN, S., BALANATHAN, P., HEDWARDS, S. L., NIRANJAN, B., GRANT, M., CHANDRASIRI, U. P., TOIVANEN, R., WANG, Y., TAYLOR, R. A. & RISBRIDGER, G. P. 2010. Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3123-8.
- MEHTA, P. P., PEREZ-STABLE, C., ROOS, B. A. & NADJI, M. 2000. Identification, characterization, and differentiation of human prostate cells. *Methods Mol Biol*, 137, 317-35.
- MORAIS-SANTOS, M. 2011. *Alterações na expressão dos receptores de estrógenos ER beta na próstata ventral de ratos em envelhecimento*. Mestrado em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais.
- NORBERG, E., ORRENIUS, S. & ZHIVOTOVSKY, B. 2010. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun*, 396, 95-100.

- O'DONNELL, M. A., PEREZ-JIMENEZ, E., OBERST, A., NG, A., MASSOUMI, R., XAVIER, R., GREEN, D. R. & TING, A. T. 2011. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol*, 13, 1437-42.
- O'KANE, H. F., WATSON, C. J., JOHNSTON, S. R., PETAK, I., WATSON, R. W. & WILLIAMSON, K. E. 2006. Targeting death receptors in bladder, prostate and renal cancer. *J Urol*, 175, 432-8.
- OBERST, A. & GREEN, D. R. 2011. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 757-63.
- OMEZZINE, A., MAUDUIT, C., TABONE, E., NABLI, N., BOUSLAMA, A. & BENAHMED, M. 2003. Caspase-3 and -6 expression and activation are targeted by hormone action in the rat ventral prostate during the apoptotic cell death process. *Biol Reprod*, 69, 752-60.
- PAPADOPOULOS, V. & MILLER, W. L. 2012. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 26, 771-90.
- PASQUALI, D., ROSSI, V., ESPOSITO, D., ABBONDANZA, C., PUCA, G. A., BELLASTELLA, A. & SINISI, A. A. 2001. Loss of estrogen receptor beta expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2051-5.
- PATEL, A. R. & KLEIN, E. A. 2009. Risk factors for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol*, 6, 87-95.
- PELLETIER, G. 2008. Expression of steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22, 223-8.
- PRAVETTONI, A., MORNATI, O., MARTINI, P. G., MARINO, M., COLCIAGO, A., CELOTTI, F., MOTTA, M. & NEGRI-CESI, P. 2007. 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, 46-54.
- PRINS, G. S., BIRCH, L., COUSE, J. F., CHOI, I., KATZENELLENBOGEN, B. & KORACH, K. S. 2001. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res*, 61, 6089-97.
- PRINS, G. S., BIRCH, L. & GREENE, G. L. 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology*, 129, 3187-99.
- QI, W., WU, H., YANG, L., BOYD, D. D. & WANG, Z. 2007. A novel function of caspase-8 in the regulation of androgen-receptor-driven gene expression. *EMBO J*, 26, 65-75.

- RICKE, W. A., MCPHERSON, S. J., BIANCO, J. J., CUNHA, G. R., WANG, Y. & RISBRIDGER, G. P. 2008. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB J*, 22, 1512-20.
- RISBRIDGER, G., WANG, H., YOUNG, P., KURITA, T., WANG, Y. Z., LUBAHN, D., GUSTAFSSON, J. A. & CUNHA, G. 2001. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. *Dev Biol*, 229, 432-42.
- RISBRIDGER, G. P., BIANCO, J. J., ELLEM, S. J. & MCPHERSON, S. J. 2003. Oestrogens and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 10, 187-91.
- RISBRIDGER, G. P., ELLEM, S. J. & MCPHERSON, S. J. 2007. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol*, 39, 183-8.
- RISBRIDGER, G. P. & TAYLOR, R. A. 2006. Physiology of the Male Accessory Sex Structure: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. In: NEILL, J. D. (ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3<sup>a</sup> ed. New York: Elsevier.
- SAFA, A. R., DAY, T. W. & WU, C. H. 2008. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 8, 37-46.
- SAKAMAKI, K. & SATOU, Y. 2009. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol*, 74, 727-53.
- SAR, M. & WELSCH, F. 2000. Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. *Andrologia*, 32, 295-301.
- SCORRANO, L., OAKES, S. A., OPFERMAN, J. T., CHENG, E. H., SORCINELLI, M. D., POZZAN, T. & KORSMEYER, S. J. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science*, 300, 135-9.
- SHAPPELL, S. B., THOMAS, G. V., ROBERTS, R. L., HERBERT, R., ITTMANN, M. M., RUBIN, M. A., HUMPHREY, P. A., SUNDBERG, J. P., ROZENGURT, N., BARRIOS, R., WARD, J. M. & CARDIFF, R. D. 2004. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*, 64, 2270-305.
- SHIBATA, Y., ITO, K., SUZUKI, K., NAKANO, K., FUKABORI, Y., SUZUKI, R., KAWABE, Y., HONMA, S. & YAMANAKA, H. 2000. Changes in the endocrine environment of the human prostate transition zone with aging: simultaneous quantitative analysis of prostatic sex steroids and comparison with human prostatic histological composition. *Prostate*, 42, 45-55.

- SIGNORETTI, S., WALTREGNY, D., DILKS, J., ISAAC, B., LIN, D., GARRAWAY, L., YANG, A., MONTIRONI, R., MCKEON, F. & LODA, M. 2000. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol*, 157, 1769-75.
- SMAILI, S., HIRATA, H., URESHINO, R., MONTEFORTE, P. T., MORALES, A. P., MULER, M. L., TERASHIMA, J., OSEKI, K., ROSENSTOCK, T. R., LOPES, G. S. & BINCOLETTA, C. 2009. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *An Acad Bras Cienc*, 81, 467-75.
- SPIERINGS, D., MCSTAY, G., SALEH, M., BENDER, C., CHIPUK, J., MAURER, U. & GREEN, D. R. 2005. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*, 310, 66-7.
- TAYLOR, R. A. & RISBRIDGER, G. P. 2008. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*, 76, 671-81.
- TSURUSAKI, T., AOKI, D., KANETAKE, H., INOUE, S., MURAMATSU, M., HISHIKAWA, Y. & KOJI, T. 2003. Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 1333-40.
- VINDRIEUX, D., DEVONEC, M., BENAHMED, M. & GRATAROLI, R. 2002. Identification of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors in adult rat ventral prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 198, 115-21.
- VINDRIEUX, D., REVEILLER, M., FLORIN, A., BLANCHARD, C., RUFFION, A., DEVONEC, M., BENAHMED, M. & GRATAROLI, R. 2006. TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand decoy receptor DcR2 is targeted by androgen action in the rat ventral prostate. *J Cell Physiol*, 206, 709-17.
- WEIHUA, Z., MAKELA, S., ANDERSSON, L. C., SALMI, S., SAJI, S., WEBSTER, J. I., JENSEN, E. V., NILSSON, S., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. 2001. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6330-5.
- WEIHUA, Z., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. 2002. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol*, 193, 1-5.
- WU, D., LIN, G. & GORE, A. C. 2009. Age-related changes in hypothalamic androgen receptor and estrogen receptor alpha in male rats. *J Comp Neurol*, 512, 688-701.
- WU, Y., TIBREWAL, N. & BIRGE, R. B. 2006. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol*, 16, 189-97.
- XIE, W., WONG, Y. C. & TSAO, S. W. 2000. Correlation of increased apoptosis and proliferation with development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in ventral prostate of the Noble rat. *Prostate*, 44, 31-9.